

XXXI. OTDK Biológia Szekció

***NDUSF8a* gén mutációjának hatása az *Arabidopsis thaliana*
stressz tűrő képességére**

Készítette: Kiss Tünde

Biológia BSc III. évfolyam

Témavezető: Dr. Zsigmond Laura

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék



2012

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA	abszcizinsav
ADP	adenozin- difoszfát
AOX	alternatív oxidáz
ATP	adenozin- trifoszfát
FADH	flavin- adenin- dinukleotid
H ₂ O ₂	hidrogénperoxid
HO ₂ [•]	hidroperoxil gyök
LB	a T-DNS baloldali határszekvenciája
MDA	malondialdehyd
NADH	nikotinamid- adenin- dinukleotid
¹ O ₂	szinglet oxigén
O ₂ ^{•-}	szuperoxid gyökanion
OH ⁻	hidroxil gyök
PAM	klorofill fluoreszcencia változás mérés
PQ	paraquat
RB	a T-DNS jobboldali határszekvenciája
ROS	reaktív oxigénformák
RT- PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
TCA	triklór- ecetsav
T-DNS	Ti plazmid transzfer-DNS-e
UQ	ubikinon

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	2
Tartalomjegyzék	3
1.Bevezetés.....	5
2.Irodalmi áttekintés	6
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> , a modellnövény.....	6
2.2. A mitokondrium és az energiatermelés	7
2.3. Növényeket érintő stressz hatások	10
2.4. Ozmotikus stressz.....	11
2.5. Szárazság stressz	12
2.6. Oxidatív stressz	13
2.7. Az oxigén reaktív formái.....	13
3.Célkitűzések	15
4.Anyagok és módszerek.....	16
4.1. Növénynevelés	16
4.2. Felületi magsterilizálás.....	16
4.3. Molekuláris biológiai technikák.....	17
4.3.1. Genomi DNS izolálás	17
4.3.2. Polimeráz láncreakció.....	17
4.3.3. DNS fragment izolálás.....	17
4.3.4. RNS-izolálás és génkifejeződési vizsgálatok	18
4.4. Klorofill fluoreszcencia változás mérése	18
4.5. H ₂ O ₂ tartalom kvantitatív meghatározás	19
4.6. Lipid peroxidáció mérése	19
4.7. Bioinformatikai programok.....	20
5.Eredmények	21
5.1. Homozigóta egyedek keresése, szűrés az elsődleges vizsgálatokhoz	21
5.2. Elsődleges szűrések.....	22
5.3. Növekedési tesztek.....	24
5.4. Szekvencia- vizsgálatok	25
5.5. <i>ndusf8a-1</i> és <i>ndusf8a-2</i> mutánsok jellemzése	26
5.6. Klorofil fluoreszcencia változás mérése	30

5.7. Lipid peroxidáció mérése	32
5.8. H ₂ O ₂ kvantitatív meghatározása.....	34
6. Összefoglaló	35
7. Nyilatkozat	36
8. Köszönetnyilvánítás.....	37
8. Irodalmi hivatkozások.....	38
9. Függelék	42

BEVEZETÉS

Nagyon hosszú ideje vizsgált állatoknál és növényeknél is, hogy hogyan alkalmazkodnak a manapság egyre inkább változó környezetükhöz. Milyen evolúciós, illetve egyed, faj szinten megnyilvánuló változások segítik ebben. Hogyan tudnánk ebbe mi, emberek is beleszólni. Tudatosan létrehozni olyan fajokat, amelyek könnyebben adaptálódnak, nagyobb toleranciát mutatnak a különböző stressz hatásokra. A növényeknél kulcsfontosságú tényező a víz megfelelő formájú megléte, ez a földi élet alapja. A vízstressz és emellett majdnem minden más stressz eredményeképpen oxidatív stressz lép fel a növényekben. Ennek következtében reaktív oxigéngyökök (ROS) keletkeznek, amik oly mértékben képesek károsítani a sejteket, hogy a növény belepusztulhat.

A ROS létrejöttének két fő helye van a növényekben: a fotoszintézis és a mitokondriális légzési lánc. Ez utóbbi fontos szerepet játszik a sejtek redox-homeosztázisának fenntartásában, így az oxidatív stressz hatásokra adott válaszokban is. Az ebben betöltött szerepe már régen felkeltette a kutatók érdeklődését. Azt vizsgálják, hogy a benne lévő komplexek melyike befolyásolja a különböző stressz folyamatokkal szembeni érzékenységet, milyen mitokondriális fehérjéket kódoló gének szabályozzák ezeket a reakciókat. Ezeket a géneket még nem mind térképezték fel. Munkáink során ilyen géneket próbáltunk megtalálni és leríni *Arabidopsis thaliana*-ban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. *Arabidopsis thaliana*, mint modellnövény

A magyarul lúdfűként ismert, keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjába tartozó *Arabidopsis thaliana* a biológiai tudományok területeinek kedvelt modellorganizmusa. Kedvező tulajdonságait használják ki többek között molekuláris biológiai, stressz élettani, genetikai és növénybiológiai kutatásokban is. Ahhoz, hogy ebből az egyetlen fajból általánosítani tudjunk egy nagyobb növénycsoport jellegzetességeire, szükséges az, hogy a mintanövény rendelkezzen bizonyos sajátosságokkal. A lúdfű ilyen kedvező tulajdonságai közé tartozik az olcsó termesztése, rövid életciklusa (ökotípustól függően: 6-8 hét), kicsi mérete, önbeporzó és könnyen keresztezhető sajátossága (Koncz Csaba és Rédei György, 1999). A magasabb rendű növényfajok feltűnően sok hasonlósággal rendelkeznek mind szervezeti felépítés, mind a környezethez történő alkalmazkodás terén. Ezek az egyezések és bizonyos evolúciós lépések arra engednek következtetni, hogy e fajok génösszetétele között elég sok azonosság figyelhető meg. A nagymértékben analóg génkollekciót tartalmazó növények közül az *Arabidopsis thaliana* rendelkezik a legkisebb sejtmagi DNS-sel, így könnyebben felhasználható a molekuláris kutatásokban (Meyerowitz, 1992).

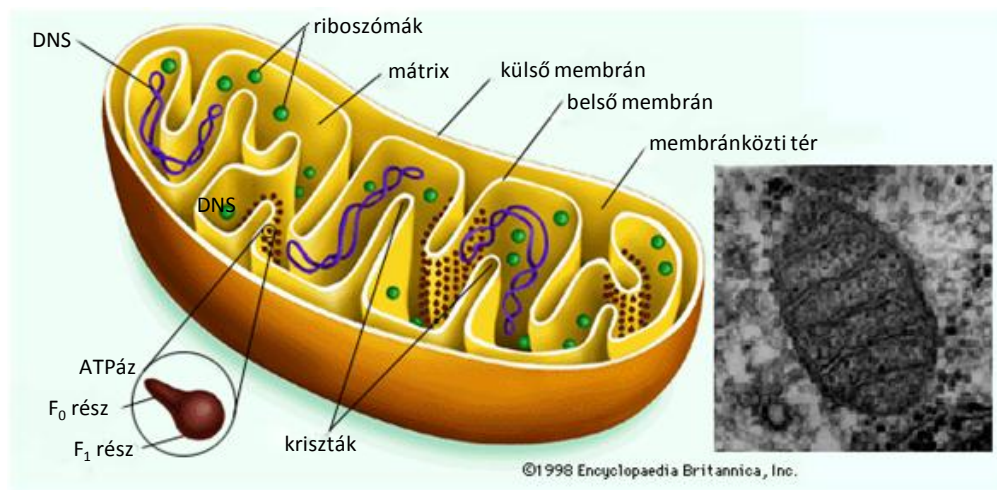
Küllemét tekintve 20-25 cm magas, fehér virágú növény. Termése becő, melyben 20-30 darab mag is megtalálható. A kifejtett növény kedvező körülmények között több ezer magot is hozhat és ez nagyobb populációk eredményes vizsgálatát teszi lehetővé. A 80-as, 90-es évektől egy új fontos célpontja van a biológiai kutatásoknak: a különböző növények, állatok génjei, azok kifejeződése, illetve az általuk befolyásolt folyamatok felderítése. Mindehhez első lépésként a teljes nukleotid sorrend meghatározásával kerülhetek közelebb. Ez a magasabb rendű növények közül elsőként az *Arabidopsis* esetében (2000-ben) fejeződött be, köszönhetően a lúdfű egyik kulcsfontosságú tulajdonságának, kevés kromoszómaszámának. Az *Arabidopsis* haploid sejtmagi DNS-e körülbelül 100 Mb, 10-100-ad része a legtöbb egy- és kétszikű növény sejtmagi DNS méretének, és öt kromoszómát alkot. Lényeges jellemzője továbbá, hogy a lúdfű genomja a többi magasabb rendű növényfajhoz viszonyítva aránylag kevés repetitív szekvenciát tartalmaz. (Balázs Ervin, Dudits Dénes, 1999)

Az eddigi kutatások alátámasztották, hogy az *Arabidopsis thaliana* kromoszómáin megtalálható gének kódolta információ felhasználható más magasabb rendű növényi fajok

tanulmányozásában is és séma szerint ráilleszthető szinte bármelyik növény tulajdonságaira, magyarázva ezzel akár az egyed/faj fenotípusának, felépítésének és a benne lejátszódó különböző (biokémiai, hormonális) folyamatok alapjait (Dr. Maróy Péter, Dr. Gauss János, Dr. Török Tibor: Genetika; Koncz Csaba és Rédei György, 1999).

2.2 A mitokondrium és az energiatermelés

A sejtekben kémiai energiát termelő, átalakító és tároló organelum a mitokondrium. Ha a sejt intenzív energiacserét folytat, benne sok mitokondrium található. Egy mitokondrium lehet gömb, vagy ellipszoid alakú. Ez a 0,5-1 μm átmérőjű és 1-7 μm hosszú sejtszervecske minden eukarióta szervezetben megfigyelhető. (Ádám Veronika, 2004). Az alakja és mérete meglepően hasonló a baktériumok felépítéséhez. Ez nem véletlen, hiszen az endoszimbionta elmélet szerint egy heterotróf aerob baktériumot bekebelezett egy ősi eukarióta sejtet, de nem emésztette meg, szimbiózis alakult ki köztük. (De Robertis és mntsai.,1970). Ezt a hipotézist támasztja alá a mitokondrium kettős membránstruktúrája, saját, gyűrű alakú DNS-e és fehérje-szintetizáló rendszere is. Kettős membránrendszere egy külső és egy belső membránból épül fel. Míg külső membránja sima, feszes, addig belső membránja felületnövelés céljából több helyen betüremkedik. E redőzöttség mértékéből ugyancsak következtethetünk a mitokondriumban lejátszódó energiacsere aktivitására. A két membrán közti tér (intermembrán tér) és a mitokondriális mátrix a membránok különböző mértékű permeabilitásának köszönhetően más - más anyagokat tartalmaznak. Az intermembrán tér összetétele- a porin fehérje által képzett nagy átmérőjű csatornáknak köszönhetően- gyakorlatilag megfelel a citoplazmáénak, hiszen így a külső membrán minden 5000 Da-nál kisebb molekulát átereszt. A belső membrán jóval specializáltabb, mivel permeabilitási tulajdonságai sokkal szűkebb intervallumban mozognak. A külső membrán 50-50%-ban lipidekből és fehérjékből épül fel, miközben a belső membrán fehérjetartalma 70%. A belső membrán tartalmaz a mitokondrium működéséhez szükséges fehérjéket, melyekhez kapcsolható az ATP-termelés. A fehérjetermelő rendszere megkérdőjelezi a mitokondrium prokarióta eredetét, hiszen bizonyos fehérjéket előállít magának, de vannak olyan fehérjéi is, amik termelése a gazdasejtre van utalva. A két organizmus közötti együttműködés rendkívül szorossá vált, s ma már nem lennének képesek egymás nélkül megélni (Novák Béla, 1994).

