

Tudományos Diákköri Dolgozat

Kováts Gyöngyi Zsuzsa

2011

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet

A rizs kloroplasztisz genetikai módosítása
The genetic modification of rice chloroplast genom

Készítette: Kováts Gyöngyi Zsuzsa
Mezőgazdasági Biotechnológus MSc
II. évfolyamos hallgató

Témavezetők: Dr. Kiss Erzsébet, egyetemi tanár, PhD
Dr. Jenes Barnabás, tudományos főmunkatárs, MBK
Intézetvezető: Dr. Kiss Erzsébet

Gödöllő
2011

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK.....	3 -
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	4 -
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6 -
2. 1. A RIZS JELLEMZÉSE	6 -
2. 2. A KLOOROPLASZTISZ JELLEMZÉSE	7 -
2. 3. TRANSZFORMÁCIÓS ÁTTEKINTÉS	8 -
2. 3. 1. Rizs transzformációs áttekintés.....	9 -
2. 3. 2. A kloroplasztisz transzformáció előnyei	10 -
2. 3. 3. Kloroplasztisz transzformáció rizsben	10 -
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	12 -
3. 1. FELHASZNÁLT NÖVÉNYANYAG.....	12 -
3. 2. SEJT-, ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉSI RENDSZER	12 -
3. 2. 1. Magkalluszosítás eszközrendszere és folyamata.....	12 -
3. 2. 2. Szkutellum preparálás eszközrendszere és folyamata	13 -
3. 2. 3. Sejtszuspenzió indítás eszközrendszere és folyamata.....	13 -
3. 3. TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER.....	14 -
3. 3. 1. Felhasznált plazmid-konstrukciók	14 -
3. 3. 2. A génbelövő készülék	15 -
3. 3. 3. A transzformáció folyamata	17 -
3. 4. SZELEKCIÓS RENDSZER ÉS DETEKTÁLÁS.....	18 -
4. EREDMÉNYEK.....	19 -
4. 1. SEJT-, ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉSI RENDSZER EREDMÉNYEI	19 -
4. 1. 1. Magkalluszosítás eredményei.....	19 -
4. 1. 2. Szkutellum kalluszosítás eredményei.....	23 -
4. 1. 3. Sejtszuspenzió eredményei.....	26 -
4. 2. TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER EREDMÉNYEI	27 -
5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	29 -
5. 1. SEJT-, ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉSI RENDSZER ÉRTÉKELÉSE	29 -
5. 1. 1. Magkallusz regeneráció kiértékelése	29 -
5. 1. 2. Szkutellum kalluszosítás kiértékelése	30 -
5. 1. 3. Sejtszuspenzió kiértékelése	30 -
5. 1. 4. Taipei-309 és Kyrara regenerációja.....	31 -
5. 2. TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER ÉRTÉKELÉSE.....	32 -
6. ÖSSZEFOGLALÁS	34 -
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36 -
8. IRODALOM JEGYZÉK.....	37 -
9. MELLÉKLET	43 -
10. NYILATKOZAT	44 -

1. Bevezetés és célkitűzések

A világszintű élelmezésében a rizs (*Oryza sativa*) elfoglalt helye igen előkelő, így modell növényként való vizsgálata az alternatív, környezetbiztonságosabb eljárást jelentő kloroplasztisz transzformációs rendszerben részmegoldást jelenthet a demográfiai növekedés okozta élelmiszerhiány visszaszorításában.

A rizs (*Oryza sativa*) transzformációja az 1980-as évek közepén sikerült, azóta megannyi kutatás alapját képezte. Az eredményes nukleáris transzformációt újabb kutatások követték, melyek a kloroplasztisz genetikai módosítására irányultak. A kloroplasztisz transzformáció mára már több mint 10 növény fajban sikeresen működő eljárás, közülük azonban az egyetlen egyszikű növény a rizs. Az *Oryza sativa* kloroplasztisz transzformációját eddig KHAN & MALIGA (1999) és LEE et al. (2006) írták le, eredményként mindkét esetben heteroplasztomikus rizs növényeket kaptak.

Számos gazdasági-, és egészségügyi előnye teszi indokoltá kísérletek folytatását rizs génmódosítás témakörben. Megoldást jelenthetne a búzalisztre érzékenyek számára a rizslisztből készült termékek fogyasztása. Allergén hatása nagyságrendekkel kisebb a búzáénál. Hiányzik azonban belőle néhány, a termék előállításához szükséges speciális tulajdonságú búzában fellelhető tartalékfehérje. A rizs genetikai módosításával termeltethetőek lennének ezek a búzafehérjék a szemtermésben, melynek köszönhetően alacsony allergén hatású, a búzából készült tésztához közelítő minőséget mutató rizstészta, majd ebből további termékek előállítására lenne lehetőség. Ehető vakcina előállításához is kiváló alapanyag a rizs. *Escherichia coli* és kolerafertőzéssel szembeni védelem kialakítására folynak ígéretes kísérletek Magyarországon. (OSZVALD et al., 2008a, OSZVALD et al., 2008b). Bizonyítást nyert, a megfelelő mennyiségű antigén fehérjék termelődése a rizsszemben, mely azt jelenti, hogy megfelelő ismétlésben néhány gramm nyers rizs elfogyasztása védelmet nyújthat e fertőzésekkel szemben. Meglévő, élelmezésügyet segítő fejlesztés az A-provitaminban, béta-karotinban gazdag „Aranyrizs”, mellyel a vitaminózis és az annak következtében - leggyakrabban a harmadik világbeli országokban - kialakuló vakság megelőzhető. Emellett a szintetikus étrend-kiegészítő A-vitamin kiváltója is lehetne a teljesen növényi eredetű A-vitaminban gazdag rizs. (MAGYAR FEHÉR KÖNYV, 2011)

A kloroplasztisz transzformáció újabb egészségügyi-, és gazdasági előnyöket hordoz magában. Az első plasztisz transzformáns dohány növényt 1990-ben állították elő SVAB et al.(1990). Azóta számos növényfajnál értek el sikereket a világon. A kloroplasztisz transzformáció kiterjesztette a vakcina előállítás határait, a kolera és az *E.coli* mellett tetanusz, lépfene, pestis és Lyme-kór ellen, illetve némely állatokat fertőző vírus és protozoa kórokozó ellen termeltetnek kísérletesen antigéneket. A humán gyógyászatban nagy jelentőségű fehérjék termeltetésének lehetőségeit szintén kutatják, ilyenek az inzulin, a szomatotropin, illetve az interferonok. A

módosított kloroplasztiszokat felhasználják bioreaktorként biopolimerek, aminosavak és ipari enzimek termeltetésére, nagyságrendekkel magasabb termékmennyiséget kapva a genomiális transzformánsokkal való előállítással összehasonlítva (VERMA & DANIELL, 2007, TAMÁS & OSZVALD, 2011).

A kloroplasztisz transzformáció technológiai előnyei a genomiális génmódosítással szemben főként az organelum bakteriális eredetére vezethetőek vissza. Homológ rekombináció jellemzi, így a transzgén hely specifikus beépítése lehetséges. A bejuttatott génre nem hathat a géncsendesítés folyamata, mivel az nem működik a kloroplasztiszban. Magas kópiaszáma okán bőséges fehérjetermék állítható elő általa. Egy sejtben 20-100 kloroplasztisz található, egy plasztiszon belül pedig 50-100 kópia, mely összesen 1000-10000 kópia sejtenként. Nagyságrendekkel meghaladva ezzel a nukleárisan módosított növények fehérje expresszióját, hisz az szoros összefüggésben áll a kópiaszámmal. A kloroplasztisz a termesztett növényfajok jelentős többségében anyai öröklődésű, így a pollen általi transzmisszió („génszökés”) nem lehetséges, mely környezetbiztonsági szempontból a legelőnyösebb jellemzője. A rizs kiváló modell növénye a gabonaféléknek, mert teljesen megszekvenált nukleáris (génbanki azonosítója: [NC_008405](#)) és kloroplasztisz genommal (génbanki azonosítója: X15901, [NC_001320](#)) rendelkezik.

Célunk egy sikeresen működő kloroplasztisz transzformációs rendszer kiépítése rizs (*Oryza sativa* L.) növényen. Ennek részeként pedig egy részletes és megismételhető *in vitro* sejt-, és szövettenyésztési, illetve növényregenerációs protokoll létrehozása.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. A rizs jellemzése

A rizs (*Oryza sativa*, L.) a búzát követően a második legfontosabb élelmezési gabonafajtánk a világon (lásd 1. táblázat). 5000 éves múlttal rendelkező Délkelet-Ázsiából származó faj. Taxonómiai besorolása alapján a *Viridiplantaea* országba, az *Angiospermatophyta* - Zárva termők törzsébe, a *Monocotyledonopsida* - Egyszikűek osztályába, a *Poales* - Pázsitfűvirágúak rendjébe, a *Poaceae* - Pázsitfűfélék családjába, az *Ehrhartoideae* - Rizsfélék alcsaládjába, és azon belül az *Oryza* nemzetségbe tartozik (TUBA és mtsai 2007, KASZAB 2004).

1. Búza	9. Zab
2. Rizs	10. Bab
3. Kukorica	11. Burgonya
4. Árpa	12. Földimogyoró
5. Köles	13. Rozs
6. Szemescirok	14. Édesburgonya
7. Szójabab	15. Cukornád
8. Gyapot	16. Manióka

1. táblázat: A világ főbb kultúrnövényeinek fontossági sorrendje. (HIDVÉGI, 2007)

Egynyári faj, levelei szélesek, nyelvecskái pillás szőrűek, fülecskéi hártásak. Nincsenek pelyvák. Virágzata laza, összezárt buga, melyben 2-7 virágú lapított, tojásdad füzérkéi vannak. Szemterméssel szaporodik, melyre ránő a toklász. C₃-as fotoszintézis úton keresztül megy végbe a széndioxid megkötése. A tápanyagban gazdag, nedves talajokat kedveli. Termesztése árasztásos rendszerrel és szárazon termesztéssel egyaránt történik. Magyarország déli része (Szarvas és környéke) kedvező éghajlata miatt a rizstermesztés északi határa. (TUBA és mtsai 2007, KASZAB 2004)

Az *Oryza* nemzetség több mint 20 fajt foglal magában, két legfontosabb fajának az *O. sativa*-t és az *O. glaberrima*-t tartják, melyek az *Oryza perennis* Moench évelő vadrizsből fejlődtek ki (HIDVÉGI, 2007). Magyarországon a mocsarainkban előforduló vad faja a *Leersia oryzoides* L. sw. – rizsfű. Öt csoportra osztható a rizsfélék családja, az *O. temperate japonica*, *O. tropical japonica*, *O. indica*, *O. aus*, és *O. aromatic* csoportokra. Közülük legnagyobb mértékben elterjedt és ismert két csoport a ragadós, rövid szemű *O. japonica*, és a nem ragadós, hosszú szemű *O. indica*. Elterjedésüket illetően, az *O. indica* alföldi csoport, mely Ázsia trópusi éghajlatú területein fordul

elő, az *O. japonica* csoport Kelet-Ázsia mérsékelt éghajlatú területein, és Délkelet-Ázsia felvidékén jelenik meg, ezen belül találhatók az *O. sativa* sp. *japonica* cv. *Kyrara* és az *O. sativa* sp. *japonica* cv. *Taipei 309* fajták is. GARRIS et al. (2004)

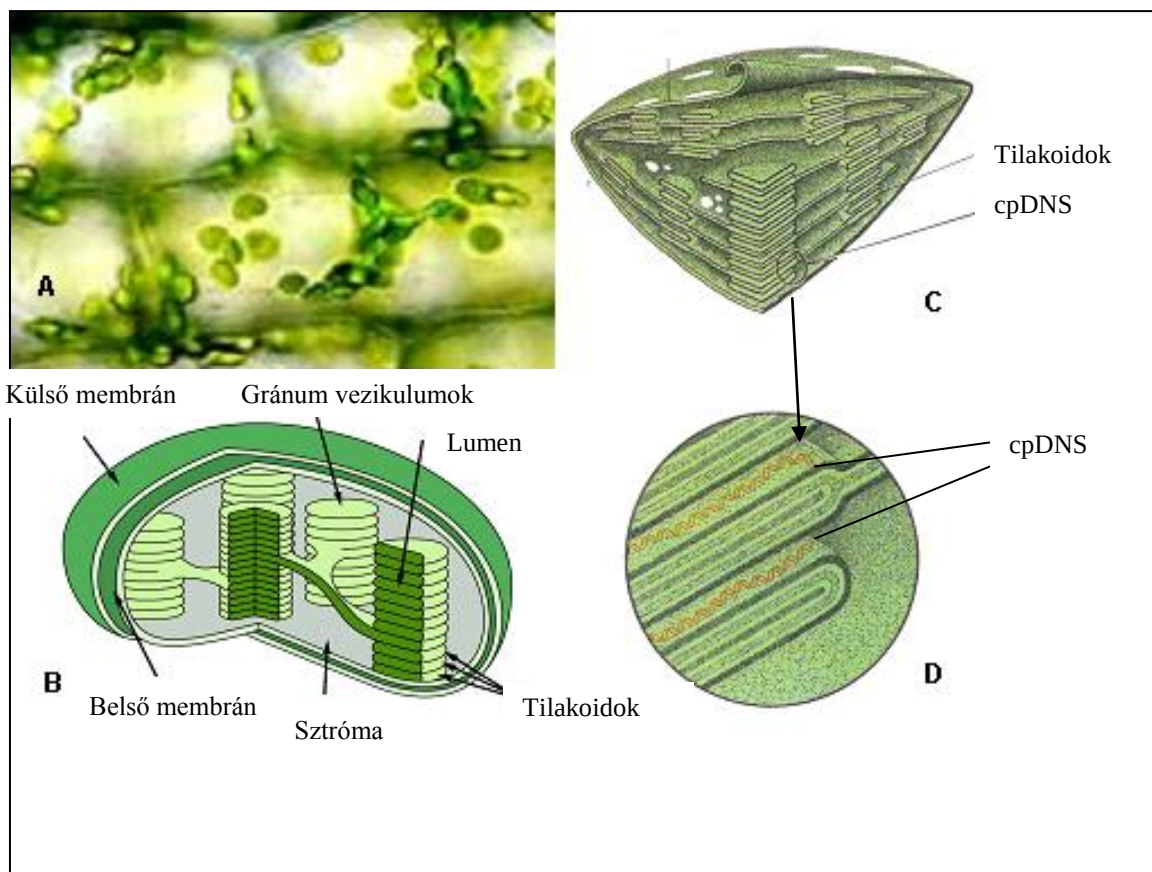
A rizs beltartalmi értékeit tekintve a búzáét meghaladó energiaértékkel, szénhidrát és nikotinsav tartalommal rendelkezik. Esszenciális aminosav-összetétele igen kedvező, az anyatejére hasonlító, keményítője könnyen emészthető, E és B-vitaminokban gazdag. A világ népességének napi kalória bevitelének 20%-át fedezi a rizs. (HIDVÉGI, 2007)

A rizs strukturális genom analízise 2003-ban befejeződött. Mind a nukleáris (génbanki azonosítója: [NC_008405](#)), mind a kloroplasztisz (génbanki azonosítója: X15901, [NC_001320](#)) genom teljes szekvenciája rendelkezésre áll. A rizs 430 Mb nagyságú genommal rendelkezik 12 kromoszómán elosztva. A plasztom (kloroplasztisz genom) mérete 134,525 nukleotid hosszú, ez 159 ismert gént tartalmaz, illetve 108 fehérjét és 46 strukturális RNS-t kódol. A szekvenciájának elérhetősége és kis genommérete teszi kiváló modellnövénné a rizst.

