

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MEZŐGAZDASÁGI KAR
NÖVÉNYTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI INTÉZET**

**A RIZS (*Oryza sativa* L.) HIDEGTŰRŐ KÉPESSÉGÉNEK FOKOZÁSA
BIOTECHNOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

TDK dolgozat

Készítette:
FINTA ÁKOS
III. évfolyamos hallgató

Belső konzulens:
DR. MONOSTORI TAMÁS
Főiskolai tanár

Külső konzulens:
DR. MIHÁLY RÓBERT
Tudományos munkatárs
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

**HÓDMEZŐVÁSÁRHELY
2012**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A RIZS JELENTŐSÉGE	5
2.2. A RIZS ÖKOLÓGIAI IGÉNYEI.....	7
2.3. A RIZS GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA.....	8
2.3.1. Rovarrezisztens transzgénikus rizs.....	9
2.3.2. Transzgénikus betegségrezisztens rizs	9
2.3.3. Transzgénikus herbicid-toleráns rizs.....	10
2.3.4. Abiotikus stressz-tolerancia	10
2.3.4.1. Géntechnológiai sikerek a stresszrezisztencia fokozására, minőségi tulajdonságok javítására	11
2.4. TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK (SOLTÉSZ NYOMÁN).....	12
2.5. A CBF GÉNEK JELLEMZÉSE (SOLTÉSZ NYOMÁN).....	13
2.6. A GENETIKAI TRASZFORMÁCIÓ MÓDSZERTANÁNAK ÁTTEKINTÉSE RIZSBEN.....	14
2.6.1. Közvetett DNS-bevitel	15
2.6.2. Közvetlen DNS-bevitel	16
2.7. A SZELEKCIÓS RENDSZER ELMÉLETI ALAPJAI, A BAR GÉN	17
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	19
3.1. NÖVÉNYI ANYAG	19
3.2. KALLUSZINDUKCIÓ, A NÖVÉNY-SEJT-NÖVÉNY RENDSZER INDÍTÁSA.....	20
3.2.1. Az 'Unggi-9' szövettenyésztéséhez használt táptalajok összetétele	21
3.3. A RIZS GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA.....	24
3.3.1. Alkalmazott plazmid-DNS	24
3.3.2. A genetikai transzformáció előkészítésének menete	25
3.3.3. A génbevitel menete.....	27
3.4. A SZELEKCIÓ ÉS A NÖVÉNYREGENERÁCIÓ MENETE.....	27
3.5. DNS-IZOLÁLÁS KALLUSZ- ÉS LEVÉLMINTÁKBÓL	28
3.6. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)	29
3.6.1. Gélelektroforézis	30
4. EREDMÉNYEK	31
4.1. A RIZS TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER OPTIMALIZÁLÁSA, TRANSZFORMÁCIÓ RIPORTER GÉNT TARTALMAZÓ KONSTRUKCIÓVAL	31
4.2. CBF GÉNEK TRANSZFORMÁCIÓJA JÓ REGENERÁCIÓS KÉPESSÉGŰ JAPONICA TÍPUSÚ RIZSBEN.....	34
4.3. A TRANSZFORMÁCIÓ TÉNYÉNEK BIZONYÍTÁSA PCR TECHNIKÁVAL	36
5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	41
6. ÖSSZEFOGLALÁS	43
7. IRODALOMJEGYZÉK	44
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	50

1. BEVEZETÉS

Földünk jelentős éghajlatváltozáson esik át, a növényeknek állatoknak alkalmazkodniuk kell a megváltozott időjárási körülményekhez. A növények számára egy hidegebb-melegebb, szárazabb-csapadékosabb időszak alkalmával különböző környezeti feltételekhez kell alkalmazkodniuk. A Kárpát-medencének igen sajátos az éghajlata, előfordulhat, hogy egyszerre több abiotikus stressz faktor jelentkezik. A növénynemesítőknek egyre több stresszhatás ellen kell nemesíteniük a növényeiket. A növényi biotechnológia gyors fejlődésével és ezen belül a géntranszformációs módszerek alkalmazásával, megvalósulni látszik, hogy úgy alakítható át egy fajta tulajdonsága, hogy a többi tulajdonság értéke ne csökkenjen. Az abiotikus stressz-tolerancia kialakulásában részt vevő élettani, biokémiai folyamatok tanulmányozása sok évtizedes múltra tekint vissza. Nehéz területnek tekinthető az abiotikus stresszek káros hatásának leküzdése, mivel a legtöbb abiotikus stressz-tolerancia több gén által meghatározott jelleg. A rizs trópusi, szubtrópusi országokban honos, ennek ellenére sikerült hűvösebb, szárazabb éghajlatú területeken is termesztésbe vonni, így hazánkban is. Ezért a rizs (*Oryza sativa* L.) kiváló alanya a hidegtűréssel kapcsolatos vizsgálatnak. Ha a rizs hidegtűrését sikerülne fokozni, a világ rizstermő területeinek száma jelentősen megnőne. Ezáltal a világon az éhínség csökkenne, mivel a rizs harmadik világ fő tápláléka. A tolerancia kialakításában és finomhangolásában a transzkripciós faktorok kulcsszerepet játszanak, ezért a genetikai szabályozás molekuláris folyamatainak feltárásakor az utóbbi években vizsgálatuk a kutatások középpontjába került. Az anyagcsere-folyamatokban részt vevő gének nagy csoportjainak működését képesek szabályozni.

A legrészletesebben lúdfűben tanulmányozták a *CBF/DREB1* transzkripciós faktorok szerepét alacsony-hőmérsékleti stressz esetében, de léteznek olyan kutatások is, melyek búzában (*Triticum aestivum* L.) és árpában (*Hordeum vulgare* L.) tanulmányozták. Kutatások igazolták, hogy a *CBF/DREB1* génnel, ezen belül a *CBF-14* és *CBF-15* esetében transzformált növények megnövekedett hideg-, illetve fagytűrést, és fokozott szárazságtűrést mutattak.

Kutató munkám során szerencsém volt bekapcsolódni a szegedi Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályán folyó izgalmas kutatásba, ahol rizs (*Oryza sativa* L.) hidegtűrését fokozó géneket jutattunk be rizsbe. Kísérletünkben 'Unggi-9' rizsfajta genetikai módosításával foglalkoztunk. *CBF-14*, *CBF-15* géneket juttattunk be ebbe a fajtába. Ezek a gének feltételezhetően szerepet játszanak a növények hideg, illetve fagytűrésében. Kutatómunkám legfontosabb célkitűzései - az előzőek alapján - a következő pontokban foglalhatók össze.

Célkitűzések:

1. A rizs transzformációs rendszer optimalizálása, transzformáció riporter gént tartalmazó konstrukcióval.
2. *CBF* gének transzformációja jó regenerációs képességű *japonica* típusú rizsbe.
3. A transzformáció tényének igazolása.
4. Genetikai alapanyag előállítása abiotikus stresszélettani kísérletekhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

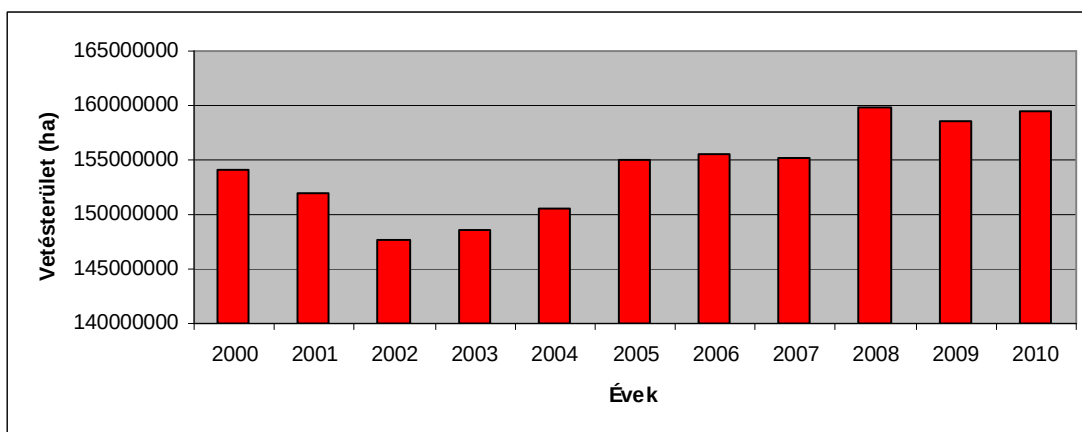
2.1. A RIZS JELENTŐSÉGE

A világon az egyik legértékesebb élelmiszernövényének tartják a búza után, fehérjetartalma (7,5%) kisebb, mint a búzáé, de esszenciális aminosav-összetétele az állati fehérjékhez hasonlít. Energia és szénhidrát tartalma magas, keményítője könnyen emészthető, B- és E- vitamin tartalma magas (Simonné Kiss, 1983). Napjainkban a korszerű zsírszegény táplálkozás egyik bázisanyagává vált, elsősorban barna csiszolatlan formában.

A hántolt rizs 95%-a emberi fogyasztásra kerül főzött, puffasztott, esetleg vitaminokkal, fehérjével dúsított formában. A hántolás során rizstörmelék keletkezik, mely ipari nyersanyag, keményítőt, rizsport készítenek belőle. A rizskorpát, rizslisztet sertéstakarmányként hasznosítják, illetve búzaliszttel keverve keksz készítéséhez. A szesziparban a rizstörmelékből rizsbort, pálinkát és különleges minőségű söröket állítanak elő. Szalmáját papír, kötél, zsákkészítésre használják fel (Tanács, 2005). További jelentősége, hogy olyan talajon is vethető, ahol más szántóföldi növény már nem termeszthető eredményesen.

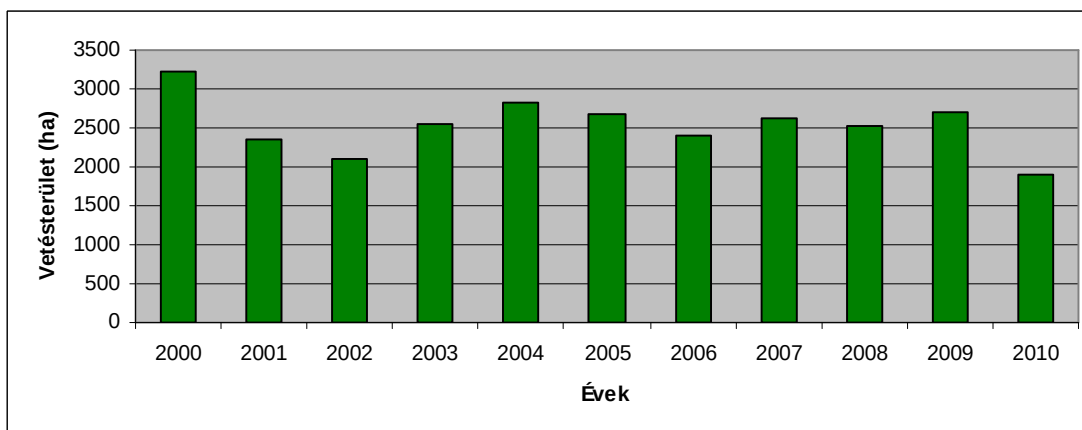
A rizs (*Oryza sativa* L.) a pászitfűfélék családjába (*Poaceae*), az *Oryza* nemzetségbe tartozik. A világon több ezer év alatt 40.000. rizsfajta alakult ki, melyek három morfológiai és genetikailag elkülönült alfajba sorolhatók: az *indica*, *japonica* és a *javaica* alfajok. Az *indica* trópusi alfaj, egyéb földrajzi területeken a *japonica* alfaj elterjedt, Mind a három alfajnak van árasztott és száraz termesztéshez alkalmazkodott változata is (Simonné Kiss, 2005). Magyarországon az árasztást igénylő *japonica* változatai állnak termesztés alatt, de a sikeres nemesítői tevékenység folytán szárazon termesztett változatok is kialakultak már. Jelenleg Magyarországon államilag minősített rizsfajták: Janka, Ábel, Bioryza H, Dáma, Risabell (www.nebih.gov.hu).

A rizs a világon a harmadik legnagyobb területen termesztett növény. A világon termőterülete 10 éves FAO adatok alapján 154,2 millió hektár volt (1. ábra). A 2010-es gazdasági évben a rizsből a világon összesen 696 millió tonna termett. Koreában és Japánban egyszeri aratással képesek elérni az 5-6 tonnás termésátlagot, de Ausztrália egyes területein a 15 t/ha-os átlagtermést is el tudják érni.



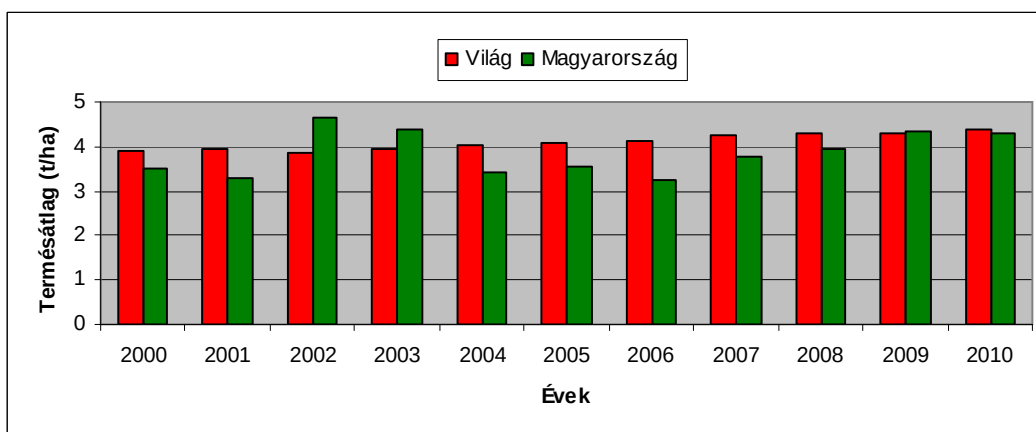
1. ábra A rizs vetésterülete a világon

A vetésterület Magyarországon az évtizedek során az öntözési költségek megemelkedésének köszönhetően fokozatosan csökkent, 10 éves KSH adatok alapján kb. 2500 hektár (2. ábra).



2. ábra A rizs vetésterülete Magyarországon

Hazánkban a szarvasi HAKI-ban folyik nemesítése. Termésátlaga a világon 4,1 t/ha míg hazánkban 10 éves FAO adatok alapján eléri a 3,8 t/ha-t (3. ábra).



