

**Genetikailag módosított árpa (*Hordeum vulgare* L.)
fenotípusos jelölése *Arabidopsis thaliana* *uvr8* gén
magháj specifikus expressziójával**

XXXI. OTDK Biológia Szekció

2013

Zelenyánszki Helga, Biológus MSc I. évfolyam

Lukács M. Sebestyén, Biológia BSc IV. évfolyam



ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Témavezető: Éva Csaba doktorjelölt

Csoportvezető: Dr. Tamás László egyetemi docens

TARTALOMJEGYZÉK:

1. CÉLKITŰZÉS	3.
2. BEVEZETÉS	3.
2.1 A transzgénikus növények típusai és jelölésük.....	3.
2.2 Árpa <i>germinB</i> és <i>germinF</i> gének	4.
2.3 Uvr8 – a növények UV-B receptora	6.
2.4 Antociánok és bioszintézisük.....	8.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	10.
3.1 Felhasznált DNS minták	10.
3.2 Genomi DNS kinyerés	10.
3.3 mRNS kinyerés és reverz transzkripció.....	11.
3.4 PCR reakciók	11.
3.5 Felhasznált primerek és alkalmazásuk.....	12.
3.6 Baktériumtenyésztés és plazmidkinyerés	12.
3.7 Restrikciós emésztések, DNS visszanyerés gélből	12.
3.8 DNS lecsapás és ligálás	13.
3.9 E. coli transzformáció	13.
3.10 TOPO ligálás.....	13.
3.11 Szekvenálás.....	14.
3.12 Agrobaktérium transzformáció	14.
3.13 Árpa transzformálás és regeneráció	14.
3.14 Növénynevelési körülmények.....	14.
3.15 Antocián extrakció és mérés	14.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	15.
4.1 Transzformációs kazetták elkészítése	15.
4.2 Növénytranszformálás	17.
4.3 Antocián és karotinoid mérés	19.
5 ÖSSZEFOGLALÁS	24.
6. SUMMARY	25.
7. NYILATKOZATOK	27.
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	27.
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	28.

1. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja olyan transzgénikus árpa előállítása volt, amelynek szemtermése ránézésre megkülönböztethető vad típusú fajtársaiétól. Ezt a neutrális pH-n lila vagy kék színű antocián molekulák fokozott szintézise révén kívántuk megvalósítani szövetspecifikus módon. A cél eléréséhez többféle promóter is rendelkezésünkre áll az irodalom szerint, mint pl. a *germin* fehérjék (F és B) promótere, mely elsősorban a szemtermés héjában biztosítja a gén transzkripcióját.

Célunk volt továbbá összehasonlítani a két promóter hatékonyságát stabil transzgénikus árpában. Ennek megvalósításához az alábbi konkrét célokat fogalmaztuk meg:

- 1., Létrehozunk két transzformációs kazettát, amelyek tartalmazzák az *uvr8* gént, valamint a *germinF* ill. a *germinB* gének promóterét
- 2., Stabil transzgénikus árpa vonalakat állítunk az elkészült transzformációs kazettákkal
- 3., A kapott növények vizsgálata DNS, mRNS és antocián szinten. Tanulmányozzuk a transzgén expresszióját, és annak specifikus/aspecifikus hatásait az alábbi módszerekkel.
 - Transzgén beépülésének igazolása PCR-rel
 - Transzgénről történő transzkripció kimutatása RT-PCR-rel
 - Antocián- és karotinoidszint mérése spektrofotométerrel

Későbbi munka során tervezzük még:

- Antioxidáns enzimek aktivitásának mérése
- UV kezelések és hatásuk vizsgálata
- Árpa saját *uvr8* génjének izolálása és jellemzése

2. BEVEZETÉS

2.1 A transzgénikus növények típusai és jelölésük

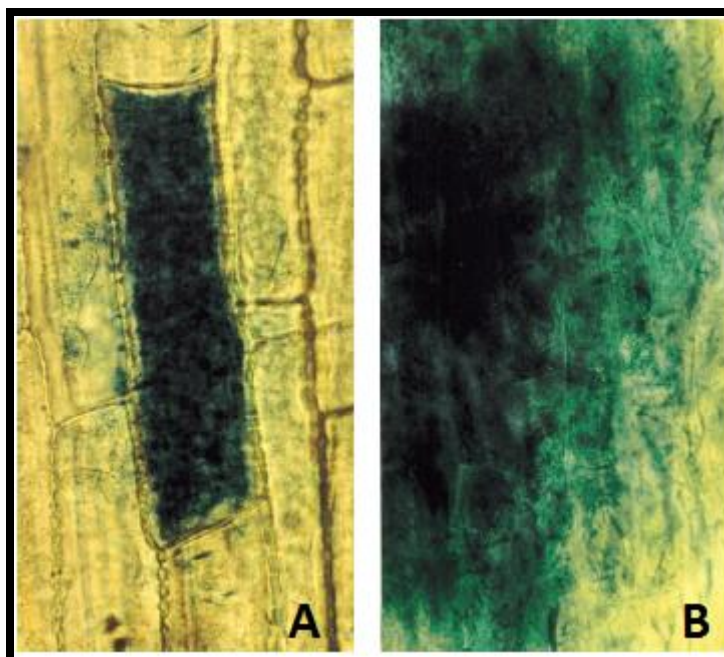
Az első rekombináns DNS technikával előállított növényvel 1983-ban találkozott a világ (*Fraley és mtsai., 1983*). Azóta a növényi géntechnológia hatalmas ütemben fejlődött, számos lehetőség elé állítva a kutatókat. Jelenleg három kategóriába soroljuk a kísérleti stádiumban és forgalomba lévő transzgénikus növényeket (*Yonekura-Sakakibara és Saito, 2006*). Az „első generációba” tartozó növények főként a mezőgazdasági termelőknek nyújtanak előnyt, amelyek például herbicid tűréssel, vírus rezisztenciával, késleltetett éréssel rendelkeznek, vagy rovarkártevő ellen termelnek toxint (*Hails, 2000*). A „második generáció” foglalja

magába a fogyasztó számára kedvezőbb tulajdonsággal rendelkező módosított növényeket. Ilyenek többek között magasabb táplálkozási értékkel, vagy például kisebb allergenitással rendelkező fajták (ld. pl. *Paine és mtsai., 2005 és Wilson és mtsai., 2005*). A „harmadik generációs” növények az úgynevezett bioreaktorok, amelyek ehető vakcinaként, gyógyszergyári vagy ipari alapanyag termelőként funkcionálhatnak (pl. *Walmsley és Arntzen, 2000 és Ramessar és mtsai., 2008*). A transzgénikus növények megkülönböztetését a nem transzgénikusaktól minden esetben elvárja a társadalom (*Demeke és mtsai., 2006*). Különösképpen a „harmadik generációba” tartozóktól, mert azok alapvetően nem élelmezési és takarmányozási célt látnak el. Ennek egyik lehetősége lehet a gabonák esetében a szemtermés fenotípusos jelölése, szabad szemmel látható módon (Kovinich és mtsai 2012). Ezáltal ránézésre megkülönböztethető lesz a transzgénikus növény termése a vad típusú növény szemtermésétől, ami elősegíti a magasabb fokú élelmiszerbiztonságot. Az ellenőrzés így nem igényel molekuláris módszereket, ezáltal az munka és költséghatékonyabb lesz. Továbbá olyan helyeken és is biztonságosan lehet genetikailag módosított növényeket termesztetni, ahol nincs megfelelő ellenőrzéstechnikai feltétel (pl. fejlődő országok).