2. 2. A kloroplasztisz jellemzése

A kloroplasztisz egy, a zöld növényekre jellemző sejt organellum, melynek elsődleges feladata a fotoszintézis helyszínének biztosítása. Proplasztiszból differenciálódással keletkezik. A növényi sejten belül a citoplazmában helyezkedik el. Kettős membránrendszerrel rendelkezik, amely ha többé-kevésbé egyenes, sztróma tilakoidnak nevezzük, melyek összekettedve gránum tilakoidokat alkotnak. Az ősi fotoszintetizáló cianobaktériumoktól származtatják őket, melyeket az endoszimbiózis elmélet szerint, a korai eukarióták bekebeleztek. Ezt igazolja önálló, cirkuláris genomuk és annak replikációja után hasadással történő osztódása, illetve egyes enzimek és struktúrfehérjék közös, megosztott szabályozása. (TUBA, 2006)

A zöld növények minden sejtjében 50-100 zöld színtest található. A plasztom nagyszámú DNS kópiával rendelkezik, mely a gránum lemezek közt helyezkedik el (lásd 1. ábra). Egy sejtben 20-100 kloroplasztisz található, egy plasztiszon belül pedig 50-100 kópia, mely összesen 1000-10000 kópia sejtenként. A kloroplasztisz DNS (cpDNS) négy nagyobb egységre tagolható, a jobb-, és bal oldali elválasztó fordított ismétlődésekre (Ir), a hosszú kódoló szakaszra (LSC) és a rövid kódoló szakaszra (SSC). Általában anyai úton öröklődik, mint például rizsben és a kukoricában. A rizs kloroplasztiszában $0,135 \times 10^6$ bp mennyiségű DNS található. HESZKY (2011) GYULAY (2010)



1. ábra: A kloroplasztisz felépítése. (HESZKY, 2011)

2. 3. Transzformációs áttekintés

Két fő csoportra oszthatóak a transzformációs rendszerek, közvetett és közvetlen technikákra. Az első transzformáns növényt a legelterjedtebb közvetett technikával érték el, az *Agrobacterium tumefaciens* nevű baktérium segítségével történő génátvitellel. Ez a talajlakó, anaerob baktérium, tumoros megbetegedést idéz elő a kétszikű növényeken, melyet már 1907-ben leírtak (SMITH and TOWNSEND, 1907). Az ún. Ti-plazmidját és működését azonban csak 1974-ben fedezték fel, illetve tették fel a hipotézist, miszerint ez a plazmid a tumorképződés indukálójá (ZAENEN et al., 1974 & LAREBEKE et al., 1974). Az első feljegyzések *Agrobacterium*-mal transzformált növényekről, az 1980-as évek elejéről származnak (DAVEY et al., 1980, BEVAN et al., 1982, HOCKEMA et al., 1982, HERRERA-ESTRELLA, 1983, KERN et al., 1983.). Az ezt követő öt évben sikerült előállítani az első gazdaságilag is jelentős transzgénikus növényeket, mint pl. vírus rezisztens (POWEL et al., 1986, BAULCOMBIE et al., 1986), rovarrezisztens (VAECK et al., 1986), illetve herbicidrezisztens növényeket (SHAH et al., 1986). Az *Agrobacterium* a természetben a kétszikű növényeket sebzésein keresztül fertőzi, mely sérülések hatására a növények a baktérium virulencia génjeit aktiváló anyagokat (pl. acetosyringon) termelnek. A virulencia gének, a baktérium tumor indukáló plazmidján (Ti-plazmid) találhatóak, melyből egy kisebb szakasz, a transzfer DNS (T-DNS) kivágódik, és beépül a fertőzött növény sejtmagjába, genomjába. A

beépülést a T-DNS ún. fordítva ismétlődő határszekvenciái teszik lehetővé. A géntechnológusok e szekvenciák közül vágják ki a bázisokat és építik a helyükre a bejuttatandó géneket. (HESZKY et al., 2005, HESZKY, 2011)

Az *Agrobacterium*-mal történő transzformáció azonban az egyszikűeknél nehézségekbe ütközött, ugyanis az egyszikű növények nem (vagy nagyon kis mennyiségben) termelik sebzések hatására a virulencia géneket indukáló anyagokat. Ennek köszönhetően alakult ki a biolisztikus géntranszfer technika (KLEIN et al., 1987), mely a közvetlen génmódosítás csoportjába sorolható módszerek közül a legelterjedtebben alkalmazott. Használata során mikrohordozóhoz (mikronméretű wolfram vagy arany szemcsék) kötjük a bejuttatni kívánt plazmidot, gént, majd ezt egy makrohordozóra helyezzük, amit nagy nyomású sűrített gázzal (N₂ vagy He) belő a génpuska a célszövetbe (részletesebben lásd Anyag és módszer 3. 3. 2. fejezete). A részecskebombázásnak több előnye is van az Agrobaktériumos transzformációval szemben, jelen kísérlet szempontjából azonban a két legfontosabb, hogy egyszikű növényt is lehet vele transzformálni, illetve organelum genomba is bejuttatható a kívánt gén. A közvetlen géntranszfer csoportjába tartozik még számos, kevésbé alkalmazott technika, ilyen többek közt a protoplasztok polietilén-glikol-os (PEG) kezelése, az elektroporáció, illetve a mikro-, és makroinjektálás. JENES et al. (1996), HESZKY (2011)

2. 3. 1. Ríz transzformációs áttekintés

Az első transzformáns rizs növényt elektroporációs kezeléssel segített protoplaszt transzformációs rendszerrel érték el (TORIYAMA et al, 1988). Ugyanabban az évben ZHANG AND WU (1988) elsőként tudtak nagyszámú transzformáns rizst előállítani, miután a bakteriális β -glükuronidáz gént bejuttatták rizs protoplasztba. Szuszpenziós kultúrát indítottak rizs szkutellumból, majd onnan izoláltak protoplasztokat, melyeket PEG-os kezeléssel fuzionáltattak a β -glükuronidáz génnel. A következő nagy lépés a herbicidrezisztens rizs előállítása, DATTA et al., (1992) ugyancsak PEG segítségével vitték be a foszfinotricin *bar* génjét a protoplasztba. A Basta nevű széles spektrumú herbicid származéka a foszfinotricinnek, mely ellen rezisztenciát nyújt. CAO et al.(1992) már biolisztikus transzformációval vitték be a *bar* gént rizsbe. Sikeresen állítottak elő transzformánsokat, melyek foszfinotricinnel végzett szelekciója is pozitív eredményt mutatott. A legnagyobb elért eredmény a mai napig a béta karotinban gazdag „Aranyrizs” kifejlesztése, mely segítene a szegényebb ázsiai országokba nagy számban előforduló vitaminózis elkerülésén (POTRYKUS, 2001).

2003-ra, megkönnyítve a kutatásokat befejeződött a rizs strukturális genom analízise - Rice Genome Programme (HESZKY 2005).

2. 3. 2. A kloroplasztisz transzformáció előnyei

Az első plasztisz transzformáns dohányt 1990-ben állították elő (SVAB et al.). Azóta számos növényen sikeresen hajtottak végre kloroplasztisz transzformációt: lúdfű (SIKDAR et al., 1998), burgonya (SIDOROV et al., 1999), paradicsom (RUF et al., 2001), repce (HOU et al., 2003), Lesquerella (SKARJINSKAIA et al., 2003), szója (DUFOURMANTEL et al., 2004), sárgarépa (KUMAR et al., 2004a), gyapot (KUMAR et al., 2004b), petúnia (ZUBKO et al., 2004), saláta (LELIVELT et al., 2005), rizs (LEE et al., 2006), karfiol (NUGENT, 2006), nyár (OKUMURA, 2006), káposzta (LIU et al., 2007), cukorrépa (DE MARCHIS et al., 2009) és tojásgyümölcs (SINGH et al., 2010).

Számos előnnyel rendelkezik a sejtmag transzformánsokkal szemben. Környezetvédelmi szempontból legfontosabb előnye, hogy a kloroplasztisz anyai öröklődésének köszönhetően itt nem kell tartani a gén/pollenszökés veszélyétől. Nagy mennyiségű fehérje expresszióra képes a plasztommódosított növény, nagyságrendileg meghaladva a nukleárisan módosított növény fehérjetermék előállító képességét. Ez a legfontosabb gazdasági előnye, mivel így kevesebb energia befektetéssel nagyobb haszon érhető el. Bioreaktorként használható fel a kloroplasztisz transzformáns növény különböző ipari területeken, gyógyászatban vakcina termeltetésre, bioiparban hasznos polimerek, enzimek termeltetésére például. Ebben az esetben külön előnyt jelent, hogy a transzformáns növények által előállított hasznos molekulák kerülnének felhasználásra, nem maga a módosított növény szolgáltatná az alapanyagot (HESZKY, 2011, TAMÁS & OSZVALD, 2011).

Szelektív mutagenézissel, szelektív antibiotikum rezisztencia alakítható ki a kloroplasztiszban, önálló genomjának köszönhetően, mind *Streptomycin*, *Rifampicin*, *Eritromycin* és *Kloramfenikol* antibiotikumok esetében (GYULAI, 2010). A mostani antibiotikum rezisztencia tiltás értelmében ennek azonban csak a kutatásban lehet jelentősége.

2. 3. 3. Kloroplasztisz transzformáció rizsben

A kloroplasztisz transzformációja rizsben napjainkban csak biolisztikus módszerrel mehet végbe sikeresen. Az *Agrobacterium tumefaciens* csak a nukleáris genomba tudja beépíteni T-DNS-ét, emellett egyszikűeknél nehezen alkalmazható. Csak úgy, mint az ismertebb közvetlen módszerek, a protoplaszt fúzió, mikroinjektálás vagy az elektroporáció.

Több probléma nehezíti a kloroplasztiszba történő gén transzformálást. Ilyen a kisebb mérete, melyhez kisebb általában 0,6 μm arany vagy wolfram szemcséket lehet használni hordozóként, az 1-3 μm -esek helyett. Kis méretéből adódóan nehezebben található el hiába van sok plasztisz egy sejtben, emellett a kloroplasztisz kettős membránrendszerén kell átjutnia a hordozószemcséknek. Az első kloroplasztisz transzformációt, ezen okokból kifolyólag a *Chlamydomonas reinhardtii* nevű zöld algával végezték el, ugyanis egy nagy kloroplasztisszal rendelkezik, mely közvetlenül a sejtmembrán alatt helyezkedik el (BOYNTON et al., 1988). Egy évvel később

BLOWERS et al. (1989) *neomycinfoszfofotranszferáz* gént (*nptII*) juttattak be *Chlamydomonas* plasztiszba. Az első virágos növényen, dohányon, végrehajtott kloroplasztisz transzformációt 1990-ben írták le (SVAB et al.).

KHAN & MALIGA (1999) ÉS LEE et al. (2006) stabil transzgén integrációt (heteroplasztomikus állapotot) sikerült elérniük rizsben, azonban a homoplasztomikus állapot lenne a megfelelő. Kísérleteik protokollja alapvetően hasonló, néhány fontos eltérést a következőkben fejtek ki. Kahn & Maliga a pMSK49-es plazmidot használta, mely nagy előnye a FLARE-S fúziós gén, ami magában foglalja az *aadA* (*aminoglycoside 3'-adenylyltransferase*) és a *gfp* (*green fluorescent protein*) marker géneket. Lee et al. (2006) is az *aadA* és *gfp* marker géneket használták, de külön építették be a konstrukciójukba. Khan & Maliga szuszpenziók sejt-aggregátumainak, Lee et al. magkalluszok bioliztikus génmódosítását végezték. A használt szelekciós ágens egyezett, *Streptomycin* volt mind a két esetben, azonban más-más koncentrációban alkalmazták. Khan & Maliga 100 mg/l koncentrációjú *Streptomycin-en* szelektált végig, Lee a transzformációt követően 200 mg/l koncentrációjú *Streptomycin-nel*, a zöld növények megjelenésekor 300 mg/l, s a túlélőknél 500 mg/l koncentrációjú *Streptomycin* szelekciót alkalmazott. Az általuk eddig elért eredmények heteroplasztomikus rizs növények.