3. ábra A rizs termésátlaga

2.2. A RIZS ÖKOLÓGIAI IGÉNYEI

A rizs melegkedvelő - termofil, rövidnappalos növény, effektív hőösszeg-igénye igen magas, 1400 °C. Jelenleg a trópusi, szubtrópusi és a mérsékelt égövekben az 53° északi és 40° déli szélességi fok között, valamint síkságokon és a tengerszint felett több ezer méter magasan lévő területeken termesztik. Magyarországon a 46° 40' - 47° 40' északi szélesség között termesztik (Ruzsányi, 1996). A rizs asszimilációs hőküszöb-értéke 10 °C, ebben a térségben a 10 °C meghaladó napi középhőmérséklet időtartama (tavasztól, őszig) meghaladja a 180 napot. A vetéstől a betakarításig a hőösszeg értéke meghaladja a 2600-3000 °C-ot (Simonné Kiss, 2005). Az időjárás elemei közül főleg a hőmérséklet a tavaszi időben szélsőségesen ingadozhat. Ezért hőmérséklet szempontjából kritikus időszak a csírázás (12-14 °C), ami az ország déli részén április 10.-20. közötti időre tehető, de más körzetekben ez későbbre esik április 20-25.-re. A bokrosodás (16-18 °C) általában június 2-3. dekájára befejeződik. A virágzás, megtermékenyülés (20-22 °C) szakasza, így a legkedvezőbb, ha ez az időszak július 20. és augusztus 5. közé esik (Kristó, 2004). Ezekben az időszakokban nagyon fontos, hogy a növény, ne szenvedjen nagy hőingadozástól, mert fejlődése lelassul és fokozódik a buga sterilitásának veszélye, valamint a termés mennyisége is csökken. A vízrétegnek a nagy fajhő következtében bizonyos kiegyenlítő hatása van a talaj hő háztartására, valamint a rizsállomány mikroklímájára.

Fényigénye változó, a 140 napos tenyészidőszak során meghaladja az 1200-1500 napsütéses órák számát. A rizs fényigénye a különböző fejlődési fázisokban eltérő, a tenyészidő elején a vegetatív szakaszban (május, július eleje, közepe) kevésbé befolyásoló tényező, míg a reprodukív (július, augusztus) szakaszban szerepe megnő. A napfénytartam és a szemtermés pozitív korrelációban áll egymással (Ruzsányi, 1996).

A rizs vízigényes növény, ezért a megfelelő mennyiségű és minőségű termés eléréséhez vízigényének kielégítése különösen fontos. Ez a tenyészidőszak alatt 500-700 mm-re tehető. A

vízmennyiséget pótolhatjuk öntözéssel, árasztással. A túl csapadékos időjárás káros lehet a növény számára, mert kisebb lesz a napi hőösszeg, valamint fényhiány léphet fel. A rizst minél erősebb vízzáró rétegű talajon érdemes termesztetni, mert annál kevesebb öntöző vizet kell kijutatni a tenyészidő alatt.

A rizs a talaj iránt nem igényes, de fontos hogy a vízzáró réteg ne legyen túl mélyen az öntözővíz takarékoság végett. A talaj összes sótartalma nem haladhatja meg a 0,4-0,6%-ot, a szóda tartalma, pedig a 0,1%-ot. Az enyhén savanyú talajokat kedveli, optimális számára 5-6 pH.

Ezeknél jobb tápanyag és víz-, levegő- és hő gazdálkodású talajokat más szántó földi növények termesztésére használjuk (Kristó, 2004).

Magyarországon a rizs termesztéséhez az ország keleti, délkeleti részen a legmegfelelőbbek az éghajlati és a vízellátási viszonyok. A rizstermesztés nagyrészt Békés, Jász-Nagykun-Szolnok, kisebb mértékben a Tisza és Körösök mentén lévő megyékben történik.

2.3. A RIZS GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA

Az utolsó fél évszázadban a rizs minőségbeli és termőképességbeli tulajdonságainak javításában hatalmas sikereket értek el. Az utolsó évtizedben a hozama nem változott a termesztéstechnológiák hiánya, illetve az egyre gyakoribb és súlyosabban megjelenő hatalmas veszteséget okozó kártevők, kórokozók és abiotikus stresszhatások miatt. Válaszul erre a kínai tudósok előálltak egy új rizsfejlesztési céllal, amely a „Zöld Szuper Hibridrizs” kifejlesztését jelentette. Ebben a rizs öt tulajdonságára összpontosítanak: rovar és kórokozó elleni rezisztencia javítása, aszály- vagy szárazságtűrő képesség fokozása, tápanyag-felhasználás hatékonyságának javítása, illetve minőség- és hozambeli tulajdonságok növelése (Zhang, 2007). Mai napig a rizsről számos géntechnológiai témájú tanulmány látott napvilágot, melyeknek célkitűzései egybeesnek a „Zöld Szuper Hibridrizs” létrehozásával. A teljes genomszekvenciájának megismerése után a rizs ugyancsak kiváló alanya a funkcionális genomikai, genetikai kísérleteknek, melyekben lehetőség nyílik a gének valódi funkciójának megismerésére. Ehhez kiváló eszköz a gén transzformációja, működésének felerősítése, vagy elcsendesítése.

2.3.1. Rovarrezisztens transzgénikus rizs

A növények általában rendelkeznek bizonyos szintű rovarrezisztenciával. A rovarkártétel az egyik legnagyobb okozója a hozamvesztésnek, ami 10%-ra tehető évente. A rizs rovarrezisztenciájának javítása nemesítési eljárásokkal környezetbarát és gazdaságosabb stratégia, mint a rovarölő szerek túlzott használata, melyek nemcsak a termelési költséget növelik meg, hanem emellett szennyezik a környezetet és veszélyt jelentenek az ember egészségére. Rovarrezisztens fajták nemesítése hagyományos eljárásokkal időigényes, és még nem sikerült azonosítani egyetlen hatékony rezisztens genetikai anyagot sem a rizs legfontosabb kártevői ellen a világon. Jelenleg ígéretes módszer a transzgénikus rovarrezisztens fajták kifejlesztésére idegen rezisztenciagének bejuttatása rizsbe. A kutatások során sok hasznos rezisztenciagént sikerült azonosítani és izolálni növényekből, állatokból és mikroorganizmusokból is, és ily módon sikerült transzgénikus rovarrezisztens rizs vonalakat létrehozni. Ezekből néhányat teszteltek szántóföldi körülmények között, és termesztésük során biztató eredményeket mutattak (Chen et al., 2009).

2.3.2. Transzgénikus betegségrezisztens rizs

A rizs nemesítése során az egyik legfontosabb cél a betegség-rezisztencia kialakítása, hiszen a rizs környezetében a kórokozók állandóan jelen vannak. A rizs legfontosabb kórokozói, amelyek termesztés során előfordulhatnak: rizs baktériumos levélfoltossága, rizs járványos barnulása, illetve a levél és levélhüvely-betegségei. A rizs baktériumos levélfoltossága (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*) a legpusztítóbb bakteriális fertőzés világszerte (Guo, 1995), ami 20-30%-os hozamvesztést okozhat. A rizsnek a legveszedelmesebb gomba betegsége a járványos barnulás (*Magnaporthe grisea*), ami a növény bármely növekedési stádiumában és bármelyik szervében megjelenhet. Eddig több mint 30 baktérium-rezisztenciagént (R) vagy a *Xanthomonas oryzae* elleni lókuszt sikerült beazonosítani. Ezek közül 6 R gént klónoztak sikeresen, ezen kívül még több gént jól jellemeztek (Wu et al., 2008, Wang et al., 2009). A rezisztenciagének bejuttatása a kívánt rizsfajtákba a részecske belövással a leghatékonyabb és legegyszerűbb. Zhang-nak 1998-ban sikerült bejuttatnia egy olyan széles spektrumú *Xa21* gént, ami egy jelentősen megnövekedett rezisztenciát mutat *Xanthomonas oryzae*-val szemben (Zhang et al., 1998).

Több mint 60 fontosabb gombabetegség elleni gént sikerült a rizsben azonosítani, ebből 10 rezisztenciagént sikerült már klónozni is (Lee et al., 2009). Mivel a *M. grisea*-nak igen nagy a variabilitása, ezért a termesztett, már rezisztenciával rendelkező fajták 3-5 évvel később elveszthetik rezisztenciájukat. A nemesítőknek ez a betegség nagy kihívást jelent, mert sajnos tartós rezisztenciát biztosító, nem rasszspecifikus rezisztenciagéneket még nem tudtak azonosítani (Chen et al., 2009).

2.3.3. Transzgénikus herbicid-toleráns rizs

Az első herbicid-toleráns növény 1996-ban került bemutatásra a világon (Heszky és Dudits, 2000). A herbicid-toleráns rizs kifejlesztésének két alapvető módszere van. Az egyik a herbicidek célfehérje génjeinek a módosítása annak érdekében, hogy csökkentsék érzékenységüket vagy növeljék kifejezési szintjüket. A másik módszer, hogy új enzimrendszereket juttatunk be géntechnológia segítségével annak érdekében, hogy javítsák a herbicidek metabolikus kapacitását. A transzgénikus herbicid-toleráns rizs előállításának okai a következők voltak: a költséget csökkentette és a jövedelmet növelni tudta, valamint növelte a magtisztaságot a hibrid rizs termesztéséhez. A herbicidrezisztencia kapcsán a legfontosabb eredmény mégis az volt, hogy szelekciós markerként használható transzgénikus növények előállításakor (Chen et al., 2009).

2.3.4. Abiotikus stressz-tolerancia

Az abiotikus stresszek hátrányosan befolyásolhatják a növények növekedését, termelékenységét és számos morfológiai, fiziológiai, biokémiai és molekuláris jellemzőjét. Ezért nagyon fontos az abiotikus stresszekkel szembeni tolerancia kialakítása, mert azok a növények termesztése során a termésmennyiség egyik limitáló tényezőjét jelenthetik. A növényeket több stresszhatás is érheti egy időben. Stressz esetén a növények alkalmazkodnak a stresszorhoz, olyan megváltozott fiziológiai állapotba kerülnek, mely jobban megfelel az új környezeti feltételeknek. Ha a növény nem képes alkalmazkodni a stresszhez, akkor növekedése és fejlődése nem kielégítő, szélsőséges esetben a növény pusztulásához is vezethet (Hoffmann, 2011). A növények életük során számos abiotikus stresszel találkoznak: aszály, szélsőséges hőmérséklet, túl sok csapadék, szikes, toxikus, nehéz fémeket tartalmazó talaj. A veszteségek csökkentésének egyik útja a kedvezőtlen hatásokhoz adaptálódott fajták nemesítése lehet, melyek az adott környezetben gazdaságosan termesztethetők. A géntechnológia célja az abiotikus stresszek által okozott sejtkárosodások megakadályozása, olyan gének feltérképezése, amelyek szerepet játszanak a tolerancia kialakításában. Napjainkban egyre több ilyen gént fedeznek fel.

A géntérképezés és a molekuláris markerekre alapozott szelekció használata nagymértékben hozzájárul olyan rizsek fejlesztéséhez, amelyek valamilyen abiotikus stressztoleranciával rendelkeznek. Ezek lehetnek só-toleráns, aszálytűrő, herbicid-toleráns, valamint hidegtűrő képességgel rendelkező transzgénikus rizsek.

2.3.4.1. Géntechnológiai sikerek a stresszrezisztencia fokozására, minőségi tulajdonságok javítására

A rizs rovarkártevőkkel szembeni rezisztenciájának kialakítására a Bt rizs az egyik legjobb példa, amely a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxinját termeli. Ye et al. (2009) előállított egy szintetikus *cry1C* gént, melyet *Agrobacterium*-os transzformáció során *japonica* fajtába közvetített. Az ily módon kapott transzgénikus növényekben a rovarkártevők legfőbb célpontjait jelentő levélben és szárban lehetett legnagyobb mennyiségben megtalálni a Bt fehérjét, míg az ehetséges endospermiumban alig lehetett kimutatni. A fogyasztók aggodalmai miatt, a mai napig nem került termesztésbe, melynek fő oka a Bt fehérje-tartalma (Chen, 2009).

A rizs baktériumokkal szembeni rezisztenciájának fokozására számos gént felfedeztek már és ezek közül többet be is jutattak rizs növényekbe, melyek termesztésük során biztató eredményeket mutattak. Ilyenek például a *Xa-1*, *Xa-4*, *Xa-5*, *Xa-13*, *Xa-21* gének (Yoshimura et al., 1992, Zhang et al., 1996).

A vitamintartalom növelését célzó génbeépítések közül a legismertebb az aranyrizs, melynek nemesítése során, a rizsszem endospermiumában az A-vitamin elővitaminja, a β -karotin szintetizálódik. A javított génkonstrukciókkal létrehozott rizs-transzformánsok 31 μg β -karotin felhalmozására képesek 1 g száraz szemsúlyra vonatkoztatva (Paine et al., 2005). A becslések szerint 72 g ilyen rizs elfogyasztásával a gyerekek napi A-vitamin-szükségletének fele fedezhető. Azonban a β -karotinból képződhet retinoiksav, amely sokkal kisebb koncentrációkban már aktív, és túlzott mennyisége okozhat fejlődési rendellenességet (Schubert, 2008). Ezért úgy kell optimalizálni a táplálék β -karotinszintjét, hogy a mellékhatások elkerülhetők legyenek (Dudits, 2009.)

A rizs herbicid toleranciájának fokozása érdekében a nemesítő cégek leggyakrabban a bar gént a használják a tolerancia kialakítására, de elterjedt ezen kívül még a Monsanto cég glifozát hatóanyagú „Roundup Ready” rizse is. A bar gént több rizsnövénybe bejutatták, ezek közül néhány: Minghui 83B, IR 72 (Wu et al., 2006).

A rizs szárazság-, só- és hidegtűrésének szabályozásáért általában egy gén felelős. A leggyakrabban alkalmazott gének: *OsDREB1*, *OsWRKY1*, *OsZIP23*, *SNAC1*, *OsSKIPa*. Ezek a gének egyes termesztett fajtákban már megtalálhatóak (Chen et al., 2009).

A rizs *OsMYB4* génje hideg-stresszt jelentő 10-15 °C-on expresszálódik a hajtásban, de alacsony szinten kontroll körülmények között is átíródhat. Háromnapos rizs koleoptiljában 4 °C-os hidegkezelés hatására négy órán belül jelentősen megnő az mRNS átírása, de ABA- vagy IAA-kezelés nem indukálja. Ez azt feltételezi, hogy az *OsMYB4* génnek rizsben a hidegre adott stresszválaszban van szerepe (Vannini et al., 2004).

2.4. TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK (Soltész nyomán)

A transzkripció faktorok a génszabályozás fontos és nélkülözhetetlen résztvevői, minden élőlényben megtalálhatók. Kiemelkedő szerepük van a génszabályozásban, biztosítják egy adott gén szövet-, fejlődés- vagy stimulus-specifikus kifejeződését úgy, hogy kötődnek a célgén promóteréhez, és felerősítik, vagy éppen gátolják a gén átíródását. A transzkripció faktorokat kódoló génekben több funkcionális szekvencia (domain) található, amelyek alapján családokba, alcsaládokba sorolhatjuk. Általában a domain-jeik nagymértékben szabályozottak, de számos példa ismert, hogy az egy családba tartozó transzkripció faktorok különböző folyamatok szabályozásában vehetnek részt. Ezt a többi domain működése teszi lehetővé (Soltész, 2011). A transzkripció faktorok sok esetben homo- vagy hetero-oligomerként működnek, a ligandum-kötő és főként a regulációs domain-ek (melyek más faktorokkal való kapcsolódást biztosítanak) a génexpresszió finom szabályozását teszik lehetővé (Goodrich és Tjian, 2006).