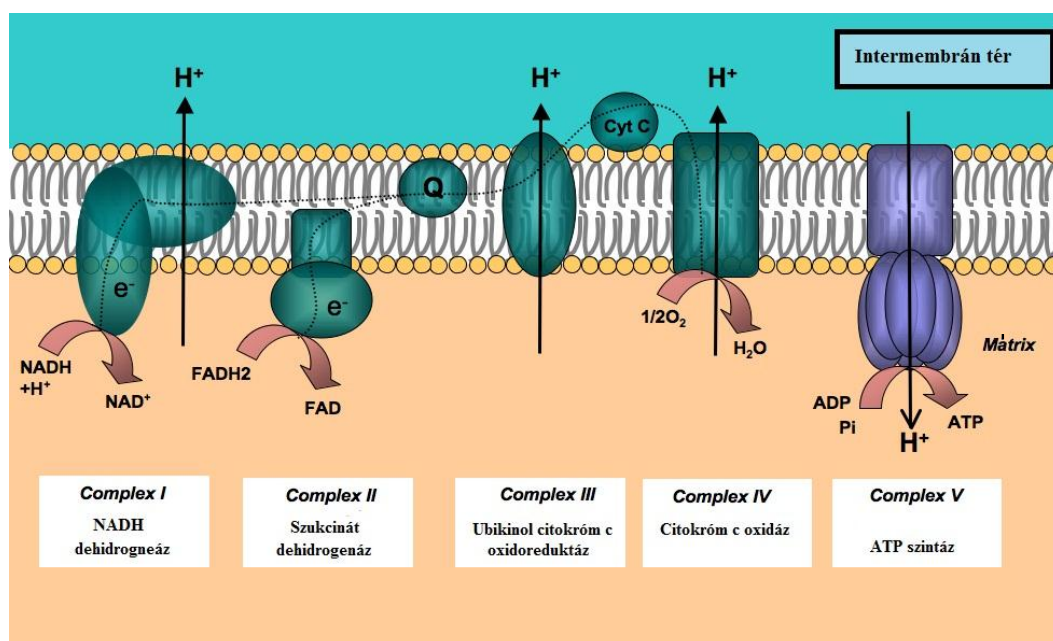
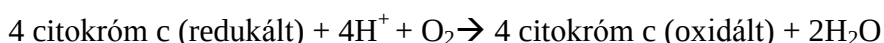


2.1 ábra: A mitokondrium szerkezete és elektromikroszkópos képe:
http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Cellular_Structures9-Mitochondria.htm,
<http://creationwiki.org/Mitochondria>)

A mitokondrium ad teret számos rendkívül fontos anyagcsere-folyamatnak, melyek közül jónéhánynak elengedhetetlen szerepe van a növényeknél, például stresszhelyzetekben az új közeghez történő alkalmazkodásban. A mitokondriumban zajló folyamatok közé tartozik a citromsav- ciklus (mitokondriális mátrixban) és a terminális oxidáció is. (Szarka András, 2008). A belső membránban megfigyelhető az ATP szintáz, és itt található számos enzimrendszer, illetve a légzési lánc elektronátvivő rendszere is. Ez utóbbinak meghatározó szerepe van. A redukált koenzimekről (NADH, FADH₂) rajta keresztül érik el az elektronok az oxigént, megóvva ezzel a növényt számos oxidációs folyamattól.

A mitokondriális elektrontranszport lánc hatására proton pumpálódik ki a mátrixból az intermembrán térbe. Ennek következtében elektrokémiai grádiens alakul ki, majd a membránpotenciálból és a létrejövő pH- különbségből proton motoros erő generálódik. A protonok a mátrixba az ATP-szintázon keresztül jutnak vissza passzív transzporttal, minek hatására csökken az iongrádiens és ADP foszforilálódik ATP-vé. A lánc négy komplexből épül fel. A két kezdő elektrondonor a NADH+ H⁺ és FADH₂, így a rendszerbe egyszerre két elektron (redukáló ekvivalens pár) lép be. A NADH az elektront az I. komplexhez (NADH dehidrogenáz) szállítja. A komplex NADH- kötőhelye megköti a mátrixban képződő NADH-t. Ennek különleges szerepe van a növényeknél, hiszen a redox egyensúly fenntartása mellett más metabolikus folyamatok enzim működéséhez is hozzájárul. Az I. komplexről az elektron az ubikinonra (UQ) jut el, mely így szemikinonná alakul, s képes

egy második elektron felvételére. Az ubikinon az elektront a III. komplexhez (ubiquinol citokróm c oxidoreduktáz) viszi, melyen keresztül az elektronok a citokróm c-re kerülnek át. A citokróm c-ről a IV. komplex (citokróm c oxidáz) felé szállítodnak az elektronok tovább, ami az I. és III. komplex mellett a harmadik protonpumpa aktivitással rendelkező komplex a légzési láncban. Elektronok a II. komplexről (szukcinát dehidrogenáz) is kerülhetnek az ubikinonra. A lánc utolsó tagjáról az elektronok az oxigén- molekulára kerülnek, mely így vízzé redukálódik (Plaxton és Podestá, 2006).



2.2. ábra: Mitokondriális légzési lánc

A mitokondriális légzési lánc komplexei; Q: ubikinon, Cyt C: citokróm c

(<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/fulltext.asp?bframe=figures.htm&doi=yes>)

Megfigyelhető egy ötödik komplex (ATP szintáz) is, mely szorosan kapcsolódik a légzési lánchoz, annak ellenére, hogy nem tagja annak. Az ATP szintáz két részből épül fel, melyek az F_0 és az F_1 . Az F_1 kilenc alegységből áll és az ADP foszforilációjáért felelős. Az F_0 képezi azt a csatornát, melyen keresztül a protonok visszajuthatnak a mátrixba.

A mitokondrium számos biotikus és abiotikus stresszre adott válaszreakció fontos szereplője. Így például részt vesz az ozmoprotektív prolin anyagcseréjében, központi szerepe van a növényi sejt redox homeosztázisának fenntartásában, a ROS (reaktív

oxigénygyökök) termelésben és semlegesítésben. A mitokondriumon belüli ROS képződés fő helye az elektrontranszport lánc I. és III. komplexe (Navrot és mtsai., 2007).

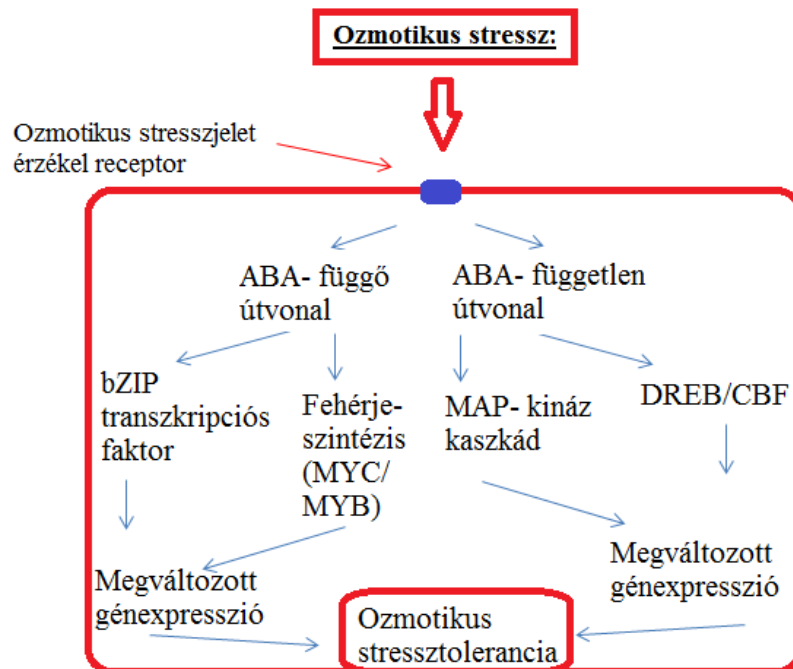
2.3. Növényeket érintő stressz hatások

A növényeket is csakúgy, mint bármely másik élőlényt, számos olyan hatás éri, amelyekre túlélésük érdekében kénytelenek a megszokottól eltérő választ produkálni, változtatni működésükön (Láng Ferenc, 2007). Mivel a világ minden részén, mindenféle környezetben elterjedtek (magas hegységek, szikes területek, sivatagok, óceánok mélye), esszenciális számukra, hogy időleges, illetve folyamatos traumáknak képesek legyenek ellenállni (Szalai István, 2006). Nélkülözhetetlen ez a specifikus védekezési képesség azoknál a növényeknél is, amik alapvetően nem élnek extrém körülmények között, hiszen például esőmentes, aszályos periódusok bárhol, bármikor előfordulhatnak.

Azt, hogy mit értünk stressz alatt már többen megfogalmazták, mégsem egyértelmű, hogy mi tartozik ebbe a fogalomkörbe. Vannak, akik úgy gondolják, a stressz a szervezet reakciója a külső hatásokra, vannak pedig, akik stressz alatt csak a körülményeket értik, s a következmények már más fogalomhoz tartoznak. Megegyeznek azonban abban, hogy ha stresszről beszélünk, akkor egy túlterhelt, erőltetett állapotról van szó (Láng Ferenc, 2007). Többféle csoportosítása létezik. Természetes és antropogén faktorok, biotikus és abiotikus stressz. Biotikus stressz kategóriájába tartoznak a vírus-, bakteriális-, gomba- eredetű hatások, illetve a rovarok okozta sérülések is. Abiotikus stressz csoportjába sorolhatók a herbicid-, a szárazság-, a fény-, a só-, illetve oxidatív-stressz faktorok, a szélsőséges hőmérsékletváltozás és a reaktív oxigénygyökök okozta hatások. A növényt először egy erősödő stressz hatás éri, amire az átlagostól eltérő működéssel felel, s közben életeréje csökken. Ha a stressz továbbra is fennáll, a növény elkezd hozzászokni, akklimatizálódni a helyzethez, majd szembeszáll, harcol az őt érő ingerek ellen. Ilyenkor helyreáll a működése, ám ha a stressz továbbra is aktív, a növény kimerül, s mivel tartalékai végesek, elpusztul (Szalai István, 2006). Az ozmotikus stressz hatások ellen a növények különbözőképpen védekezhettek. Erre az egyik megoldás az ozmoprotektáns molekulák termelése. Ilyenek például a prolin, a glicerin, a trehalóz és bizonyos fruktóz származékok is (Yokoi és mtsai., 2002).

2.4.Ozmotikus stressz

A szárazság- és a sóstressz, a szélsőséges hőmérsékletváltozás következményeként léphet fel ozmotikus stressz. Lényeges kapcsolat van a szárazság és a só stressz között, hiszen az egyik tovább növelheti a másik által okozott gondot. Esőmentes időszakokban azok a növények, amelyek alacsonyabb sótartalmú területeken élnek még kiterjedtebb sokknak vannak kitéve. Ez fékezi meg a növények növekedését, termőképességét például szikes területeken, s szab gátat a növénytermesztésnek. Régóta köztudott viszont, hogy egyes növények képesek többszörösét elviselni a hátráltató tényezőknek. Több generáció alatt eredményesen adaptálódtak a szélsőséges körülményekhez, ugyanis enélkül nem tudtak volna fennmaradni. Az adaptáció során bizonyos folyamataik, anyagsere útvonalai módosultak, s ezek segítségével képesek nagyobb ellenállóságot mutatni. A növényekben az ozmotikus stresszt egy a plazmamembránban található receptor érzékeli. A receptor aktiválja az ABA- függő és ABA-független szignál transzdukciós útvonalakat. Az ABA - függő utak egyike a MYB, MYC rendszer.



2.3. ábra: Szignáltranszdukciós válaszfolyamatok ozmotikus stressz hatására (Plant physiology 2006, Taiz, Zeiger)

Két ABA- független útvonal létezik. Egyik magába foglalja a MAP-kináz szignalizációs kaszkádot, a másik pedig a tartalmazza a DREB/CBF-el kapcsolatos transzkripciós faktorokat.(Shinozaki és Yamaguchi- Shinozaki után, 2000).

2.5. Szárazság stressz

A növekedés és a termőképesség oldaláról vizsgálva az egyik leglényegesebb és legkockázatosabb stressz hatás a vízhiány. A növények és gyakorlatilag minden élőlény életben maradásához alapvető feltétel egy olyan környezet, melyben a víz számukra felvehető formában van jelen. Minden ettől eltérő állapota, illetve azok a tényezők, amik ezt megváltoztatják, szárazság stresszt idézhetnek elő. Vízvesztés természetesen nem csak esőmentes periódusokban léphet fel, előidézheti a túlzott párologtatás, ami összefüggésben van a magas hőmérséklettel, a mély faggyal, és mindemellett fontos szerepe van a talaj sótartalmának is. Ez ellen a növényekben megannyi védekező mechanizmus alakult ki. Vannak növények, melyek vízpotenciáljuk szabályozásával vészelik át a kritikus időket. Kialakíthatnak magas vízpotenciált, de hatásos defenzív stratégia ugyanennek alacsonyan tartása is. Ez utóbbit főként az ionok transzportjával tudja előidézni, úgy, hogy fokozza a belső koncentrációjukat. Az alacsony vízpotenciált használják ki azok a növények is, amik szinte maximálisan kiszáradnak, s ha a környezet megfelelő víztartalommal rendelkezik, visszaállítják normál anyagszere-folyamataikat. A vízpotenciál csökkenésével együtt jelentkeznek a szárazság stressz ismérvei is. (Tabaeizadeh, 1998). A folyamat elején megfigyelhető már a sejt megnyúlásos növekedésének lassulása, ABA felhalmozódás, majd a gyökér és levélfelület növekedési ütemének csökkenése. Az ABA akkumuláció különféle jelátviteli folyamatok aktiválását eredményezi. Bár az ABA egy kulcsfontosságú molekula a szárazság stresszben, mégis az ABA függő útvonalak mellett vannak ABA független folyamatok is. Mindezek mellett fontos védekező mechanizmus a különféle proteinek szintézise. Erre jó példák a LEA fehérjék, melyek a védekezési mechanizmusban víz-, illetve ion- megkötéssel játszanak szerepet (Taiz, Zeiger: 2012).