3. Anyag és módszer

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növényi Sejtbiológia Csoportjának 2004-ben indult, és jelenleg is folyó kísérletébe csatlakoztam 2010-ben. A cél egy “környezetvédő” transzgénikus technológia fejlesztése – a kloroplasztisz transzformáció volt.

3.1. Felhasznált növényanyag

A kísérlet *Oryza sativa sp. japonica cv. Taipei 309* és *Oryza sativa sp. japonica cv. Kyrara* fajtákkal lett beállítva. Elterjedésüket illetően Délkelet-Ázsiai fajták. A T-309 egy nagyon hatékonyan regeneráló, standard fajta, mely azt jelenti, hogy 1 explantumból nagyobb számú sejt, illetve növény regeneráltható. A Kyrara fajtát gyorsabb regeneráló képesség jellemzi a Taipei-309-el szemben. A Kyrara kalluszai ún. soft jelleget mutatnak, a T-309 inkább kompaktabb kalluszokat képez.

3.2. Sejt-, és szövettenyésztési rendszer

A kísérlet *in vitro* körülmények között zajlik. Első fázisa a megfelelő mennyiségű és minőségű explantum előállítás sejt-, és szövettenyésztési technikák segítségével. Érett magból differenciált kalluszok, érett magból preparált szkutellumok és szkutellum tenyészetből indított finom embriogén sejtszuspenziók összehasonlító vizsgálatát végeztük.

3.2.1. Magkalluszosítás eszközrendszere és folyamata

A magvak hántolását követően a sterilizálás következik. Ennek lépései a következők: 70 %-os Ethanol 3 perc, 2x steril desztillált vizes öblítés, majd hypo-desztillált víz 1:1 arányú keveréke, melyhez 100 ml-enként egy csepp Tween 20 felületaktív anyagot cseppentünk. A sterilizáló oldatban 30 percig rázatjuk a magokat. A következő lépésként eltávolítjuk a hypot a magvokról, steril desztillált vízzel jól átmoszuk min. 2x ismétlésben, alkalmanként 10-10 perces rázatással. Az utolsó öblítővíz eltávolítását követően N6-3 táptalajra helyezzük őket, 10 mag/ Petri csésze elosztásban. Az eredeti N6 táptalajt (CHU et al., 1975) 3 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) hormon hozzáadásával használjuk (lásd 5. táblázat). A magokat három hétre 28 °C-os sötét termosztátba helyezzük a jó kalluszképződés elősegítése érdekében. Az idő leteltével leválasztjuk a kalluszokat a magról - lehetőség szerint darabolás nélkül. A génbelövéshez a Petri csésze közepére helyezzük őket 1-1,5 cm átmérőjű körben (még mindig N6-3 táptalajon).

A transzformációt követően a kalluszok 2-3 napig ugyanezen a táptalajon maradnak, de a jobb tápanyagellátás érdekében egyenletesen szétrakjuk őket a Petri csészében és visszahelyezzük a

termosztátba. 2-3 nap elteltével kezdjük meg a szelekciót 100 mg/l *Streptomycint* tartalmazó MS-I vagy MS-II regenerációs táptalajon, melyek az alábbi hormon kiegészítéseket tartalmazzák: MS-I (2 mg/l *BAP* és 1 mg/l *NAA*), MS-II (2 mg/l *Kinetin* és 2 mg/l *NAA*). Az MS alap táptalaj (MURASHIGE & SKOOG, 1962) változatai (lásd 5. táblázat). Mindkét táptalajt 2 mg/l *Gelrite*-al szilárdítjuk. Ekkor kerülnek át sötétből fényszobába, ahol nappal 22-24 °C-on, éjszaka 20-21 °C-on, 16/8 óra fotoperiódus mellett, 2-3000 lux megvilágítást kapnak. A kísérletet LEE et al. (2006) cikke alapján állítottuk be.

3. 2. 2. Szkutellum preparálás eszközszerrendszere és folyamata

A magvak sterilizálása a magkalluszosításnál leírtakkal megegyezően zajlik. A magokat az utolsó öblítővíz csekély maradékával együtt egy hirtelen mozdulattal steril szűrőpapírt tartalmazó Petri csészébe öntjük. Ezt követően egy napra 28 °C-os termosztátba tesszük őket, mely idő alatt a rizsszemek megduzzadnak, megpuhulnak. Másnap sztereo mikroszkóp alatt az endospermiumból kipreparáljuk a szkutellumot, és eltávolítjuk a csírákezdeményt. A preparátumokat LS-2.5 kalluszosító táptalaj közepére helyezzük egy körülbelül 0,5 cm-es átmérőjű körben (30 szkutellum/Petri csésze).

Amennyiben nem sikerült minden szemből teljesen eltávolítani a csírákezdeményt, azt a belövést követően folyamatosan távolítjuk el a kalluszosodásnak indult szkutellumokból. Az alkalmazott LS táptalaj (LINSMAIER & SKOOG, 1965) 2,5 mg/l 2,4-*D* hormont tartalmaz (lásd 5. táblázat), melyet 2-3 nap múlva 100 mg/l *Streptomycin*-nel egészítünk ki a szelekció érdekében. 3 hét alatt 28°C-os sötét termosztátban elkalluszosodnak. A kalluszok a transzformációt követően 1,5-2 hónap múlva kerülnek MS alap regenerációs táptalajra, melyet 2 mg/l *BAP* és 1 mg/l *NAA* hormonokkal egészítünk ki és 3,5 mg/l *Gelrite*-al szilárdítunk. A regenerációt fényszobában végezzük, mely paraméterei megegyeznek a magkalluszosításnál leírtakkal.

3. 2. 3. Sejtszuspenzió indítás eszközszerrendszere és folyamata

A hántolás és a sterilizálás a fent leírtak alapján történik. A vízzel történő átmosást követően a szkutellum preparálás előkészítéséhez hasonlóan 1 napra, nedves szűrőpapíron, 28 °C-os sötét termosztátba helyezzük a magvakat, ahol megduzzadnak és puhulnak. Másnap mikroszkóp alatt kipreparáljuk a szkutellumot az endospermiumból és LS-2.5 táptalajra helyezzük. 3-4 napra visszakerülnek a termosztátba, ez alatt megindul a kicsírázás. Amikor a csíranövények elérték az 1-1,5 cm hosszúságot, szike és csipesz segítségével eltávolítjuk őket, a szkutellumok pedig újra friss LS-2.5 táptalajra kerülnek. 7-14 nap alatt 28°C-os sötét termosztátban tartva őket elkalluszosodnak. Megfigyeléseink alapján a 10. napra képződnek ideális méretű és szilárdságú kalluszok. Ekkor indítjuk el a folyékony szuszpenziós sejtkultúrát a következőképpen: két csipesz segítségével

belemorzsolunk egy 15-20 ml AA2 tápoldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmayer lombikba körülbelül 30 kalluszt (egy Petri csészényi). Innentől sötét körülmények közt, folyamatosan rázógépen rázatjuk a lombikokat 120 rpm fordulatszámon, a sejtek megfelelő oxigénellátásának biztosítása végett. A korábbi tapasztalatok szerint az alkalmazott AA2 táptalajnak (MÜLLER & GRÁFE 1978, TORIYAMA & HINATA 1985) gyakran módosult a pH-ja a passzálások ideje alatt és a meglehetősen pH függő sejtuszpenziók nem tudtak megfelelően szaporodni és osztódni ebben a számukra kevésbé optimális közegben. A problémát 5 mM MES (2-(*N-morpholino*)ethanesulfonic acid) puffer hozzáadásával sikeresen kiküszöböltünk. Az AA2 táptalajt 2 mg/l 2,4-*D*, 0,2 mg/l Kinetin és 0,1 mg/l Gibberellinsav hormon kiegészítéssel használjuk (lásd 5. táblázat). Az elsődleges (primer) szuszpenziók hetente kétszeri passzálást igényelnek, melynek során ülepítjük a szuszpenziót, majd leöntjük róla a tápközeget és a méretnövekedésüknek megfelelően töltjük fel ismét friss AA2 tápoldattal. Körülbelül 1 hónap elteltével a táptalaj sűrűsödése (kocsonyásodás) figyelhető meg. Újabb 1 hónap elteltével visszatisztul a tápközeget és megindul a sejtek osztódása, sejt-aggregátumok képződése. A szuszpenziós kultúra indításától számítva 3-4 hónap elteltével megfelelő mennyiségű sejt-aggregátum keletkezik, ekkor megkezdődhet az elválasztásuk az „anyakalluszoktól”. Kisebb térfogatukból és tömegükből adódóan lassabban ülepednek, így rövid ülepítés (dekantálás) után kis mennyiségű tápoldattal átönthetőek egy másik Erlenmayer lombikba. Az így kapott egysejtes, illetve apróbb sejt-aggregátumokat tartalmazó finom szuszpenziókat már elegendő hetente egy alkalommal passzálni. A génbelövéshez a szuszpenzióból 1-2 ml-nyi mennyiséget rácsöppentünk egy steril szűrőpapír koronggal borított szilárd AA2 táptalajra. Körülbelül 1,5-2 cm-es körben egyenletesen szétterítjük, így génbelövésre alkalmas explantumot kapunk. (GONZÁLEZ-CORONEL and JENES, 2001)

3. 3. Transzformációs rendszer

A sejt-, és szövettenyésztési munkákat követően megkezdjük az explantumok transzformálását.

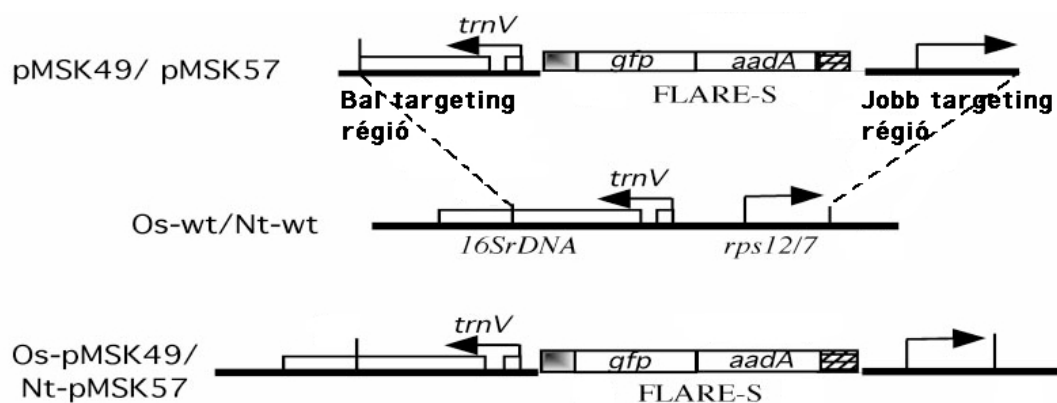
3. 3. 1. Felhasznált plazmid-konstrukciók

A New Jersey-i Rutgers Egyetemen Maliga Pál által kifejlesztett pMSK49 gén-konstrukciót használtuk a transzformációhoz (génbanki taxonómiai azonosító: 120083). A kísérlethez való csatlakozásom előtt a pOPV2 vektor-konstrukció is használatban volt, melyet úgyszintén Maliga Pál tervezett. Kifejezetten a célnövényre lettek tervezve a konstrukciók, beépített rizs plasztisz genom szakaszokkal („targeting” régiók, trn) rendelkeznek, melyek a transzgén specifikus beépülését teszik lehetővé. A transzformáció nyomonkövethetősége érdekében kettő marker gén fúzióját tartalmazzák, az *aadA* (aminoglycoside 3'-adenylyltransferase) és a *gfp* (green fluorescent

protein) génekét a *FLARE-S* (fluorescent antibiotic resistance enzyme, spectinomycin and streptomycin) gént. Hordozzák továbbá az ismert legerősebb plaztid riboszómális RNS promótert (*rrn* gén promóter régió), és a *psbA* gén 3'-UTR szakaszát (*psbA* gén terminátor régió) az mRNS stabilizálásáért (lásd 2. táblázat). Ez a konstrukció a rizs nemkódoló 16SrDNS, *trnV* és *rps12/7* régiók közé képes beépülni (Génbanki azonosító AF176637, lásd 2. ábra). (KHAN & MALIGA, 1999)

Plazmid neve	Targeting régió	Marker gén	Promóter régió	Terminátor régió	Gazdaságilag hasznos gén
<i>pOPV2</i>	rizs	<i>aadA</i> – <i>gfp</i>	<i>PrnLatpB</i>	<i>TpsbA</i>	N / A
<i>pMSK49</i>	rizs	<i>aadA</i> – <i>gfp</i>	<i>PrnLT7g10</i>	<i>TpsbA</i>	N / A

2. táblázat: Vektor-konstrukciók részei.