Miután a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modellnövény teljes szekvenciájának meghatározása megtörtént 2000-ben, lehetőség nyílt a fehérjék, ezen belül a transzkripció faktorokat kódoló gének számának becslésére. Az előbbieket 25 498-re, míg az utóbbiakét - a DNS-kötő domain-ek elemzése alapján - mintegy 1500-ra becsülték, ez a szám mára már a 2000-et is meghaladja (Soltész, 2011). A növényi genom több transzkripció faktort kódol, mint az állati genom, ezen felül még nagyobb diverzitást is tapasztaltak a növények esetében. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a transzkripció szintű szabályozásnak nagyobb szerepe van a növényekben, mint az állatokban (Mitsuda és Ohme-Takagi, 2009). Az *Arabidopsis* transzkripció faktorait 72 családba sorolták és arra a megállapításra jutottak, hogy a transzkripció faktorok fele növény-specifikus, azaz csak olyan DNS kötő domain-t tartalmaz, amely csak növényekben ismert (Riechmann et al., 2000).

A rizs (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) esetében 2834 transzkripció faktort tart jelenleg számon a Rizs Transzkripció Faktor Adatbázis (DRTF), amelyeket 63 családba sorolnak. A rizsénél 38-szor nagyobb genom-méretű kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.) mintegy 7000 transzkripció faktor szekvenciát azonosítottak, melyeket 40 családba soroltak. A transzkripció faktor családok rizs és búza közötti összevetése azt mutatta, hogy e családok konzerváltak (Romeuf et al., 2010). Az *Arabidopsis* és a rizs közötti filogenetikai analízis (Xiong et al., 2005) a transzkripció faktorok mintegy felénél ortológ kapcsolatot mutatott ki, ami arra utal, hogy e transzkripció faktorok génjei közös ősektől származnak (Soltész, 2011).

2.5. A CBF GÉNEK JELLEMZÉSE (Soltész nyomán)

Az abiotikus stressz-tolerancia kialakításában szerepet játszó transzkripciók faktorok szerepét a legérzékenyebben lúdfűben, alacsony-hőmérsékleti stressz esetében tanulmányozták. A transzkripciójuk mértékét a fotoperiódus és a napi ritmus ugyancsak befolyásolhatja. Legjobban jellemzett a *CBF/DREB1* transzkripciók faktorok szerepe. Ezek a faktorok az általuk szabályozott gének promóterében található, *CRT/DRE* rövidítéssel jelölt szekvenciához kötődnek, elnevezésük is erre utal (*CRT/DRE* Binding Factor) (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998). Két labor egymástól függetlenül, szinte egy időben közölte eredményeit, ezért ismert a két elnevezés. Sok hideg-, és kiszáradás-stresszre indukálódó gén promóterében megtalálható a *CRT/DRE* (C-repeat/dehydration responsive-element) cisz-elem, ami egy CCGAC „core” szekvenciát tartalmaz, melyhez a *CBF* fehérjék kötődnek (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki 1994; Stockinger et al., 1997). *Arabidopsis*-ban leírtak egy olyan transzkripciók faktort, mely maguknak a *CBF* géneknek a transzkripcióját szabályozza hidegben. Ez az *ICE1* (Inducer of *CBF* expression 1) gén konstitutívan expresszálódik, normál hőmérsékleten inaktív állapotban marad, azonban hidegkezelés hatására aktív állapotba kerül, hozzákapcsolódik a *CBF* gének promóteréhez, így indukálva a *CBF*-ek átíródását (Gilmour et al., 1998). *ICE1* génnel transzformált *Arabidopsis*-ban a gént konstitutívan túltermelve hidegben megnő a *CBF* regulonhoz tartozó gének átírása a vad típushoz képest, továbbá nő a fagyállóság mértéke is (Chinnusamy et al., 2003). A *CBF/DREB1* transzkripciók faktorok kifejeződését az *ICE1*-t poszttranszkripciók szinten negatív szabályozóként módosító ligázok (*HOS1*, *SAZ1*, *SIZ1*) is befolyásolják. Ezeket és további, már részletesen tanulmányozott *CBF/DREB1* regulátor géneket foglalja össze Chinnusamy et al. (2010). A *CBF* géneket *Arabidopsis*-ban írták le elsőként; azóta 54 növényfajban, 31 kétszikű és 23 egyszikű növényben is azonosítottak *CBF* ortológ géneket (Navarro et al., 2009). A *CBF* gének alacsony hőmérséklet hatására, időlegesen fejeződnek ki a hideg-akklimatizáció korai fázisában (Gilmour et al., 1998). Minél alacsonyabb a hőmérséklet, a *CBF*-ek transzkripciója annál intenzívebb (Zarka et al., 2003). A közelmúltban kimutatták, hogy hidegedzett nyírfában (*Betula pendula*) a fagy utáni olvadási periódus során szintén megnő *CBF*-ek és egy általuk szabályozott gén (*BpLTI36*) transzkriptumának mennyisége, ami azt jelzi, hogy a *CBF*-indukálta folyamatok újra aktiválódnak a stresszt követő regenerációs időszak alatt (Welling és Palva, 2008). A *CBF/DREB1* géneket olyan fajokban is leírták, melyek életciklusuk során nem akklimatizálódnak fagyponthoz közeli hőmérsékletekhez. Ilyen például a paradicsom és a rizs (Jaglo et al., 2001; Dubouzet et al., 2003; Zhang et al., 2004), ugyanakkor kimutatták azt is, hogy paradicsomban a *CBF* regulon kisebb és kevésbé változatos, mint a hideg-akklimatizálódni képes *Arabidopsis*-ban. A *CBF/DREB1* gént túltermelő növényekben kimutatták, hogy nem induktív hőmérsékleten is megnő az általuk

szabályozott hideg-indukálható gének expressziója, és ennek eredményeként fokozódik ezeknek a növényeknek a fagyűrése (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998). Transzgénikus *Arabidopsis* növényben igazolták, hogy a *CBF3* gén expressziójának növelésével nem csak a fagyállóság mértéke növekszik meg, hanem a transzformánsok a dehidratációs stresszel szemben is toleránsabbak lettek (Kasuga et al., 1999), ami jól példázza, hogy egy adott transzkripciós faktor nem csak egyetlen génszabályozási folyamatban vehet részt. A *CBF/DREB1* transzformáns növények megnövekedett hideg-, illetve fagyűrése, és fokozott szárazságtűrése mellett több tanulmányban a transzgén negatív pleiotróp hatását is leírták. Ezek szerint a *CBF/DREB1* gének konstitutív overexpressziója lassítja a transzgénikus növény fejlődését, késői virágzást, vagy akár törpeséget is okozhat (összefoglaló: Thomashow, 2010; Hussain et al., 2011).

A növényi abiotikus stressz-tolerancia egyik legintenzívebben kutatott területe a *CBF* génreguláció. A gabonafélékben kapott eredmények nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy a klasszikus genetika és a molekuláris biológia kapcsolódásával egyre közelebb kerüljünk egy olyan komplex rendszer megértéséhez, mint az alacsony-hőmérsékleti-, vagy a fagytolerancia (Soltész, 2011).

A dolgozatunkban főszerepet kapó *CBF-14* és *CBF-15* gének szerepét búzában (*Triticum aestivum* L.) és árpában (*Hordeum vulgare* L.) tanulmányozták. Ezek a tanulmányok igazolták, hogy ezeknek a transzkripciós faktoroknak szerepe van a fagytolerancia kialakításában. Kimutatták, hogy a transzformáns vonalak kevésbé károsodtak a fagykezelés hatására, mint a vad típusé. A legellenállóbb *CBF* transzgénikus árpavonalak túléltek a vad típus számára letális fagyasztási hőmérsékletnél néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérsékletet. A *CBF* génekkel transzformált árpa növények a vad típushoz képest lassabb növekedést és későbbi virágzást produkáltak, melyet valószínűleg a *CBF* gének giberellin jelátviteli útra gyakorolt hatása, a bioaktív gibberellinek inaktivációja okoz (Soltész, 2011).

2.6. A GENETIKAI TRASZFORMÁCIÓ MÓDSZERTANÁNAK ÁTTEKINTÉSE RIZSBEN

A rizs transzformációja a 1980-as évek második felében ért el fontos sikereket. Három független csoport számolt be 1988-ban rizs protoplasztok felhasználásával regenerált transzgénikus rizs növényekről, melyeket elektroporációval és polietilén-glikol (PEG) kezeléssel állítottak elő (Toriyama et al., 1988; Zhang et al., 1988a; Zhang et al., 1988b).

Sikeres, részecskebelövéses rizs transzformáció először 1991-ben történt, mely később az egyik legelterjedtebb módszerré vált (Christou, 1991). Chan (1993) állított elő először transzgénikus rizs növényeket *Agrobacterium* által közvetített módszerrel. Hiei (1994) ezt tovább fejlesztette és *Agrobacterium* által közvetített rendszert hozott létre a *japonica* rizs számára a kifejelett rizs kalluszt felhasználva. A génátvitelhez szükséges faktorok közül a siker legfontosabb kulcsa az *Agrobacterium*

virulencia génjeinek aktiválásában rejlik. A sebzett dohánysejtek fenol jellegű molekulákat bocsátanak ki, melyek fontos jelként funkcionálnak az *Agrobacterium*-ok számára a megfelelő gazdaszervezet felismerésében (Stachel et al., 1985). Az egyszikűek sebzésekor nem termelődik ez a fenol jellegű acetosyringone, illetve α -hydroxy-acetosyringone. Az egyszikűek *Agrobacterium* közvetítette transzformációjának fejlesztésekor a mesterséges adagolásuk áttörést jelentett. Ez a módszer megoldotta a *japonica* rizs transzformációját, viszont az *indica* rizs transzformációja továbbra is nehézkes maradt. A közelmúltban Hiei és Komari (2008) közétett, egy továbbfejlesztett *Agrobacterium* által közvetített transzformációs rendszert, ami alkalmazható *indica* és *japonica* fajtákra is. Szerintük az *indica* rizs transzformációja 2,5 hónapon belül kivitelezhető, éretlen embrió felhasználásával, rendkívül magas transzformációs hatékonysággal (egy éretlen embrióból 5-13 egymástól független transzformáns hozható létre). Hátránya ennek a módszernek, hogy az éretlen embriók csak egy bizonyos időszak alatt gyűjthetők be, illetve rendkívül munkaigényes. Hazánkban először Jenes és Pauk (1989) állított elő protoplaszt eredetű rizs növényeket.

Az eddigi adatokból is jól látszik, hogy a rizs genetikai modellnövénynek tekinthető, a gabonafélék között és szinte minden fontosabb biotechnológiai kutatási eredmény is ebben a fajban született meg először a világon és hazánkban is. Ezért a rizs nemcsak az egyik legfontosabb gabonanövényünk, hanem a gabonafélék biotechnológiai modellnövényének nevezhető.

2.6.1. Közvetett DNS-bevitel

A közvetett génbevitel azokat a technikákat foglalja magába, melyekben az ember a transzgén átvitelére más növényi élőlényt, vírust, baktériumot használ fel a transzgén átvitelére és a DNS beépítésre a sejtmagba. Ma az egyik leghatékonyabb és legsokoldalúbb transzformációs rendszer kifejlesztéséhez, a talajbaktériumok által okozott gyökérgolyvásodás molekuláris alapjának megismerése vezetett. A *Rhizobiaceae* családba tartozó *Agrobacterium tumefaciens* és *A. rhizogenes* anaerob talajbaktériumok a kétszikű növényeket a sebzési helyükön fertőzik meg. Ezeken a fertőzött növényeken hajszálgyökeresedést, illetve tumorok kifejlődését okozzák. Kimutatták, hogy a tumorképződés összefügg egy plazmid, a tumor indukáló Ti-plazmid jelenlétével az *A. tumefaciens* sejtekben (Zaenen et.al., 1974). Később több laboratóriumban kimutatták, hogy a Ti-plazmid egy része, az ún. transzfer DNS, röviden T-DNS átkerül a baktérium fertőzés során a növényi sejtekbe, és ott stabilan integrálódik a sejtmag DNS-ébe. Ezek az eredmények egy természetes génátviteli mechanizmusra világítottak rá, mely során bakteriális DNS-ek kerülnek be a fertőzött növény génállományába. A további kutatások során a Ti-plazmid T-DNS-ének határszekvenciái között minden gént kivágtak és lehetővé tették, hogy helyettük különböző gazdaságilag jelentős géneket, valamint

markergéneket tudjanak beépíteni növényi sejtekbe. Ezzel megteremtődtek a feltételek, ahhoz hogy a Ti-plazmidokat transzformációs vektorként használhassuk fel. Az első sikeres kísérletekről 1983-ban számoltak be. A vektormolekulát hordozó *Agrobacterium*-mal nagyon egyszerű a transzformáció, a sebzett növényi szöveteket fertőzni kell *in vitro* körülmények között baktérium szuszpenzióval, és így a génátvitel természetes úton következik be. Ezek után a kezelt szöveteket hajtásregeneráló táptalajon kell tenyészteni (Heszky és Dudits, 2000).

Az *Agrobacterium* által megvalósított génbeépítés általánosan elterjedt, mára már nem csak a kétszikű növényeknél, hanem szinte minden gazdasági növénynél alkalmazható.

2.6.2. Közvetlen DNS-bevitel

A közvetlen géntranszformáció során a transzgént mi magunk juttatjuk be a célszövet sejtjeibe. Sokféle közvetlen génbeviteli módszert fedeztek fel napjainkig. Sikeres génbevitelt értek el különböző laboratóriumok részecskebombázással, protoplasztok PEG-es kezelésével, elektroporációval, mikro- és makroinjektálással. Számos technika közül azonban a részecskebelövés módszerét alkalmazzák a legszélesebb körben és a legsikeresebben a világon.