2.7. Oxidatív stressz

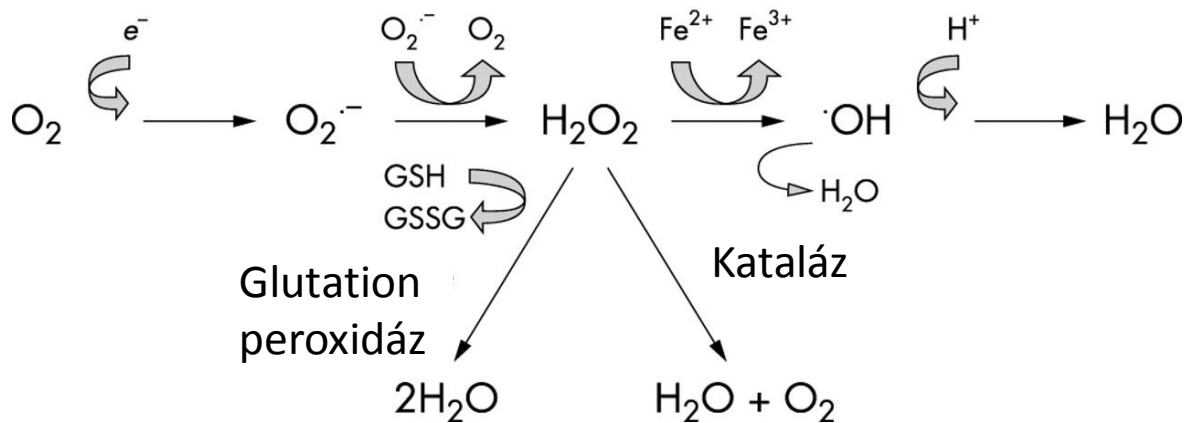
A 90-es évek végén és a millenniumot követő években bizonyítást nyert, hogy a legtöbb stressz eredményeként a növényeket tulajdonképpen oxidatív stressz is éri. A stresszorok nagy százaléka végső soron a növény sejten belüli redox állapotát és/vagy oxigén anyagcsere folyamatait változtatja meg. A növényeket tehát közvetve és akár közvetlenül is érheti oxidatív stressz. Okozhatják nehézfémek, fény stressz és légszennyező anyagok is (Láng Ferenc: Növényélettan). Eredményképpen reaktív oxigénformák keletkeznek.

2.7.1. Az oxigén reaktív formái

Az oxigén „hasznosságával” kapcsolatban közismert egy paradoxon tétel. A legtöbb szervezet számára, akár növényekről, akár állatokról beszélünk, az oxigén elengedhetetlen mind az energiatermelés, mind a légzés terén. Ugyanakkor számos elváltozást, betegséget okozhat. A ROS nagyon széleskörű szerepet töltenek be az élettani folyamatokban, funkcionálnak fontos jelátviteli utakban, a programozott sejthalálban és a fehérjék stabilitásának szabályozásában is (Desikan és mtsai., 2001, Laloi és mtsai., 2004). Károsíthatják a sejtekben található makromolekulákat is.

Az oxigén, mint molekula nem egy aktív forma. Ám a növényen belül is képes redukálódni, aminek következtében megváltozik az elektronszerkezete. Azok a molekulák, amelyek párosítatlan elektronnal, vagy elektronokkal rendelkeznek reaktív gyökök. A redukció során pontosan ilyen párosítatlan elektron jön létre az oxigén külső elektronhéján. A ROS fogalmába a szabadgyökökön kívül beletartoznak még a szabadgyök képzésére képes molekulák. Ezenkívül találhatunk még ebben a kategóriában olyan molekulákat is, amik szabadgyök képzésére képtelenek, ugyanakkor enélkül is rendkívül reakcióképesek. A leggyakrabban előforduló ROS- formák a szuperoxid($O_2^{\bullet-}$), a hidroxil($OH^{\bullet}$), a hidroperoxil($HO_2^{\bullet}$) és a nitrogén- monoxid gyök($NO^{\bullet}$). A hidrogén peroxid(H_2O_2) és a szinglet oxigén(1O_2) is nagyon reaktív oxigén- formák (Apel and Hirt, 2004). Ezek közül a reaktív gyökök közül a legerősebb a hidroxil gyök, ami képes egy láncreakciót elindítani és ezzel lipid- peroxidációt és nukleinsav degradációt indukálni (Lamb and Dixon 1997).

Szuperoxid dizmutáz



2.4. ábra: Reaktív oxigénformák keletkezése (Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction, Z S Nedeljkovic, N Gokce, J Loscalzo).

A molekuláris oxigén, ha rendelkezik egy párosítatlan elektronnal a külső elektronhéjon, akkor átalakul szuperoxid anionná. A szuperoxid dizmutáz átalakítja a szuperoxid aniont hidrogén peroxiddá. Ez spontán átalakulhat hidroxil gyökké, ami magas reaktivitással rendelkezik. A hidrogén peroxidból keletkezhet glutation peroxidáz vagy kataláz közreműködésével víz. Ez a folyamat egyfajta méregtelenítésként értelmezhető.

Ezen gyökök képződését kiválthatják bizonyos herbicidek vagy akár a paraquat is. Ez utóbbi szuperoxid-anion gyököket képes létrehozni, ha molekuláris oxigénnel reagál. Ezek az aktív gyökök természetesen nem csak a légzési lánc eredményeképpen, és oxidatív stressz során keletkezhetnek. Többféle stressz, például a fém stressz, eredményezheti létrejöttüket (Dat és mtsai, 2000). Központi szerepet tölt be a ROS képződésében a fotoszintézis. Egyrészt keletkezhet aktív gyök a II-es fotokémiai rendszerben. Az ott végbemenő folyamatok végeredménye szinglet oxigén is. Illetve az egyes fotokémiai rendszertől elektronok vándorolhatnak molekuláris oxigénre, ami így szuperoxiddá alakul és H_2O_2 képződéséhez vezet a kloroplasztisban (del Río és mtsai, 2002.).

A ROS a növényeket érintő stressz folyamatok következtében oly mértékben felhalmozódhatnak, hogy teljesen képtelenné teszi a sejtalkotókat funkciójuk ellátására. Ezek ellen a gyökök ellen a sejt természetesen rendelkezik védekező mechanizmusokkal. Bizonyos antioxidánsokat, például aszkorbinsavat, glutationt és E vitamint termel (Nakano és Asada, 1981). Ezek képesek a ROS jelátviteli utakat szabályozni, a keletkező ROS- t semlegesíteni.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A munkáink során T-DNS inszerciós *Arabidopsis thaliana* mutánsokkal dolgoztunk, melyekben a mutáció a mitokondriális légzési lánc I. és III. komplexét érintette. Az, hogy a mitokondriális ROS képződésben a légzési lánc I. és III. komplexének nagy szerepe van, már régóta ismert. Azt viszont, hogy ebbe a két komplexbe tartozó fehérjéket kódoló gének miként befolyásolják a növény stressztűrő képességét még nem sikerült minden esetben felderíteni.

A kutatás során ezeket a témaköröket jártuk körül:

- ❖ Befolyásolja - e a mutáció a növény fejlődését és, ha igen, akkor milyen irányba tolja el azt
- ❖ Van-e valamilyen jelentősége a fotoszintetikusán aktív növények fiziológiai állapotára nézve
- ❖ Hogyan befolyásolja a termelődő ROS mennyiségét a mutáció
- ❖ Milyen hatással van a H₂O₂ képződésére
- ❖ Változik- e miatta a lipid peroxidáció aktivitása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Növénynevelés

Kísérleteink során *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípus, vad típusú növényeket (Col-0), illetve a SALK Intézet maggyűjteményéből és a SAIL kollekciónból rendelt T-DNS inszerciós mutánsokat (SALK_125126C, SALK_080960, SALK_145408, SALK_062179C, SALK_129902C, SALK_008750C, SALK_083695C, SALK_084317C, SALK_010194C, SAIL_1276_C05, SALK_115315C, SALK_061350C, SALK_151958, SALK_072274C, SALK_140677C, SAIL_404_C10, SALK_034578C, SALK_133951C, SALK_098106C) használtuk. A növényeket steril körülmények között 8 óra fény és 16 óra sötét periódus mellett neveltük 22 °C hőmérsékleten 0,5% szacharóz tartalmú 1/2 MS táptalajon (Murashige Skroog, 1962), amit az adott kísérleteknek megfelelően a következő vegyszerekkel egészítettünk ki: 50 és 150 mM NaCl, 100, 200, 400 és 600 mM szorbitol, 0,1 és 0,2 µM paraquat. A magokat az üvegházban szaporítottuk, ahol a körülmények megegyeztek a növénynevelő szobában tartottakkal. Gyökérhossz növekedés mérésekor a magokat 1/2 MS táptalajon kicsíráztattuk, majd a 4 napos csíranövényeket átraktuk különböző módon kiegészített táptalajra. Ezután függőlegesen növesztve 3 naponként mértük a gyökök hosszát. A kísérlet 12 napig tartott és ezalatt a mérést mindig ugyanabban az időpontban végeztük. Vonalanként 30-50 növényt mértünk le. Csírázási teszteknel vonalanként 70-100 magot kiraktunk, majd naponta ellenőriztük mennyi csírázott ki belőle. Minden fenotípus vizsgálatot legalább három független ismétléssel végeztünk el.

4.2 Felületi magsterilizálás

A magokat a kísérlet előtt legalább egy nappal sterilizáltuk. Az eppendorf csövekbe 1-1 ml etanolt pipettázunk. Ezután lecentrifugáljuk, az etanolt leszívjuk és 4 %-os Domestos oldatot (4 ml Domestos, 96 ml víz) adunk hozzá. Így 15 percig rázatjuk, majd a Domestos oldatot is eltávolítjuk. A magokra steril desztillált vizet pipettázunk, centrifugáljuk azután a vizet is leszívjuk, ezt 4-5 alkalommal megismételtük. A steril magokat 4 °C-on tároltuk a felhasználásig.

4.3. Molekuláris biológiai technikák

4.3.1. Genomi DNS izolálás

Az üvegházban nevelt növényekből 10-30 mg mintát vettünk (egy-két átlagos méretű levél). A leveleket folyékony nitrogénben szétroncsoltuk. A folyamatot ettől kezdve az Aquagenomic (MultiTarget Pharmaceuticals, LLC) DNS izoláló oldattal a gyártó ajánlása szerint végeztük, kis módosításokkal. A homogenizálás után az eppendorf csőbe 200 µl-t pipettáztunk az oldatból. A mintákat kézzel ráztuk, majd 20 µl izopropanol hozzáadása után 65 °C-on tartottuk 10-15 percig. Az oldódás közben szintén kézzel rázogattuk. Ezután öt perc centrifugálás következett maximum sebességen. Utána új eppendorf csőbe átpipettáztunk 90 µl-t a felülúszóból és hozzáadtunk 72 µl izopropanolt. 10 perc centrifugálás után a DNS csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, majd szárítottuk és 100 µl vízben feloldottuk a DNS-t. A kész mintát -20°C-on tároljuk.

4.3.2. Polimeráz láncreakció

Az izolált DNS-t használtuk fel a homozigóta vonalak megkereséséhez, ami PCR technikával történt. Attól függően, hogy mit vizsgáltunk (homozigóta keresés, fragment itolálás) 30 és 50 µl-es végtérfogatban dolgoztunk. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 1x DreamTaq Green reakció puffer (Fermentas), 0,2 mM végkoncentrációjú dNTP oldat, templátként 1 µl genomi DNS, 100-100 pmol specifikus primer (ld. 1.1 táblázat, függelék) és 0,2 µl DreamTaq DNS polimeráz (5 units/µl; Fermentas). A kísérletek végrehajtásához a 2720 Thermal Cycler készüléket (Applied Biosystems) használtuk az alábbi beállításokkal: 3 perc 95°C, majd 36-szor ismételve 30 másodperc 95°C, 30 másodperc 62°C vagy 64°C (primertől függően), 1-1,5 perc 72°C (képződő termék hosszától függően), végül pedig 7 perc 72°C. A művelet befejezése után a mintákat -20°C-on tároltuk, így a DNS nem károsodott. A PCR tesztek elvégeztük genom- és T-DNS-specifikus primerekkel is, hogy megtaláljuk a homozigóta vonalakat. A felhasznált primerek listája a függelék 1.1. táblázatában található.

4.3.3. DNS fragment izolálás

A 0,8% agaróz gélen elválasztott DNS fragmenteket UV fény alatt vágtuk ki. Ezután a GeneJet Gel Extraction KIT-et (Fermentas) használtunk, a gyártó által megadott protokollt követve. A DNS-t tartalmazó gél darabhoz ugyanakkora tömegű "binding" puffert adtunk hozzá, mint a fragment tömege, majd 50°C-on tartottuk 5 percig, hogy

feloldódjon. Ezután a fragment súlyával 1:1 arányban izopropanolt pipettáztunk a kithez mellékelt kötési oszlopra, és ezt követően 1 percig centrifugáltuk. 100 µl "binding" pufferrel és 700µl mosópufferrel mostuk az oszlopot. A mintát 50µl elúciós pufferrel oldjuk le végül. A tisztítás hatékonyságát 0,8% agaróz gélen történő elválasztással ellenőriztük. Az izolált fragmenteket -20 °C-on tároltuk, majd az SZBK-ban található szekvenáló laboratóriumba vittük.