2.2 Árpa *germinB* és *germinF* gének

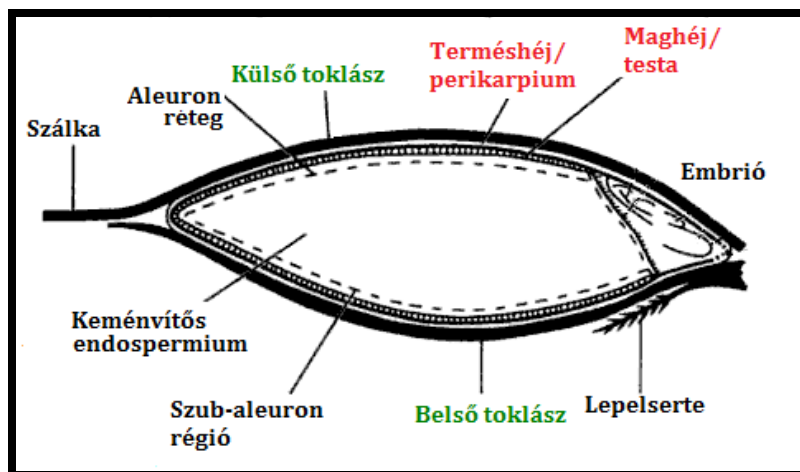
Először 1980-ben írták le a germin fehérje génjét búzából, mikor csírázás specifikus géneket kerestek. Innen jön az elnevezése is a géncsaládnak (germination = csírázás). Azóta tudjuk, hogy a géncsalád bizonyos tagjai akár az összes növényi szervben vagy a növekedés minden szakaszában is kifejeződnek, és fontos szerepet töltenek be a fejlődésben és a stresszvédelemben. A germin géncsalád három funkciót tölt be; rendelkezhetnek enzim aktivitással (oxalát-oxidáz, szuperoxid-diszmutáz), részt vehetnek strukturális fehérjeként és lehetnek receptor fehérjék. A család minden tagjára igaz, hogy az extracelluláris mátrixban található glikoproteinek (*Bernier és Berna 2001*). Eddig árpából B,E,F,D típusú germin gént írtak le. Közülük a *germinB,F* gének (*gerB,F*) rendelkeznek szemterméshéj specifikus expresszióval, amit Wu és mtsai. tranziens expressziós rendszerben is igazoltak (**1. ábra**). Ezért fordult felénk a figyelmünk, pontosabban a gének transzkripcióját specifikusan irányító promóterekre. A *gerB* és *F* promóterek szekvenciája 93,3 százalékban megegyezik (1352 bázispár), mégis valamelyest eltérő specifitásúak a növény fejlődése során (*Wu és mtsai, 2000*). A csírázás megindulása után négy nappal mért eredményeknél kimutatható mindkét gén aktivitása a csíranövény szöveteiben, de a *gerB* aktívabb a koleoptil és a primer levelek

fejlődésénél, míg a *gerF* a gyökér fejlődése során mutat jelentősebb expressziót. A fejlődő hajtásban öt nappal a csírázás megindulása után a mért mRNS-ek megoszlása a két germin gén között jelentősen eltér. Az átíródott mRNS-ek 73-78 százalékát a *GerB* fehérje mRNS-e teszi ki. Ahogy korábban is említettük, kifejlett növényben viszont a *gerB* és *gerF* gén is magháj/szemtermésháj specifikusnak számít, az mRNS-t, levél vagy gyökér szövetekben nem találták meg. Az árpa kalász fejlődésénél pl. a *gerF* gén transzkripciója dominál, a kinyert mRNS-ben a *gerB* a *gerF*-nek csak a 22 százaléka volt (Frederico és mtsai., 2006).



1. ábra. *germinF* promóter expressziós mintázata az epikarpiumban (A) és a testában (B) GUS tranziens expressziós rendszerrel vizsgálva (Wu és mtsai., 2000)

A szemtermés (részeit ld. **1. 2. ábrán**) esetében a *gerF* expresszálódik a testában (magháj) és az epikarpiumban (termésháj külső része) ellenben a *gerB* csak a testában. Mindezt árpában tranziens expressziós rendszerben is sikerült igazolni, *uidA* riportergénes konstrukcióval (Wu és mtsai., 2000). A germin fehérjék pelyvalevélben történő expresszióját csak gombafertőzés esetén figyelték meg.



2. ábra: Árpa szemtermés szerkezete

(http://www.plantprotection.hu/modulok/angol/barley/morf01_bar.htm alapján módosítva)

2.3 Uvr8 – a növények UV-B receptora:

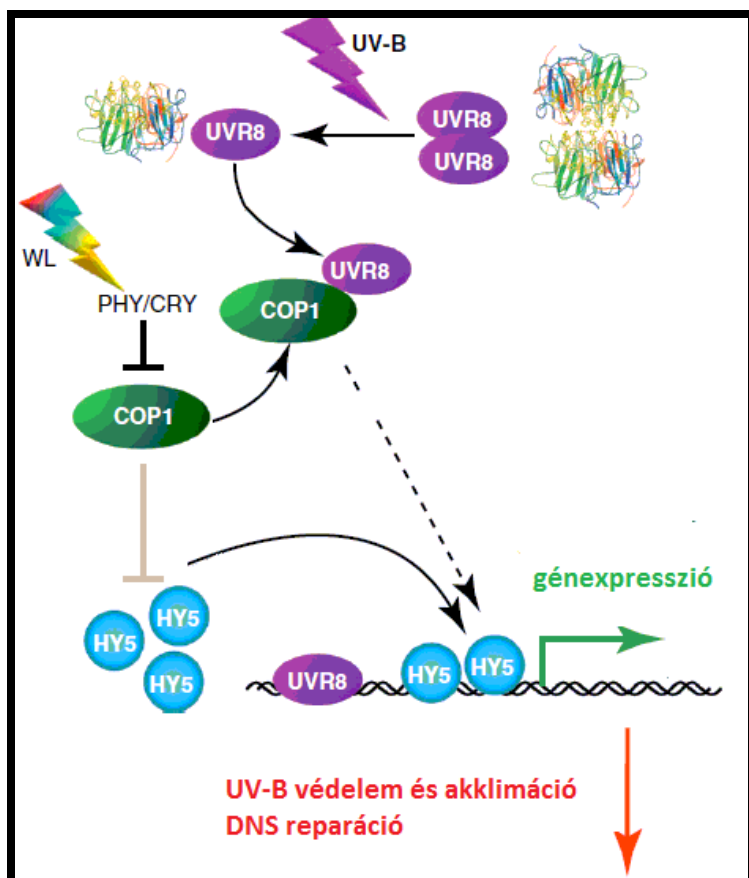
A növények számára a napfény jelenti az energiaforrást, ebből és helyt ülő életmódjukból következően is erősen kitettek az UV sugárzás hatásainak, mely nagymértékben káros a növények számára. Az UV-fény érzékelése és az ezt követően aktiválódó védekezési mechanizmusok ezért létfontosságúak.

Az UV sugárzást három fő tartományba sorolják, csökkenő hullámhossz és növekvő energiatartalom szerinti sorrendben: UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280nm) és UV-C (280-200 nm). Az ózonréteg a 280 nm alatti sugárzás egészét, és az UV-B tartományba eső sugárzás nagy részét is elnyeli, mindössze 0,5 % éri el a föld felszínét.

Az UV-B sugárzás káros hatásának hátterében két fő mechanizmus áll, az aromás vegyületek gerjesztése és a reaktív oxigénformák (angol rövidítéssel ROS – Reactive Oxygen Species) képződése. Az aromás vegyületek általában jól abszorbeálják az UV fényt, ami károsíthatja is azokat. A DNS két egymást követő pirimidin nukleotidja gerjesztés hatására képes ciklobutil pirimidin dimerré alakulni, az aminosavak aromás oldalláncai pedig a gerjesztődve felnyílhatnak. A reaktív oxigénformák – bár fontos jelátviteli funkcióik is ismertek – a sejt szinte minden részét károsítják, például oxidálhatják a DNS-t és a fehérjéket továbbá a membrán lipideket (Jordan 1996). A membrán lipidek kettős kötéseinek oxidációja a telítetlen zsírsavak arányának csökkenésével és a membrán rigidebbé válásával, funkcióvesztésével jár (Zhang és mtsai, 2005). A károsodások kivédésére a növények fokozzák a DNS hibajavító enzimek, antioxidáns enzimek (pl.: aszkorbát-peroxidáz, szuperoxid-diszmutáz) expresszióját, valamint az UV tartományban abszorbeáló másodlagos

anyagcseretermékek (flavonoidok) bioszintézisét. Utóbbi vegyületek nem csak fényvédő pigmentek, hanem erőteljes antioxidánsok is. A munkánk számára fontos antocián molekulák, melyek fenoloid típusú vegyületek önmagukban nem abszorbeálnak az UV tartományban, például észterezve azonban igen, például cinnaminsav-észter formájában (Jordan 1996).