A részecskebombázás vagy génbelövés eszközei a stabil génpuska vagy a mobil génpisztoly. Az 1980-as évek második felében jelentek meg az első közlemények a közvetlen DNS-bevitellel kapcsolatban. Napjainkban a második leggyakrabban alkalmazott transzformációs rendszerré vált. Az első részecskebelövő berendezést, népszerű nevén a génpuskát, a Cornell Egyetemen fejlesztették ki (Sanford, 1988). A génpuskával a géneket *in vitro* löhetjük be a sejt, protoplaszt, kallusz, proembrió, sziklevél, levélkorong tenyészetek sejtjeibe. A módszer lényege, hogy az átvendő DNS-t, expressziós vektort (általában plazmid molekulát) mikroszkópos méretű arany vagy wolfram részecskékre adszorbeáljuk. A részecskék átmérője átlagosan 1-2 mikrométer. A mikrolövedék alatt a részecskéket és a felületükre ragasztott vektor molekulát értjük. Ezt egy makrolövedékhez kapcsolják és a génpuska csövében helyezik el (Heszky, 2011). A génpuska a lövedéket nagy nyomással áramló héliumgázzal gyorsítja fel körülbelül 430 m/sec sebességre, majd a makrolövedék fennakad az ütköző vagy fékező lemezen. A mikrolövedékek, pedig a mintakamrában szétszóródva bizonyos sebességgel becsapódnak a célszövet sejtjeibe. Óriási gyakorlatot és tapasztalatot igényel a módszer sikeres alkalmazása, hogy a célsejteket ne lőjük keresztül és a részecskék lehetőleg elérjék a sejtmagot, ahol a nukleinsav-molekulák DNS-ről a transzkripció megkezdődhessen. Riportergénnel (pl. GUS) történő belövést követő 2-3. napon az eltalált sejtek, szövetek kékre festődnek, ami vizualizálhatóvá teszi a bombázás eredményét. A belövést követően a sejt-, szövet-vagy szervtenyészeteket a markergénre kell szelektálni, majd a transzgénikusnak mutató tenyészetekből növényeket kell regenerálni. Mivel a

belövés során a lövedékek véletlenszerűen hatolnak a célsejtekbe és pontosan nem ismert, hogy milyen folyamatokon keresztül képes a belőtt részecskén lévő transzgén DNS a genomiális DNS-be beépülni, a módszer hatékonysága alacsony. Előnye, hogy a rendszer automatizálhatósága, ismételhetősége, továbbá egy időben nagyszámú sejt belőhetősége miatt, mégis viszonylag könnyű nagyszámú transzgénikus sejtet, növényt kapni.

A szegedi Gabonakutató Kft. saját búza transzformációs kísérleteiben elért eredményeiről 1998-ban számoltak be először, ami az első sikeres egyszikű transzformáció volt hazánkban (Pauk és mtsai., 1998).

Jenes et al. (1996) a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban kifejlesztettek egy nitrogéngázzal működő génpuskát, mely segítségével további fejlesztéseket tettek az egyszikűek transzformációs módszerének tökéletesítése érdekében (Jenes, 1999).

2.7. A SZELEKCIÓS RENDSZER ELMÉLETI ALAPJAI, A BAR GÉN

A génbevitel után a transzformált sejteket transzformálatlan sejtek veszik körül. A transzformáció döntő lépése azon sejtek szelektálása és felszaporítása, amelyekben a transzgén nemcsak integrálódott a nukleáris genomba, de expresszáldott is. Ilyen sejtek azonosítása és kiválogatása markergénekkel lehetséges. Ezek a gének legtöbbször rezisztenciagének, melyek ellenállóvá teszik a növényt antibiotikumokkal vagy herbicidekkel szemben (Jelenska et al., 2000).

A glufozinát-ammoniumot a fehérjeszintézist gátló herbicidek közé sorolják, mert hatását a glutaminszintézis gátlása során fejt ki. Savként 1972-ben fedezték fel, ekkor kapta a foszfinotricin (ppt) nevet. Ezt a növényekre toxikus anyagot a *Streptomyces viridochromogenes* baktérium termeli. A növényben irreverzibilisen gátolja a glutaminszintézist, a glutaminnak glutaminsavból és ammóniából történő képződését. A felvett ammónia, illetve ammóniává redukált felvett nitrát nem tárolódnak. A felhalmozódó ammónia egy idő után toxikus mértékben lesz jelen, ami a növény pusztulását eredményezi (Nosticzius, 1992). A nyolcvanas évek második felében sikerült izolálni a *bar* gént a *Streptomyces hygroscopicus*-ból. A ppt a baktériumot nem károsítja, melynek oka a *bar* gén fehérjeterméke, a foszfinotricin-acetil-transzferáz (PAT). Ez az enzim a foszfinotricint inaktiválja úgy, hogy a szabad NH₂-csoportját acetilálja. A PAT génnel transzformált kultúrnövények rezisztensekké váltak a ppt-típusú herbicidekkel (Basta, Liberty, Finale, Ignite) szemben. Ezeknek a herbicideknek a hatóanyaga glufozinát-ammonium. A rezisztenciát szántóföldi körülmények között tesztelve bebizonyosodott, hogy a transzformált növények a herbicid normál dózisének többszörösét is képesek elviselni károsodás nélkül. A növényekben az ammónia nem halmozódik fel, és azok fenotípusosan sem térnek el a kontroll egyedektől. Az első glufozinát-rezisztens növény az AgrEvo Libertylink®

repcefajtája volt, amely 1996-ban került köztermesztésbe az USA és Kanada, valamint az Egyesült Királyság területein. Azóta számos kultúrfaj glufozinát-rezisztens fajtáját állították elő, pl. kukoricában, szójában és cukorrépában (Heszky és Dudits, 2000).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. NÖVÉNYI ANYAG

Transzformációs kísérleteinkhez az észak – koreai eredetű 'Unggi-9' fajtát használtuk (4. ábra). Erre a fajtára kedvező szövettenyésztési tulajdonságai miatt esett a választás. Továbbá mérsékelt égövi *japonica* típusából adódóan hazánkban sem okoz gondot a növények sikeres termesztése. Hosszúnappalos életmódja lehetővé teszi, hogy mesterségesen szabályozott fényviszonyok nélkül is fertilis növényeket neveljünk.

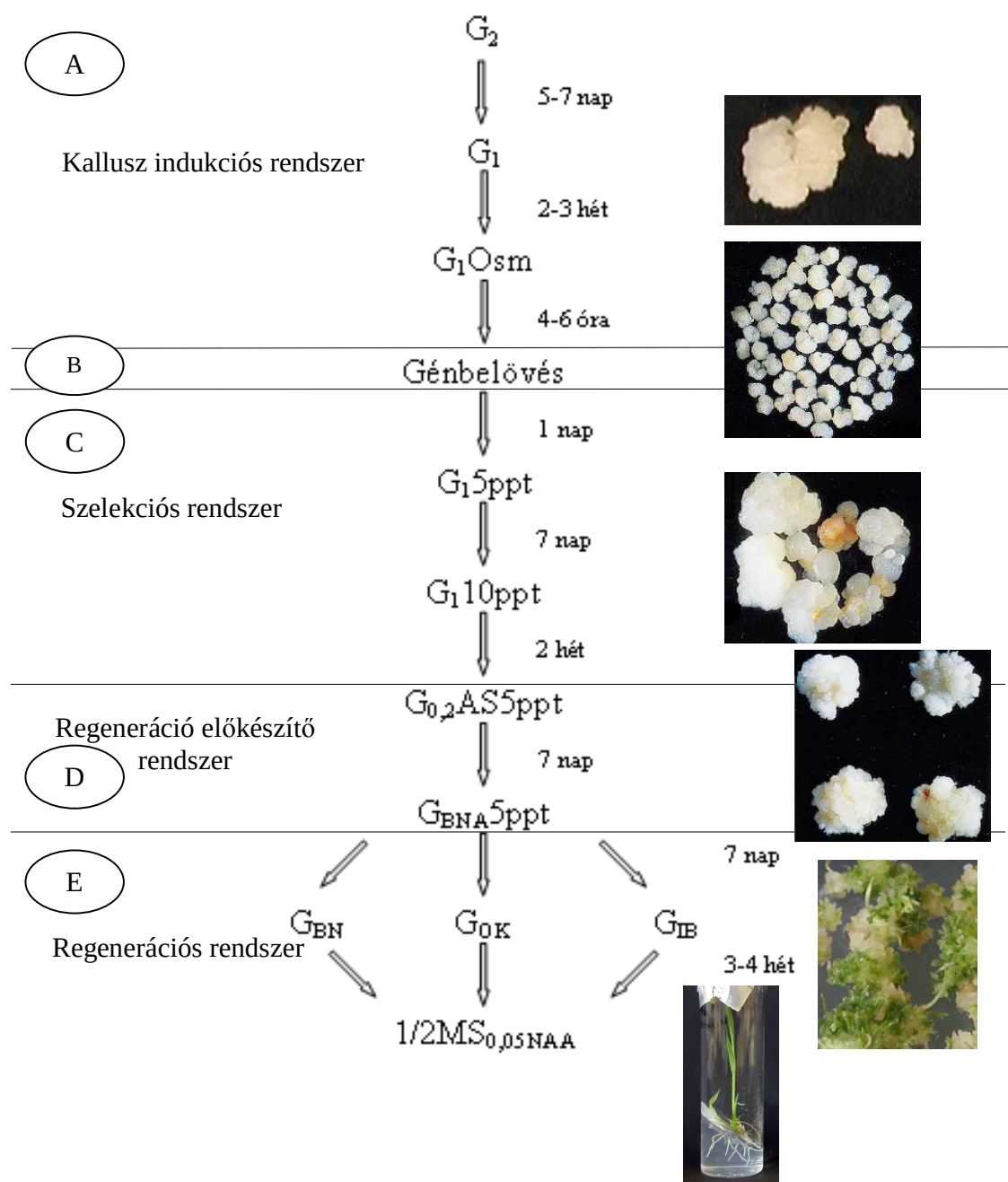


4. ábra 'Unggi-9' rizs növény, buga és termés

Forrás: Jancsó M. Rizs fajtagyűjtemény leírás. Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas

3.2. KALLUSZINDUKCIÓ, A NÖVÉNY-SEJT-NÖVÉNY RENDSZER INDÍTÁSA

A transzformációs kísérletünk során az egymást követő lépések sorrendjét a következő folyamatábra (5. ábra) szemlélteti.



5. ábra Transzgénikus rizs előállításának folyamata

A hántolt rizsszemeket a szarvasi Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) biztosította. A szemek sterilizését 50%-os háztartási Hypo és két-három csepp „Tween 20” oldatával végeztük, melyet lombikba töltöttünk és felhelyeztük 20 percig 130/perc fordulattal üzemelő rázógépre. Ezt követően a magokat háromszor leöblítettük steril desztillált vízzel lamináris boxban, majd egy éjszakán át ráztuk steril desztillált vízben. A megduzzadt szemekből sztereómikroszkóp alatt végeztük az érett embriók izolálását, csipesz és szike segítségével. Az izolált érett rizs-embriókat Petri-csészékbe tettük, melyek szilárd G_2 táptalajt tartalmaztak. A G_2 -es táptalaj 2 mg/l 2,4 diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) tartalmazott, mellyel az érett embriók dedifferenciálódását segítettük elő. Öt-hét nap alatt az embriók kicsíráztak, ezzel egy időben a scutellum erőteljes osztódásnak indult. Az 5-7. napon a hajtás részeit eltávolítottuk az osztódásnak indult kalluszról szike és csipesz segítségével, majd ezeket G_1 -es táptalajra tettük át, mely 1 mg/l 2,4-D tartalmazott (5.A. ábra). A táptalajra tett szövetek zavartalanul osztódtak 2-3 hétig a 25-28 °C-os, sötét termosztátban.

3.2.1. Az 'Unggi-9' szövettenyésztéséhez használt táptalajok összetétele

In vitro szövettenyésztéshez használt tápközegek általános összetevői a következők: makroelemek, mikroelemek, Fe-Na-EDTA, vitaminok, szerves komponensek, hormonok és szilárdító komponens.

A tápközegek pH-ját 5,8-as értékre 1 M KOH-dal, digitális pH-mérő segítségével állítottuk be. Ezt követően 20 percig steriliztük a táptalajt, közönséges konyhai kuktában 130 °C-on, 120 kPa nyomáson, indikátorpapír segítségével. Az előtenyésztés, transzformáció, szelekció és növényregeneráció során alkalmazott táptalajok pontos összetételét az 1. és 2. táblázat foglalja össze.

1. táblázat A szövettenyésztés során használt tápközegek összetétele I. (mg/l).

Komponensek	G₂	G₁	G₁Osm	G₁ 5ppt	G₁10ppt	G_{0,2}AS5ppt
KNO ₃	3000	3000	3000	3000	3000	3000
NH ₄ NO ₃	400	400	400	400	400	400
CaCl ₂ x2H ₂ O	166	166	166	166	166	166
MgSO ₄ x7H ₂ O	185	185	185	185	185	185
MnSO ₄ x4H ₂ O	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
ZnSO ₄ x7H ₂ O	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H ₃ BO ₃	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
KI	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Thiamin-HCl	1	1	1	1	1	1
Pyridoxin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nicotinic acid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glycine	2	2	2	2	2	2
FeNAEdta	21,21	21,21	21,21	21,21	21,21	21,21
2,4-D	2	1	1	1	1	-
Szacharóz	30000	30000	30000	30000	30000	30000
ABA	-	-	-	-	-	0,2
Mannitól	-	-	63680	-	-	-
Gelrite	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Glufosinate-ammonium (ppt)	-	-	-	5	10	5
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

2. táblázat A szövettenyésztés során használt tápközegek összetétele II. (mg/l).