4.3.4. RNS-izolálás és génkifejeződési vizsgálatok

RNS izoláláshoz tiszta, RNáz mentes eszközöket és oldatokat használtunk. Az izolálást az RNeasy Plant Mini Kittel (Quiagen), a gyártó által ajánlott módszert alapul véve csináltuk. A körülbelül 100 mg növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltuk, és 450 µl izoláló puffert (445 µl RLT puffer, 5 µl β-merkapto-etanol) adtunk hozzá. 5 percig 65°C-on tartottuk, majd a kithez mellékelt szűrő oszlopra pipettáztuk a mintát. 1 perc centrifugálás után az átfolyó oldatot új eppendorf csőben tettük át, 1/2 térfogat 96%-os etanolt adtunk hozzá, majd az RNS kötő oszlopra pipettáztuk. 1 perc centrifugálás után 700 µl RW1 pufferrel majd, 500 µl RPE pufferrel mostuk az oszlopot. Enyhe szárítás után 50 µl RNáz mentes vízzel mostuk le az RNS-t. Az RNS koncentrációját a Nanodrop2000c (Thermo Scientific) géppel mértük meg. Mivel az izolálás során a mintákban DNS is maradt, annak eltávolítása miatt 1 µg RNS-t kezeltünk 1 µl (1 unit) RQ1 DNáz (Promega) enzimmel 30 percen keresztül 37°C-on a gyártó által leírtak szerint. Az így kapott RNS-ből 0,5 µg-ot használunk fel egyes szálú cDNS szintéziséhez, amit SuperScript™ III RNase H⁻ reverz transzkriptázzal (Invitrogen) végeztük mindenben pontosan követve a gyártó utasításait. A reverz transzkripciót követő PCR reakciókat 30 µl reakcióelegyben végeztük kb. 0,1 µg cDNS-t felhasználva 1 unit DreamTaq DNS polimerázzal (Fermentas) a gyártó által javasolt körülmények között az alábbi protokoll szerint: 3 perc 95°C, majd 38-szor ismételve 30 másodperc 95°C, 30 másodperc 62°C, 30 másodperc 72°C, végül pedig 7 perc 72°C. A felhasznált primerek listája a függelék 1.1 táblázatában található.

4.4.Klorofill fluoreszcencia változás mérése

Imaging-PAM (*M-series*, MAXI verzió, Heinz Walz GmbH) készülékkel végeztük a méréseket. A vizsgálatokat mindig ugyanazokkal a paraméterekkel hajtottuk végre. A mérőfény fotoszintetikusán nem aktív, intenzitása a mintától függ, minél kevesebb klorofill

van a benne, minél rosszabb állapotban vannak, annál több fény kell. A laborban előzetes kísérletek során 8-10 napos növényeknél optimálisnak vélt 1-es intenzitást és 7-es frekvenciát használtunk. A növényeket 24 és 48 órán át kezeltük, közvetlenül a mérés előtt pedig 15 percig sötétben tartottuk. A szaturációs pulzust 2-es erősségre állítottuk be, ami megközelítőleg 2000 μ E-nek felel meg. Az első a gép késleltetve adta, majd ezután szintén később (40s) történt az első mérés. Az egész mérés megközelítőleg 800 másodperces, amiből a fényszakasz nagyjából a feléig (415 s), 8 mérésig tartott. Ez alatt az időszak alatt a növények a szaturációs pulzusok közt is folyamatos megvilágítást kaptak. A fennmaradó időben pedig végig szeretnénk követni a különböző szakaszokban végbemenő változásokat. Így, egy dinamikus diagramon a mérés közben is láthattuk a kiválasztott vonalak különböző reakcióit.

4.5. H₂O₂ tartalom kvantitatív meghatározása

A növényi minták H₂O₂ mennyiségét Velikova és munkatársai (2000) fotometriás módszere alapján határoztuk meg. A friss levél tömegét pontosan lemértük, majd folyékony nitrogénbe raktuk, és fagyottan homogenizáltuk. 100 mg növényi mintára 400 μ l 0,1 %-os triklórecetsav (TCA) oldatot mértünk, összeráztuk, majd 4 °C -on centrifugáltuk 15 percen keresztül. A centrifugálás után szűrtük a mintákat, és csak a 300 μ l szűrletet használtuk tovább. Hozzáadtunk 300 μ l 10 mM-os K-foszfát (pH 7) puffert és 600 μ l 1M-os Kálium - jodid oldatot, majd 10 perc inkubációs idő után 390 nm-en fényelnyelést mértünk a 10 mM-os foszfátpufferrel szemben. Minden esetben legalább 3 párhuzamos mintát mértünk meg. A H₂O₂ tartalmat az előre elkészített H₂O₂ kalibrációs görbe alapján számoljuk ki.

4.6. Lipid-peroxidáció mérése

Ebben a kísérletben a lipidperoxidáció során keletkező termék, a malondialdehid (MDA) mennyiségét mértük Heath és Parker (1968) módszere alapján. A mintákat, miután pontosan lemértük a tömegüket, folyékony nitrogénben homogenizáltuk. 100 mg növényi mintára 1 ml 0.1% triklór-ecetsav oldatot és 0.1 ml 4% butilált-hidroxitoluolt mértünk, és alapos összerázás után 10 percig centrifugáltuk, majd szűrtük. A szűrletből kivett 0,2 ml kivonathoz 0,8 ml 20% triklór-ecetsavban feloldott 0.5% tiobarbiturinsavat adtunk és 100 °C-on 30 percig inkubáltuk. Az abszorbanciát 600 és 532 nm hullámhosszon mértük.

Minden esetben legalább 3 párhuzamos mintát mértünk meg, és relatív malondialdehid tartalmat számoltunk a kezeletlen kontroll (Col-0) mintához képest.

4.7.:Bioinformatikai programok

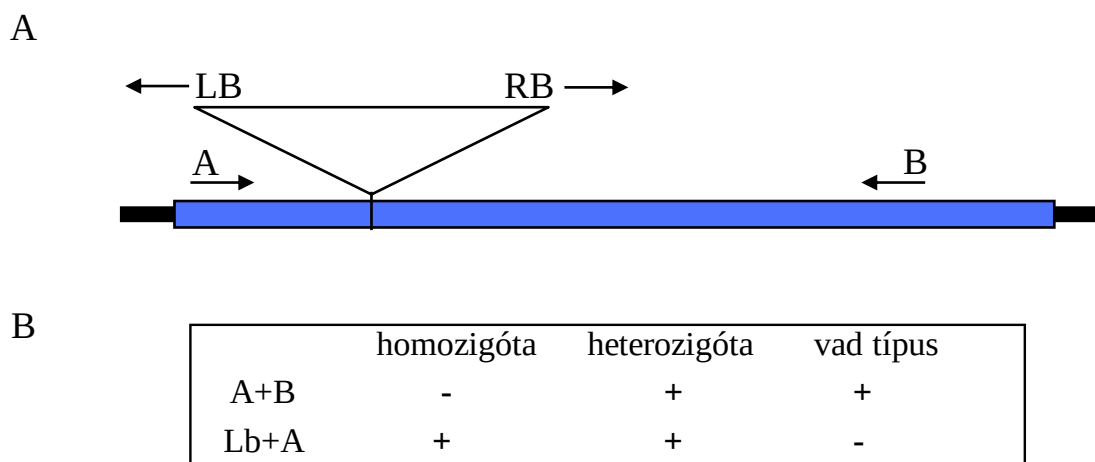
Munkáim során a következő programokat és internetes oldalakat használtam: ChromasLite, ImagingWin, ImageJ. Szekvenciaelemzés során a TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), SALK Intézet oldala (<http://signal.salk.edu/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5. EREDMÉNYEK

A kísérleteinket kezdetén a SALK Intézet maggyűjteményéből rendelt T-DNS inszerciós mutánsok magjait kiültettük szelektív (kanamicin) táptalajra, hogy kiválogathassuk a biztosan T-DNS inszerciót hordozó, ezáltal kanamicin rezisztens vonalakat. Így csak azokkal dolgoztunk tovább, amelyeknél ez nem volt letális, tehát életben maradtak, a rezisztens növényeket kiültettük az üvegházba. Ezekkel a növényekkel minden kísérletet háromszor ismételtünk meg.

5.1. Homozigóta egyedek keresése, szűrés az elsődleges vizsgálatokhoz

Az üvegházban felnőtt zöld növényekről mintát gyűjtöttünk. Egyedenként 1-2 levél elegendő volt ahhoz, hogy ezekből megfelelő minőségű és tisztaságú DNS-t izoláljunk. Ezután PCR technika segítségével megállapíthattuk melyek a homozigóta vonalak. A növények DNS-ével kétféle PCR reakciót indítottunk el. Az egyikben T-DNS, a másikban pedig genomi DNS specifikus primereket használtunk (5.1. A ábra.). A DNS-t felamplifikálása után megfuttattuk 0,8 %-os agaróz gélen. A DNS futását UV fény alatt tudtuk ellenőrizni. Homozigóta vonal esetében a beépült T-DNS mindkét allélban jelen van, nincs vad, csak mutáns allél. A beépült T- DNS nagy mérete (kb. 8-12 ezer bp) miatt PCR termék nem keletkezik génspecifikus primerpár használatakor (5.1. B ábra). Heterozigóta esetében a T-DNS csak az egyik allélba épült be, vad típusú allél is van. Vad típusú növények esetében nincs T-DNS beépülés, csak vad allélok vannak. A megtalált 19 homozigóta vonal listája a függelékben található (függelék 1.2. táblázat).



5.1. ábra Homozigóta vonalak keresésének általánosított mechanizmusa

A: A T-DNS inszerció helye és a gén illetve T-DNS specifikus primerek elhelyezkedése az inszercióhoz képest. A és B primerek génspecifikusak, LB és RB primerek T-DNS specifikusak.

B: Genotípus vizsgálat eredménye különböző primer kombinációk esetében.

5.2. Elsődleges szűrések

Az előzőekben megtalált 19 homozigóta vonallal dolgoztunk tovább, melyekkel csírázási tesztek végeztünk. Referenciaként a vad típusú (Col-0) magokat használtuk. A kontrollként alkalmazott alap 1/2 MS táptalaj mellett a következő vegyszerekkel kiegészített táptalajokra raktuk ki a magokat: 150 mM és 200 mM NaCl, 0,1 és 0,2 μ M paraquat. A paraquat szuperoxiddá képes alakulni és oxidatív stresszt eredményezhet (Ramiro Lascano és mtsai, 2012). Minden alkalommal legalább 70-100 magot használtunk vonalanként, és a csírázási kísérleteket legalább háromszor megismételtük. Naponta számoltuk le a kicsírázott magok számát. A mérési eredmények alapján (5.1. táblázat) olyan vonalakat választottunk ki további vizsgálatokra, melyek jelentősen eltérően viselkedtek a különböző kezelésekre a vad típushoz képest.

Salk azonosító	gén	fehérje	NaCl 150 mM	NaCl 200 mM	PQ 0,1 μM	PQ 0,2 μM
SALK_125126C	At2g01090	QCR6-2	n	S	n	n
SALK_080960	At3g06310	NDUFA8a	R	s	n	s
SALK_145408	At3g16480	MPPα-2	S	S	n	S
SALK_062179C	At1g79010	NDUSF8a	S	S	S	S
SALK_129902C	At1g79010	NDUSF8a	n	S	n	s
SALK_008750C	At3g27240	CYC1-1	n	S	n	s
SALK_083695C	At3g27240	CYC1-1	S	S	R	n
SALK_084317C	At4g32470	QCR7-1	n	s	n	n
SALK_010194C	At1g47260	FPBP2	n	S	n	n
SAIL_1276_C05	At1g47260	FPBP2	S	S	n	S
SALK_115315C	At5g13430	UCR1-1	n	S	R	n
SALK_061350C	At5g13430	UCR1-1	S	S	n	s
SALK_151958	At5g63510	FPBP4	n	S	n	R
SALK_072274C	At5g63510	FPBP4	S	S	S	S
SALK_140677C	At5g66510	FPBP5	S	S	n	n
SAIL_404_C10	At5g66510	FPBP5	n	S	n	s
SALK_034578C	At3g62790	NDUFS5a	n	S	n	n
SALK_133951C	At3g02090	MPPβ	R	s	R	n
SALK_098106C	At2g20360	NDUFA9	n	S	R	n

5.1. táblázat Csírázási kísérletek eredményei

A csírázási tesztek eredményei azt a változást mutatják, hogy az adott vonal a vad típushoz (Col-0) képest hogyan viselkedett különböző körülmények között

n nincs változás; **R** toleráns; **S** érzékeny; **s** kissé érzékeny.

A legtöbb mutáns NaCl kezelésre érzékenyen reagált. Azok a vonalak, amelyek 150 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajon növekedtek és toleránsak voltak, vagy hasonlóan viselkedtek a vad típusú növényekhez képest, a 200 mM-os NaCl kezelés hatására ők is érzékennyé, vagy kissé érzékennyé váltak. 0,1 μM paraquat már több toleráns vonal volt megfigyelhető, de ezek száma is jelentősen lecsökkent a paraquat koncentráció növelésével. A csírázási képességek alapján kiválasztottunk 10 vonalat, és a későbbiekben azokkal dolgoztunk tovább (5.3.1. táblázat).