A növényekben az eddig egyetlen leírt UV-B fény receptor az *uvr8* (UV rezisztencia 8. lókus) gén terméke (Rizzini és mtsai 2011). E mellett a növények az UV-fényt közvetetten is képesek érzékelni, a keletkező ROS (egészen pontosan a hidrogén peroxid) szintjét a hisztidin kináz receptor méri (Desikan és mtsai, 2008). A korábban leírt növényi fotoreceptorokkal (pl. fitokróm, kriptokróm, fototropin) szemben az UVR8 fehérje nem tartalmaz proszterikus csoportot, a kromofórt a fehérje triptofán oldalláncai (Trp 233 és 285) alakítják ki (Wu és mtsai, 2012).



3. ábra. UV-B szignalizáció: UV-B percepció hatására az UVR8 monomerizálódik, így képes interakció lépni a COP1 ubiquitin ligázzal. A COP1 gátló hatása alatt álló HY5 transzkripciós faktor felszabadul a gátlás alól és megindítja az UV-B védelemben részt vevő gének expresszióját. A COP-1 represszálásában részt vesznek még a fehér fény (WL) aktiválta fitorómok (PHY) és kriptokrómok (CRY). (Heijde és Ulm, 2012 alapján módosítva)

Az UV-B szignáltranszdukció (3. ábra) további fő elemei a COP1 nevű E3-típusú ubiquitin ligáz (Oravecz és mtsai. 2006), illetve a HY5 és HYH transzkripciós faktorok (Brown és Jenkins 2008). Bármelyik elem hiánya gyenge UV-B stressz toleranciához vezet (Favory és mtsai. 2009). Az UVR8 receptor dimer formában található a citoplazmában, UV-B abszorpció hatására monomerizálódik és képes a sejtmagba transzlokálódni (Kaiserli és Jenkins 2007).

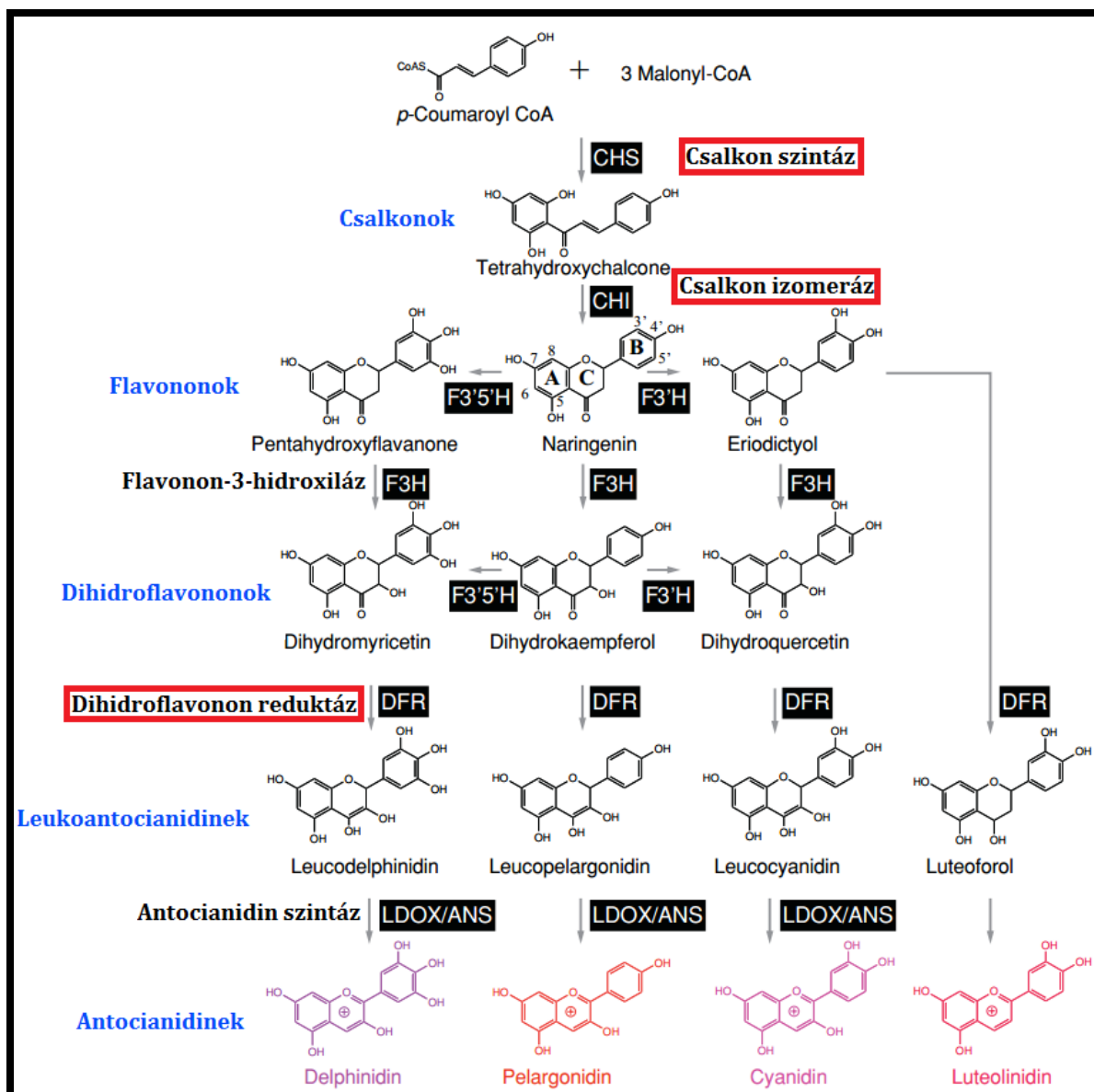
Az UVR8 monomer formában képes interakcióba lépni a COP1 fehérjével (*Favory és mtsai. 2009, Rizzini és mtsai 2011*). A COP-1 elősegíti a HY5 és egyéb serkentő transzkripciósfaktorok degradációját, az UVR8-al történő interakció következtében ez a gátlás megszűnik (*Heijde és Ulm 2012*). A HY5 és a vele homológ HYH fehérje funkciója átfedő. Az előbbi mutációja fokozottabb UV érzékenységet okoz, ami a fehérje elsődleges szerepére utal (*Brown és Jenkins 2008*). A két transzkripciósfaktor közel 100 gén expresszióját szabályozza, köztük DNS hibajavító enzimét is (fotoliázok), valamint a flavonoid bioszintézis számos enzimét (l. 2.4 fejezet) és ezek transzkripciósfaktorait (MYB faktorok) (*Oravecz és mtsai. 2006*). Az *uvr8* feltételezett homológjait bioinformatikai módszerekkel eddig nyolc, algából vagy magasabb rendű növényből írták le. Megfigyelhető, hogy a triptofán aminosavak helyzete szigorúan konzervált a fehérjében (*Rizzini és mtsai., 2011*). Az árpában kódolt homológot fehérje génjét tudomásunk szerint még nem azonosították, nem írták le.

2.4 Antociánok és bioszintézisük:

Az antociánok flavonoid típusú vegyületek, alapvázuk három aromás gyűrűből áll, melyhez glikozidos kötessel szénhidrát molekulák kapcsolódnak. Azon túl, hogy a virágok és egyéb vegetatív szervek élénk színét (savas pH-n vörösek, lúgos pH-n sárgák, kékek lehetnek) adják egyik fő pigment csoportot alkotják, széleskörű stresszvédő szerepet is betölthetnek. Az antociánok alapvetően 500-600 nm közt mutatnak abszorpciós maximumot, azonban pl. cinnaminsav-észter formában alkalmasak az UV-B fény abszorbeálására (*Jordan, 1996*). Az antociánok erős antioxidáns hatásúak, szerepet játszanak a reaktív oxigén és nitrogénformák eliminálásában. *In vitro* kísérletben a megvilágított kloroplasztiszok által termelt szuperoxid gyökök 17%-át eliminálta a cianidin-3-(6-malonil)-glükózid (*Neill és Gould 2003*). Erős fényen pl. fénylevelekben optikai szűrőként működnek, képesek abszorbeálni a felesleges fotonokat, így kivédve a fotoszintetikus elektrontranszportlánc túltelítődését, ami fotoinhibícióhoz vezetne. Bizonyították továbbá, hogy a fentieken kívül az antociánok elősegíthetik a hideg-, fagy-, szárazság-, nehézfémstressz és a fizikai sérülés tűrését is (*Gould 2004*).