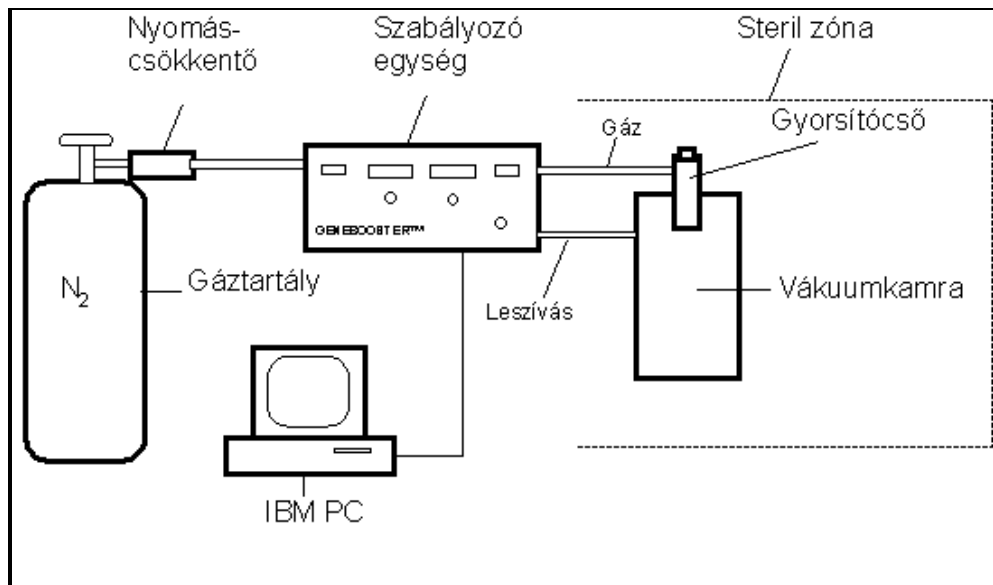


2. ábra: A *pMSK49* plazmid-konstrukció és a beépülés helyének fizikai térképe. (KHAN & MALIGA, 1999)

3. 3. 2. A génbelövő készülék

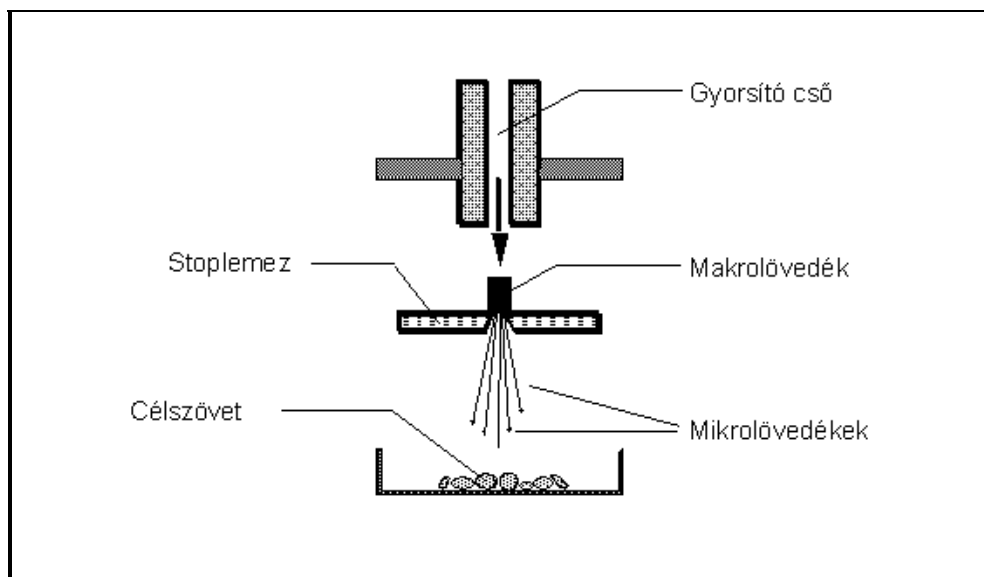
Munkánk során a második generációs GENEBOOSTER™ génbelövő készüléket használtunk (JENES et al., 1996), melynek első generációs példánya 1990-ben készült el Gödöllőn, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Jenes Barnabás és munkatársai tervezésében és kivitelezésében. Az egyszikűek vastag sejtfa megnehezítette, esetenként ellehetetlenítette (lásd irodalmi áttekintés 1.3.) az Agrobaktériummal történő transzformálás sikerességét, mely elvezetett a biolisztikus (génbelövő) rendszer kialakulásához. A génbelövő módszer lényege, hogy egy hordozó mikrolövedékhez kapcsoljuk az élő szervezetbe bevinni kívánt gént. A mikrolövedéket sűrített gáz segítségével felgyorsítjuk, majd belőjük a célsejtbe. A mikrohordozó magával viszi a bejuttatandó részecskét, amely leválik a gazdaszervezetben és beintegrálódik annak DNS-ébe, vagy időlegesen működésbe lép. ([HTTP://WWW.MUSZEROLDAL.HU/MMK/NR65/JENEI.HTML](http://www.muszeroldal.hu/MMK/NR65/JENEI.HTML), JENES et al., 1996, JENES et al., 1997)

A génpuska főbb részei a N₂-gáztartály, a hozzáépített nyomáscsökkentő, egy szabályozó egység, melyhez kapcsolható egy irányító egység (PC), illetve a steril közegbe helyezett vákuum kamra és annak részei. (3. ábra)



3. ábra: A génbelövő készülék főbb részei. ([HTTP://WWW.MUSZEROLDAL.HU/MMK/NR65/JENEI.HTML](http://www.muszeroldal.hu/MMK/NR65/JENEI.HTML))

A vákuum kamra legfontosabb szerkezeti elemei a záró dugó, melyre a makrolövedéket helyezzük, a gyorsító cső, a stop lemez, a fémháló, illetve a célszövetet és a fémhálót tartó polcok. A szerkezet sűrített N₂ gázzal működik. Ez gyorsítja fel a makrohordozót a vákuummal telített térbe juttatva. A makrohordozót megállítja a stop lemez, a mikrolövedék és a hozzákötött anyag tovább halad, keresztül megy a fémháló résein, így szórtan jut el a célhoz (lásd 4. ábra).



4. ábra: A vákuumkamra részei és a transzformáció folyamata. ([HTTP://WWW.MUSZEROLDAL.HU/MMK/NR65/JENEI.HTML](http://www.muszeroldal.hu/MMK/NR65/JENEI.HTML))

A nitrogén nyomása és a vákuum nagysága manuálisan állítható a szabályozó egységen, lehetőséget biztosítva ezzel a mikrohordozó sebességének befolyásolására. Ez a sebesség függ még a mikrolövedék által a stop lemezig, és onnan a célszövetig megtett út hosszúságától. (JENES et al., 1997)

3. 3. 3. A transzformáció folyamata

Makrohordozóként műanyag lövedéket, mikrohordozóként 0,6 μm átmérőjű aranszemcsét használunk (0.6 μm Gold Microcarriers, Biorad), erre kötjük rá a kívánt DNS-t. Először 30 mg aranyat sterilizálunk 500 μl abszolút alkohollal történő átmosással, mely során 2-3 perces vortexelés és 4 másodperces, 13,4 X 1000 fordulatszámon történő centrifugálás történik, háromszoros ismételtsben. A felülúszó eltávolítása után 500 μl milliQ vízzel végzünk átmosást háromszori ismételtsben, az előbbiekhöz hasonlóan. A felülúszó leszívását követően rámerünk negyedik alkalommal is 500 μl milliQ vizet. Az így elkészített mikrolövedék tárolható -20°C-on.

A következő lépés a DNS rákötése a hordozó szemcsékre, mely közvetlenül a transzformálás előtt végezendő el. Kimérünk a mikrohordozóból 50 μl -t Eppendorf csővenként, hozzáadunk 5 μl -nyi 1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -es plazmidot és összekeverjük vortex segítségével. Frissen felbontott, hideg, 2,5 M-os CaCl_2 -oldattal kicsapjuk a szemcséhez hozzákötni kívánt DNS-t, majd ugyancsak frissen felbontott, hideg, 0,1 M-os Spermidin oldattal hozzákötjük azt az aranszemcsékhez. A két oldatnak egymást követve, gyorsan kell érintkeznie az aranszuspenzióval, ezért az elfektetett Eppendorf cső falára cseppentjük alulra a CaCl_2 -ot, felé a Spermidin-t, majd az Eppendorf cső óvatos függőleges helyzetbehozásával először az alsó, rögtön utána a felső csepp is eléri az oldatot. Azonnali egy perces vortexelés következik. 4 másodperces centrifugálás után, a felülúszó leszívása következik, majd 250 μl abszolút alkoholt mérünk az oldatra. Újabb vortexelés, ülepítés következik és a felülúszó eltávolítása. A pelletre 105 μl izopropanolt mérünk és a vortexre helyezzük, ezzel elkészült a mikrohordozónk, a hozzárögzített plazmiddal. Mintaszámhoz mérten és a kívánt mintánkénti lövésszámmal igazodva előre kiszámítjuk az előállítandó mikrolövedék mennyiségét. Lövésenkénti (makrohordozónkénti) 10 μl mikrolövedék felvitel mellett egy Eppendorf-nyi mikrohordozó 8-10 lövésre elegendő.

A Petri csésze közepére helyezett explantumokkal a már előkészített növényi anyag transzformációja következik. A génpuska üzembe helyezésekor beállítjuk a nyomást, és a vákuumot. 70 bar nyomás és -0.7 bar vákuum mellett használtuk a szerkezetet, néhány kivétellel (bővebben lásd Értékelés és következtetések 5. 2. fejezete). A makrohordozóra 10 μl -nyi mikrolövedéket pipetázunk. A magkalluszok transzformálása során eleinte 6-szor, a későbbiekben 10-szer lőttünk be 10 μl -nyi mikrolövedéket egy Petri csészén található sejttömegbe (lásd 3.

táblázat). A szkutellumok egyöntetűen 10 lövést kaptak Petri csészénként, a szuszpenziók 8-at (lásd 4. táblázat). Minden lövést követően fordítottunk egyet-egyet a Petri csészén a lövésszámtól függően, hogy a mikrohordozó minél jobban szétterülhessen a célobjektumon. A célszövet fémhálótól való távolságát tekintve általában felülről számolva a 4. emeletet preferáltuk, némely esetben van csupán eltérés (bővebben lásd Értékelés és következtetések 5. 2. fejezete). Párhuzamosan kontroll növények azonos kezelését is végeztük, leszámítva a lövést.

3. 4. Szelekciós rendszer és detektálás

A plazmid-konstrukció által tartalmazott *aadA* (*aminoglycoside 3'-adenylyltransferase*) gén több antibiotikum rezisztenciát kódol: *Streptomycin*, *Spectinomycin*. Ezek közül a *Streptomycin*-t használjuk szelekciós markernek, mivel a rizs egy pontmutációjából adódóan rezisztens az említett másik antibiotikumra. A transzformációt követő 2-4-ik napon indítjuk a szelekciót *Streptomycin*-t 100 mg/l-es koncentrációban tartalmazó táptalajon. Szuszpenziós sejtek esetén a lövést követően kétféle módszert alkalmazunk; ismét folyékony AA2 kalluszosító táptalajba (pár nap elteltével kiegészítve *Streptomycin*-nel) mossuk vissza az aggregátumokat, illetve szilárd AA2 táptalajon (+ *Streptomycin* pár nap múlva) hagyjuk őket 2-3 hétig. Ez az időszak segíti a kalluszok erősödését, illetve az esetleges transzplasztomikus sejtek feldúsulását. Ezt követően kerülnek át a regenerációs MS-BAP-NAA (+ *Streptomycin*) táptalajra. A magkalluszok és szkutellumok a lövést követő 2-4-ik napon kerülnek szelekciós táptalajra. A magkalluszok regenerációját MS-I és MS-II táptalajokon, a szkutellumokét MS-BAP-NAA táptalajon végezzük. A szelektálás egészen a kiültetésig változatlan 100 mg/l *Streptomycin* koncentráció mellett folyamatosan történik. Amennyiben sikerül előállítanunk plasztom módosított növényeket, azok zöldellni fognak a szelekciós táptalajon is, míg a sikertelenül transzformáltak kifehérednek. Ez tehát egy szelekcióra és detektálásra egyaránt alkalmazható módszer. A kontrollokat nem részesítettük *Streptomycin* szelekcióban, tehát antibiotikum-mentes regenerációs táptalajon nevelkedtek, ez által segítségünkre voltak a regenerációs rendszer tesztelésében.

A plazmid tartalmazza a *gfp* (*green fluorescent protein*) génjét is, mely pontosabb detektálhatóságot tesz lehetővé. Amennyiben a transzgén integrálódik a kloroplasztisz genomba, annak átírása során a *gfp* gén is átíródik, zöld fluoreszcens fehérje expresszióját eredményezve. A növények fluoreszcenciáját vizsgálva Olympus IMT-2 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével, a zöld fluoreszcens fehérjetermékek megmutatják a beépülés pontos helyét. A technika működik az élő sejtekben, így nem kell letális hisztokémiai módszereknek kitenni a vizsgálati alanyt. (KHAN & MALIGA, 1999)

A zöld regeneránsok molekuláris vizsgálatát most kezdjük, mely során alkalmazunk PCR-analízis, gélelektroforézis technikákat. DNS izolálást, emésztést és szekvenálást végzünk.

4. Eredmények

4. 1. Sejt,- és szövettenyésztési rendszer eredményei

Érett magból differenciált magkallusz, érett magból preparált szkutellum és szkutellum tenyészetből indított embriogén sejtszuspenzió növényregenerációs összehasonlító kísérletét végeztük el a rizs két fajtáján; *Oryza sativa sp. japonica cv. Taipei 309* és *Oryza sativa sp. japonica cv. Kyrara*.