5.3.Növekedési tesztek

Az előzetesen kiválasztott 10 mutáns vonallal növekedési tesztek végeztünk. Elsőként gyökérnövekedést mértünk. A magokat 1/2 MS táptalajon kicsíráztattuk, majd amikor megfelelő méretűre nőttek, átraktuk őket különböző táptalajra, amiket 100mM és 200 mM szorbitollal és 50 mM NaCl-dal kiegészítettünk. A növényeket függőlegesen növesztettük ezek után. Az átrakás napját számoltuk 0. napnak. Másnap, az 1. napon megjelöltük, hogy honnan fogjuk kezdeni a gyökérhossz növekedésének mérését. Ettől a naptól kezdve 3 naponként jelöltük, hogy mennyit nőttek a gyökerek. A kísérlet 12 napig tartott, amikor a növényekről digitális felvételt készítettünk, és az ImaginJ programmal kiszámoltuk a három napok alatti növekedést (5.3.1. ábra). A viszonyítás itt is a vad típusú növényekhez történt.

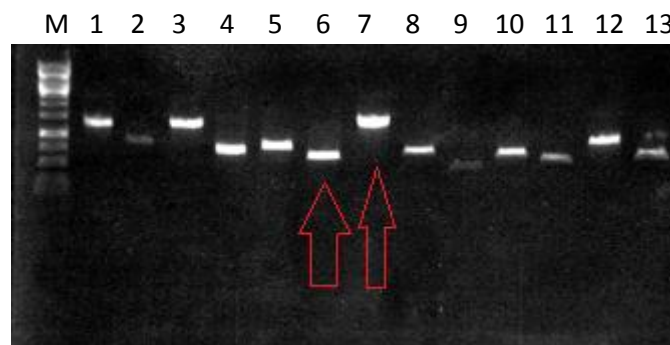
Salk azonosító	gén	fehérje	mitokondriális komplex	gyökér növekedés		friss tömeg	
				A	B	A	B
SALK_072274C	At5g63510	FPBP4	I	n	R	S	R
SALK_098106C	At2g20360	NDUFA9	I	s	n	S	S
SALK_034578C	At3g62790	NDUFS5a	I	r	n	r	s
SALK_062179C	At1g79010	NDUSF8a	I	S	R	S	R
SALK_129902C	At1g79010	NDUSF8a	I	s	r	n	r
SALK_008750C	At3g27240	CYC1-1	III	s	n	n	n
SALK_083695C	At3g27240	CYC1-1	III	S	n	s	R
SALK_145408	At3g16480	MPP α -2	III	S	S	n	S
SALK_133951C	At3g02090	MPP β	III	R	R	r	R
SALK_115315C	At5g13430	UCR1-1	III	S	n	n	s

5.3.1. táblázat: A csírázási tesztek során kiválasztott 10 vonal, melyekkel a növekedési tesztek is elvégeztük. A: 50 mM NaCl, **B:** 100 mM szorbitol; **n** : nincs lényegi különbség **s** : kissé érzékeny (10-15%) **S** : érzékeny (>15%) **r** : kissé toleráns (10-15%) **R** : toleráns (>15%)

Friss tömeg mérésekor a gyökérnövekedési kísérletben használt, 12 napig különböző stressz kezelésnek kitett növények tömegét mértük le. A gyökérnövekedési és friss tömeg teszteken mért eltérések jóval nagyobbak voltak, mint a csírázási teszteken mérték. A NaCl-ot tartalmazó táptalaj itt is egyértelműen gátolta a növekedést, a szorbitolos táptalajon viszont több vonal is toleranciát mutatott.

5.4. Szekvencia vizsgálatok

A növekedési kísérletekben használt 10 homozigóta vonallal szekvencia vizsgálatokat is végeztünk, hogy pontosan meghatározzuk a T-DNS beépülésének pontos helyét. PCR reakcióban felszaporítottuk a T-DNS inszerciók körüli genomi DNS régiókat (T-DNS specifikus primereket használva, függelék 1.1. táblázat), fragmentet izoláltunk, majd a mintákat elküldtük a MTA Szegedi Biológiai Központ szekvenáló laboratóriumába (5.4.1. ábra). Erre azért volt szükség, mert olyan vonalakat kerestünk, amikben a mutáció csak egy gént érint, és az adott génből legalább két különböző mutáns allélunk van. Így már valószínűsíthettük, hogy a kísérletekben megfigyelhető tolerancia, vagy érzékenység valóban annak a mutációnak köszönhető, amit mi vizsgáltunk. A szekvenálás eredményét összehasonlítottuk a SALK Intézet által megadottakkal. Az <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> oldalon, génszám alapján, online megtalálhatóak a T-DNS inszerciók helyei. Ezt összevetettük az általunk meghatározottal, ezzel megtudtuk mekkora szekvenciárészlet deletálódott ki az inszerció létrejötte közben. Amennyiben túl nagy deléción volt megfigyelhető, az általunk tapasztalt fenotípusos változás egy másik génben okozott mutáció eredménye is lehetett, és nem csak az általunk vizsgálni kívánt gén mutációja okozhatta azt.



5.4.1. ábra: A DNS fragment izolálás eredményének ellenőrzése agaróz gélen történő elválasztással

M: 1 kb DNS létra; 1-13: izolált DNS fragmentek elválasztási képe piros nyíllal jelölve az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsokból izolált DNS szakaszt

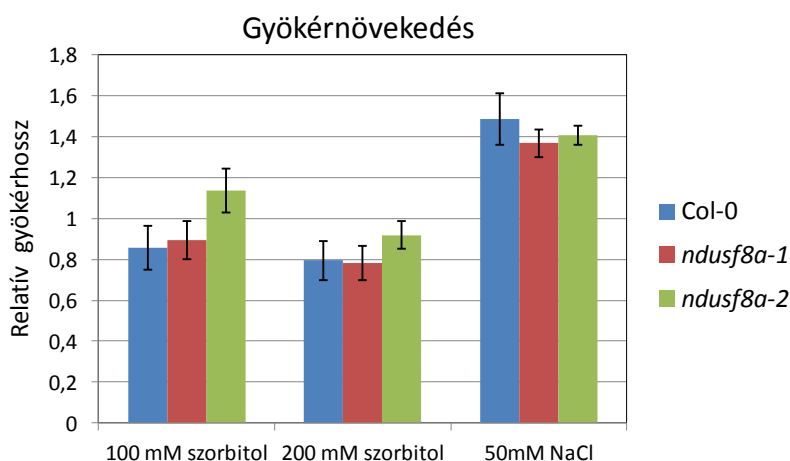
A szekvenálási vizsgálatok eredményeit összevetve az eddigi elsődleges vizsgálatokéval és növekedési tesztekével, kiválasztottuk az általunk *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsnak nevezett homozigóta vonalat mélyebb elemzésre. A kiválasztott *NDUSF8A*

gén esetében nem volt semmilyen eltérés a SALK Intézet által megadottak és az általunk meghatározottak szekvenciák között.

5.5. *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok jellemzése

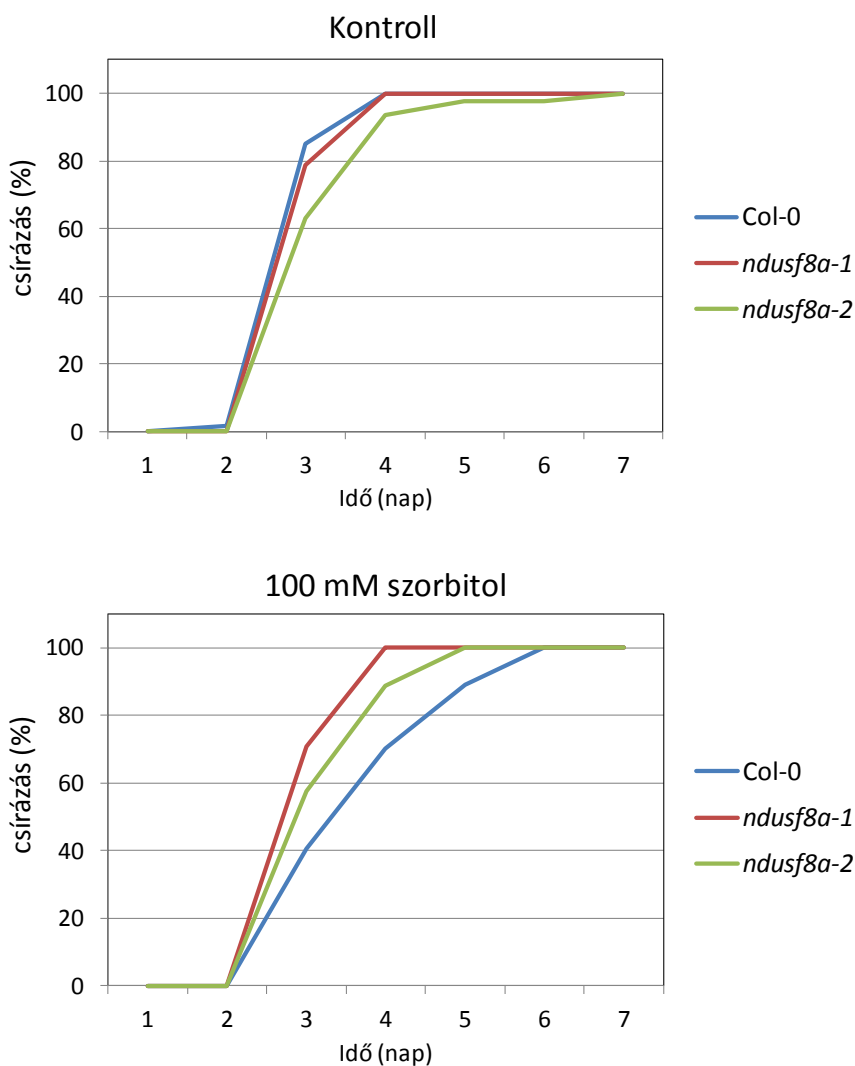
A kiválasztott két mutáns esetében a mutáció az At1g79010 gént érintette, az *ndusf8a-1*-nél (SALK_129902C) a promóter régióban, az *ndusf8a-2*-nél (SALK_062179C) az első intronban volt (5.5.4. ábra). Az NDUSF8a fehérje a mitokondrium I komplexének az alkotója. Az előzetes csírázási és növekedési vizsgálatok alapján az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* növények különböző mértékben bár, de NaCl és paraquat érzékenységet mutattak (5.1. és 5.3.1. táblázat). Szorbitollal szemben azonban mindkét vonal toleránsnak bizonyult (5.3.1. táblázat). Korábbi kutatásokból tudtuk azt, hogy a mitokondrium I komplex NDUSF4 fehérjéjét érintő mutáció (Meyer és mtsai, 2009) befolyásolhatja a só és ozmotikus stresszre adott válaszokat. Ezért alaposabban megvizsgáltuk a *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* növények NaCl és szorbitol kezelésre adott válaszait.

Gyökérnövekedési tesztekben 100 mM és 200 mM szorbitol és 50 mM NaCl kezelést használtunk. 12 napig követtük nyomon a növekedést, majd a kontroll (1/2 MS) táptalajon növesztett növények növekedéséhez viszonyítottuk az eredményeinket. Szorbitol kezelés hatására a vad típusú növények mutattak nagyobb érzékenységet. Az *ndusf8a-2* mutáns gyökere 1,3-szor akkora nőtt, mint a vad típusé (Col-0) (5.5.1. ábra). Az *ndusf8a-1* mutánsnál nem találtunk lényegi eltérést. Az 50 mM NaCl kezelés hatására nem tapasztaltunk megváltozott gyökérnövekedést a mutánsok esetében.



5.5.1. ábra: Az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok relatív gyökérnövekedése a kontrollhoz képest 12 nap alatt

A csírázási képességet is vizsgáltuk 100 mM szorbitollal kiegészített táptalajon. Az eddigiekkel összhangban a mutánsok jobban reagáltak szorbitolra, mint a vad típus, tehát hamarabb csíráztak ki (5.5.2. ábra).

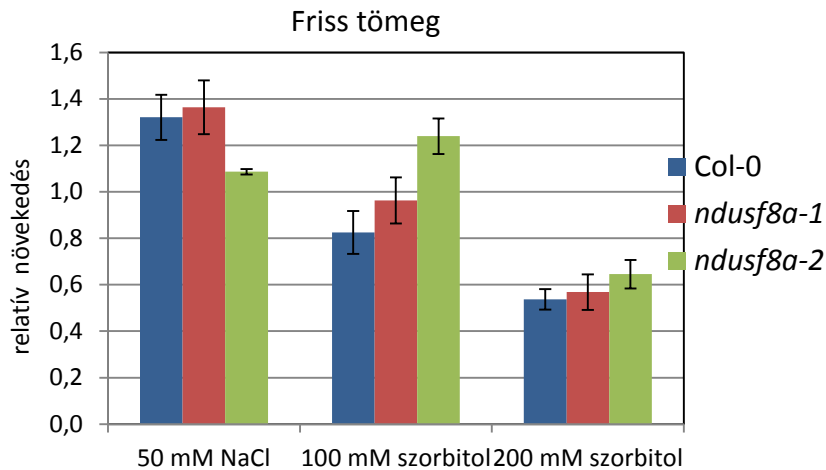


5.5.2. ábra: Az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok csírázási tesztje

Csírázási %: a 7 nap alatt kicsírázott növények aránya az adott napi eredményhez képest

A csírázási tesztet természetesen elvégeztük szorbitolt nem tartalmazó, kontroll táptalajon is. Ha ehhez viszonyítjuk a kezelt növények válaszát, akkor még jobban látszik, hogy a mutánsok egyértelműen toleránsak az ozmotikus stresszt kiváltó szorbitollal szemben csírázási kísérletben a vad típushoz (Col-0) képest.