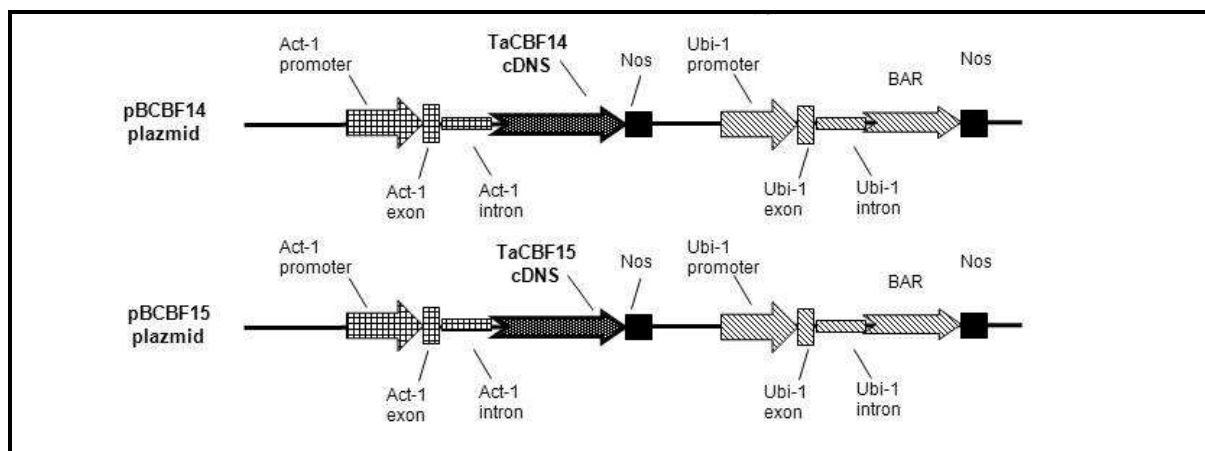
Komponensek	G_{BNA5ppt}	G_{OK}	G_{BN}	G_{IB}	1/2MS_{0,05NAA}
KNO ₃	3000	3000	3000	3000	950
NH ₄ NO ₃	400	400	400	400	825
CaCl ₂ x2H ₂ O	166	166	166	166	220
MgSO ₄ x7H ₂ O	185	185	185	185	185
MnSO ₄ x4H ₂ O	4,4	4,4	4,4	4,4	11,15
ZnSO ₄ x7H ₂ O	1,5	1,5	1,5	1,5	5,25
H ₃ BO ₃	1,6	1,6	1,6	1,6	3,1
KI	0,8	0,8	0,8	0,8	0,415
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
Thiamin-HCl	1	1	1	1	0,05
Pyridoxin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Nicotinic acid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Glycine	2	2	2	2	1
FeNAEdta	21,21	21,21	21,21	21,21	18,35
Szacharóz	30000	30000	30000	30000	10000
BAP	2	-	3	0,3	-
NAA	1	1	0,5	-	0,05
ABA	5	-	-	-	-
IAA	-	-	-	0,5	-
Kinetin	-	5	-	-	-
Agaroz	-	7000	7000	7000	-
myo-inositol					50
Gelrite	3000	-	-	-	3000
Glufosinate-ammonium (ppt)	5	-	-	-	-
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

3.3. A RIZS GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA

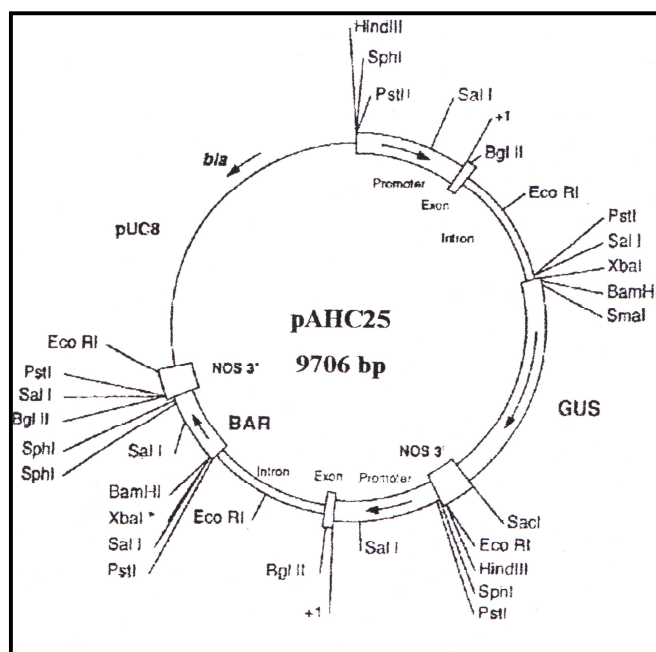
A génbelövési sorozat elvégzése előtt a következőkben ismertetett előkészületeket kellett elvégeznünk. A génbelövés kiindulási anyagául G₁ táptalajon két–három hét alatt kialakult kallusok szolgáltak. A részecskebelövést BioRad® PDS-1000/He részecskebelövő készülékkel végeztük. A berendezés paramétereinek pontos beállítása a sikeres transzformáció elengedhetetlen feltétele.

3.3.1. Alkalmazott plazmid-DNS

A búza *CBF-14* és *CBF-15* géneket hideg-kezelt Cheyenne őszi búza genotípusból izolálták és tették klónozó vektorokba Soltész (2011). A rizs növényeink hidegtűrésének fokozására szolgáló két gén transzformációjához a pBAJEN plazmidot használtuk transzformációs vektorként, amelynek a fogadó helyeire a kooperációs partnerünk beépítette a rezisztenciagén szekvenciáit (6. ábra). A célgén meghajtására mindkét konstrukció esetében a rizs *Actin-1* promótert használtunk, a rizs szövetek szelekciójára a kukorica *Ubiquitin-1* promoterével ellátott *bar* gént alkalmaztuk. A szelekciós és transzformációs rendszerünk optimalizálására a *GUS* (*Uid-A*) gént hordozó pAHC25 (Christensen et al., 1992) plazmid molekulát használtuk (7. ábra).



6. ábra Transzformációnk során alkalmazott pBCBF14 és a pBCBF15 plazmid molekulák sematikus képe



7. ábra Transzformációnk során alkalmazott pAHC25 plazmid molekula térképe a hasító helyekkel és enzimekkel

3.3.2. A genetikai transzformáció előkészítésének menete

A mikro-hordozó aranyrészecskékre felvitt DNS-oldat elkészítéséhez szükséges komponensek:

- steril desztillált víz (Millipore, Elix[®])
- abszolút etanol (Merck)
- 70%-os etanol (70% abszolút etanol [Merck] + 30% Millipore, Elix[®])
- vízzel hígított, kuktázással sterilizett 2,5 M CaCl_2 ($m_w=147$ g/mol)
- vízzel hígított 0,1 M spermidin ($m_w=2,54,6$ g/mol)
- plazmid-DNS

A fent ismertetett anyagokat a DNS oldat elkészítésének ideje alatt jégen hűtöttük.

Az aranyrészecskék előkészítése a belövéshez (20-25 lövéshez, végig jégen):

1. 60 mg aranyat (BioRad, Biolistic® 1.0 Micron Gold) mértünk ki 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe.
2. 1 ml abszolút etanolt adtunk hozzá.
3. 3 percen keresztül Vortex-el kevertük
4. 2 percig centrifugáltuk 14000-es fordulaton, a fölülúszót eltávolítottuk.
5. 1 ml etanolt adtunk hozzá, majd a 2-4. lépést megismételtük.
6. Újabb 1 ml etanolt adtunk hozzá.
7. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk (azonnali használatkor jégre tettük).
8. Vortex-el kevertük 3 percig, maximum fordulaton, ultrahangos vízfürdőben kezeltük felhasználás előtt.

A makrohordozók előkészítése a belövéshez:

1. 30 µl arany szuszpenziót pipettáztunk 0,5 ml-es Eppendorf csőbe.
2. 14000-es fordulaton 1-2 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk.
3. 50 µl steril vízzel (Millipore), Vortex-el kevertük, majd ultrahangos vízfürdőben szuszpendáltuk.
4. 14000-es fordulaton 1-2 percig centrifugáltuk, a fölülúszót eltávolítottuk.
5. 55 µl steril vízzel kevertük Vortex-el, majd ultrahangos vízfürdő következett.
6. Az 1µg/µl koncentrációra beállított pBCBF14, pBCBF15 vagy pAHC25 plazmid DNS-ből 5 µl-t adagoltunk, Vortex-el kevertük közepes fordulaton 1 percig.
7. Hozzáadtunk 20 µl (0,1 M) spermidint.
8. Hozzáadtunk továbbá 50 µl CaCl₂-ot.
9. Megkevertük Vortex-el, közepes sebességen.
10. Centrifugáltuk ugyancsak 14000-es fordulaton 1-2 percig, ezután a fölülúszót eltávolítottuk.
11. Hozzáadtunk 200 µl abszolút etanolt.
12. Ismét centrifugáltuk 14000-es fordulaton 1-2 percig, majd a fölülúszót eltávolítottuk.
13. 120 µl abszolút etanolt adtunk hozzá.
14. Makrohordozónként 3,5 µl előkészített szuszpenziót adagoltunk, egyenletesen szétkenve középre, így nagyon finom filmréteget kaptunk a hordozó korongokon. A kiadagolás ötösével történt. Az arany kiadagolását követően nem tartottunk várakozási időket.

3.3.3. A génbevitel menete

A génbelövés előtt 4-6 órával a két-három hetes rizs kalluszokat egy magas mannitol-tartalmú, „ozmotikus” (G_1Osm) táptalajra raktuk át (5,B. ábra). A belövés során a génpuska használatakor a munkatérben 27 Hgmm vákuumot alkalmaztunk. A hélium gázt 1100 psi nyomásnál engedték be az aranyrézecskeket hordozó korong fölötti térbe. A vákuum és a Hélium-nyomás hatására szétrepedő műanyag korong és a belőtt kalluszok közötti távolságot 6 cm-re állítottuk be. A transzformáció után újra visszahelyeztük a kalluszokat a 28 °C-os termosztátba.

3.4. A SZELEKCIÓ ÉS A NÖVÉNYREGENERÁCIÓ MENETE

A szelekció során az embriogén kalluszokat (ppt) foszfinotricin tartalmú táptalajra helyeztük át, ezzel biztosítva, hogy csak a transzformált sejtek és utódaik fejlődjenek tovább. A szelekció során alkalmazott foszfinotricin koncentráció már letális a nem transzformáns sejtekre.

Egy nappal a transzformáció után a belőtt kalluszokat G_15ppt kallusz-indukciós táptalajra tettük (5,C. ábra). Ezen a táptalajon tartottuk sötétben 7-10 napig, 24-25 °C-os termosztátban. Ezt követően a kalluszok 1 mg/l 2,4-D tartalmú G_110ppt táptalajra kerültek, ahol erősebb szelekciós nyomás mellett folytattuk a kalluszok tenyésztését (5,C. ábra). Két-három hétig a sötét 24-25 °C-os termosztátban tartottuk, utána $G_{0,2}AS5ppt$ előkészítő táptalajra kerültek (5,D. ábra), amely már nem tartalmazott 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat. A 0,2 mg/l abszcizinsav (ABA) táptalajba adagolásával indukált szomatikus embriogenezis első lépéseként a kalluszban nem dedifferenciált sejtek, hanem merisztematikus és embriogén gócok alakultak ki. Ezt követően egy megnövelt 5 mg/l abszcizinsav (ABA) tartalmú $G_{BNA}5ppt$ táptalajra kerültek, ezáltal még jobban elősegítve a merisztematikus- és embriogén jelleg kialakulását (5,D. ábra). A szomatikus embriogenezis ezeknek a merisztemoidoknak a felületi sejtjeiből indult ki. Az előkészítő táptalajon felszaporodott embriogén kalluszokat regeneráló táptalajokra (G_{OK} -ra, G_{BN} -re, illetve G_{IB} -re) tettük át melyek már nem tartalmaztak glufozinát-ammóniumot (5,E. ábra). A Petri-csészéket a termosztátból áthelyeztük a 26 °C-os tenyésztőszobába (5,E. ábra). Körülbelül 2-3 hétre volt szükség ahhoz, hogy az immár differenciálódó kallusz sejtekben meginduljon a zöld színtestek képződése, és kifejlődjenek az első csíranövények. A regenerált növényeinket (1,5-2 cm fölött) gyökereztető $1/2MS_{0,05NAA}$ táptalajra raktuk, amely 0,05 mg/l naftil-ecetsavat (NAA) tartalmazott (5,E. ábra). A növényeket 24-25 °C-on, fényen tartottuk, üvegcsőekben.

A megfelelően meggyökeresedett növényeket talaj és tőzeg keverékét tartalmazó agyagcserepekbe ültettük ki, zárt rendszerű üvegházi körülmények közé. Frissen kiültetett növényeinket 3-5 napig kisméretű, átlátszó polietilén, izoláló zacskóval egyedenként takartuk le, így

védjük az erős párolgástól. A fóliatakarást igény szerint, fokozatosan távolítottuk el a növényekről, ahogyan azok megerősödtek.

A transzformáns jelölt kalluszokból és növényekből a transzformációs esemény ellenőrzésére és bizonyítására genomi DNS-t tisztítottunk és specifikus primerekkel PCR reakciót végeztünk.

3.5. DNS-IZOLÁLÁS KALLUSZ- ÉS LEVÉLMINTÁKBÓL

A munka megkezdése előtt az alábbi anyagok, berendezések előkészítése szükséges:

- Steril Eppendorf csövek
- Steril pipettacsúcsok
- Oldatok
- 65 °C fokra felfűtött termomixer
- 37,1 °C felfűtött vízfürdő

Az izoláláshoz a Promega mini kit-protokollt használtuk.

1. A DNS izoláláshoz 10-40 mg friss levélmintát steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és Vortex segítségével, homogenizáló, rozsdamentes acél- vagy üvegrúd segítségével eldörzsöltük.
2. 600 µl Nuclei Lysis Solution-t adtunk minden mintához.
3. 15 perces inkubáció következett 65 °C-on, az inkubáció közepénél és a végénél a mintákat kíméletesen megkevertük.
4. 3 µl RNase solution-t adtunk a mintákhoz, majd kíméletesen kevertük.
5. 15 perces inkubáció következett 37,1 °C-on.

Fehérjekicsapás:

1. A mintákat lehűtöttük szobahőmérsékletre.
2. Hozzáadtunk 200 µl Protein Precipitation Solution-t a mintákhoz.
3. 20 másodperc Vortex keverés következett, magas fordulatszámon
4. Ezután 10 percig centrifugáltuk, 13000 rpm fordulatszámon.

A DNS kicsapása és oldása:

1. A fölülúszót új, steril Eppendorf csőbe mértük és 500 µl szobahőmérsékletű izopropanolt adtunk hozzá, mellyel kicsaptuk a benne levő DNS-t.
2. Óvatosan megkevertük a mintákat, 10-szer átfordítva.
3. 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm fordulaton.
4. A fölülúszót alaposan eltávolítottuk és hozzáadtunk 600 µl 70%-os etanolt.
5. 3 perc centrifugálás következett, 13000 rpm fordulaton, majd alaposan eltávolítottuk az etanolt.
6. Lamináris boxban történő 10-15 perces szárítás következett.
7. Végül 50-100 µl DNA Hydration solution (TE puffer) hozzáadása következett, majd 65 °C-on vagy szobahőmérsékleten oldottuk a DNS-t.
8. A DNS tárolása 2-8 °C-on történik.

3.6. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)

Ez a molekuláris technológia alkalmas a DNS enzimatisz amplifikálására, lehetővé teszi a DNS egy rövid, jól definiált szakaszának megsokszorozását analízis céljából. Ezért a felfedezésért K. Mullis kémiai Nobel-díjat kapott 1993-ban. A polimeráz-láncreakció során egy speciális, kiválasztott DNS szekvenciát enzimes reakciók ismétlődésével amplifikáljuk *in vitro* körülmények között.

A PCR reakcióelegy összeállításánál a Fermentas® 2X Master Mixet használtunk kutatásaink során (3. táblázat).

3. táblázat A láncreakcióhoz használt reakcióelegy összetevői 20 µl végtérfogatban a táblázat szerint

Anyag	Bemérendő mennyiség	Végső koncentráció
2X PCR Master Mix	10 µl	1x
Primer	1 µl	0,1-1 µM
Primer	1 µl	0,1-1 µM
Templát DNS	1 µl	10 pg-1 µg
DMSO	1 µl	
Víz	6 µl	

A transzgénikus-jelölt növényekben a célgén azonosítására a 4. és 5. táblázatban összefoglalt PCR programokat alkalmaztuk.