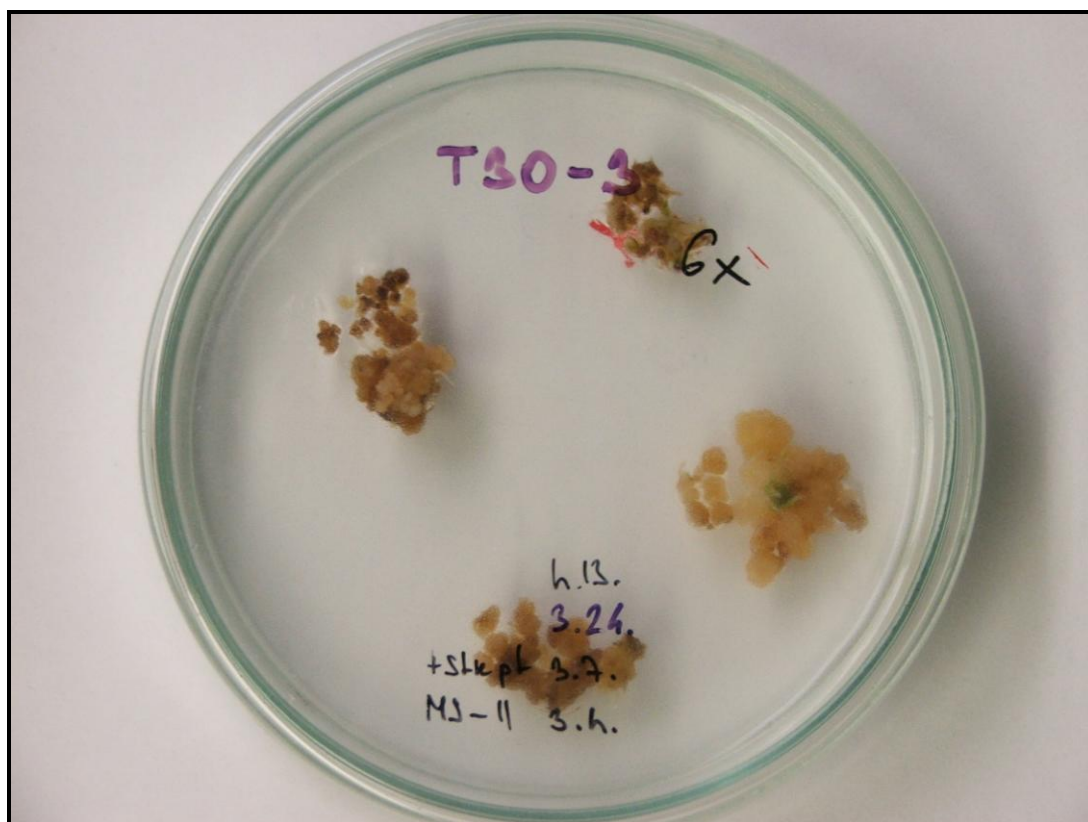
4. 1. 1. Magkalluszosítás eredményei

Az érett magokat sterilizálást követően kipreparáltuk a szkutellumokat és kalluszosítás céljából N6-3 táptalajra helyeztük. 3 hét elteltével transzformálásra alkalmas jó minőségű sárga kalluszokat kaptunk, a T-309-es fajtából kompaktakat, a Kyrara fajtából ún. soft jellegűeket, melyek puhább, tapadósabb állagúak voltak. Összesen 420 explantumot transzformáltunk, melyből 320 kalluszra 6x löttünk Petri csészénként, az utolsó 100 kallusznál már megemeltük 10-re a lövések számát (lásd 3. táblázat). Ezen felül 100 darab kallusz szolgált kontrollként, melyek azonos kezelésben részesültek, leszámítva a transzformációt és a szelekciós ágenszt. A 0,6 µm átmérőjű aranysemcsékhez kötött plazmidok kloroplasztiszokba való bejuttatása következett biolisztikus módszerrel. 2-3 nap múlva a kalluszok MS-I vagy MS-II regenerációs táptalajra kerültek. Ekkor a táptalajhoz 100 mg/l koncentrációban *Streptomycin*-t adtunk és megkezdtük a szelekciót.

A Kyrara fajta kalluszai hamar, 2-3 héten belül, egyidejűleg több gyökérkezdeményt fejlesztettek (elkezdtek „szőrösödni”), méretbeli növekedésük azonban csekély mértékű volt. A T-309-es fajta kalluszai erőteljes növekedésnek indultak, tehát nagymérvű szövet szaporodás volt megfigyelhető. Emellett a T-309 fajta kalluszai több mint egy hónap elteltével kezdtek zöldülni (5-6 hetes korban), a Kyrara viszont már 2-3 hét múlva.

A kalluszok 3 hetenként esedékes friss táptalajra helyezésekor ügyeltünk a megfelelő tér és tápanyagellátás biztosítására, így a Petri csészénkénti kalluszok számát növekedésük arányában csökkentettük.

Körülbelül 1 hónappal a transzformálás után a kalluszokon zöld foltosodást lehetett megfigyelni, majd újabb 1-2 hónapot követően megjelentek az első fehér, zöld, vagy kimérás növénykéek (1., 2. kép). Az okkersárga színű kalluszok ez idő alatt jellemzően besötétedtek néhány árnyalattal (1., 2., 3. kép). Ez a kallusz öregedésével járó természetes folyamat. Némely kalluszok a regeneráció folyamán bebarnultak, ez azonban nem jelentette a pusztulásukat, a teljesen elbarnult kalluszból is fejlődött növény.



1. kép: Kyrara magkalluszok a transzformáció után 1 hónappal. Jól látható a zöld foltosodás.



2. kép: Taipei-309 magkalluszok a transzformáció után 2 hónappal, zöld regeneráns növénykével.



3. kép: Két hónapos T-309 kontroll kalluszok regenerációs táptalajon.

Összesen 520 darab érett magot kalluszosítottunk el, ebből 420 darab transzformálására, majd szelektálására került sor, a fennmaradó 100 darabot kontrollként kezeltünk, tehát nem voltak részecskebombázás és szelekció részesei (lásd 3. táblázat). A kettő rizsfajta kísérleti körülményei azonosak voltak. A 3. táblázat megmutatja továbbá az egyes kísérletek esetében alkalmazott regenerációs táptalajokat.

A kísérlet jelölése	Fajta	Explantum szám (db mag)	Lövesszám/ Petri csésze	Regenerációs táptalaj	Zöldülő kalluszosok száma (db)	Kifehéredő regeneránsok száma (db)	Zöld regeneránsok száma (db)
T-27	T-309	80	6 X	MS-I	18	-	-
kontroll	T-309	20	-	MS-I	*	-	2
T-28	T-309	80	6 X	MS-II	44	-	-
kontroll	T-309	20	-	MS-II	*	-	12
T-29	Kyrara	80	6 X	MS-I	40	-	-
kontroll	Kyrara	20	-	MS-I	*	-	14
T-30	Kyrara	80	6 X	MS-II	34	20	1
kontroll	Kyrara	20	-	MS-II	*	-	6
T-31	T-309	50	10 X	MS-I	22	26	1
kontroll	T-309	10	-	MS-I	*	-	5
T-32	Kyrara	50	10 X	MS-I	26	-	-
kontroll	Kyrara	10	-	MS-I	*	-	-
Σ T	T-309	210	nv	nv	84 (40%)	26 (12,4%)	1 (0,5%)
Σ kontroll	T-309	50	nv	nv	*	-	20 (40%)
Σ T	Kyrara	210	nv	nv	100 (47,6%)	20 (9,5%)	1 (0,5%)
Σ kontroll	Kyrara	50	nv	nv	*	-	19 (38%)
Σ T	T-309 & Kyrara	420	nv	nv	184 (43,8%)	46 (11%)	2 (0,5%)
Σ kontroll	T-309 & Kyrara	100	nv	nv	*	-	39 (39%)

3. táblázat: Transzformált magkalluszosok kísérleti paraméterei és eredményei.

(Megjegyzés: * - nincs adat, nv – nem vizsgálható, irreleváns)

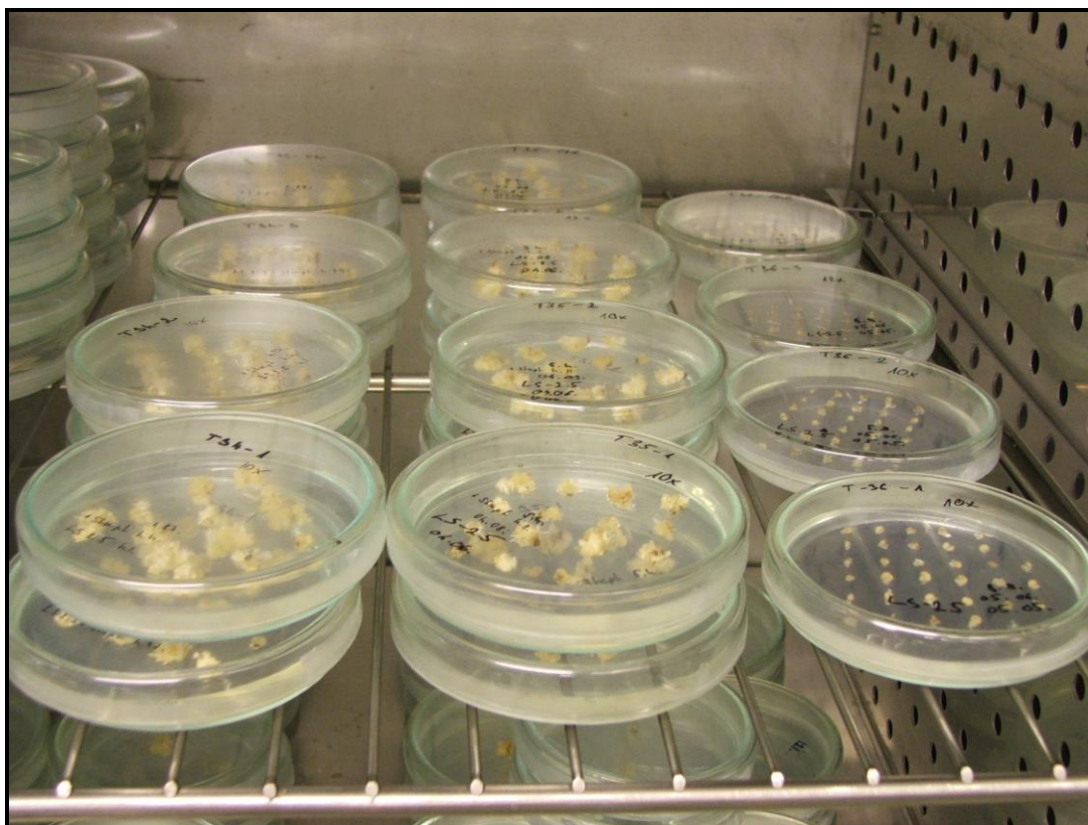
A 420 transzformált magkalluszból 2 zöld növényt kaptunk, 1-1 növényt a Kyrara és a T-309 fajtából. Ez a két regeneráns két külön vonalnak számít, amennyiben egy vonal alatt az egy kalluszból kifejlődött zöld növényt értjük. Ebben a megközelítésben pedig egy kallusz alatt azt az összes, friss táptalajra való átrakások során esetlegesen szétarabolódott kalluszosokat értjük, melyek

egy azon kezdetben elkalluszosított magból származnak, hisz ezek genetikai jellemzői tulajdonképpen azonosak. A transzformációs folyamaton átesett explantumokból 184 zöldülő kallusz fejlődött ki, ez 43,8%-a az összes kallusznak, melyből 100 darab a Kyrara, 84 a T-309 fajtából származik. A Kyrara fajtából regenerált kalluszok 47,6%-án, a T-309 fajtából nevelt kalluszok 40%-án jelent meg zöldülés. Ezen explantumokból fejlődött ki a 2 zöld növény. A két zöld vonal 0,5%-os regenerációs hatásfokot jelent. Emellett összesen 46 darab kifehéredő regeneránst kaptunk, mely 11%-a az összes explantumnak, ebből 26 fehér növény a T-309, 20 darab a Kyrara fajtából fejlődött ki.

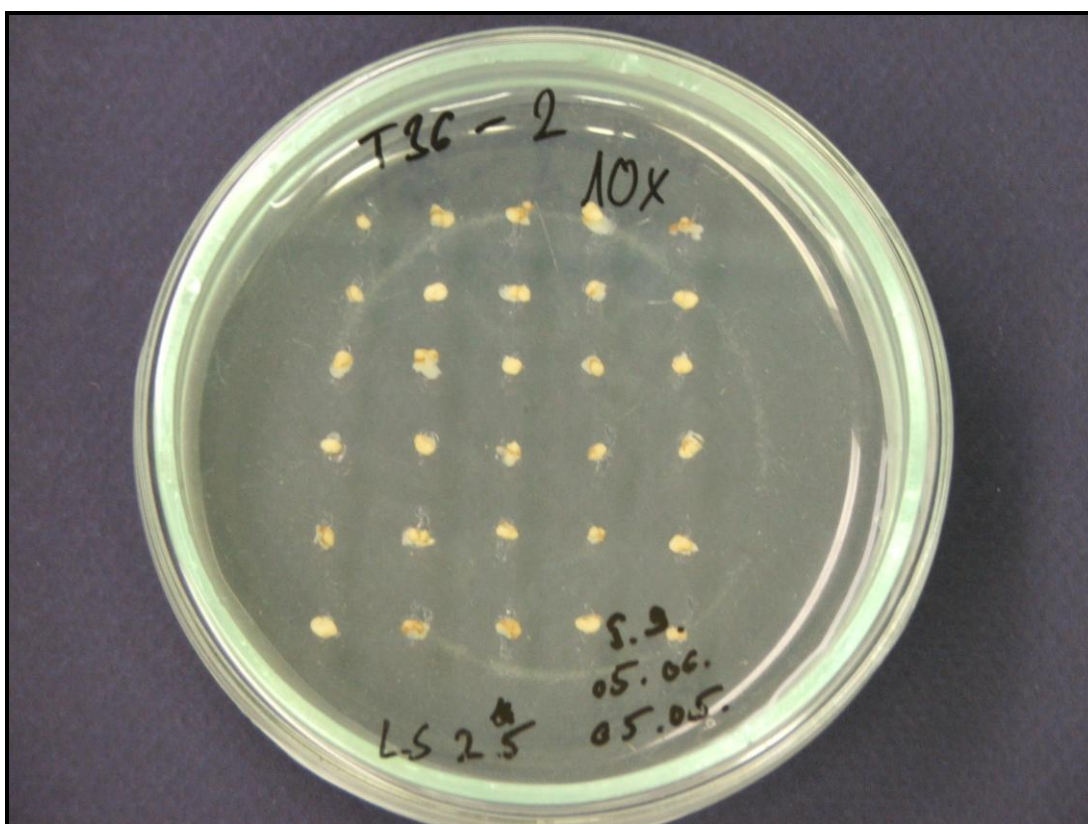
Tehát a T-309 fajtából regenerált magkalluszok 21,4%-ából kaptunk fehér növényeket, illetve a Kyrara explantumok 9,5%-ából. Kifejlődött a kontroll kísérletekből (nem transzformált és nem szelektált kalluszokból) is 39 zöld növény, mely az összes kontroll explantum 39%-a. Fajtánkénti lebontásban a T-309 fajtából előállított kalluszok 40%-ából, a Kyrara fajta 38%-ából.