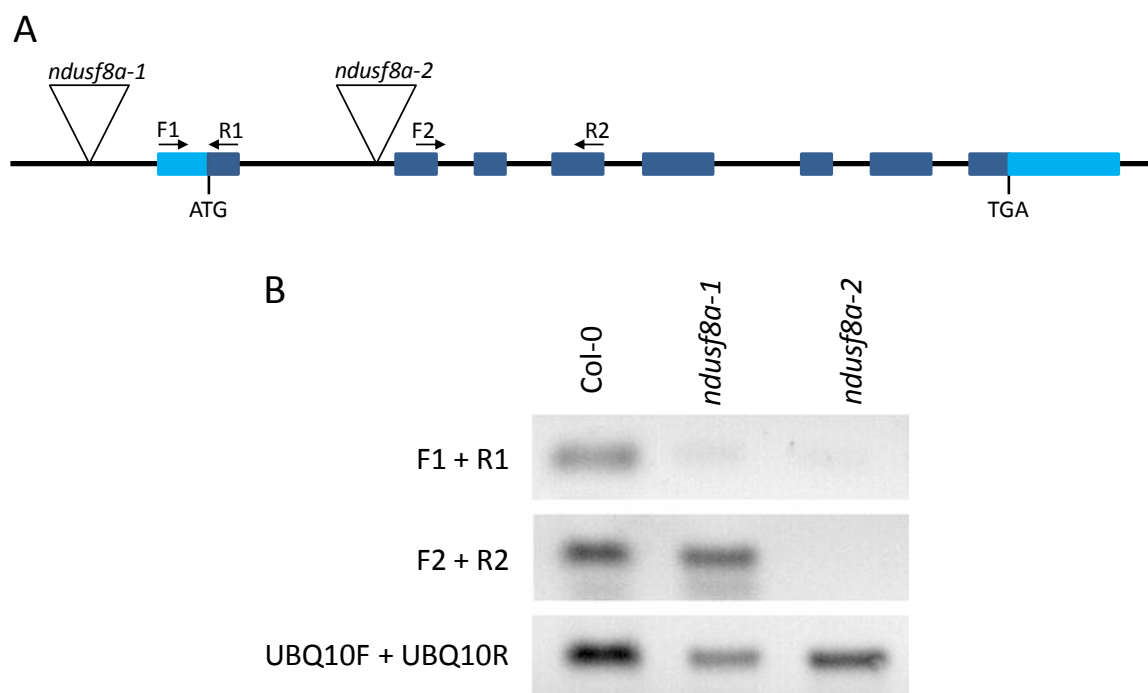
Frisztömeg mérést is végeztünk 12 napig kezelt mutáns és vad típusú növényeken.



5.5.3. ábra: Az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutáns növények relatív friss tömeg változása a különböző kezeléseknek megfelelően

A legnagyobb toleranciát a növények az 50 mM NaCl-al, a legkevésébbet pedig a 200 mM sorbitollal szemben mutatták (5.5.3. ábra). Az eredmények hasonlóak voltak az előző csírázási és növekedési teszteken kapott eredményekhez. A sorbitol ozmotikus stressz és plazmolízis kialakulását eredményezheti. Az így stressz kezelt növények növekedési fázisa rövidebb, mint a normál körülmények közt nevelteké (HL Wang, és mtsai., 1999). A frisstömeg mérésnél is relatív értékeket számoltunk a kontroll (1/2 MS) táptalajon növesztett növényekhez képest. A sorbitol tartalmú táptalajon egyértelműen jobban nőttek a mutánsok, elsősorban az *ndusf8a-2*, mint a vad típusú növények. 100 mM sorbitol mellett például másfélszerese volt a kontroll táptalajon mért növekedése az *ndusf8a-2* mutánsnak, mint a vad típusú növényeknek. A 200 mM-os sorbitolon már kevésbé voltak toleránsak a növények, de ott is egyértelműen látszott a mutáns vonalak nagyobb fokú ellenállása a Col-0-hoz képest (5.5.3. ábra).

A növekedési vizsgálatok után az *ndusf8a-1*, *ndusf8a-2* és vad típusú növényekből RNS-t izoláltunk és génkifejeződési vizsgálatokat végeztünk. Az izolált RNS-ből cDNS-t írtunk át, és PCR segítségével (RT-PCR) átíródó szakaszokat vizsgáltunk meg.



5.5.4. ábra:

A T-DNS inszerciók helye a *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsokban és a mutánsok RT-PCR analízise

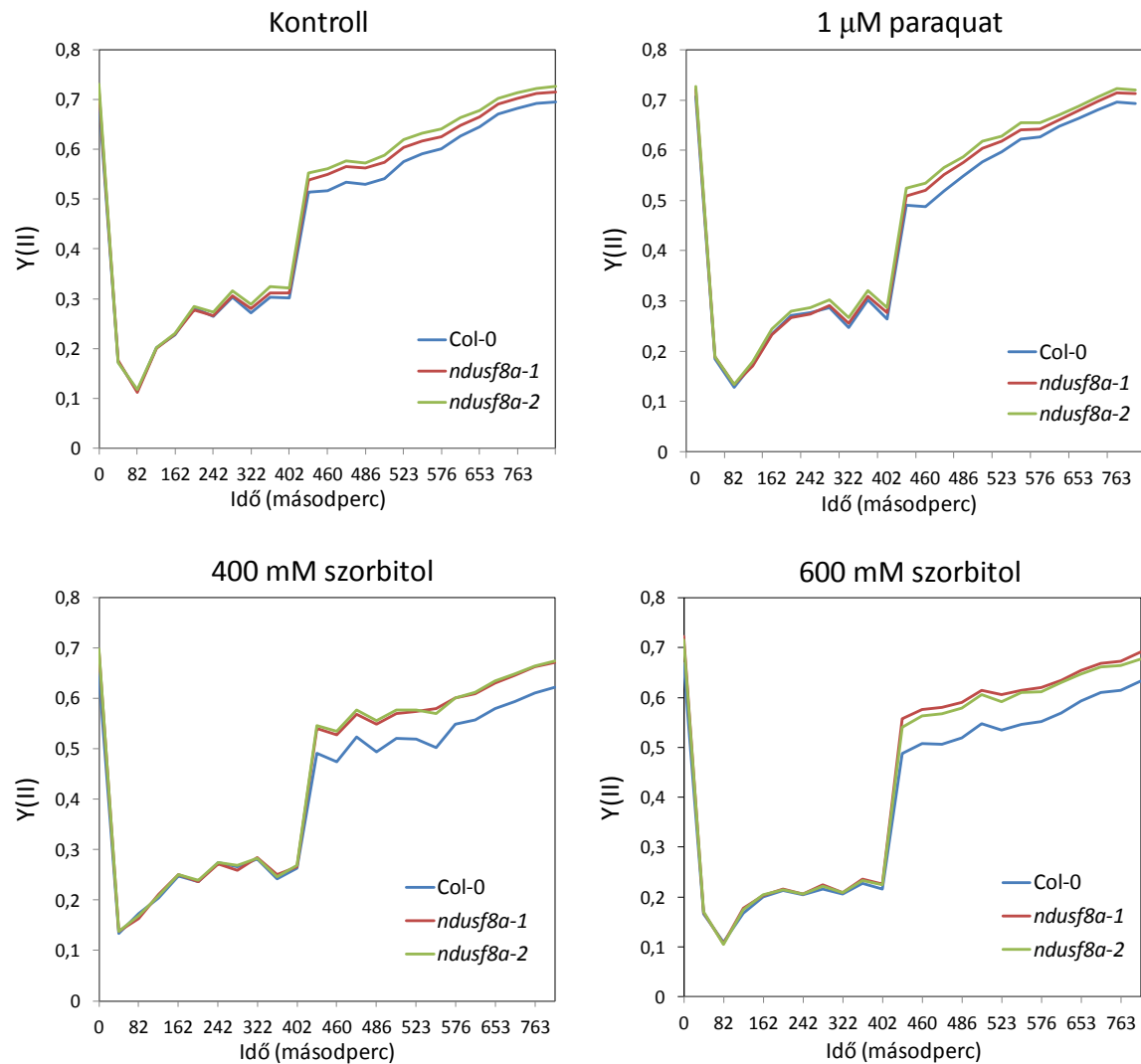
A: T-DNS inszerciók helye az *At1g79010* génben. Az ábrán nyilakkal jelöltük a génspecifikus primerek (F1, F2, R1, R2) elhelyezkedését az inszerciókhoz képest, melyeket RT-PCR analízishez használtuk.

B: Az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok és vad típusú (*Col-0*) növények RT-PCR analízise. Különböző primer kombinációkat használva vizsgáltuk az *At1g79010* gén kifejeződését a transzgenikus növényekben UBQ10 belső kontroll mellett

Ennél a kísérletnél arra voltunk kíváncsiak, hogy az *At1g79010* génből mi és hogyan íródik át; képződik-e a T-DNS inszerció helye után transzkript, s ha igen, mennyisége a vad kontrollhoz képest mekkora. Abban az esetben, mikor az F1 és R1 primereket használtuk, mindkét mutánsnál van egy nagyon alacsony transzkript szín, F2 és R2 primerek használatakor az *ndusf8a-2* mutánsnál nincs transzkript (5.5.4. ábra). Ezért valószínűsíthetjük, hogy az *ndusf8a-1* mutáns esetében a mRNS valószínűleg teljes hosszában átíródik, mennyisége eltér a vad típushoz képest.

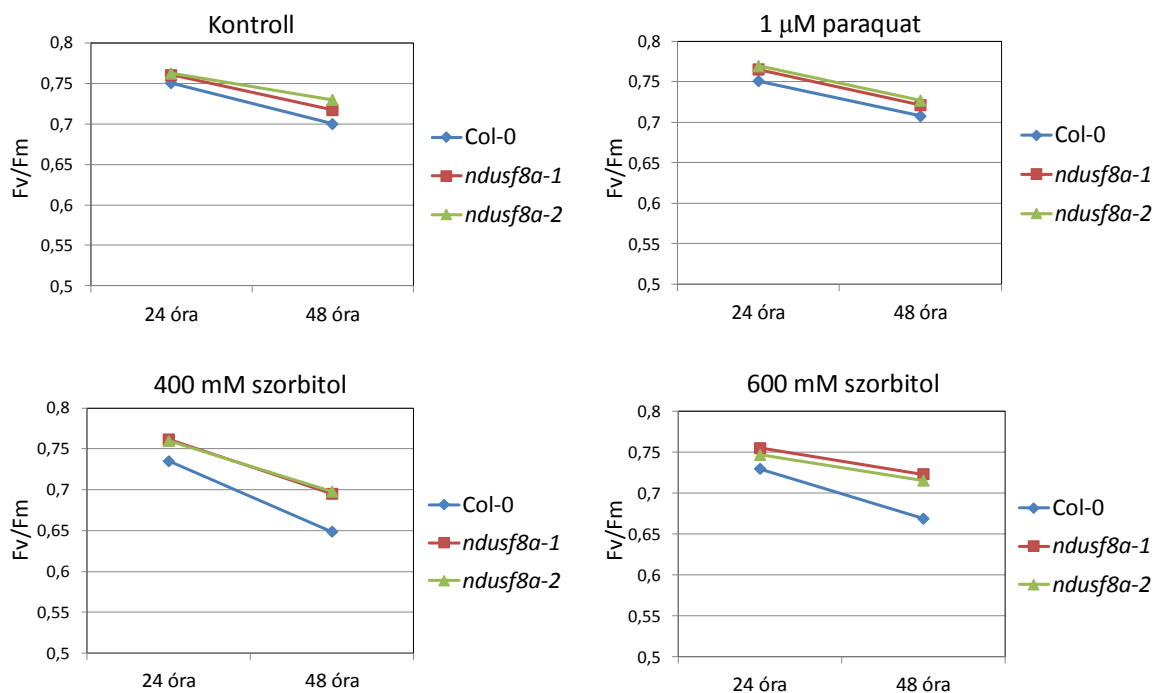
5.6. Klorofill fluoreszcencia változás mérése