A flavonoidok fenil-alaninból származtatható másodlagos anyagcseretermékek. A flavonoid szintézis (ld. **4. ábra**, összefoglalta *Grotewold 2006*) kiinduló lépése egy kumaroil-CoA és 3 malonil-CoA kondenzációja. Ezt a lépést a csalkon szintáz (CHS) katalizálja, s a kondenzáció eredménye a csalkon. Ez a molekula az összes flavonoid vegyületcsoport (flavonok,

flavonolok, flaván-diolok, flaván-4-olok, proantocianidinek, izoflavonoidok, antocianinok) prekuzora. A csalkonból gyűrűzáródással keletkeznek a flavononok (csalkon-izomeráz, CHI működésével), ezekből pedig hidroxilációval a dihidroflavonolok. Az antocián szintézis első lépését a dihidroflavonol-4-reduktáz katalizálja (DFR), leukocianidinek keletkeznek. Az antocianidin szintáz/leukocianidin dioxigenáz (ANS) katalizálja a leukoantocianidinek antocianidinné alakulását. Antocianidinekből redukcióval keletkeznek a proantocianidinek, glikozilációval pedig az antociánok.



4. ábra: A flavonoid bioszintézis menete. Pirossal vannak keretezve azok az enzimek, melyek expressziója fokozódik az UV-B szignalizáció eredményeképp (Grotewold, 2006)

Az antociánok két fő tautomerje a piros színű flavilium kation, valamint az ebből nukleofil vízaddícióval keletkező színtelen karbinol pszeudobázis. Előbbi forma a vakuólumban felhalmozódó, utóbbi a citoplazmában előforduló antociánokra jellemző. A flavilium kation intra- és intermolekuláris ko-pigmentáció, valamint a planáris antocianidok kötegelődése révén stabilizálható. Kopigmentáció során kovalens (intra) vagy nem kovalens (inter) kapcsolatok alakulhatnak ki más flavonoidokkal, szerves savakkal, fémionokkal stb., mely az abszorpció s így a szín megváltozásához vezethet (Grotewold 2006). Az antocianidin szintézis fokozása céljából különböző szintézisút enzimeket már sikerrel termeltettek túl különböző transzgenikus növényekben pl. csalkon szintázt (Napoli és mtsai 1990), csalkon izomerázt (Muir és mtsai 2001), antocianidin szintázt (Reddy és mtsai 2007). A megemelt enzimszint általában megnövekedett antocián szinthez vezetett. Tudománytörténeti érdekesség, hogy éppen az egyik ilyen munka során, abból kiindulva fedezték fel az RNS-interferencia jelenségét. A túltermeltetett csalkon szintáz mRNS ugyanis egyes esetekben aktiválta a genom „immunrendszer”-ét és így éppen hogy nem megnövelt, hanem lecsökkent transzlációt és így alacsony antocián szintű, fehér virágú petúniát sikerült előállítani Napoli-nak és munkatársainak (1990).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Felhasznált DNS minták

A *Hordeum vulgare* L. *germinB* (génbank azonosító: DQ324801.1, méret: 1308 bp) és *germinF* (DQ324801.1, méret: 1-1156bp) promótereket Golden Promise árpafajta genomi DNS-éből klónoztuk. A szekvencia pontosságának megőrzése érdekében Pfu (Fermentas) enzimet használtunk. Az *Arabidopsis thaliana* *uvr8* génjét (NM_125781.3 – 2117 bp) cDNS-ből klónoztuk. A *nos* terminátort tartalmazó pCRII-TOPO vektort témavezetőnk, Éva Csaba bocsátotta rendelkezésünkre.

3.2 Genomi DNS kinyerés

A növényi genomi DNS-t 30 mg növényi szövetből nyertük ki, Aquagenomic kit (Biocenter) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. A módszer a sejtek feltárásán, majd a DNS etanolos, izopropanolos lecsapásán alapul. A megfelelően beszáradt (átlátszó) csapadékot 30 µl 1 mM-os Tris-EDTA pufferben oldottuk, ezt követően -20 °C-on tároltuk.

3.3 mRNS kinyerés és reverz transzkripció

Az mRNS kinyerést Genovision kittel végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. A módszer alapja, hogy az mRNS-ek poliA farokrésze kikötődik a cég által biztosított mágnesgyöngyök felszínén található oligo-dT nukleotidokhoz.

Többszöri mosás után az mRNS-eket RN-áz aktivitás mentes (dietil-pirokarbonáttal kezelt) ioncserélt vízben eluáltuk, az esetleges genomi DNS szennyezést DN-áz kezeléssel távolítottuk el. A cDNS átíráshoz a reakcióelegyet az alábbiak szerint állítottuk össze: 19 µl DN-áz kezelt mintához 4 µl 50 µM d(T)18-at (oligo-dT), 2 µl MQ-t, 8 µl Fermentas RT puffert, 4 µl 10 mM dNTP-t, legvégül pedig 2 µl RevertAid reverz transzkriptázt (Fermentas) adtunk, A reakciót az alábbi protokoll szerint végeztük: 25 °C - 5 perc, 42 °C - 30 perc, 85°C - 5 perc .

3.4 PCR reakciók

Klónozáshoz Pfu polimerázt, az ellenőrzésekhez Taq polimerázt használtunk. Primerjeinket (3.1.5. pontban) Primer3 programmal (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) terveztük és az Invitrogen cégtől rendeltük meg. A PCR (és RT-PCR) reakciókat ez ICyclerTM (BIO-RAD) készüléken végeztük. A PCR reakciókat 10µl térfogatban (vagy egész szám szerinti többszörösében) végeztük. A reakció elegy összetétele 10 µl –re: 0,4 ng plazmid DNS templát/20-40 ng növényi genomi DNS *templát*, 25-50ng *primer*, 1mM dNTP, 1U *DNS polimeráz*, 1/10 térfogat *PCR puffer*. PCR reakcióinkban cDNS templát esetén 2 perc, kolónia PCR vagy genomi DNS-en végzett PCR esetén viszont 5 perc kezdeti denaturációt (95 °C) állítottunk be. A célszekvenciát 36 ciklusban szaporítottuk fel. Az egyes szakaszok hőmérsékletét és időtartamát az alábbiak szerint állítottuk be: *denaturáció* (95 °C) 30 s, *primer kapcsolás* (primer3-által javasolt T +3-4 °C), az egyes primereknek megfelelően 55 °C-on 20 s (fokenként +1 s), *lánchosszabbítás* (72 °C) a termék méretétől függően -1000 bp/1 perc + 10%

3.5 Felhasznált primerek és alkalmazásuk

1. táblázat: Felhasznált primerek neve, szekvenciája és alkalmazása

Primernév	Szekvencia	Alkalmazás
GerminF2	5' GAGCTCGGGCCGCC CAGGCAGATGAATTTGG3'	gerB/F klónozása SacI és NotI hasítóhelyek bevitele, mindkét promóterhez kapcsolódnak
GerminR2:	5'CATATGGAGTTGCTTTGTCAATGAAG 3'	
Germinfk1F	5'AGGCAGACTGAATTTGG3'	nested PCR, gerF-re specifikus
Germinfk1R	5'TATGTACCCCGCAAAG3'	
Uvr8F	5'CATATGGCGGAGGATATGGCTG3'	uvr8 klónozás
Uvr8R2	5'ACTAGTCAAATTGTACACGCTTG 3'	
Htuba32F	5'GCCTTTGTCCACTGGTATG'3'	mRNS kinyerés ellenőrzése
Htuba32R	5'GTACTCATCACCCCTCGTCAC3'	
germin3F1	5'AATCTACGGCTATTTAAGCAC 3'	Ellenőrzések, promóter/gén átfedő szakaszt szaporítja fel
UVR85R1	5'CTAGAGAATCTTCGGTGTCC 3'	
UVR3F	5'TTCAAGTCTCATGTGGATGG3'	RT-PCR
UVR3R	5'GAAAGTTCCGTCAACCGAC3'	