4. táblázat A *CBF-14* és *CBF-15* génre végzett PCR program

A reakció lépései	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	95°C	3'
2. ciklus: 30x	95°C	30"
	59°C	45"
	72°C	45'
3. ciklus: 1x	72°C	10'
4. ciklus:	4°C	∞

5. táblázat A *bar* génre végzett PCR program

A reakció lépései	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	95°C	4'
2. ciklus: 40x	95°C	30"
	61,7°C	30"
	72°C	30"
3. ciklus: 1x	72°C	5'
4. ciklus:	4°C	∞

A felhasznált primerek szekvenciái:

CBF14ForwBamHI: CGGGATCCTAATTACCCACAGTCG
 CBF14RevXbaI: GCTCTAGATGCTTAGTCGAACAAGTAGCTC
 CBF15ForwBamHI: CGGGATCCTAACCAACACTCCTCAG
 CBF15RevXbaI: GCTCTAGAAGCTGGCTGGAGTGTTTTAGTA
 Bar BF5: CGAGACAAGCACGGTCAACTTC
 Bar BR6: AAACCCACGTCATGCCAGTTC

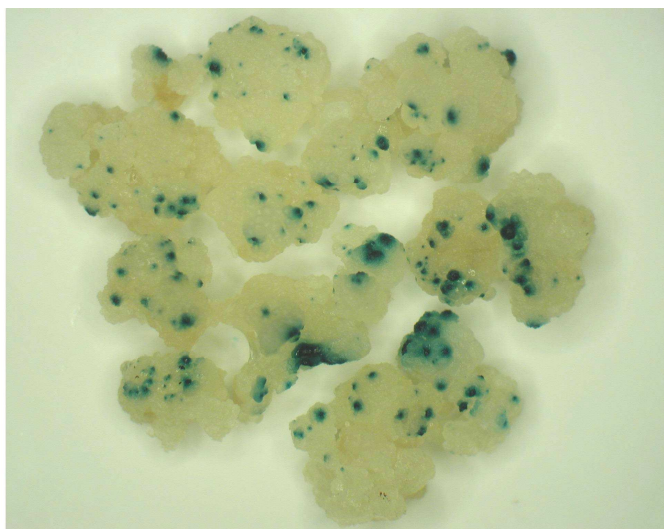
3.6.1. Gélelektroforézis

A kapott PCR termékeket 1,5%-os agaróz-gélben, elektroforézissel futtattuk 100 mA áramerősségnél. Az agaróz gélbe 1 µg/ml ethidium-bromidot fecskendeztünk, mellyel a vizsgált DNS molekulák láthatóvá válnak ultraibolya fény alatt. A gélelektroforézis során a gél első zsebeibe GeneRuler Mix oldatot injektáltunk, ami ismert méretű DNS-fragmenteket tartalmaz. Ehhez viszonyítva becsülhető a PCR termékek hossza. Minden PCR reakció során 1 negatív kontroll növényi DNS-t is elhelyeztünk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A RIZS TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER OPTIMALIZÁLÁSA, TRANSZFORMÁCIÓ RIPIORTER GÉNT TARTALMAZÓ KONSTRUKCIÓVAL

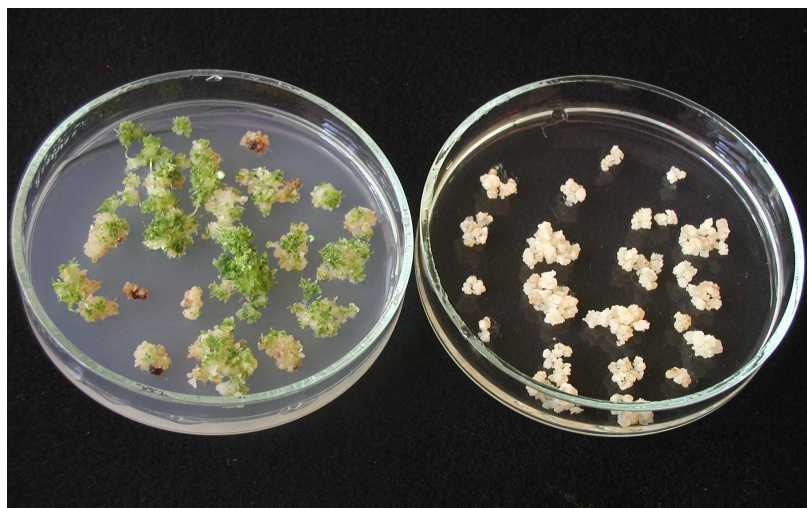
Transzformációs kísérletünk során 'Unggi-9' rizsfajtából érett embriókat izoláltunk, melyeket G₂-es 2,4-D tartalmú táptalajon tenyésztettünk és tartottunk fenn, így kaptuk a részben már dedifferenciálódott kalluszokat a belövéshez. A *bar* gén bevitelénél, azaz a pAHC25 plazmid esetében a génbelövést transzformációnk során 9-szer végeztük el, 5 µl-es plazmid mennyiség mellett. A részecskebelövést követően 2 óra múlva egyes transzformált embrioid kallusz tenyészeteknél GUS-teszttel bizonyosodtunk meg arról, hogy a mikrolövedékek a célsejtekben szétszóródva csapódtak be (8. ábra). Jól látható, hogy a találatot kapott szövetekben a *GUS* gén tranziens expressziója egyenletes eloszlást mutat. A génpuska anyag és módszerben leírt beállításai mellett körülbelül 5 cm átmérőjű körben kaptunk nagyszámú találatot.



8. ábra A *GUS* gén tranziens expressziója

A belövést követően a nem transzformált kalluszok a szelekciós ágens (ppt) hatására elhalványultak és hosszabb idő után elhaltak. A transzformáción átesett kalluszok egy része, amelyek genomjába nem jutott be vélhetően a transzformált gén (transzgén), elhaltak. Ezzel szemben azokon a kalluszokon, melyekbe bejutott és expresszáldott a transzgén, ott a regeneráció nyomai fedezhetők fel (9. ábra). A belövést követően az embriogén kalluszokat egymás után többször glufoszínát-ammonium (ppt) tartalmú táptalajra tettük át, ezzel biztosítva, hogy csak a transzformált sejtek és utódaik fejlődjenek tovább. Egy Petri-csészébe 15-20 embriogén kalluszt helyeztünk. A transzformált sejteket

tovább szaporítottuk. A szelekciós folyamat végén *GUS* festést alkalmaztunk egyes kallusz tenyészetek esetében azért, hogy meggyőződjünk arról, hogy valóban a transzformált sejtek kerülnek-e regenerációra (10. ábra.) A regenerálás során a zöld regenerációs pontok helyén a szelekciós idő előrehaladtával egyre erősebb hajtáskezdemények jelentek meg (11. ábra).



9. ábra Belőtt és belövés nélküli, kontroll kalluszok

A bal oldali Petri-csészében lévő embriókon a regeneráció jelei mutatkoznak, zöldülni kezdtek. A jobb oldali Petri-csészében a belövés nélküli, kontroll embriók láthatóak, amelyek a ppt hatására nem indultak fejlődésnek, illetve később elhaltak.



10. ábra A *GUS* festés által megfestett, pAHC25 plazmida transzformált kalluszok. A transzformálódott kalluszok kék színűre festődtek, míg a fehér kalluszok mozaikosak, a génbelövés során az expresszió kismértékű volt.



11. ábra Jól láthatóak a képen a kallusz tenyészetekből kihajtó hajtáskezdemények.

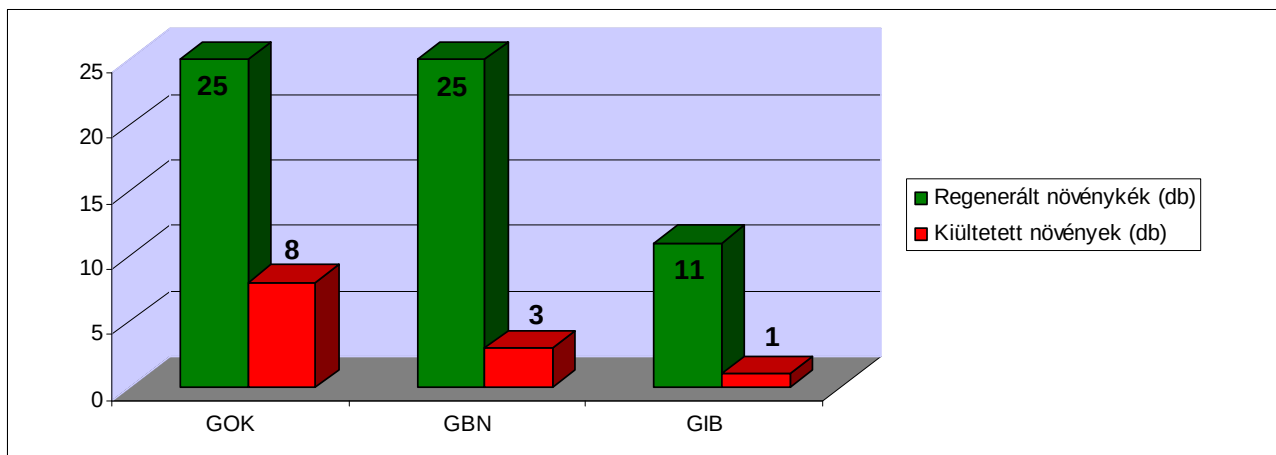
A növények nevelését tovább folytatva, 65 darab növénykét áthelyeztünk egyedi növénynevelő csövekbe, ahol a táptalaj ($1/2MS_{0,05NAA}$) 0,05 mg/l naftil-ecetsavat (NAA) tartalmazott, ami a fiatal növények gyökérképződését segítette elő (12. ábra). Ezzel a módszerrel sikeresen kialakítottuk az érett embriókból kiinduló, ppt szelekción alapuló transzgénikus növény regenerációs modellt, amely kísérletünk alappillére volt.



12. ábra A szelektív körülmények között indított növényregenerálás eredménye látható.

4.2. CBF GÉNEK TRANSZFORMÁCIÓJA JÓ REGENERÁCIÓS KÉPESSÉGŰ *JAPONICA* TÍPUSÚ RIZSBEN

Kísérletünk során olyan transzgénikus növények előállítására törekedtünk, melyek a *CBF-14* vagy a *CBF-15* gént tartalmazzák. A kutatásunkban a kiindulási anyaga érett embrió volt, melyet 650 rizs szemből izoláltunk. Az izolált embriókat dedifferenciáltuk G_2 -es táptalajon, mely 2 mg/l 2,4-D tartalmazott, ami az embriók gyors osztódását segítette. Ezután az embriók a dedifferenciálódás irányába osztódtak tovább, majd a kalluszosodás az 5-7 nap után indult meg. A kalluszosítást G_1 -es táptalajon végeztük, mely 1 mg/l 2,4-D-t tartalmazott. Az embriók 2-3 hét kalluszosodás után már megfelelőek voltak a transzformáció elvégzéséhez. A transzformáció előtt 4-6 órával a kalluszokat ozmotikus (G_1Osm) táptalajra tettük, amely előnyös hatással bír a transzgénikus jelöltek regenerálódó képességére. A részecskebelövést a 3.3.2. és a 3.3.3. fejezetekben leírtak alapján végeztük el. Kísérletünk során mind a két gén esetében 5 μ l-es plazmid mennyiséget adagoltunk. A két *CBF* gént összesen 1445 kallusztényészetbe jutattuk be, 19 esetben *CBF-14*, és 24 esetben *CBF-15* génnel transzformáltunk. A génbelövés után a transzformált kalluszokat foszfinotricin (ppt), valamint 1 mg/l 2,4-D tartalmú táptalajra tettük. Először (G_15ppt) 5 mg/l, majd egy hét múlva (G_110ppt) 10 mg/l foszfinotricin tartalmú táptalajra kerültek, erősítve a szelekciós nyomást. Ennek hatására a nem transzformálódott kalluszok, valamint a kalluszoknak egy része, amelyek genomjába nem integrálódott a transzgén, elbarnultak, majd később elpusztultak. Ezzel szemben azok a kalluszok, melyekbe sikeresen bejutott és feltehetően expresszáldott a markergén, ott további sejtosztódás mutatkozott. A jól láthatóan növekvő, fejlődő kalluszokat 2-3 hét múlva előkészítő táptalajokra tettük. Először egy csökkentett hormontartalmú $G_{0,2}AS5ppt$ előkészítő táptalajra kerültek, ami 0,2 mg/l abszcizinsavat (ABA) tartalmazott, majd egy hét múlva egy növelt 5 mg/l abszcizinsav (ABA) tartalmú $G_{BNA}5ppt$ táptalajra kerültek. Megfigyeléseink szerint, akkor kaptuk a legnagyobb regenerálási arányt, ha a két előkészítő táptalajra történő átrakás között nem telt el több 7 napnál. Az előkészítő táptalajon felszaporodott embriogén kalluszokat regeneráló táptalajokra (G_{OK} -ra, G_{BN} -re, illetve G_{IB} -re) tettük át, melyek összetételét a 2. táblázat tartalmazza. A regeneráció során igyekeztünk minden genotípust elhelyezni a regeneráló táptalajokra. A táptalajok és a regenerált növényképek megoszlását, valamint a kiültetett növények számát a 13. ábra szemlélteti. A diagramon jól látható, hogy a legtöbb növényke, 25-25 darab a G_{BN} , illetve a G_{OK} táptalajon regenerálódott sikeresen, míg a G_{IB} esetében mindössze 11 darab. A leghatékonyabb növénykiültetést a G_{BN} regeneráló táptalaj esetében értük el, a sikeresen kiültetett növények száma 8, ami százalékos hatékonyságban kifejezve 32%. A G_{OK} táptalaj esetében 3 növényt ültetünk ki, ami 12%-os hatékonyságnak felel meg. A legkevesebb kiültetett növényt a G_{IB} estében kaptunk mindössze egyet, ami 9,1% növény kiültetési hatékonyságot eredményezett.



13. ábra A különböző növényregeneráló táptalajok és eredményességük a kiültetett növények számára

A regeneráció során megfigyelhető volt, hogy vélhetően a találatot kapott egyes pontokból indult ki a sejtek, sejtcsoportok zöldülése, ez sohasem az egész kalluszt érintő folyamat volt. A zöld részek ezt követően egyre erőteljesebb növénykezdeményekké alakultak. A kísérletünk során albínó növénykék is regenerálódtak, ezeket szelektív körülmények között, lombikokban neveltünk fel és vetettük őket DNS szintű tesztelésnek.

A kéthetes akklimatizáció után a kiültetett növényeink megerősödtek, azután a növények DNS szintű tesztelését végeztük el. Kísérleteink célja a transzgénikus jelölt növények közül a valóban transzgénikusok azonosítása, hogy valójában tartalmazzák-e a beépíteni kívánt géneket, és ezek kifejeződésre jutnak-e a vizsgált növényekben. A kiültetett és a tesztelés alá vetett zöld növények láthatóak a 14. ábrán.