Ezekkel a mérésekkel nyomon követhettük azt, hogy a 15 perces sötétadaptációt követően a 24 és 48 órán át különböző stressznek kitett növények milyen mértékben tudták feldolgozni az őket érő hatásokat, ez mennyiben befolyásolta a fotoszintézist, pontosabban milyen fiziológiai állapotban van a II fotokémiai rendszerük (PSII). A kísérlet és a mérés beállításainál arra törekedtünk, hogy a mérő fény a nevelési fénnel megegyezzen. A mérés folyamán a sötét adaptált növényeket először folyamatos fény éri 402 másodpercig, majd a sötét szakasz következik pulzáló (mérő) fénnel. A magokat kontroll (1/2 MS 0,5 % szacharózzal) táptalajon növesztettük. A növények 12 napig nőttek, majd 400 és 600 mM-os szorbitollal kiegészített szacharóz nélküli 1/2 MS táptalajra tettük át, illetve ugyanebben az időben 1 μ M-os paraquat oldattal lefűjtünk szacharóz nélküli 1/2 MS táptalajra átrakott növényeket. A méréseket a kezeléstől számított 24 és 48 órás inkubáció letelte után kezdtük el. A mérés során, az Imaging-PAM készülékkel összekapcsolt számítógépen, nyomon követhettünk több mint tíz féle paraméter változását. Számunkra ezen kísérletek alatt fontos volt a maximális kvantumhatásfok (F_v/F_m) és a lineáris elektron transzport hatékonyságát leíró ($Y(II)$) érték. Az F_v/F_m érték a változó fluoreszcencia pillanatnyi értéke a maximálishoz képest, a maximális fotoszintetikus aktivitásból mennyit képes a növény az aktuális kezelés mellett hasznosítani. A különböző szorbitol kezeléseket a mutáns vonalak ismét nagyon jól tolerálták. Mind a 400 mM, mind 600 mM-os szorbitol kezelés esetében az $Y(II)$ érték változása ezt bizonyította. Míg a kezelés nélküli növényeknél a különbség nem volt sokkal nagyobb a vad típushoz képest, a 400 és 600 mM szorbitol kezelés után már enyhén látszott a mutáns vonalak nagyobb toleranciája 24 óra után (függelék, 1.3. ábra). Ez a különbség a 48 órás kezelést követő méréseknél még nyilvánvalóbb (5.6.1. ábra) lett. Az eltérés a mérés sötét szakaszát érintette (402 másodperc után). Paraquat kezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a növények között. Az F_v/F_m értékek változását megvizsgálva a 400 és 600 mM szorbitol kezelésnél látszik, hogy a kontrol növény ellenálló képességét mutató görbe sokkal meredekebben esik, mint a mutáns vonalaké (5.6.2. ábra). Ez azt jelenti, hogy az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* vonalak ellenálló képessége kevésbé csökkent, mint a vad típusnak a 24 és 48 órás kezelés hatására. Paraquat kezelés hatására most sem találtunk lényegi eltérést.



5.6.1. ábra: Klorofill fluoreszcencia mérés *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsokban és vad típusú növényekben 48 óra stressz kezelés után

Fény szakasz: 0-402 másodperc, sötét szakasz: 402-820 másodperc.



5.6.2. ábra: Az Fv/Fm értékek változása a két mérési időpont között eltelt 24 órában

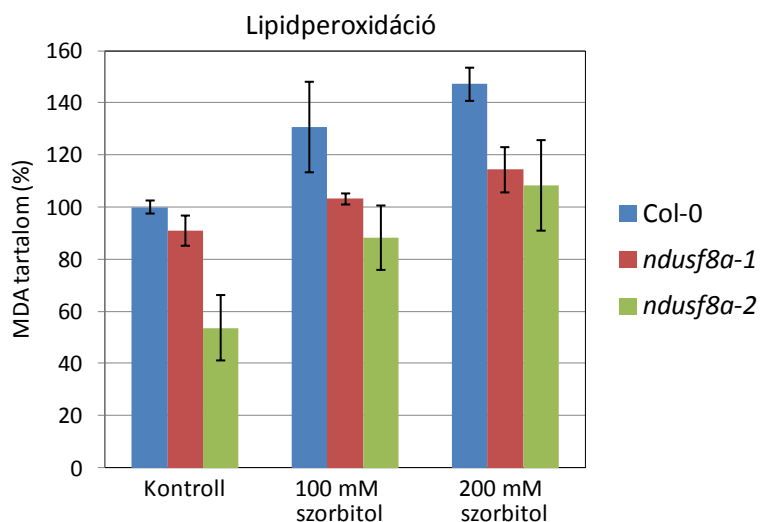
A szorbitol kezelés után kapott eredményeinket a következőképpen magyarázhatjuk:

- 1: Y(II) különbség: a különbség az Fv/Fm különbségből adódik, a görbék eltolódtak egymáshoz képest az ozmotikus stressz hatására, a II fotokémiai rendszer adott fényintenzitásra vonatkoztatott kvantum hasznosításában különbséget találtunk. A fényszakaszban a lineáris elektrontranszport hatékonysága még megfelelően működik azon a fény intenzitáson, amihez adaptálódott, míg a sötét szakaszban (a PSII általános állapotára utal, itt történik a regeneráció a fényszakasz után) a regeneráció sebessége ugyan olyan, csak a minimum és maximum értékekben van különbség, amiből kiindult és amihez visszatér - ez az Fv/Fm.
- 2: Fv/Fm különbség: ozmotikus stressz hatására a maximális kvantum hasznosítása a II fotokémiai rendszernek a két mutáns esetében jobb volt a vad típushoz képest. A mutánsokban 24, 48 óra alatt szignifikánsan nem változott az Fv/Fm, míg a vad típusnál 20-25 %-os csökkenést tapasztaltunk. A rövid távú (24, 48 óra) ozmotikus stresszel szemben az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutáns toleranciát mutatott.

5.7. Lipid peroxidáció mérése

A ROS sokféle útvonalon károsíthatják a sejteket. Egyik következménye a zsírsavak oxidációja. Így azzal, hogy megállapítjuk mennyire sérültek a lipidek,

következtetni tudunk a felhalmozódott ROS mennyiségére. Az ozmotikus stressz következtében is képződhetnek ROS. A stressz tűrő képesség tehát vizsgálható, ha a lipidperoxidáció mértékét megnézzük. Mi malondialdehid (MDA) mennyiségét mértük fotometrálián két hullámhosszon (600nm, 532 nm). A minták MDA tartalmát 24 órás 200mM és 400mM szorbitol kezelés után vizsgáltuk. A kiértékelésnél az adatokat a vad típusú (Col-0) növények kontroll (1/2 MS) körülmények között kapott értékét figyelembe véve számoltuk ki (5.7.1. ábra).



5.7.1. ábra: A lipid peroxidáció mértéke a különféle kezelések hatására az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* és mutánsokban.

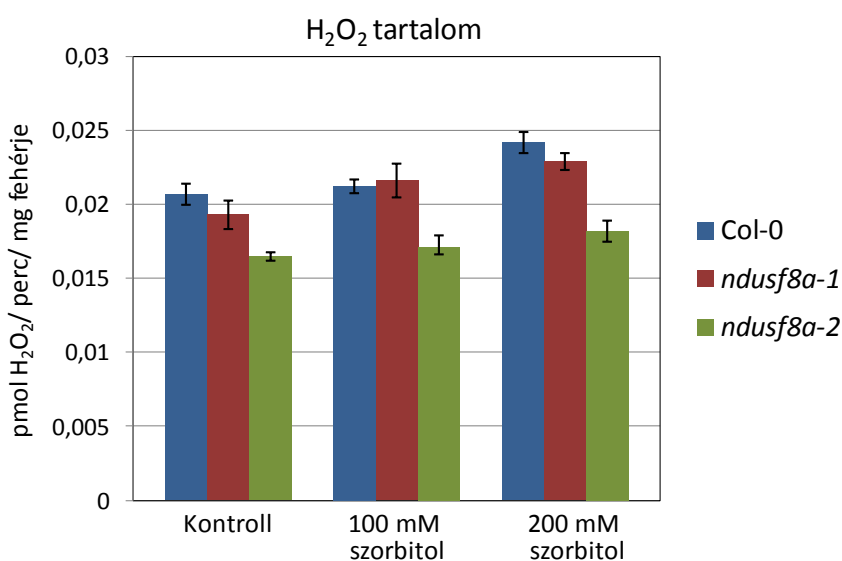
100 % : 1/2 MS táptalajon (Kontroll) növesztett Col-0 növények MDA tartalma

A MDA mennyiségi változása vonalanként eltérő volt. A szorbitol koncentrációjának emelésével együtt nőtt a lipidperoxidáció mértéke is. A legkisebb relatív változást az *ndusf8a-1* mutáns mutatta, aminél végeredményben 1,26-szorosára emelkedett a MDA szint, míg a vad típusban 1,47-szeresére. Ez azt jelenti, hogy ha a növények válaszát csak annyira vizsgálánk, hogy saját magukhoz képest, a szorbitol koncentrációjának növekedésével megegyező arányban nőtt-e bennük a MDA, akkor a legkevesebb növekedést ebben a vonalban tapasztalhatnánk. Ennél a vonalnál már a kontroll és a 200 mM szorbitolos kezelés eredményében is jóval kisebb volt a lipid peroxidáció mértéke. A vad növényekben átlagosan 1,31-szeresére, míg a vizsgált mutáns vonalban csak 1,13-szorosára növekedett a MDA. Az *ndusf8a-2* lipid peroxidációs vizsgálatakor sem a 200 mM sem a 400 mM szorbitol kezelés hatására nem alakult ki olyan magas MDA szint, mint a vad típusú növényben. Tehát az *ndusf8a-2* növényekben az ozmotikus stressz

következtében a lipidek károsodásának a mértéke kisebb volt, mint bármelyik másik itt vizsgált vonal esetében.

5.8. H₂O₂ kvantitatív meghatározása

A H₂O₂ nem tartozik a legerősebb, legreaktívabb ROS közé, viszont könnyen kimutatható, akkor is, ha kisebb mennyiségben van jelen, illetve oxidatív stresszt indukálhat. A H₂O₂ tartalom kimutatásakor 100mM és 200 mM szorbitol kezelést alkalmaztunk. A mintákat ugyanúgy 24 órán át kezeltük, mint a lipid peroxidációs vizsgálatoknál.



5.8. ábra: H₂O₂ tartalom mérés eredménye

Kontroll: 1/2 MS táptalaj

A H₂O₂ mennyiségének változása általában összefüggésben van a lipidperoxidáció mértékével. Ez követhető a mi méréseinkben is. A lipidperoxidáció mérésekor a legkevesebb MDA az *ndusf8a-2* mutánsban keletkezett (5.7. ábra). Ugyanígy itt, a H₂O₂ mérésben is ebben a vonalban keletkezett a legkevesebb H₂O₂ (5.8. ábra). Az *ndusf8a-1* mutáns már érzékenyebben reagált. MDA és H₂O₂ is több keletkezett, mint a *ndusf8a-2* mutánsban. Ugyanakkor még mindig kevesebb, mint a vad típusban. Ez főleg a magasabb szorbitol koncentrációnál volt megfigyelhető. A H₂O₂ tartalom mérése alátámasztotta az eddigi eredményeinket, vagyis az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* eltérő mértékben bár, de toleranciát mutatott ozmotikus stresszel szemben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényeket érő stressz hatások közül a só-, az ozmotikus- és a szárazságstressz is olyan nagymértékű lehet, hogy az egyed pusztulását eredményezheti. Így napjainkban azoknak a növényeknek, amelyek az ilyen jellegű hatásokkal szemben toleranciát mutatnak, jelentős mértékben megnőtt a szerepük például mezőgazdasági hasznosítások terén. Ezen stressz folyamatok végeredményeként a növényekben oxidatív stressz alakulhat ki, aminek hatására ROS halmozódhatnak fel a szervezetben. Ezek kialakulásának egyik legfontosabb sejten belüli központja a mitokondriális légzési lánc.

Kísérleteinket T-DNS inszerciós mutáns *Arabidopsis thaliana* növényeken végeztük melyekből a csírázási és növekedési tesztek során két olyan mutánst választottunk alaposabb vizsgálatokra, melyek ozmotikus, só- és oxidatív stressz kezelésekre eltérően reagáltak a kontrollként használt *Columbia* vad típustól. Ezek a mutánsok az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok. Bennük a mutáció az At1g79010 gént érinti, aminek terméke a mitokondriális légzési lánc I. komplex alkotója. A csírázási és elsődleges növekedési teszteken az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok NaCl és paraquat kezelésekre, eltérő módon ugyan, de érzékenységet mutattak, míg a szorbitollal szemben toleránsabbnak bizonyultak. A friss tömeg mérése is alátámasztotta ezeket az eredményeket. Ott az *ndusf8a-2*-es mutánsnál másfélszeres növekedés is volt megfigyelhető a vad típushoz képest 100 mM szorbitol kezelés hatására. A mutációk hatására az *ndusf8a-2* esetében nem íródik át a teljes mRNS, míg az *ndusf8a-1*-nél igen, de mennyisége nem egyezik a vad típusával. A klorofill fluoreszcencia változás mérésénél is megfigyelhető volt a mutáns növények ozmotikus stresszel szembeni toleranciája. A szorbitollal kiegészített táptalajon a mutáns vonalak ellenálló képessége sokkal tovább fennmaradt, mint a vad típusnak. A lipid peroxidáció és H₂O₂ tartalom méréseknél az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsok egyikében sem keletkezett annyi MDA és H₂O₂, mint a vad típusban.