3.6 Baktériumtenyésztés és plazmid kinyerés

A megfelelő *E. coli* kolóniát 2 ml LB táplevesbe (10 mg/ml tripton, 5 mg/ml élesztőkivonat, 10 mg/ml NaCl) oltottuk. A csak a kívánt plazmidot hordozó baktériumok növekedését antibiotikus szelekcióval segítettük elő, plazmidtól függően az alábbi végkoncentrációkat alkalmaztuk: ampicillin (pGEM-TE, pCRII-TOPO) 100 µg/ml, kanamicin (pCRII-TOPO) 10 µg/ml, spektinomicin (pWBVec8) 100 µg/ml. a baktérium szuszpenziókat 37 °C-on, 16 (ampicillin) ill., 20 órán át (kanamicin, spektinomicin) 180 rpm-en rázatva neveltük. A plazmid kinyerést hagyományos módon végeztük, mely lúgos lizáláson, a sejtalkotók (és így a sejtfalhoz kötött kromoszómális DNS) kicsapásán, végül a plazmid DNS etanolos lecsapásán alapszik. A DNS-t beszárítást követően 40-80 µl 1 mM-os Tris-EDTA pufferben oldottuk és -20 °C-on tároltuk.

3.7 Restriktációs emésztések, DNS visszanyerés gélből

A DNS emésztését a Fermentas cég megfelelő restriktációs endonukleáz enzimeivel végeztük a cég által ajánlott pufferekben. A kettős emésztések optimális puffer körülményeit a gyártó

honlapjának segítségével állapítottuk meg. Ha szükséges volt, az emésztések által generált fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel szeparáltuk, majd a megfelelő fragmentumot a Viogene Gel Advanced kit-el a gyártó utasításai szerint nyertük vissza és tisztítottuk ki a gélből.

3.8 DNS lecsapás és ligálás

A ligálásokba lehetőleg (minimum) 100 ng vektort és moláris arányokat tekintve háromszoros mennyiségű inszertet tettünk. A ligálások elemeit együtt (emésztett plazmid vektor és inszert) csaptuk le vizes oldatból az alábbi recept szerint: a DNS oldat 20 µl-jéhez 55 µl 96%-os etanolt, 0,5 µl 0,5 M EDTA-t, 2 µl 10 M NH₄Ac-ot adtunk. 30 perc 4 °C-on történő centrifugálás után a csapadékot kétszer mostuk 70%-os etanollal majd beszárítottuk és kis térfogatú 1 mM-os EDTA-ban oldottuk vissza. A ligálási reakcióba az ilyen módon elkészített oldatból 3,5 µl-t mértünk és 0,5 µl 10nM dATP-t, 0,5 µl T4 ligáz puffert és 0,5 µl puffert adtunk hozzá. A ligálási reakciót 1 órán át szobahőmérsékleten, ezt követően 4 °C-on egész éjjel végeztük.

3.9 *E. coli* transzformáció

A transzformációhoz DH5α elektrokompetens *E. coli* törzset használtunk. 0,2 mm-es küvetába (Bio-Rad) pipettázott kompetens sejtekhez a 3.2.3 pontban leírt ligálási reakció 0,5-0,5 µl-ét adtuk, majd 2,46 kV feszültségen transzformáltuk őket. 1 óra SOC oldatban (LB+0,4% glükóz+10 mM MgCl₂) történő rázatást követően a megfelelő szilárd LB táptalajra kentük a baktérium szuszpenziót.

3.10 TOPO- ligálás

A TOPO TA klónozó rendszer (Invitrogen) pCRII-TOPO vektorba építi be a 3' túlnyúló A véget tartalmazó PCR-termékeket. A klónozáshoz 2 µg PCR terméket, 0,5 µl TOPO TA vektort mértünk össze. A reakciótermék 1 µl-ét *E. coli* elektrokompetens baktériumsejtekbe transzformáltuk (l. 3.2.5). A baktérium-szuszenziót ampicillint, vagy kanamicint, valamint a kék fehér szelekcióhoz szükséges IPTG-t és X-galt tartalmazó szilárd LB táptalajokra szélesztettük.

3.11 Szekvenálás:

A szekvenáló PCR reakcióhoz az ABI PRISM™ Dye Terminator Sequencing Kit-et (PE Applied Biosystems) használtuk. A szekvenáló PCR reakciót a gyártó által ajánlott paraméterek szerint hajtottuk végre. A nukleotid sorrend meghatározását automata szekvenáló készülékkel végeztettük. A DNS szekvenciák elemzéséhez, ellenőrzéséhez a Chromas programot használtuk, a célszekvenciával történő összehasonításhoz a www.ebi.ac.uk/emboss webcímen hozzáférhető programot használtuk.

3.12 Agrobaktérium transzformáció

Az elkészült konstrukciókat tartalmazó pWBVec8 szuperbináris plazmidokat AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe juttattuk fagy- és hősokkon alakuló módszerrel (Weigel és Gazebrook, 2006).

3.13 Árpa transzformáció és regeneráció

Az árpa növényeinket agrobaktérium közvetítette géntranszferrel transzformáltuk (Éva és mtsai 2008) módszere alapján. A Golden promise fajta árpanövényekből éretlen embriót izoláltunk steril körülmények között, majd az agrobaktérium inokulációt követően higromicin rezisztencián alapuló szelekció révén transzgénikus kallusztényészeteket indukáltunk. A kalluszokból ezt követően teljes növényt regeneráltunk.

3.14 Növénynevelési körülmények

Transzgénikus növényeinket, valamint az embrió izolációra használt nem transzgénikus növényeket egyaránt SANYO Fitotron készülékben, tőzeges virágföld és homok keverékébe (3:1) ültetve, 16 óra 15°C, 200 µmol/m²•s fényen, és 8 óra 15°C sötétben, 70% relatív páratartalom mellett neveltük, heti kétszeri öntözés mellett.

3.15 Antocián és karotinoid extrakció és mérés

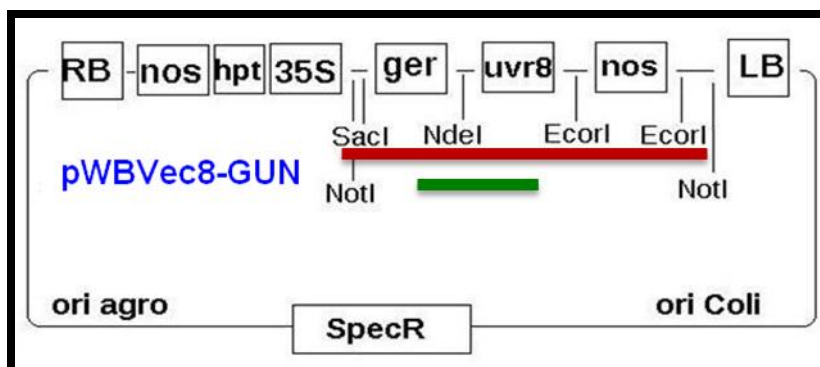
Az antocián extrakciót és mérést Takeda (1990) módszere alapján végeztük: 40 mg maghéjat késhegynyi dörzshomok segítségével 400 µl sósavas metanolban (összetétele: 1V/V% 0,1 M HCL, 21 V/V% metanol, 78 V/V% desztillált víz) eldörzsöltünk. Öt perc 12 000 g-n történő

centrifugálást követően a felülúszót pipettával eltávolítottuk és Perkin Elmer UV-VIS spektrofotométerrel (USA) mértük meg az abszorbanáciáját 530 és 470 nm-es hullámhosszon. Az eredményeket a két hullámhosszon mér abszorbanacia értékek különbségeként ($A_{470}-A_{530}$) 40 mg maghéjra vonatkoztatva adtuk meg. A karotinoidokat 100%-os acetonnal extraháltuk, majd Shimadzu UV-VIS spektrofotométerben mértük Lichtenhaler és munkatársai (1987) módszere szerint.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1A transzformációs kazetták elkészítése