14. ábra A kiültetett transzgénikus zöld rizs növények láthatók

4.3. A TRANSZFORMÁCIÓ TÉNYÉNEK BIZONYÍTÁSA PCR TECHNIKÁVAL

A mintákat PCR technika segítségével vizsgáltuk mind a szelekciós markergénre, mind a *CBF-14*, illetve a *CBF-15* génekre nézve. A PCR-es vizsgálatot a 3.6.-os alfejezetben leírtak szerint végeztük el. A kapott eredményeket a 6. számú táblázatban foglaltuk össze, melyekben megtalálhatóak azok a kalluszok, illetve albínó és zöld növények, melyekből genomi DNS mintát tisztítottunk. Százalékos arányokat nézve biztató eredményeket kaptunk (7. táblázat).

6. táblázat A transzformált kalluszok, az albínó növények és a kiültetett növények molekuláris teszt eredményei.

DNS minta	Jele	Plazmid	<i>bar</i> ⁺	<i>CBF-14</i> ⁺	<i>CBF-15</i> ⁺
1.	61/1	pBCBF15	pozitív		pozitív
2.	32/1	pBCBF15	pozitív		pozitív
3.	75	pBCBF15	pozitív		pozitív
4.	64	pAHC25	pozitív		
5.	11/1	pBCBF14	pozitív	pozitív	
6.	12/1	pBCBF14	pozitív	pozitív	
7.	61/3	pBCBF15	pozitív		pozitív
8.	61/3-1	pBCBF15	pozitív		pozitív

9.	61/3-2	pBCBF15	pozitív		pozitív
10.	61/3-3	pBCBF15	pozitív		pozitív
11.	61/2	pBCBF15	pozitív		pozitív
12.	80-1	pBCBF15	pozitív		pozitív
13.	80-2	pBCBF15	pozitív		pozitív
14.	80-3	pBCBF15	pozitív		-
15.	80-4	pBCBF15	pozitív		-
16.	80-5	pBCBF15	pozitív		pozitív
17.	80-6	pBCBF15	pozitív		pozitív
18.	81 2x	pBCBF15	-		-
19.	89	pBCBF14	pozitív	pozitív	
20.	93	pBCBF14	pozitív	pozitív	
21.	93/2	pBCBF14	pozitív	pozitív	
22.	94/1	pBCBF14	pozitív	pozitív	
23.	95	pBCBF14	pozitív	pozitív	
24.	98	pBCBF14	pozitív	pozitív	
25.	13	pBCBF15	-		pozitív
26.	89	pBCBF14	pozitív	pozitív	
27.	88	pBCBF14	pozitív	pozitív	

A 9 zöld növényből 8 (0,55%) esetben kaptunk *bar* génre nézve pozitív eredményt, a *CBF-14* és *CBF-15* esetében 6 (0,42%) minta bizonyult pozitívnak. Az albínó növénykéek esetében mind a 4 minta pozitív volt *bar* génre, illetve *CBF-15* génre nézve is. A transzformált kalluszok közül mind a *CBF-14* és a *CBF-15* esetében 13 mintánál 13 pozitív mintát kaptunk a célgénekre nézve és 12 pozitív mintát a *bar* génre nézve.

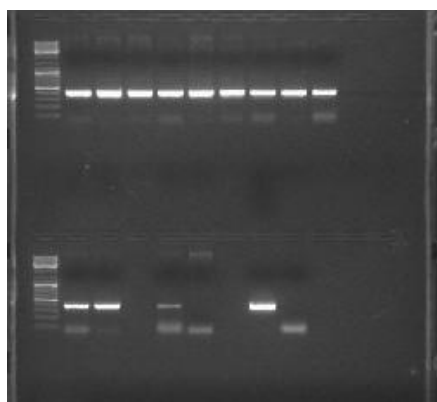
Százalékos megoszlásban a 7. táblázat foglalja össze az eredményeket.

7. táblázat A transzformációs kísérleteink eredményeit összefoglaló táblázat. A 2. és 3. oszlop mutatja a növényregeneráció eredményeit, a növények darabszámát és a százalékos arányt a transzformált kalluszkhoz viszonyítva. Az 4. és az 5. oszlop adatai mutatják a DNS szintű molekuláris tesztek (PCR) eredményeit, ahol a bevitt rezisztencia géneket hordozó növények egyedszámát és százalékos értékét tüntettük fel.

	Belőtt kallusz- tenyészetek száma (db)	Növények csőben		Kiültetett növények		<i>bar</i> ⁺		<i>CBF</i> ⁺	
		(db)	%	(db)	%	(db)	%	(db)	%
<i>CBF-14</i>	646	36	5,57	2	0,31	2	0,31	2	0,31
<i>CBF-15</i>	799	25	3,13	7	0,87	6	0,75	4	0,5
	1445	61	4,22	9	0,62	8	0,55	6	0,42

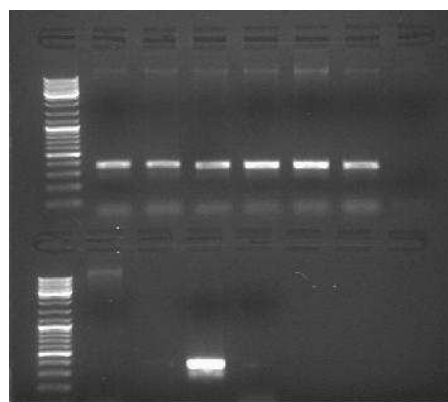
Összességében elmondható, hogy a *CBF-14* és a *CBF-15* génekkel végzett transzformációnk során, a *CBF-15* génnel értük el a leghatékonyabb 0,5%-os (4 növénynél). transzformációt (7. táblázat).

Az 1-27. vizsgált minta gélelektroforézise során kapott gélképek egyértelmű bizonyítékkal szolgálnak a bejuttatott gének jelenlétéről, melyek a 14-19. ábrákon láthatóak.



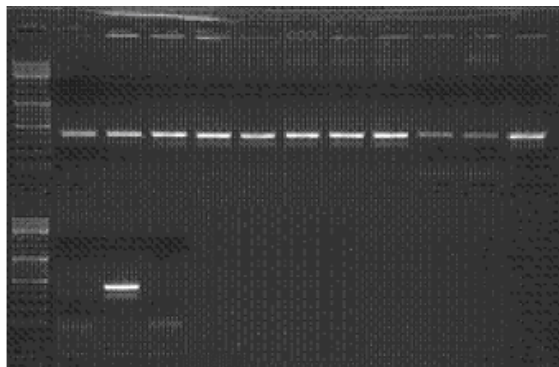
14. ábra *Bar* PCR

1. sor: marker; 1-10. minta
2. sor: marker; 11; 12. minta, üres zseb,
2 negatív kontroll, üres zseb, plazmid, blank



15. ábra *Bar* PCR

1. sor: marker; 12-18. minta
2. sor: marker; negatív rizs növényi kontroll,
üres zseb, plazmid, blank

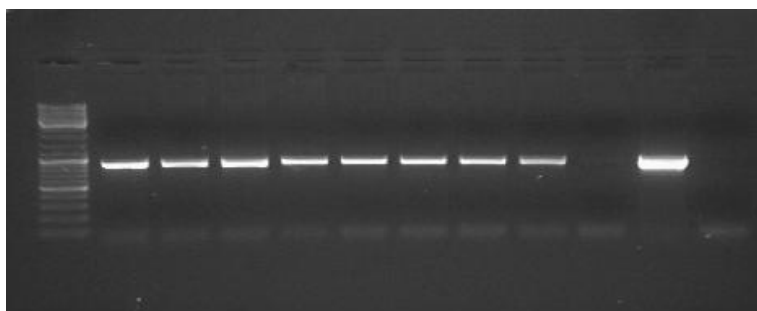


16. ábra *Bar* PCR

1. sor: marker; 20-25; 5; 6; 26-27. minta

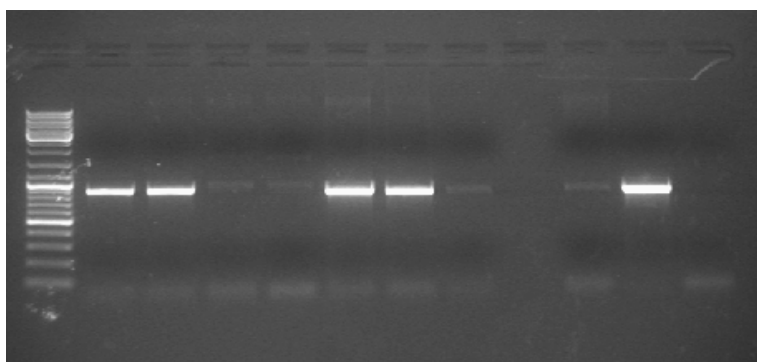
2. sor: marker; negatív növényi kontroll,
plazmid; blank

A géleképeken jól látható, hogy a *bar* gén esetében 25 mintánál kaptunk pozitív eredményt. A *CBF-15* génre végzett PCR reakciók géleképei (17. ábra és a 18. ábra) láthatóak, valamint a *CBF-14* génre végzett PCR reakció géleképe (19. ábra).



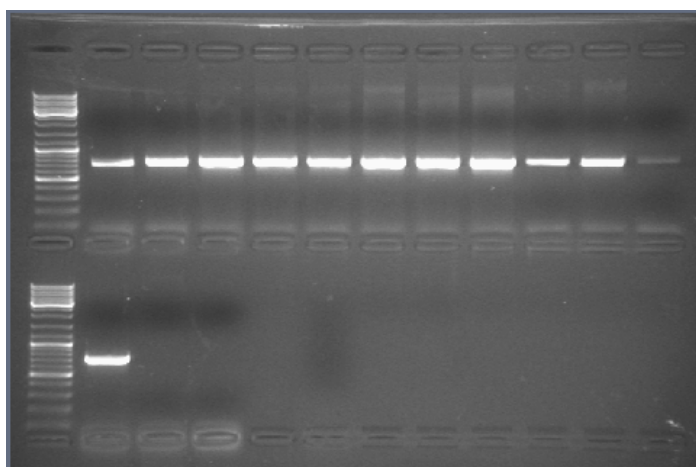
17. ábra *CBF-15* PCR

1. sor: marker; 1-3; 7-11. minta, negatív
rizs növényi kontroll, plazmid, blank



18. ábra *CBF-15* PCR

1. sor: 12-18. minta, üres zseb,
negatív rizs növényi kontroll,
plazmid, blank



19. ábra *CBF-14* PCR

1. sor: marker; 20-25; 5; 6; 26; 27. minta, üres zseb

2. sor: marker; plazmid, negatív rizs növényi kontroll, blank

A *CBF-15* génre végzett PCR reakciók gélképein jól látható, hogy 12 minta mutatott pozitív eredményt, a *CBF-14* gén esetében 10 minta mutatott pozitív eredményt. A *CBF-14* génnel transzformált növények között nem találunk olyat, melyben a markergén jelenléte mellett nem lett volna kimutatható a rezisztenciagén.

5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozatunkban is ismertetett genetikai transzformációs eljárás az egyik leghatékonyabb eszköz egyes gének szerepének legteljesebb körű tisztázásához. A nagy áteresztőképességű genomikai tesztrendszerhez képest – melyekkel gének ezrei tesztelhetők (Douchkov et al., 2005) – kevesebb gént tesztelhetünk, de azokhoz képest plusz információkat nyerhetünk, akár több generáción keresztül a legrészletesebb tanulmányok folytatathatók.

A kísérleteinkben előállított transzgenikus növények hozzájárulnak a hidegtűréshez kapcsolódó genetikai szabályozás részletesebb megismeréséhez. A könnyen transzformálható 'Taipei 309' fajtájú rizs helyett a hazai viszonyok között jól kezelhető *japonica* típusú 'Unggi-9' fajtát választottuk, mert regenerációs képessége megközelíti az általánosan használt, de hosszúnappalos rizsekét. A nehezebb transzformálhatóságot reményeink szerint ellensúlyozza, hogy növényeinket az élettani tesztek során nem csupán mesterséges hőmérsékleti és fényviszonyokkal készíthetjük a generatív fázis eléréséhez. Munkák során elért 0,31- 0,5%-os hatékonyság elmarad a többi közismert rizsfajta esetében belövással reálisan elérhető 2-5%-os eredményektől, mégis az 'Unggi-9' hosszúnappalos jellege biztos alapot adott a jól tesztelhető genetikai alapanyag előállításához.

A részecskebelövésen alapuló transzformációs módszert tekintve nagy eltérések vannak a különböző növényfajok transzformálhatóságában. Az általunk kapott transzformációs gyakoriság eléri a búza esetében nemzetközi szinten publikált 0,1-2%-os hatékonyságot (Varshney and Altpeter, 2001), mégis a rizs esetében célra vezető transzformációs rendszer jelentősen bonyolultabb a búzához és a könnyen transzformálható árpához képest.

Az esetünkben alkalmazott növényregenerálási módszer során az embriogén kallusz állapot eléréséhez, a növényregenerálás beindításához nem elegendő a szintetikus auxin (2,4-D) elhagyása, hanem szükség van egy előkészítő fázisra, melyet ABA adagolásával biztosítunk. Módszerünk optimalizálása során az elsőként kipróbált 0,2 mg/l mennyiségű abszcizinsav (ABA) sok esetben nem volt elegendő a megfelelő embriogén állapot eléréséhez, ezért a Chen et al. (1998) által leírt magas (5 mg/l) dózisú ABA adagolást próbáltuk ki. A magas abszcizinsav dózis ebben az esetben gyakran vezetett egyes tenyészetek teljes elbarnulásához. A két módszer kombinálása azonban kiváló minőségű, jó regeneráló képességű kalluszokat eredményezett. Laboratóriumunkban alkalmazott magas dózisú herbicides szelekció a nagy mennyiségű alapanyag hatékony szelekcióját biztosította, de esetünkben nem várt mellékhatást eredményezett. Az első transzformációs ciklusban nagyszámú albínó növényt regeneráltunk. A probléma megoldására a regenerációs folyamat utolsó lépésében felfüggesztettük a ppt adagolását. Ennek eredményeként megjelentek az első zöld hajtáskezdemények, majd növényké

is, viszont a fennmaradó genetikai mozaikosság miatt regenerált növényeink közül nem mindegyik bizonyult pozitívnak a molekuláris tesztelés során. Ezt a jelenséget megerősíti a szelekció közben végzett *GUS* festés eredménye is (10. ábra).

A sikeres növényregenerálás érdekében két laboratóriumunkban bevált és egy irodalmi utalás alapján Chen et al. alkalmazott hormon kombinációt hasonlítottunk össze. A G_{OK} táptalaj nagy mennyiségű 5 mg/l kinetin-t, a G_{BN} táptalaj 3 mg/l benzil-amino-purint (BAP) és 0,5 mg/l naftil-ecetsavat (NAA), míg a G_{IB} 0,5 mg/l indol-ecetsavat (IAA) és 0,3 mg/l benzil-amino-purint (BAP) tartalmazott. A jól előkészített embriogén, szelektált kalluszból regenerálva, a G_{BN} esetében 8 növényt kaptunk, a G_{OK} esetében 3, míg a G_{IB} -nél 1 növényt értünk el.