4. 1. 2. Szkutellum kalluszosítás eredményei

Az érett magok sterilizálását, majd 1 napi duzzasztását követően kipreparáltuk a szkutellumot és LS-2.5 kalluszosító táptalajra helyezve közvetlen transzformációt végeztünk rajtuk. 3 nap múlva a táptalajhoz adtunk 100 mg/l koncentrációban *Streptomycin*-t, ezzel megindítva a szelekciót. 1,5-2 hónap múlva, miután megerősödtek a kalluszok, kerültek át MS-BAP-NAA regenerációs táptalajra és fényre. Eddig 28°C-os sötét termosztátban nevelkedtek, lásd 4. kép. A szkutellumból kifejlődött kalluszok nagyarányú gyökérképződést („szőrösödést”) mutattak és itt is jellemző volt a kalluszok sötétedése, esetleges elbarnulása.



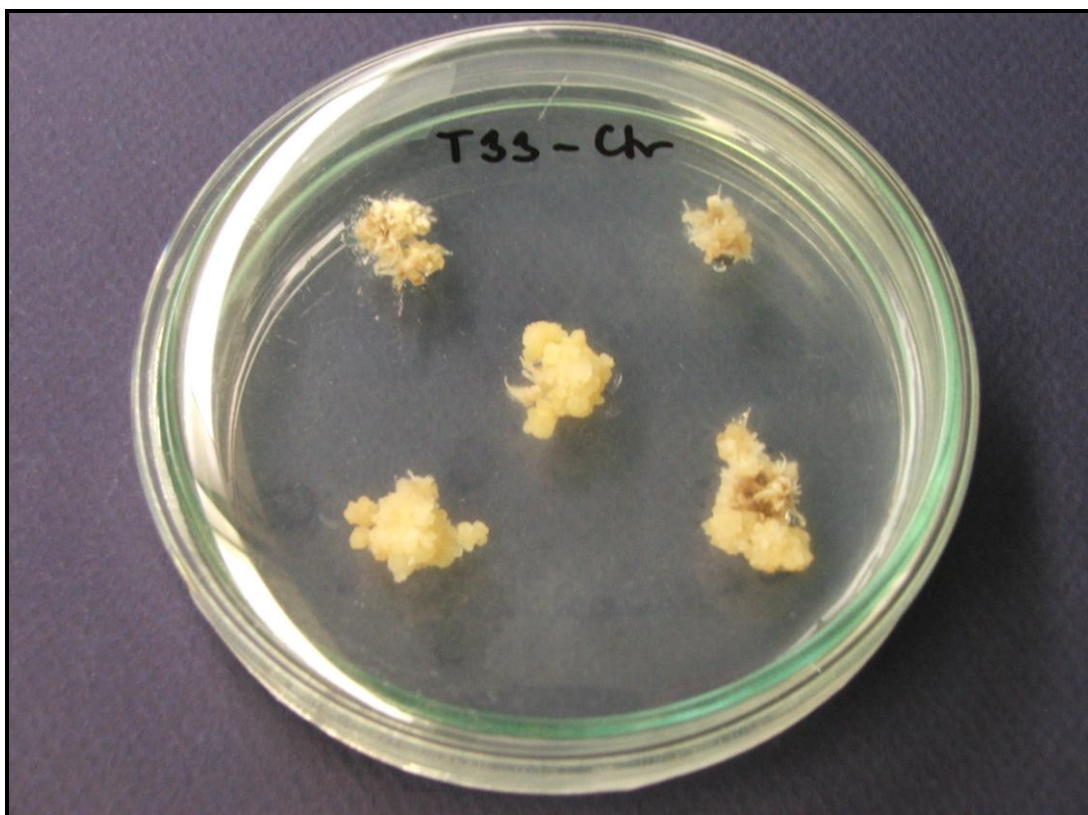
4. kép: Szkutellumok kalluszosítása 28°C-os sötét termosztátban



5/a kép: 4 napos transzformált szkutellumok kalluszosítása LS-2.5 táptalajon.



5/b kép: 4 napos transzformált szkutellumok kalluszosítása LS-2.5 táptalajon.



6. kép: Szkutellumból kifejlődött 2 hónapos kontroll kalluszok MS-BAP-NAA táptalajon.

A kísérletet a T-309 rizs fajtára állítottuk be. Összesen 540 érett magból preparált szkutellum kalluszosítását végeztük el, ebből 420 explantumot transzformáltunk biolisztikus módszerrel, 120 kontroll kallusz fenntartása mellett, melyek nem estek át transzformáción, illetve szelekción. A 420 transzformált explantumból összesen 728 fehér növény fejlődött, mely 146 fehér vonalat jelent (34,8%), illetve 8 darab zöld, feltételezhetően transzplasztomikus vonalat kaptunk. A 120 kontroll kalluszból összesen 45 fehér növény jelent meg, mely 8 fehér vonalat jelent, illetve 166 zöld növény regenerált, ami 37 zöld vonalnak felel meg. Egy vonal alatt ebben az esetben is az egy kalluszból regenerált növényeket értjük.

A 8 zöld vonal növényei jelenleg hormonmentes MS-táptalajon (+*Streptomycin*) vannak kiültetve 16 cm-es üvegcsövekbe.

Rizs szkutellum explantum belövéséről nincs további összehasonlítható irodalmi adat, ebben a témakörben az első adatokat mi szolgáltatjuk.

Sorszám	Fajta	Explantumok száma (db szkutellum)	Lövések száma / Petri csésze)	Regenerációs táptalaj	Kifehéredő regeneránsok száma (vonalt/növény)	Zöld regeneránsok száma (vonalt/növény)
T-33	T-309	150	10 X	MS-BAP-NAA	53 / 295	4 / 4
kontroll	T-309	30	-	MS-BAP-NAA	4 / 36	6 / 24
T-34	T-309	90	10 X	MS-BAP-NAA	28 / 71	- / -
kontroll	T-309	30	-	MS-BAP-NAA	3 / 8	2 / 6
T-35	T-309	90	10 X	MS-BAP-NAA	23 / 118	2 / 2
kontroll	T-309	30	-	MS-BAP-NAA	- / -	18 / 78
T-36	T-309	90	10 X	MS-BAP-NAA	42 / 244	2 / 2
kontroll	T-309	30	-	MS-BAP-NAA	1 / 1	11 / 58
Σ T	T-309	420	10 X	MS-BAP-NAA	146 / 728 (34,8%)	8 / 8 (1,9%)
Σ kontroll	T-309	120	-	MS-BAP-NAA	8 / 45 (6,7%)	37 / 166 (30,8%)

4. táblázat: Transzformált szkutellumok kísérleti paraméterei és eredményei.

4. 1. 3. Sejtszuspenzió eredményei

A rizs T-309 fajtájával állítottuk be a kísérletet. Sterilizálás és duzzasztás után kipreparáltuk a magból a szkutellumot és szilárd LS-2.5 táptalajra helyeztük 28°C-os sötét termosztátba. 3-4 nappal később eltávolítottuk a csíranövényeket és friss táptalajra helyeztük a preparátumokat. 7-14 nap elteltével a megfelelő kalluszok kialakulásakor elindítottuk a folyékony szuszpenziós

sejtkultúrát, folyékony AA2 táptalajba morzsolva a kalluszokat. Innentől sötétben tartva, folyamatos rázatás mellett, heti kétszeri passzálassal, körülbelül 2 hónap alatt megindult a sejt-aggregátumok képződése. 1,5 – 2 hónapos korú szuszpenziókat választottunk ki a belövéshez, kicsit göbös állagú sejt-aggregátumokkal telítve, melyeket a passzálást követő 1-3 napon belül szélesztettünk ki a szilárd AA2 táptalajra. Korábbi kísérletek során ezek a paraméterek bizonyultak optimálisnak a transzformációt követő növény regenerációs hatékonyság tekintetében (Mitykó J. szóbeli közlése és GONZÁLEZ-CORONEL, 2001 eredményei alapján). 2-3 hétig előtenyésztésnek lettek alávetve az intenzív kalluszosodás megindulása érdekében. A transzformálás során minden Petri csészére 8 lövést adtunk le, vagyis 80 µl mikrohordozót juttattunk be.

A T-37-es és T-38-as kísérleteknél a lövést követő 2-4. napon megkezdődött a szelekció, szilárd AA2 táptalajon, 100 mg/l koncentrációjú *Streptomycin* hozzáadásával. Ez az időszak az intenzív kallusz szaporodás időszaka, mely során a potenciális transzplasztomikus sejtek feldúsítása a cél. 10-14 nap elteltével kerültek át a kalluszok szilárd regenerációs MS-BAP-NAA táptalajra. Jelenleg a kalluszok növekedése okán el kellett távolítani a szűrőpapírt a táptalajról a jobb tápanyag-ellátottság érdekében. A szűrőpapírra csak a szuszpenziós, illetve az apró kalluszos fázisban van szükség a tenyészetek könnyebb kezelhetősége (átrakások) miatt.

A T-40-es kísérlet kalluszait szintén szilárd AA2 táptalajon transzformáltuk, azonban közvetlenül a belövést követően visszamostuk az aggregátumokat friss folyékony AA2 táptalajba és folytatódott a rázatás. A szelekció ebben az esetben a 3. napon indult 100 mg/l koncentrációjú *Streptomycin* hozzáadásával. Jelenleg a potenciális transzplasztomikus sejtek feldúsítása érdekében, illetve a sejteken belül a transzformáns plasztiszok magasabb számának elérése érdekében 1 hónapja folyadékkultúrában rázatjuk az aggregátumokat.

A három transzformált kísérlet mellett párhuzamosan egy-egy kontroll kísérlet is folyik azonos fenntartási körülmények között, a transzformálás és szelektálás kivételével. Mivel a szuszpenziós kísérleteket alig egy-két hónappal ezelőtt indítottuk, ezért növény regenerációs eredményeket itt még nem áll módunkban közölni.

4. 2. Transzformációs rendszer eredményei

Mind a három explantummal folytatott kísérlet során a pMSK49-es plazmidot használtuk transzformálásra, mely magában foglalja az *aadA* és a *gfp* gének fúzióját (*FLARE-S*), mint marker gén, melyeket a *Prn* promóter hajt meg és a *TpsbA* terminátor „állít le”. A plazmidba terveztek „targeting” régiókat is specifikusan a rizs genomából; *trnV* és *rps12/7*. (lásd Anyag és módszer 2.1.)

Kloroplasztisz transzformációs kísérleteket rizs növényen eddig KHAN & MALIGA (1999) és LEE et al. (2006) végeztek eredményesen. Kahn & Maliga is az általunk használt plazmiddal kísérleteztek. A pMSK49-es plazmid előnye a *FLARE-S* gén, mely használatánál nem kell tartani a

marker gének fizikai elválásától (KHAN & MALIGA, 1999). Lee et al. (2006) is az *aadA* és *gfp* marker géneket használták, de külön építették be a konstrukciójukba. Khan & Maliga sejtszuspenziók, Lee et al. magkalluszok belövését végezték, mi e két explantum mellett a szkutellum közvetlen transzformálását is elvégeztük, ismereteink szerint elsőként. Khan & Maliga és a saját kísérletünk során 100 mg/l koncentrációjú Streptomycin volt a szelekciós ágens. Lee a transzformációt követően 200 mg/l koncentrációban alkalmazott Streptomycin-t, majd a zöld növények megjelenésekor ezt megemelte 300 mg/l-re, s a túlélőket 500 mg/l-es szelekciónak tette ki.

A Khan & Maliga valamint a Lee által eddig elért eredmények heteroplasztomikus rizs növények. A saját kísérleteinkből kapott zöld növények transzplasztomikus eredetét azonban ez idáig nem sikerült molekulárisan bebizonyítani.

5. Értékelés és következtetések

5. 1. Sejt-, és szövettenyésztési rendszer értékelése

Rizs kloroplasztisz transzformálása céljából sikeresen alkalmazott explantum regenerációs rendszereket mind ez idáig KHAN & MALIGA (1999), illetve LEE és mtsai (2006) írtak le. Khan & Maliga sejtszuszpenzióból regeneráltatott embriogén sejt-aggregátumokat, Lee és mtsai érett magból differenciált embriogén és nem embriogén magkalluszt használtak explantumként. A kísérletünk során mi három különböző explantum összehasonlító vizsgálatát végeztük el; érett magból differenciált magkalluszon, érett magból preparált szkutellumon és elsőként, szkutellum tenyészetből indított finom embriogén sejtszuszpenzión. A kallusz és a szuszpenzió is gyorsan osztódó proplasztiszokat tartalmaz, ezért mind a három explantum alkalmas transzformációra.

5. 1. 1. Magkallusz regeneráció kiértékelése

Kallusz transzformálás esetében a nagyobb szövethalmaz miatt az aranyszemcsék nehezebben jutnak el a mélyebb sejtrétegekbe, ezenfelül a tápanyagok és a szelekciós ágens kisebb felületen érintkezik a sejtekkel. Azonban a transzformációra alkalmas állapotú magkalluszok nevelési ideje, hónapokkal rövidebb a szuszpenziós kultúrából előállítható transzformációra alkalmas explantumokénál. Ez előnyt jelenthetne a szuszpenziós rendszerrel szemben, viszont a magkallusz regeneráció hatékonyságát nem tartom megfelelőnek, mely fontosabb paraméter a regeneráció gyorsaságánál.

Az általunk végzett magkallusz transzformációs kísérletek eredményei alapján (lásd Eredmények 1.1.-es fejezete, illetve 3. táblázat) a magkallusz nem igazán bizonyult alkalmas objektumnak a kísérleteinkhez, mivel a kontroll kalluszokból is csak csekély számban sikerült növényt regeneráltatni. A 420 transzformált kalluszból csupán 184 zöldülő kalluszt, - ez kevesebb, a kiindulási maganyag felénél (43,8%) - 46 fehér regeneránst és 2 zöld növényt kaptunk. A nem transzformált kontroll kalluszokból pedig csupán 39 zöld növény fejlődött, ami szintén kevesebb a kiinduló maganyag felénél (39%). Tehát maga a rizs magkallusz regenerációs rendszer nem optimális. Nem biztos, hogy ennek a rendszernek a hatékonyság növelésén megéri tovább dolgozni. Érdemesebb lenne más explantumok felé tekinteni, úgy mint fiatal sejt-szuszpenzió vagy éretlen embrió tenyészet, melyek intenzívebb szaporodásra képesek és ez által feltételezhetően nagyobb mennyiségű regeneráns állítható elő belőlük.