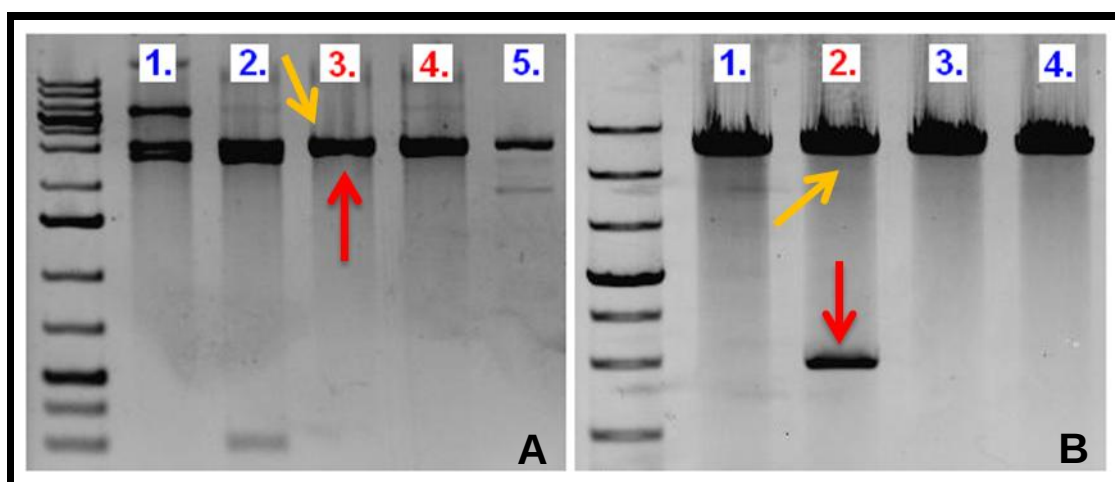
Sikeresen előállítottuk a transzformációs kazettáinkat (**5. ábra**). A *gerB* és *gerF* promótereket árpa genomból izoláltuk. A gén klónozásához UV-kezelt, az antociánoktól lila színű *Arabidopsis thaliana*-ból mRNS-t nyertünk ki, amiről a génbank alapján a gén két végre tervezett primerekkel RT-PCR reakcióban szaporítottuk fel az *uvr8* gént. A *nos* terminátorunk már pCRII-TOPO plazmidban volt amit témavezetőnk bocsájtott rendelkezésünkre.



5.ábra: GUN konstrukciónk transzformációs kazettája: RB, LB (Right-,Left Border): a beépülő génszakasz határai, nos: agrobaktérium nopalin szintáz transzkripció terminátor, hpt: hygromicin rezisztencia gén, 35S: karfiol mozaikvírus 35S promóter, ger: árpa germin promóter, uvr8: arabidopsis UV-B rezisztencia gén, ori agro: agrobaktérium plazmid replikációs origó, SpecR: spektinomycin rezisztencia gén, ori Coli: E coli plazmid replikációs origó

A konstrukciónk elemeit külön-külön ligáltuk TOPO-TA klónozó vektorba, és meghatároztuk a nukleotid sorrendjét. A megfelelő szekvenciákat a TOPO vektorból szubklónoztuk pGEM-T Easy vektorba, és ez utóbbiban állítottuk össze a génkonstrukciót. A *gerB* promótert *SacI* és *NdeI* hasítási helyek közé illesztettük be. A *gerB* 5' végéhez bevittünk primerekkel egy plusz

NotI helyet. A későbbiek során ez a hasítási hely az egész génkonstrukció kivágásához kellett. Ezt követően a *gerB* promóter mögé beépítettük az *uvr8* gént, az *NdeI* *EcoRI* helyek közé. A ligálás sikerességét *NdeI* – *EcoRI* kettős emésztéssel ellenőriztük. A gén mögé, abba az egyetlen *EcoRI* helybe szubklónoztuk a *nos* terminátort, a TOPO vektor multiklónozó helyének két oldalán lévő *EcoRI* helyeket használva hozzá. Mivel egyetlen hasító helyet használtunk a *nos* terminátor két irányban is beépülhetett. *NotI* emésztéssel igazoltuk a helyes orientációt (**6.A ábra**). Fordított irány esetén az emésztés magát a *nos* fragmentet (3' irányban található még egy *NotI* hely a pGEM-TE-ben), normál irány esetén a teljes konstrukciót egészében kivágta.

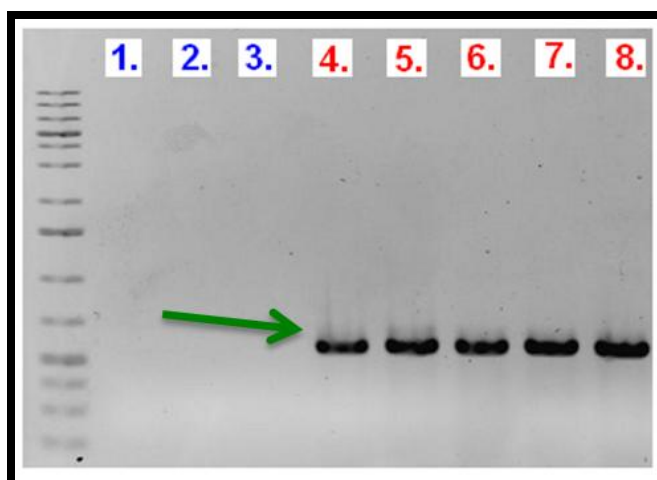


6. ábra: *NotI* emésztések eredményei.

- A)** képen felül pGEM-TE plazmid backbone (3000 bp – sárga nyíl), a 2-es mintában látható a fordított orientáció eredményeképpen kivágódott *nos* terminátor (300 bp), a 3-4 mintákban a backbone-tól jelentősen nem válik el a GUNB konstrukció (2800 bp – piros nyíl)
- B)** képen felül a Vec8 plazmid backbone (11280 bp – sárga nyíl), a 2-es mintában alul az emésztés hatására kivágódott GUNB konstrukció (2800 bp – piros nyíl) látható.

A pGEM-T Easy plazmidban elkészített konstrukciót *NotI* enzimmal kihalásítottuk és pWBVec8 bináris vektor egyetlen *NotI* helyébe építettük be. A ligálás sikerességét *NotI* emésztéssel ellenőriztük (**6.B ábra**). A GUNB(GerminUvr8Nos)Vec8 transzformációs kazettát *Agrobacterium tumefaciens* AGLI sejtekbe transzformáltuk hő és fagy sokkal. Agrobaktériumból körülményes mérhető mennyiségű plazmidot kinyerni, úgyhogy promóter gén átfedő szakaszra vonatkozó kolónia PCR módszerrel ellenőriztük, hogy tartalmazzák-e a GUNB-Vec8 vektort (530bp) (**7. ábra**) A második génkonstrukciónk elkészítéséhez a *gerB*

promótert *SacI-NdeI* emésztéssel kivágtuk a pGEM-TE plazmidból és helyére ligáltuk a *gerF* promótert, majd az így elkészült kazettával (GUNF-Vec8) agrobaktériumot transzformáltunk.



7. ábra: *Agrobacterium* kolónia PCR eredménye, a promóter/gén átfedő szakaszra tervezett primerek segítségével. A keletkező termék mérete (530 bp - zöld nyíl)

4.2 Növénytranszformálás

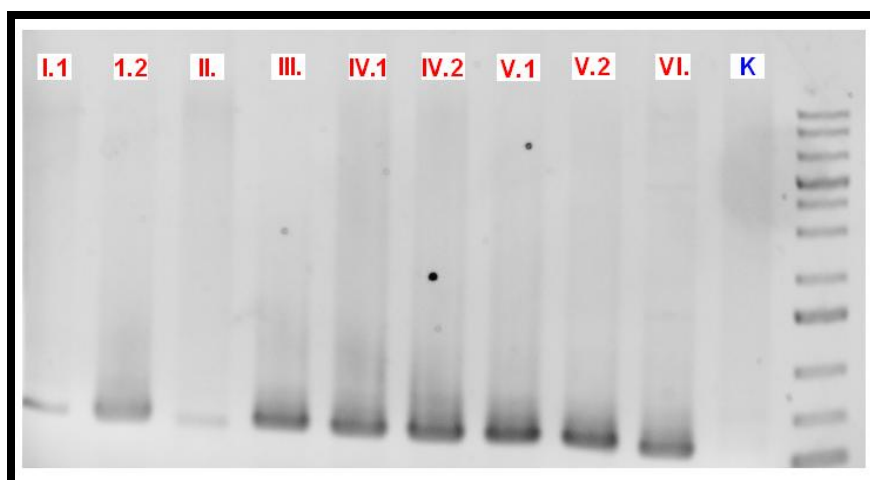
A két transzformációs kazettával 50-50 éretlen embriót transzformáltunk (kiindulási explantátum). Az első konstrukcióval (GUNB) eddig bizonyítottan hat független transzgénikus növényvonalat állítottunk elő (összesen kilenc regenerált növényből), a másodikkal (GUNF) hármát (nyolc regenerált növényből).