Transzformáció folyamán tapasztalt viszonylagosan alacsony hatékonyság összefüggésben lehet Achard et al. (2008) által árpa esetében kapott eredményekkel. A *CBF* gént túltermelő árpa növények esetében törpeséget és viszonylag késői virágzást tapasztaltak a megnövekedett hidegtűrés mellett. Rizs transzformációs kísérletünkben is gyanakodhatunk a gének gátolt gibberellinsav (GB) szintézisre. A nagyszámú zöldülő, de hajtást nem növelő embriogén kallusz jelenléte is ezt erősíti (20. ábra). A továbbiakban regenerált a növényeinket a fenotípus részletes jellemzésén túl ilyen irányú vizsgálatoknak is alávetjük.



20. ábra Zöldülő embriogén kallusz, mely hajtást nem tud növelni.

Növényeinket a jövőben teszteljük hidegtűrést illetően, különös tekintettel a fagyűrő képességre, valamint Soltész (2011), árpában kapott eredményei alapján érdemes vizsgálni a *CBF-14* és *CBF-15* gén só és szárazság stresszhez kapcsolódó hatását. Az eddigi eredmények alapján a két transzkripció faktorának különböző fajok esetében eltérő funkcionális hatásai figyelhetők meg. Rizs esetében ezeket a géneket a világon még nem vizsgálták. Eredményeink ehhez nyújtanak fontos alapanyagot.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A rizs trópusi, szubtrópusi országokban honos, ennek ellenére sikerült hűvösebb, szárazabb éghajlatú területeken is termesztésbe vonni, így hazánkban is. A rizs hidegtűrésének fokozása rendkívül fontos feladat, hiszen az egyik legérzékenyebb növényünk a hőmérsékletre. Ezért a rizs (*Oryza sativa* L.) kiváló alanya a hidegtűréssel kapcsolatos vizsgálatoknak. Másrészt a legjobban ismert genomszerkezetének és jó transzformálhatóságának köszönhetően jó választásnak tűnik funkcionális genetikai és genomikai vizsgálatokhoz.

Kutatások igazolták, hogy a **CBF-14** és **CBF-15** génnel transzformált növények, megnövekedett hideg-, illetve fagyűrés, és fokozott szárazságtűrés mutattak árpa esetében. **Céljaink között szerepelt egy ilyen rezisztencia kialakítása rizsben, genetikai transzformációval, valamint, hogy genetikai alapot szolgáltatassunk e két gén hatásainak és szerepének minél szélesebb körű feltárásához.**

Ezeknek a célgéneknek a bejuttatásával a rizs hideg tűrőképességét kívántuk növelni. A búzából (*Triticum aestivum* L.) izolált **CBF-14** és **CBF-15** géneket a pBAJEN plazmid vektor fogadó helyeire építette be a kooperációs partnerünk. A célgén meghajtására mindkét konstrukció esetében a rizs *Actin-1* promótert használtunk, a rizs szövetek szelekciójára a kukorica *Ubiquitin-1* promoterével vezérelt *bar* gént alkalmaztuk.

'Unggi-9' rizs genotípusunknál sikerrel indukáltunk embriogén kalluszkat és regeneráltunk belőlük gyökeres zöld növényeket. Célunk minél több, rezisztencia gént hordozó kallusz, majd növények előállítása volt. Azokat a növényeinket, melyek megfelelően növekedtek az üvegcsőbe helyezést követően, kiültettük az üvegházba számukra optimális körülményeket biztosítva a további fejlődéshez. Az albínó növényeket az üvegcsőbe rakást követően, lombikban neveltük tovább. Azokat a növényeket, melyeknél valamilyen oknál fogva a gyökér- és hajtásfejlődés gátolva volt, nem tudtuk kiültetni. A növények üvegházi nevelése és vizsgálatuk még a dolgozat megírása közben is tart.

A kiültetett zöld növényeket molekuláris módszerekkel jellemeztük. PCR technika alkalmazásával bizonyítottuk, hogy mostanáig **6 független transzgénikus rizs** vonalat állítottunk elő, melyek tartalmazzák valamely bejuttatott gént.

Kísérletünk során előállított növények alkalmasak arra, hogy teszteljük a bejuttatott gének hasadását és öröklődését, illetve teszteljük hideg, sóstressz, szárazság és más abiotikus stresszeket illetően. A génexpressziós vizsgálatokat követően növényeink kiváló alanyai lehetnek a két gén szerepének tisztázásában és hozzájárulhatnak a hidegtűrés finomhangolásának és molekuláris szabályozásának jobb megértéséhez.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Chan, M.T., Chang, H.H., Ho, S.L., Tong, W.F., Yu, S.M. (1993):** Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 22: 491-506. p.
- Chen, H., Lin, Y.J., Zhang, Q.F. (2009):** Review and prospect of transgenic rice research. *Chinese Sci Bull*, 54: 4049-4068. p.
- Chen, L., Zhang, S., Beachy, R. N., Fauquet, C.M. (1998):** A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, 18: 25-31. p.
- Chinusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M., Zhu, J.K. (2003):** ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes and Development*, 17: 1043-1054. p.
- Chinusamy, V., Zhu, J.K., Sunkar, R. (2010):** Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639: 39-55. p.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992):** Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675-689. p.
- Christou, P., Ford, T., Kofron, M. (1991):** Production of transgenic Rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9: 957-962. p.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003):** OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33 (4): 751-763. p.
- Dudits, D. (2009):** Zöld Géntechnológia és Agrárinnováció. Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, Szeged, 42-47. p.
- Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U., Schweizer, P. (2005):** A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:755- 761. p.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. (1998):** Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional

activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16 (4): 433-442. p.

Goodrich, J.A., Tijan, R. (2006): Transcription: The Never Ending Story. In: MA J. (Szerk.): Gene expression and regulation. Higher Education Press Distributed by Springer Science and Business Media, 3-18. p.

Guo, C. (1995): Rice Bacterial Blight. *Crop Disease and Insect Pest of China*. Beijing: China Agricultural Press, 14-24. p.

Heszky, L. (2011): Géntranszfer technikák. *Agrofórum*. 2. 90-94. p.

Heszky, L., Dudits, D. (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia, *Agroinform Kiadó*, Budapest, 190-201, 238. p.

Hiei, Y., Komari, T. (2008): Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protoc*, 3: 824—834. p.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 6: 271—282. p.

Hoffmann, B. (2011): Növénygenetika, Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem, Keszthely, 1-3. p.

<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>

<http://statinfo.ksh.hu/Statinfo/haViewer.jsp>

Hussain, S.S., Kayani, M.A., Amjad, M. (2011): Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnology Progress*, 27 (2): 297-306. p.

Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T., Thomashow, M.F. (2001): Components of the Arabidopsis C-repeat/Dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiology*, 127 (3): 910-917. p.

Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F. (1998): Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280 (5360): 104-106. p.

Jelenska, J., Tietze, E., Tempe, J., Brevet, J., (2000): Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plant cells. *Plant Cell. Rep.*, 19: 298–303. p.

Jenes, B., Bittencourt, P.A.L., Csányi, Á., Pauk, J., Nagy, I., Toldi, O., Balázs, E. (1996): The Genebooster - a new microparticle bombardment device - for genetic transformation of plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. Volume 2. No. 1: 42-51. p.

- Jenes, B. (1999):** Növényekbe történő közvetlen DNS bevitel, egyszikűek transzformációja. In: Balázs E., Dudits D. (szerk): Növény Molekuláris Biológia: Szemelvények. Akadémiai Kiadó, Budapest, 628-637. p.
- Jenes, B., Pauk, J. (1989):** Plant regeneration from protoplast derived calli in rice (*Oryza sativa* L.) using dicamba. *Plant Science*, 63: 187-198. p.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999):** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17 (3): 287-291. p.
- Kristó, I. (2004):** Rizs. In: Növénytermesztés II. Főiskolai jegyzet. SZTE MFK, Hódmezővásárhely, 83-97. p.
- Lee, S.K., Song, M.Y., Seo, Y.S., Kim, H.K., Ko S., Cao, P.J., Suh, J.P., Yi, G., Roh, J.H., Lee, S., An, G., Hahn, T.R., Wang, G.L., Ronald, P., Jeon, J.S. (2009):** Pi5-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. *Genetics*, 181: 1627-1638. p.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998):** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10 (8): 1391- 1406. p.
- Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M. (2009):** Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 50 (7): 1232-1248. p.
- Navarro, M., Marque, G., Ayax, C., Keller, G., Borges, J.P., Marque, C., Teulieres, C. (2009):** Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *Journal of Experimental Botany*, 60 (9): 2713-2724. p.
- Nosticzius, Á. (1992):** Agrokémia és növényvédelmi kémia. Mezőgazda Kiadó, Budapest 273-274. p.
- Paine, J.A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hincliffe, E., Adams, J.L. Silverstone, A.L., Drake, R. (2005):** Improving the nutritional value of Golden rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23 (4): 482-487. p.
- Pauk, J., Hansch, R., Schwarz, G., Nerlich, A., Monostori, T., Mészáros, A., Jenes, B., Kertész, Z., Matuz, J., Schule, J., Mendel, L.R. (1998):** Transzgenikus búza (*Triticum aestivum* L.) előállítása Magyarországon. *Növénytermelés*, 47: 241-251. p.

- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., YU, G.L. (2000):** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105-2110. p.
- Romeuf, I., Tessier, D., Dardevet, M., Branlard, G., Charmet, G., Ravel, C. (2010):** wDBTF: an integrated database resource for studying wheat transcription factor families. *BMC Genomics*, 11: 185. p.
- Ruzsányi, L. (1996):** Rizs 331-353. p In: Bocz E.(szerk): Szántóföldi növénytermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 886. p.
- Sanford, J.C. (1988):** The biolistic process - a new concept in gene transfer and biological delivery. *Trends Crop Science*, 22: 546-550. p.
- Schubert, D. R. (2008):** The problem with nutritionally enhanced plants. *Journal of Medicinal Food*, 11 (4): 601–605. p.
- Simonné Kiss, I. (1983):** A rizs és termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 21-27 p.
- Simonné Kiss, I. (2005):** Rizs. 284-293. p In: Antal J.(szerk): Növénytermesztés 1. A növénytermesztés alapjai. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 391 p.
- Soltész, A. (2011):** Az abiotikus stressz-adaptációt szabályzó OSMYB4, TACBF14 és TACBF15 transzkripciós faktorok funkciójának igazolása transzgénikus árpában. PhD disszertáció. 17-22; 54-55. p.
- Stachel, S.E., Messens, E., van Montagu, M., Zambryski, P.C. (1985):** Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318; 624-629. p.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1997):** Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cisacting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94 (3): 1035-1040. p.
- Tanács, L. (2005):** Élelmiszer-ipari nyersanyag ismeret. Szaktudás Kiadó Ház Budapest, 47-51p.
- Thomashow, M.F. (2010):** Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold responsive pathway. *Plant Physiology*, 154 (2): 571-577. p.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiyaa, H., Hinata, K. (1988):** Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology*, 6: 1072—1074. p.
- Vannini, C., Locatelli, F., Bracecale, M., Magnani, E., Marsoni, M., Osnato, M., Mattana, M., Baldoni, E., Corragio, I. (2004):** Overexpression of the rice *Osm4* gene 117 increases

- chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 37 (1): 115-127. p.
- Wang, C. T., Wen, G. S., Lin, X. H., Liu, X. Q., Zhang, D. P. (2009):** Identification and fine mapping of the new bacterial blight resistance gene, Xa31(t), in rice. *Eur J Plant Pathol*, 123: 235—240. p.
- Varshney, A., Altpeter, F. (2001):** Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum aestivum*, L.). *Mol. Breed.* 8: 295-309. p.
- Welling, A., Palva, E.T. (2008):** Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant Physiology*, 147 (3): 1199-1211. p.
- Wu, F., Wang, S., Li, SC., Zhang, KZ., Li, P., (2006):** Research progress on herbicide resistant transgenic rice and its safety issues. *Mol Plant Breed*, 4: 846—852. p.
- Wu, X., Li, X., Xu, C., Wang S. (2008):** Fine genetic mapping of xa24, a recessive gene for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Theor Appl Genet*, 118: 185—191. p.
- www.nebih.gov.hu/data/cms/147/082/szfoldfajtajegyzek2012szept.xls**
- Xiong, Y., Liu, T., Tian, C., Sun, S., Lij., Chen, M. (2005):** Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology*, 59 (1): 191-203. p.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994):** A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6 (2): 251-264. p.
- Ye, R., Huang, H., Yang, Z., Chen, T., Liu, L., Li, X., Chen, H., Lin, Y. (2009):** Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm. *Pest Manag Sci*, 65: 1015—1020. p.
- Yoshimura, S., Yoshimura, A., Saito, A., Kishimoto, N., Kawase, M., Yano, M., Nakagahra, M., Ogawa, T., Iwata, N. (1992):** RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice bacterial blight resistance genes, Xa-1, Xa-3 and Xa-4. *Jpn. J. Genet.* 67: 29-37. p.
- Zaenen, J., Van Larebeke, N., Tenchy, H., Schell, J. (1974):** Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127. p.
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., Thomashow, M.F. (2003):** Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*, 133 (2): 910-918. p.

- Zhang, H.M., Yang, H., Rech, E.L. (1988a):** Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep*, 7: 379-384. p.
- Zhang, Q. (2007):** Strategies for developing green super rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 16402-16409. p.
- Zhang, S.P., Song, W.Y., Chen, L. L., Ruan, DL., Tayllor, N., Ronald, P., Beachy, R., Fauquet, C. (1998):** Transgenic elite indica rice varieties, resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol Breed*, 4: 551—558. p.
- Zhang, W., Wu, R. (1988b):** 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. p.
- Zhang, X., Fowler S.G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S.Y., Stockinger, E.J., Thomashow, M.F. (2004):** Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 39 (6): 905-919. p.
- Zhang, G., Angeles, E.R., Abenes, M.L.P., Khush, G.S., Huang, N. (1996):** RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene Xa-13 in rice. *Theor Appl. Genet.* 93:65-70. p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az SZTE Mezőgazdasági Karának, hogy lehetővé tették számomra a TDK munkákban való bekapcsolódást, valamint a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályának, hogy biztosították kísérleteim szakmai és tárgyi feltételeit.

Köszönetem fejezem ki, továbbá Zombori Zoltánnak (a szegedi SZBK munkatársának) együttműködéséért, a plazmid konstrukciók elkészítéséért, valamint köszönet Dr. Galiba Gábornak és Dr. Soltész Alexandrának, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a két célgént.

Köszönöm Dr. Mihály Róbertnek, hogy a konzulensi szerepkörrel járó nehézségek ellenére elvállalta ezt a feladatot, valamint Dr. Monostori Tamásnak, hogy lehetőséget adott a témában való elmélyülésre. Külön szeretném megköszöni a sok szakmai és technikai segítséget Dr. Pauk Jánosnak, Palaticki Szilviának és Markó Ferencnek.