Az érett magokból indított kallusz kultúrák transzformációja után MS-I és MS-II regenerációs táptalajon neveltük és szelektáltuk a kalluszokat. A kettő táptalaj regenerációra

gyakorolt hatásai között nem találtunk szignifikáns különbséget, mind a kettő összetételű közeg tökéletesen alkalmas kallusz proliferációra és fenntartásra.

5. 1. 2. Szkutellum kalluszosítás kiértékelése

Szkutellumok transzformálása esetén a preparátum keményebb állaga miatt a mikrohordozó mélyebb sejtrétegekbe való bejutása nehezebb. Szkutellum transzformáció során azonban már a kalluszosodás előtt integrálódhat a transzgén a plaztomba, így nagyobb eséllyel fejlődhetnek ki belőlük homoplasztomikus növények. További előnye, hogy a szkutellumokat mikroszkóp alatt preparáltuk, így teljesen eltávolítottuk róluk az endospermiumot, mely biztosította a kalluszok kizárólagosan szkutellumból való kifejlődését. A három lehetőség közül a szkutellumok transzformációra való felkészítése igényli a legrövidebb időt. A kísérlet során mutatott regenerációs hatékonysága is magas. A 420 transzformált szkutellumból összesen 728 fehér növényt kaptunk, és 8 zöld vonalat. Ez a kiindulási anyag közel duplája. A 120 kontroll szkutellumból 166 zöld növény és 45 fehér növény regenerálódott, mely több mint másfélszerese a kezdeti szkutellum számnak. A viszonylag magas regenerációs százalék alapján a szkutellumot a magkallusznál alkalmasabb objektumnak tartom a kloroplasztisz transzformáció megvalósításához.

A 37 zöld vonal a kontroll szkutellumokból, 30%-os növényregenerálási hatásfokot jelent (4. táblázat). Ez alapján kijelenthető, hogy a regenerációs folyamat maga jól működő, és jóval hatékonyabb, mint a mag transzformáció esetében. Azonban a szelekciós ágens nem tartalmazó táptalajon, a kontroll kalluszokból kifejlődött fehér növények létjogosultságának magyarázata bonyolultabb.

Látható továbbá az is, hogy a transzformáns szkutellumok 37%-ából kaptunk növényeket, a kontroll kalluszoknak pedig 37,5%-ából, ami közel azonos érték. Ez újabb bizonyítéka a regenerációs rendszer hatékonyságának, mivel a kontrollok által előállított növényszám mutatja az aszeptikus, *in vitro* körülmények közt regeneráltatható növényszámot, amit a transzformáns kalluszokból regenerált növények száma elért.

A kontroll szkutellumokból fejlődött 45 növény 82%-át zöld növények tették ki, a transzformált szkutellumokból fejlődött 154 növény 95%-át fehér növények alkották. A 8 zöld vonalról még nem sikerült bebizonyítani, hogy transzplasztomikusak, így sajnos egyelőre nem beszélhetünk transzformációs hatékonyságról.

5. 1. 3. Sejtszuspenzió kiértékelése

A sejtszuspenzió előnyét a kisméretű aggregátumok adják, melyekbe egyenletesebb eloszlásban juttatható be a transzgén, emellett a tápanyagok, és a szelekciós ágens is közvetlenebbül, méretéhez képest nagyobb felületen érintkezik a sejtekkel. Regenerációs

eredményeink még nincsenek a kísérletből, azonban korábbi kísérletek eredményei magas regeneráló képességet mutatnak szuszpenziós kultúrából (Mitykó J. szóbeli közlése, GONZÁLEZ-CORONEL, 2001).

A T-309-es fajta esetében a szkutellumok mikroszkóp alatti precízebb megtisztítása visszavetette a szuszpenziós kultúra indítását. Szépen növekedtek, megfelelően kocsonyásodtak, de mégsem osztódtak. Több hónapnyi fenntartás után fel kellett számolni a kultúrát. Ezzel szemben a szabad szemmel preparált szkutellumokból - melyeken maradtak endospermium darabok - indított szuszpenziók, tökéletesen működtek. Feltételezhető, hogy érzékenyek a vízvesztésre, melyet a mikroszkóp lámpája előidézhet és lehetséges, hogy a stresszre is.

Azok a Taipei-309 fajtából indított szuszpenziók, melyeknél a szkutellumokat először kalluszosító LS-2.5 táptalajon tartottunk fent 1-2 hétig, hamarabb kocsonyásodtak, majd tisztultak ki és képeztek aggregátumokat, mint az AA2-táptalajról indult társaik.

A korábbi tapasztalatok szerint az alkalmazott AA2 táptalajnak gyakran módosult a pH-ja a passzálások ideje alatt és a meglehetősen pH függő sejtszuszenziók nem tudtak megfelelően szaporodni és osztódni ebben a számukra kevésbé optimális közegben. A problémát 5 mM MES (2-(*N-morpholino*)ethanesulfonic acid) puffer hozzáadásával sikeresen kiküszöböltünk.

5. 1. 4. Taipei-309 és Kyrara regenerációja

A magkalluszok transzformációját, illetve a szelekció megindítását követően a Kyrara fajta kalluszai hamar, 2-3 héten belül elkezdtek zöldülni, szemben a T-309 fajta kalluszaival, melyeken később, 5-6 hetesen kezdett megjelenni a zöld foltosodás.

A transzformációt követő 3-4. héten a T-309 fajta kalluszai gyors növekedésnek indultak, vagyis nagymérvű sejtszaporodás volt megfigyelhető, míg a Kyrara kalluszai kisebbek voltak, sejtosztódása jóval lassabb volt.

Ezek a jelenségek a Kyrara fajta gyorsabb regenerációs képességét támasztják alá a T-309 fajtával szemben. Emellett bizonyítja a T-309 fajta jobb regenerációs képességét a Kyrarával szemben, ami azt jelenti, hogy 1 explantumból nagyobb számú sejt, illetve növény regeneráltatható. Ezek alapján elmondható, hogy kisebb számban, de hamarabb regeneráltatható növény a Kyrara fajta kalluszaiból, a T-309 fajtából, lassabb folyamaton keresztül, nagyobb számú növény regeneráltatható.

420 magkallusz transzformálásával 2 zöld vonalat sikerült előállítanunk, egy a Kyrara fajtából, egy a T-309 fajtából fejlődött ki. Emellett 46 kifehéredő növényt kaptunk, melyből 26 növényt a Kyrara fajta, 20 növényt a T-309 fajta adott. Közel azonos számú fehér és zöld növény regenerálódott a T-309 és a Kyrara fajtából egyaránt. A két fajta növényregenerációs képességében nem tudtunk szignifikáns különbséget találni. Ez a megfigyelésünk tehát – a magkallusz

explantumok esetében - nem támasztja alá a két fajtánál közismert, regenerációs hatékonyság szintjén jelentkező különbségeket. Azonban meg kell jegyezni a fentiekben levezetett magkallusz regenerációs protokoll tökéletlenségét, ami alapján ez az eredmény falsnak tekinthető.

5. 2. Transzformációs rendszer értékelése

Az eddig sikeres kloroplasztisz rendszerek (KHAN & MALIGA, 1999 és LEE et al. 2006) eredményeinek (lásd 4. 2. fejezet), illetve a saját részeredményeink összevetése alapján megállapítható, hogy a Streptomycin, mint szelekciós szer koncentrációja 100-500 mg/l közt sikeresen alkalmazható, azonban a transzplasztomikus organellumok kellő feldúsítását, homoplasztomikus növény kinevelését így sem sikerült elérniük.

A pMSK49-es plazmidban található fúziós *FLARE-S* gén, illetve a konstrukcióba külön beépített *aadA* és *gfp* génjei, kiválóan alkalmazhatóak marker génekként.

A sejtszuspenziók kiváló explantumnak bizonyultak rizs kloroplasztisz transzformálásához, melyet Khan & Maliga, illetve Mitykó J. korábbi kísérleteinek eredménye támaszt alá. A magkalluszok Lee et al. kísérleteiben transzformánsok létrehozásához megfelelően működtek, melyben hozzávetőlegesen 4000 kalluszból (100-120 Petri csészényi transzformált kallusz) 2 független zöld vonalat kaptak, amely 6 növényt jelentett. Ezt a regenerációs hatékonyságot azonban csekélynek tartom. Ezen ráta figyelembevételével illetve a saját magkallusz kísérletünk során tapasztalt rossz regenerációs hatékonyság alapján transzformáláshoz nem tartom jó explantumnak a magkalluszt. A szkutellum transzformálás során tapasztalt eredményeink azonban egyértelműen kiválóak, így azokat tökéletes explantumnak tartom biolisztikus transzformáláshoz.

0,6 µm-es aranyzemcséhez kötöttük a konstrukciót. A génbelövő készülék beállításainak megváltoztatásával próbáltunk optimalizálni a transzformációs hatékonyságot. A kezdeti beállítások a következők voltak: nyomás 70 bar, vákuum -0,7 bar, a célszövet felülről tekintve a 4. emeleten, 6 lövés Petri csészénként (60 µl mikrohordozó). Először a lövések számát emeltük meg 8-10-re, majd a nyomást csökkentettük 60 bar-ra, illetve a célszövetet helyeztük át a 3. később a 2. emeletre.

A lövésszámot több részecske sejtbe való bejuttatása érdekében emeltük meg, amivel nő a beépülés lehetősége is. A célszövet áthelyezése magasabb emeletre, annak a hipotézisnek a megvizsgálása érdekében történt, miszerint az aranyzemcsék nem jutnak el az explantumok mélyebb sejtrétegeibe. Amennyiben a mikrolövedéknek rövidebb utat kell megtennie a célszövetig, úgy csökken a ráható ellenállás és nagyobb sebességgel tud becsapódni a sejtekbe, ezáltal mélyebbre hatolni. Ebben az esetben a 2. emeleten való lövés már túl közelinek bizonyult, az aranyrészecskék szórási átmérője erősen beszűkült, és nehezebben is regeneráltak a 2. emeleten belőtt explantumok. A 3. és 4. emeleten való transzformálás tekintetében nem láttunk igazán

különbséget. A változtatások érdemi hatásait, eredményeit nem ismerjük, ugyanis még nem sikerült előállítanunk transzplasztomikus rizst.

A szkutellum transzformáció során megjelent 8 vonal, és a további kísérletek ígéretesek a kiváló regenerációs eredmények tükrében. Miután a szelekciós táptalajon túlélő zöld növények transzformáns mivoltát nem sikerült molekulárisan bebizonyítani, így ezen növények eredetét meghatározó további alternatívák kutatásával is foglalkozunk, mint például az esetlegesen kialakult *Streptomycin* rezisztencia mutációjának felkutatása, molekuláris bizonyítása. Emellett éretlen rizs embriók kloroplasztisz transzformálását tervezzük a közeljövőben, melyről még nem található irodalom.

6. Összefoglalás

Célunk egy, a rizs növényen jól alkalmazható és reprodukálható *in vitro* növényregenerálási rendszer kikísérletezése, majd ennek segítségével egy sikeres kloroplasztisz transzformációs rendszer kialakítása.

Globális célunk egy, a koegzisztenciának megfelelő, úgynevezett „környezetbiztonságos” génmanipulációs rendszer létrehozása, és annak felhasználása a világ mezőgazdaságának élelmiszerellátási küzdelmében. Ezen felül a gabonafélék kutatásainak segítése a rizs kiváló modellnövény szerepe alapján. Ipari jellegű felhasználhatósága e technikával módosított rizsnek szerteágazó, ehető vakcina előállítására, ipari,- gyógyszeripari termékek nagymennyiségű termeltetésére, csökkent allergén hatású rizsliszt készítésére alkalmas.

A kísérletek a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban folynak. Két fajtaival dolgozunk, az *Oryza sativa*, L. sp. japonica termesztési csoportjából származó Taipei 309 és az *Oryza sativa*, L. cv. Kyrara fajtaival. Az alábbi explantumok összehasonlító vizsgálatát végeztük el: érett magból differenciált magkalluszok, érett magból preparált szkutellumok és szkutellum tenyészetből indított finom embriogén sejtszuszpenziók. Direkt transzformációs módszert alkalmaztunk a hasznos gén plaztomba juttatásához, GENEBOOSTER™ génbelövő készülék segítségével. A génbelövést a pMSK49 vektor konstrukcióval végeztük el, mely tartalmazza az *aadA* (aminoglycoside 3'-adenylyltransferase) és *gfp* (green fluorescent protein) géneket, illetve specifikusan beépített rizs plaztisz genom szakaszokkal („targeting” régió) rendelkezik. Az *aadA* több antibiotikum rezisztenciát kódol, melyből mi a *Streptomycin* rezisztenciát használjuk szelektáláshoz, 100 mg/l mennyiségben a táptalajhoz adva, minden explantum vizsgálata esetén.

A regenerációs kísérletek folyamatban vannak. A szelekciós táptalajon kapott zöld regeneránsok *gfp* gén expresszióját fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáljuk. Az ígéretesnek vélt növények molekuláris vizsgálatát szintén elkezdtük, azok transzplasztomikus vagy mutáns eredetének bizonyítására. PCR-analízist végzünk az *aadA*, és *gfp* génekre tervezett specifikus primerpárokkal. Az eddig kapott zöld vonalokról azonban még nem sikerült bebizonyítani transzplasztomikus mivoltukat.