2. táblázat: A transzgén beépülésének igazolása, PCR módszerrel a gén promóter átfedő szakaszra készült primerekkel

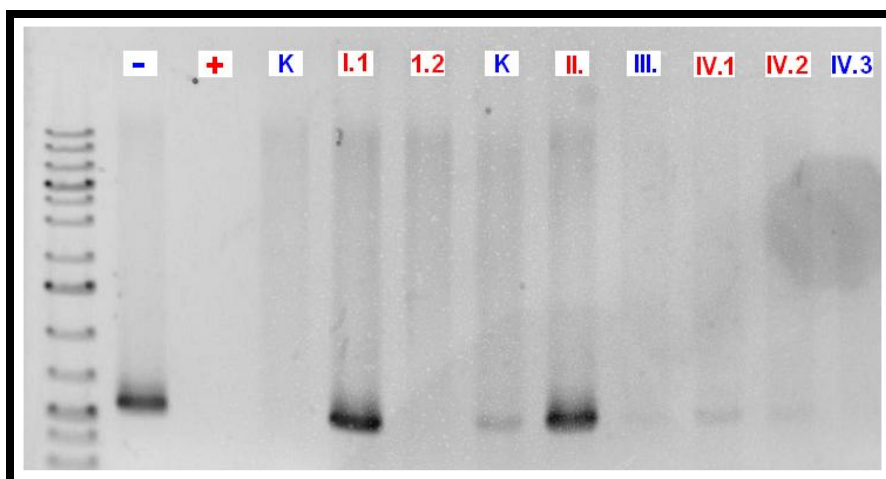
GUNB	I.1	I.2	II.	III.	IV.1	IV.2	V.1	V.2	VI.
transzgén beépülés	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GUNF	I.1	I.2	I.3	II.	III	IV.1	IV.2	IV.3	
transzgén beépülés	+	-	+	+	-	+	+	-	

Független vonalnak számít az a növény, amelyik különálló kalluszból regenerálódik, olyan is előfordult, hogy egy kalluszból több növényt is sikerült regenerálni (ezeket azonos római számmal jelöltük) (**2. táblázat**). Ezen növények jó eséllyel ugyanabból a transzformációs eseményből származnak, függetlenségüket külön (például Southern blottal) igazolni kellene. A GUNB konstrukcióval a transzformációs hatékonyság 12 %-os, a GUNF konstrukcióval 6

%-os (8. ábra, 9. ábra). Ez elfogadható transzformációs hatékonyságnak számít a szakirodalommal összevetve; Bartlett és mtsai. (2008) által elért 25% mögött, de más kutatók eredményeit elérve, meghaladva például Shrawat és mtsai. (2007): 6,7%-ot érték el. A transzgént kimutató ellenőrző PCR primerjei a promóter/gén átfedő szakaszra készültek (530bp) és genomi DNS volt a templát, amit levélből nyertük ki



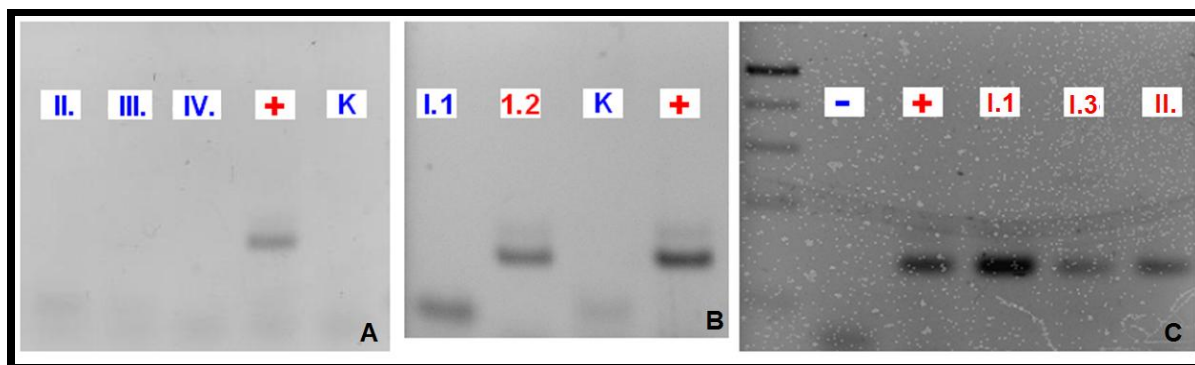
8. ábra: *GUNB* növények genomi DNS promóter/gén átfedő szakaszra specifikus PCR eredmények (530 bp). Látható, hogy az összes minta pozitív



9. ábra: *GUNF* növények genomi DNS-en történő, promóter/gén átfedő szakaszra specifikus PCR eredmények (530 bp). A pozitív vonalakat piros, a negatívakat kék szín jelzi.

Kimutattuk a transzgénről történő transzkripciót. mRNS-t nyertünk ki, majd reverz transzkripcióval cDNS-eket írtunk át. A cDNS épségét árpa alfa tubulin house-keeping génre

specifikus primerekkel ellenőriztük. Az így kapott cDNS-eket az *uvr8* gén 5' végére tervezett primerpárral PCR módszerrel ellenőriztük. GUNB II., III., IV.1 növények leveléből vett mintáknál negatív eredményt kaptunk. Ellenben a GUNB I.2 és a GUNF I.1, I.3, II növények szemterméshéjából vett minták pozitív eredményt mutattak (**10. ábra**). Ezáltal valószínűsíthetjük a promóter szemterméshéj specifikusságát, mivel ott transzgénünk átíródott, ellenben a levélben nem.

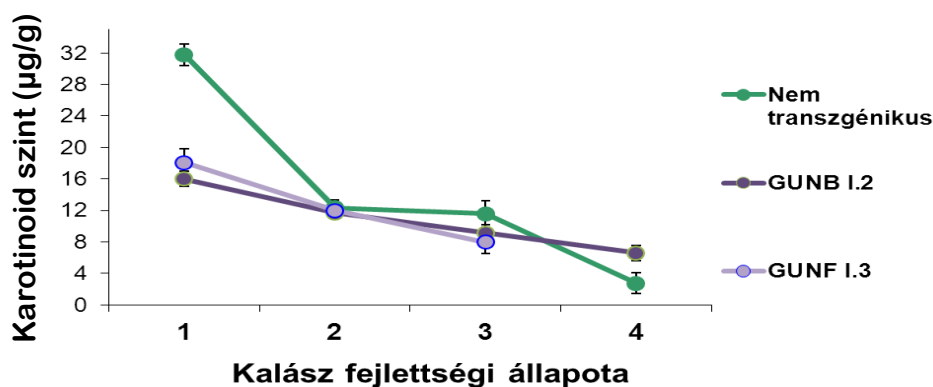


10. ábra: RT-PCR eredményei különböző növényi mintákból. A transzgén 5' végére tervezett primer párral (120 bp) **A:** GUNB levél, **B:** GUNB szemterméshéj, **C:** GUNF szemterméshéj

4.3 Antocián és karotinoid mérés

Jelenleg még csak T_0 növényeink hoztak kalászt. Karotinoid és antocinánszintet mértünk azonos fejlődési stádium lévő kontroll és transzgénikus növények szemterméshéjából. Növényenként az egyes fejlődési állapotokban 3-3 mintát mértünk, majd az eredményeket átlagoltuk. Méréseinket a GunB I.2 és GunF I.3 növényeken a virágzást követő 12, 26, 33 és 61 napon végeztük (=1,2,3 és 4 fejlettségi állapot). A vizsgálati minták a testát, az epikarpiumot és a toklást tartalmazták.