Mivel az *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* növényekkel végzett kísérleteink mind ugyanazt az eredményt adták, miszerint a mutánsok egyértelmű toleranciát mutattak az általunk alkalmazott különböző szorbitol kezeléssel szemben, feltételezhetjük, hogy a mutáció által érintett gén és terméke fontos szerepet tölthet be a növények ozmotikus stressz elleni védekezésésként aktivizálódó folyamatiban.

7. NYILATKOZAT

Alulírott *Kiss Tünde*, *Biológia BSc* szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatomban foglaltak saját munkáim eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Szeged, 2012.11.04.

.....

Kiss Tünde

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Zsigmond Laura tudományos munkatársnak a kísérletek eredményes megvalósításában nyújtott segítségét, illetve a rengeteg elméleti háttérrel és gyakorlati tanácsokat, amelyek lehetővé tették, hogy ez a dolgozat elkészüljön.

Köszönettel tartozok Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma egyetemi docensnek, az SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy a tanszéknél dolgozhassak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabados Lászlónak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportnál dolgozhassak.

Ezúton szeretném megköszönni az Arabidopsis Molekuláris Genetikai csoport minden tagjának folyamatos segítőkészségüket.

És nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak.

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Apel K and Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399

Ádám Veronika (2004): Orvosi biokémia, Medicina Könyvkiadó Rt.

De Robertis E. D. P.- Nowinski W. W. -Saez A. S. (1970): Sejtbiológia (Akadémiai Kiadó – Budapest)

Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127: 159–172

Donato Pastore, Daniela Trono, Maura N. Laus, Natale Di Fonzo and Zina Flagella (2007), Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress A case study: durum wheat mitochondria, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 2, pp. 195–210

Dudits Dénes, Heszky László: (2000), Növényi biotechnológia és géntechnológia Agroiinform Kiadó, Budapest

Erdei László (2004): Növényélettan, Növekedés-és fejlődésélettan, Jatepress Szeged

Etienne H. Meyer, Tiago Tomaz, Adam J. Carroll, Gonzalo Estavillo, Etienne Delannoy, Sandra K. Tanz, Ian D. Small, Barry J. Pogson, and A. Harvey Millar (2009): Remodeled Respiration in *ndufs4* with Low Phosphorylation Efficiency Suppresses Arabidopsis Germination and Growth and Alters Control of Metabolism at Night

Frank Van Breusegem, James F. Dat (2006), Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death, *Plant Physiology June 2006 vol. 141 no. 2 384-390*

Hassan Harrak, Hélène Chamberland, Michèle Plante, Guy Bellemare, Jean G.

Lafontaine and Zohreh Tabaeizadeh (1999): A Proline-, Threonine-, and Glycine-Rich Protein Down-Regulated by Drought Is Localized in the Cell Wall of Xylem Elements
Plant Physiology October 1999 vol. 121 no. 2 557-564

Heng- Long Wang, Ping- Du Lee, Li- Fei Liu, Jong- Ching Su (1999): Effect os sorbitol induced osmotic stress ont he changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin. (1999) 40: 219-225*

Kazuo Shinozaki¹ and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki (2006): Gene networks involved in drought stress response and tolerance
Published by Oxford University Press [on behalf of the Society for Experimental Biology].

Koncz Csaba – Rédei György (1999): A molekuláris genetika eszközei: Agrobacterium T-DNS és Arabidopsis. In: Molekuláris növénybiológia. Szerk. Balázs Ervin – Dudits Dénes. Akadémiai Kiadó. 323-452.

Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* 7: 323–328

Láng Ferenc (2007): Növényélettan, A növényi anyagcsere I-II. ELTE Eötvös Kiadó

Luis A. del Río, Luisa M. Sandalio, Francisco J. Corpas, José M. Palma, and Juan B. Barroso (2006) : Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol.* 2006 June; 141(2): 330–335.

Mandre, M. (2002.): Stress concepts and plants. – Forestry Studies / Metsanduslikud uurimused XXXVI, lk. 9–16. ISSN 1406-9954.

Etienn H. Meyer, Tiago Tomaz, Adam J. Carroll, Gonzalo Estavillo, Etienne Delannoy, Sandra K. Tanz, Ian D. Small, Barry J. Pogson, and A. Harvey Millar

(2009) Remodeled Respiration in *ndufs4* with Low Phosphorylation Efficiency Suppresses Arabidopsis Germination and Growth and Alters Control of Metabolism at Night. *Plant Physiology* vol. 151, 603–619

Miguel Angel Torres, Jonathan D.G. Jones, Jeffery L. Dangl (2006): Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* June vol. 141/2, 373-378

Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures.

Physiol. Plant 15:473-497. Pierce, M. and K.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867–880

Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129: 185-195

Novák Béla (1994): *Sejtbiológia*, Akadémiai Kiadó

Owen K. Atkin¹ and David Macherel (2009): The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance
Annals of Botany 103: 581–597

Pethő Menyhért (1998): *A növényélettan alapjai*, Akadémiai kiadó

Plaxton WC, Podesta FE (2006) The functional organisation and control of plant respiration.
Crit Rev Plant Sci 25: 159–198

Ramiro Lascano, Nacira Muñoz, Germán Robert, Marianela Rodriguez¹, Mariana Melchiorre¹, Victorio Trippi and Gastón Quero (2012): Paraquat: An Oxidative Stress Inducer

Szalai István (2006): *A növények élete, ahogyan ma látjuk I-II.* Nemzeti Tankönyvkiadó

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines, *Plant Science*.

Yokoi S, Bressan RA and Hasegawa PM (2002): Salt Stress Tolerance of Plants.
JIRCAS Working Report, 25-33

Taiz L and Zeiger T (2012): Plant Physiology. Sunderland, MA, USA, Sinauer Associates Inc.

10. FÜGGELÉK

T-DNS specifikus primerek:

név	szekvencia (5' → 3')	referencia
Fish2	CAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCA	SALK, RB
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	SALK, LB
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	SALK, LB
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	SALK, LB

Génspecifikus primerek:

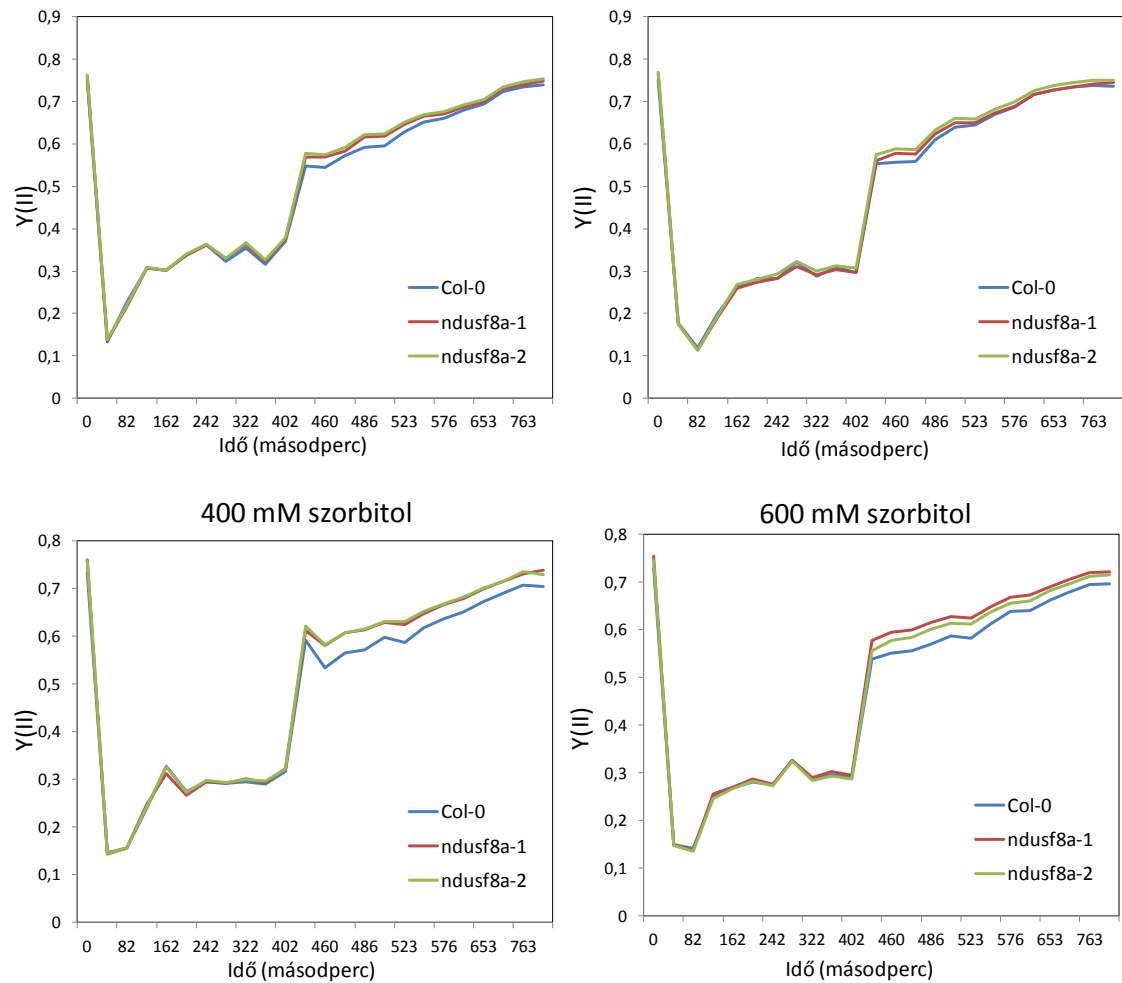
név	szekvencia (5' → 3')	gén
MPP α -2salk-F	GCCAAAGCAGCAACAAAATC	At3g16480
MPP α -2salk-R	CCGAAGAGAAGAAATACGCAAC	At3g16480
CYC1-1-F2	CCGCTGTGTCATCGTGGAAC	At3g27240
CYC1-1-R2	GCCGAAAATAGACAACAAAATCAGAG	At3g27240
UCR1-1-F2	CGAAGCTGTCAAAACGCCTAAC	At5g13430
UCR1-1-R	GCGATGGATAAACGAAGATTGA	At5g13430
FPBP4-F	AAGGTCTGGATTGTGTTTGTGTTGT	At5g63510
FPBP4-R	GTTTCTTCGTTGGTTAGGGTTCT	At5g63510
NDUFS5a-F	CCTCAAAAGTTCACACGCAAG	At3g62790
NDUFS5a-R	TCTAATCCACCAACAAGTCAAACA	At3g62790
MPP β -F2	GAAATGCCAACAATCAACAGAA	At3g02090
MPP β -R2	CTCTTCTCCAACGCTCTCAC	At3g02090
NDUFA9-F1	GGAGAAGGAGCACGTATAGAAAGG	At2g20360
NDUFA9-R1	AAATCAGAGGAAACACACAAAATCA	At2g20360
NDUSF8A-F	TGTTTATGCTCCGTTCAAAGACTAC	At1g79010
NDUSF8A-R	ATTCCTAGTTCTCGTTTCACCAACT	At1g79010
NDUSF8a-RT-F1	CAATCGCAGTGAAGAAGGAAG	At1g79010
NDUSF8a-RT-R1	GTCGAGCACGGAGAGTATTCAG	At1g79010
NDUSF8a-RT-F2	GCAGCAACAAAGATGATGAAGA	At1g79010
NDUSF8a-RT-R2	TACTTGAGGGTCAGCGACAAAC	At1g79010
UBQ10F	GGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCT	At4g05320
UBQ10R	CTTATTCATCAGGGATTATACAAG	At4g05320

1.1. táblázat: A kísérleteink során használt primerek listája.

Homozigóta vonalak (19 db):

N672027	24	QCR6-2	At2g01090	SALK_125126C
N580960	18	NDUFA8a	At3g06310	SALK_080960
N645408	3	MPP α -2	At3g16480	SALK_145408
N653253	21	NDUSF8a	At1g79010	SALK_062179C
N653481	3	NDUSF8a	At1g79010	SALK_129902C
N654052	1	CYC1-1	At3g27240	SALK_008750C
N666573	2	CYC1-1	At3g27240	SALK_083695C
N655676	5	QCR7-1	At4g32470	SALK_084317C
N660705	1	FPBP2	At1g47260	SALK_010194C
N879130	1	FPBP2	At1g47260	SAIL_1276_C05
N663730	2	UCR1-1	At5g13430	SALK_115315C
N670799	2	UCR1-1	At5g13430	SALK_061350C
N666407	1	FPBP4	At5g63510	SALK_151958
N651958	20	FPBP4	At5g63510	SALK_072274C
N667491	2	FPBP5	At5g66510	SALK_140677C
N862587	3	FPBP5	At5g66510	SAIL_404_C10
N674402	25	NDUFS5a	At3g62790	SALK_034578C
N676996	4	MPP β	At3g02090	SALK_133951C
N684316	3	NDUFA9	At2g20360	SALK_098106C

1.2 táblázat: A PCR technika segítségével megtalált 19 homozigóta vonal.



1.3. ábra: Klorofill fluoreszcencia mérés *ndusf8a-1* és *ndusf8a-2* mutánsokban és vad típusú növényekben 24 óra stressz kezelés után

Fény szakasz: 0-402 másodperc, sötét szakasz: 402-820 másodperc