Eredményeinket röviden összefoglalva elmondhatjuk, hogy:

- 1.Sikeresen beállítottunk és teszteltünk három különféle *in vitro* növényregenerációs rendszert rizsben, melyek a következő explantumokon alapulnak: érett magkallusz, szkutellum és finom sejtszuszpenzió.

- 2.Az elkalluszosított szkutellumot, mint explantumot, ismereteink szerint elsőként próbáltuk ki rizs kloroplasztisz transzformációs kísérletekben.

3.A bioliztikus módszerrel végzett kloroplasztisz transzformáció során kaptunk zöld regeneránsokat, melyek folyamatos *Streptomycin* szelekció mellett sem fehérednek ki. Ez a jelenség ezen vonalak transzplasztomikus vagy mutáns eredetére enged következtetni.

A jövőben éretlen rizs embriók regenerációs és transzformációs rendszerének kidolgozását tervezzük. Továbbá folytatni szeretnénk a molekuláris vizsgálatokat annak érdekében, hogy a szelekciós táptalajon túlélő zöld növények transzplasztomikus vagy mutáns eredetét bizonyítani tudjuk. Emellett a sikeres modell kísérleteket követően a foszfinotricin hatóanyagot tartalmazó Basta (Finálé) gyomirtószer rezisztenciát okozó fehérje (foszfinotricin acetiltranszferáz) génjének (*bar* gén) beépítését tervezzük a rizs kloroplasztisz genomjába.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek mind a gyakorlati munkában, mind pedig a dolgozat formai elkészítésében.

Köszönöm Dr. Jenes Barnabás tudományos főmunkatársnak, külső témavezetőmnek, hogy lehetővé tette diplomadolgozatom elkészítését; szakmai segítségére végig számíthattam. Dr. Kiss Erzsébet tanszékvezető, belső konzulensem, tanácsaival mindvégig segítette munkámat.

Továbbá köszönöm Dr. Dudás Brigittának a molekuláris biológiai technikák elsajátításában és megértésében nyújtott segítségét.

Szakmai felkészültségét a témához való feltétlen segítőkészségét köszönöm Dr. Mitykó Juditnak. A jelen kísérlet kidolgozásának alapját, az elméleti és szakmai kompetenciám kialakulását egyaránt neki köszönhetem. Ő volt az, aki mindvégig támogatott, ösztönzött a téma mind teljesebb kidolgozására, az elmélethez kapcsolódó kísérletek létrehozására. A kísérletek helyszínének biztosítását ugyancsak neki köszönhetem.

8. Irodalom jegyzék

BEVAN, M. W.; CHILTON, M. D., (1982): Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors. *Journal of Molecular and Applied Genetics* (1982), 1 (6), 539-46.

BLOWERS, A. D., BOGORAD, L., SHARK, K. B., SANFORD, J. C. (1989): Studies on *Chlamydomonas* Chloroplast Transformation: Foreign DNA Can Be Stably Maintained in the Chromosome. – *Plant Cell*, 1 (1): 123-132.

BOYNTON, J. E., GILLHAM, N. W., HARRIS, E. H., HOSLER, J. P., JOHNSON, A. M., JONES, A. R., RANDOLPH-ANDERSON, B. L., ROBERTSON, D., KLEIN, T. M., SHARK, K. B., SANFORD, J. C. (1988): Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. – *Science*, 240 (4858): 1534-1538.

CHU, C.C., WANG, C. C., SUN, C. C., HSÜ, C., YIN, K. C., CHU, C. Y., BI, F. Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. – *Scientica Sinica*, 18, 659-668.

CAO, J., DUAN, X., MCELROY, D., WU, R. (1992): Regeneration of herbicide-resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension-culture cells. – *Plant Cell Reports*, 11 (11): 586-591.

DATTA, S. K., DATTA, K., SOLTANIFAR, N., DONN, G., POTRYKUS, I., (1992): Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. – *Plant Molecular Biology*, 20 (4): 619-629.

DE MARCHIS, F., WANG, Y., STEVANATO, P., ARCIONI, S., BELLUCCI, M. (2009): Genetic transformation of the sugarbeet plastome. – *Transgenic Research*, 18(1): 17-30.

DUFOURMANTEL, N., PELISSIER, B., GARCON, F., PELTIER, G., FERULLO, J. M., TISSOT, G. (2004): Generation of fertile transplastomic soybean. - *Plant Molecular Biology*, 55 (4): 479-489.

GARRIS, A. J., TAI, T. H., COBURN, J., KRESOVICH, S., MCCOUCH, S. (2004): Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L.. – *Genetic Society of America*, 169: 1631-1638.

GYULAI G., (2010): Természetvédelmi genetika. – Egyetemi jegyzet. - Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Gödöllő, pp: 79-81, 143.

GONZALEZ-CORONEL, A. S., JENES, B. (2001): Evaluation of a plant regeneration test of embryogenic cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). – In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (5): 658-666.

HERRERA-ESTRELLA, L. (1983): Transfer and expression of foreign genes in plants. PhD thesis. - Laboratory of Genetics, Gent University, Belgium.

HESZKY L., FÉSÜS L., HORNOK L. (2005): Mezőgazdasági Biotechnológia. – Agroinform Kiadó, Budapest, pp: 121-122.

HESZKY L. (2011): Géntranszfer technikák. – Agrofórum 2: 90-94.

HESZKY L. (2011): GM fajták előállítása kloroplasztisz transzformációval. – Agrofórum 10: 72-77.

HIDVÉGI SZ. (2007): Növénytermesztés - Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma, Agrárgazdasági és Vidékfejlesztési Kar, Debrecen, pp. 7, 68-72.

HOU, B. K., ZHOU, Y. H., WAN, L. H., ZHANG, Z. L., SHEN, G. F., CHEN, Z. H., HU, Z. M. (2003): Chloroplast transformation in oilseed rape. – Transgenic Research, 12 (1): 111-114.

JENES, B., BITTENCOURT, P. A. L., CSANYI, A., PAUK, J., NAGY, I., TOLDI, O., BALAZS, E. (1996): The GENEBOOSTER – a new microprojectile bombardment device – for genetic transformation of plants. – Plant Tissue Culture And Biotechnology, 2: 42-51.

JENES, B., TOLDI, O., BITTENCOURT, P. A. L., NAGY, I., CSÁNYI, Á., ERVIN, B. (1997): The GENEBOOSTER™ designed and developed by Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő. - Hungarian Agricultural Research, 6 (3): 14-17.

KASZAB L. (2004): Növénytan. - Egyetemi jegyzet. - Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő, pp. 124-147.

- KHAN, M. S., MALIGA, P. (1999): Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. - *Nature Biotechnology*, 17 (9): 910-915.
- KLEIN, T. M., WOLF, E. D., WU, R. & SANFORD, J. C. (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. - *Nature* 327, 70-73.
- KUMAR, S., DHINGRA, A., DANIELL, H. (2004a): Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. – *Plant Physiology*, 136 (1): 2843-2854.
- KUMAR, S., DHINGRA, A., DANIELL, H. (2004b): Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. – *Plant Molecular Biology*, 56 (2): 203-216.
- LEE, S. M., KANG, K. S., CHUNG, H., YOO, S. H., XU, X. M., LEE, S.B., CHEONG, J.J., DANIELL, H., KIM, M. (2006): Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. – *Molecules And Cells*, 21 (3): 401-410.
- LELIVELT, C. L. C., MCCABE, M. S., NEWELL, C. A., DESNOO, C. B., VAN DUN, K. M. P., BIRCH-MACHIN, I., GRAY, J. C., MILLS, K. H. G., NUGENT, J. M. (2005): Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). - *Plant Molec. Biol.*, 58 (6): 763-774.
- LINSMAIER, E. M., SKOOG, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. - *Physiol Plant* 18:100-127.
- LIU, C. W., LIN, C. C., CHEN, J., TSENG, M. J. (2007): Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) by particle bombardment. - *Plant Cell Rep* 26: 1733–1744.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiol Plant* 15 (3): 473-497
- MÜLLER, A. J., AND GRÁFE, R. (1978): Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. – *Molecular and General Genetics*, 161(1): 67-76.
- NUGENT, G. D., COYNE, S., NGUYEN, T. T., KAVANAGH, T. T., DIX, P. J. (2006): Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. - *Plant Sci.*, 170: 135–142.

OKUMURA, S., SAWADA, M., PARK, Y. W., HAYASHI, T., SHIMAMURA, M., TAKASE, H., TOMIZAWA, K. (2006): Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. - Transgenic Res., 15: 637–646.

OSZVALD, M., GARDONYI, M., TAMAS, C., TAKACS, I., JENES, B., TAMAS, L. (2008A): Development and characterization of a chimaeric tissue specific promoter in wheat and rice endosperm. - In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 44: 1–7.

OSZVALD, M., KANG, T. J., JENES, B., KIM, T. G., TAMAS, L., YANG, M. S. (2008B): Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm. - Mol. Biotech., 40: 261–268.

POTRYKUS, I. (2001): Turning Point Article, The ‘Golden rice’ tale. – In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 37 (2): 93-100.

POWELL, A. P., NELSON, R. S., DE, B., HOFFMAN, N., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T., BEACHY, R. N. (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. – Science, 232:738-743.

RUF, S., HERMANN, M., BERGER, I. J., CARRER, H., BOCK, R. (2001): Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. - Nature Biotechnology, 19 (9): 870-875.

SHAH, D. M., HORSCH, R. B., KLEE, H. J., KISHORE, G. M., WINTER, J. A., TUMER, N. E., HIRONAKA, C. M., SANDERS, P. R., GASSER, C. S., AYKENT, S., SIEGEL, N. R., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T., (1986): Engineering herbicide tolerance in plants. – Science, 233:478-481.

SIDOROV, V. A., KASTEN, D., SHENG-ZHI, P., HAJDUKIEWICZ, P. T. J., STAUB, J. M., NEHRA, N. S. (1999): Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. - The Plant Journal, 19 (2), 209-216.

SIKDAR, S. R., SERINO, G., CHAUDHURI, S., MALIGA, P. (1998): Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. - Plant Cell Reports, 18 (1-2): 20-24.

SINGH, A. K., VERMA S. S., BANSAL, K. C. (2010): Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). - Transgenic Research, 19:113-119.

SKARJINSKAIA M., SVAB, Z., MALIGA, P. (2003): Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicaceae. - Transgenic Research, 12: 115-122.

SMITH, E. F., TOWNSEND, C. O. (1907): A plant tumor of bacterial origin. - Science, 25: 671-673.

SVAB Z., HADUKIEVICZ P., MALIGA P. (1990): Stable transformation of plastids in higher plants. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87 (21): 8526-8530.

TAMÁS, L. & OSZVALD, M. (2011): Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében. - Magyar Fehér Könyv, 13: 82-88.

TORIYAMA, K., HINATA, K. (1985): Cell suspension and protoplast culture in rice. - Plant Sci., 41:179-183.

TORIYAMA, K., HINATA, K. (1988): Diploid somatic-hybrid plants regenerated from rice cultivars. – Theor. Appl. Genet., 76: 665-668.

TUBA Z., (2006): Növényélettani alapok. – Egyetemi jegyzet. - Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Növénytan és Növényélettani Tanszék, Gödöllő, pp: 9-10, 22-26.

TUBA Z., SZERDAHELYI T., ENGLONER A. & NAGY J. (2007): Botanika II. – Bevezetés a növénytanba, algológiába, gombatanba és a funkcionális növényökológiába –Rendszertan - Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt., Budapest

VAN LAREBEKE, N., ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN DEN ELSACKER, S., ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R. A., SCHELL, J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. – Nature, 252, 169 – 170.

VERMA, D., DANIELL, H. (2007): Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. - Plant Physiology 145: 1129-1143.

ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., AND SCHELL, J.,(1974): Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. -Journal of Molecular Biology, 86, 109–127 (1974).

ZHANG, W., WU, R. (1988): Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. – Theor. Appl. Genet., 76 : 835-840.

ZUBKO, M. K., ZUBKO, E. I., VAN ZUILEN, K., MEYER, P., DAY, A. (2004): Stable transformation of petunia plastids. - Transgenic Research, 13 (6): 523-530.

MAGYAR FEHÉR KÖNYV (2011): Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében. 13. fejezet: 82-88.

<http://www.muszeroldal.hu/MMK/nr65/jenei.html>

9. Melléklet

Összetevők (mg/l)	AA2	N6-3	MS-I	MS-II	LS-2.5
Markoelemek					
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	166	440	440	440
KH ₂ PO ₄	170	400	170	170	170
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	185	370	370	370
KCl	2950				
NH ₄ NO ₃			1650	1650	1650
KNO ₃		2830	1900	190	190
(NH ₄) ₂ SO ₄		463			
Mikroelemek					
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025		0,025	0,025	0,025
H ₃ BO ₃	6,2	1,6	6,2	6,2	6,2
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25		0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	4,4	22,3	22,3	22,3
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025		0,025	0,025	0,025
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	1,5	8,6	8,6	8,6
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85
Na ₂ EDTA	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25
Vitaminok és cukrok					
Inozitol	100	100	100	100	100
Nikotinsav	0,5	1	0,5	0,5	
Piridoxin-HCl	0,1	0,5	0,5	0,5	
Tiamin-HCl	0,5	0,5	0,1	0,1	1
Szacharóz	30000	30000	30000	30000	30000
Aminosavak					
Glicin	75	2	2	2	
L-glutamin	877				
L-aszpartát	266				
L-arginin	228				
Casein		1 (g)			
Hormonok					
2,4-D	2	3			2,5
Kinetin	0,2			2	
GA3	0,1				
NAA			1	2	
BAP			2		
Gelrite		2	2	2	3,5
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

5. táblázat: A kísérlet során alkalmazott táptalajok összetételei.

10. Nyilatkozat

Alulírott Kováts Gyöngyi Zsuzsa a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági Biotechnológus MSc. Szak nappali tagozat hallgatója kijelentem, hogy a szakdolgozatomat nem megengedett segítség nélkül, saját magam készítettem és csak az Irodalomjegyzékben megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból vettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

.....