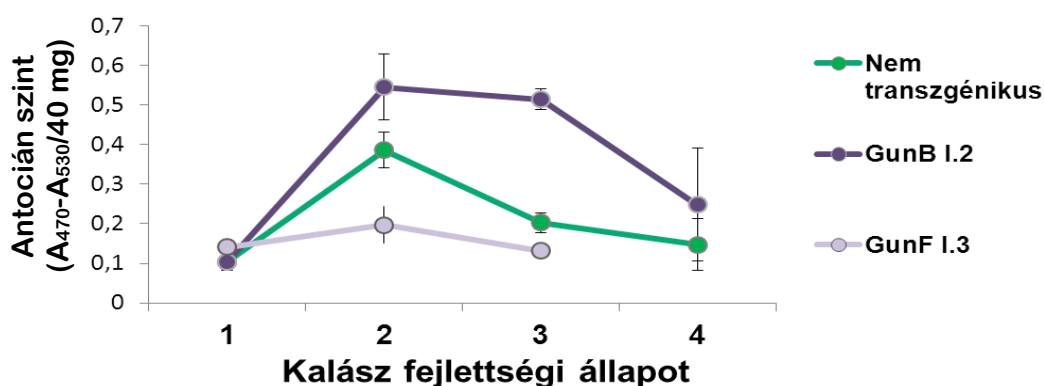
A szakirodalmi adatok alapján például Liu és mtsai, (2004) az UVR8 receptorfehérje UV-fény esetén és kisebb mértékben erős látható fény esetén is az eltűrést segítő nem csak az antociánok szintézisét fokozza, hanem más antioxidáns rendszerek, enzimek működését is felfuttatja (pl. karotinoidok, kataláz, glutation peroxidáz). Éppen ezért transzgénikus és kontroll növényeink szemterméséből karotinoid szintet mértünk. A karotinoidok szintje a kalász fejlődése során csökkent, a transzgénikus növények karotinoid tartalma – meglepő módon, a szakirodalmi adatoktól eltérően – majdnem végig a kontroll növényeké alatt maradt (**11. ábra**).



11. ábra Szemterméshéj karotinoid tartalma a kalász különböző fejlettségi állapotaiban

Egy lehetséges magyarázat, hogy a megemelkedett antociánszint esetében, alacsonyabb karotinoid mennyiség, mint antioxidáns is elegendő lehet a növénynek, bár ez ellentmond Butelli és mtsai (2004) munkájának. Ott paradicsomban ütötték ki az UVR8 represszorát, ezáltal megugrott az antocián és a karotinoid szint, emellett sötétzöldebbek lettek a levelek. Az eredmények eltérését az egyszikű és kétszikű növények között különbségek is magyarázhatják, de további vizsgálatokra is szükség lehet a megmagyarázásához. A későbbiekben antioxidáns enzimek (pl. kataláz, glutation peroxidáz) szintjének mérését is tervezzük a kontroll és transzgénikus növényekben.

Munkánk fő célja az *uvr8* gén antocián szintézisre gyakorolt hatásának kiderítése volt. Ahogy az a **12. ábrán** látható az antociánok mennyisége a virágzást követően nőtt egészen a 26. nap környékéig, majd elkezdett csökkeni. A GUNF növény antociánszintje csak az első fejlettségi állapotban haladta meg a kontroll növény szintjét, onnantól nem haladta meg a kontroll növényét, azonban a GUNB antociánszintje a második fejlettségi állapottól kezdve az érés során végig, az érett, száraz magban is magasabb volt a kontrollénál.

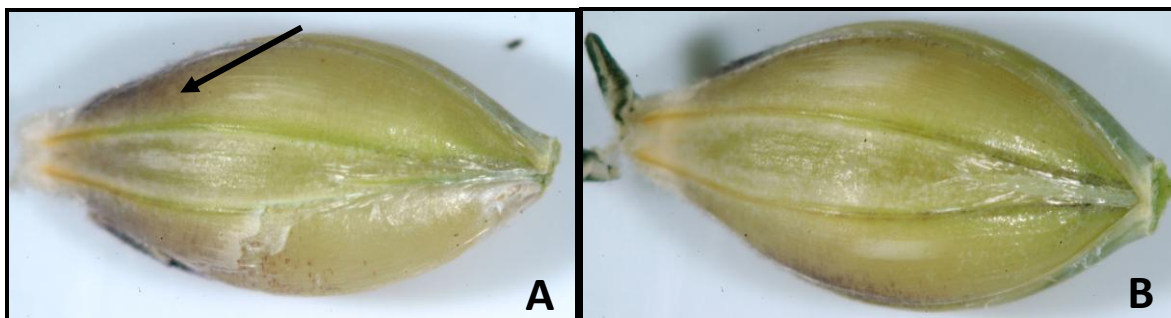


12. ábra: Szemterméshéj antocián tartalma a kalászkülönböző fejlettségi állapotaiban

Az antociánszintbeli különbség a második fejlődési állapottól kezdve szabad szemmel is érzékelhető az egyes kalászek közt (13. ábra). A szemek mintázatát vizsgálva látható, hogy egyrészt az árpára jellemző antocián csíkok vastagabbak a GUNB I. esetében a pelyvavevén, és megfigyelhető a sávok közt megjelenő antocián felhalmozás is, ami a vad típusra nem jellemző. Másrészt pigment felhalmozódás megfigyelhető a testához és az epikarpiumhoz köthetően a mag felső részén, a pelyvavevél által nem takart részeken. A különbség kevésbé látványos a szemtermés kalász tengely felé eső oldalának alsó részén, ahol nem olyan nagymértékben érhette fény a szemeket (14. ábra).



13. ábra: Transzgénikus (GUNB I.2) és nem transzgénikus árpa kalászek a virágzást követő 12-ik (A), 26-ik (B) 33-ik (C) és 61 (D) napon. Az egyes fotókon bal oldalt a transzgénikusak, jobb oldalt a kontroll kalászek vannak. Látható, hogy a transzgénikus szemeken erőteljesebbek az antocián csíkok.



14. ábra: **A.** Transzgénikus (GUNB I.2) és **B.** nem transzgénikus szemtermés összehasonlítása. A szemterméseknek a kalász tengelye felé eső része látható. A bal oldali transzgénikus szemtermésen intenzívebb lila elszíneződés figyelhető meg (nyíl).

Az antocián molekulák túlermelésére a szakirodalom szerint két fő stratégiát alkalmaznak. Korábban inkább az antociánszintézi struktúrgénjeit expresszáltatták túl (Napoli és mtsai 1990, Muir és mtsai 2001, Reddy és mtsai 2007), míg az újabb kutatásokban inkább a transzkripciós faktorokat, melyek hatékonyabbnak tűnnek. A transzkripciós faktorok több struktúrgént is szabályoznak, alkalmazásuk ezért előnyösebb lehet, mint önmagában egy struktúrgén expressziójának fokozása. Li és mtsai (2010) pl. arabidopsisből származó szabályozó gént (*pap-1*. Production of Anthocyanin Pigment) expresszáltattak repcében. Az antocianin bioszintézisben részt vevő enzimek expressziós szintjének emelkedése következtében nőtt az antociánok mennyisége, ami lilás színt eredményezett. A PAP-1 a MYB transzkripciós faktorok közé tartozik, melyek a bHLH és WD-40 fehérjékkel együtt az antocián bioszintézis szabályozásáért felelősek (Gonzalez 2008). A MYB családba tartozó DELILA és ROESAL transzkripciós faktorok expressziója paradicsom esetében is nagymértékű antocián felhalmozást okozott, a transzgénikus paradicsom sötétlila színe szárított formában is eltért a vad típustól (Butelli és mtsai 2008). Az általunk választott *uvr8* azért lehet előnyös, mert a szignalizáció első elme, így végső soron az összes alatta levő elemet szabályozza. Mód nyílnak továbbá az utóbbi években széles körben kutatott UV-B fény recepció vizsgálatára egyszikű rendszerben. Favory és munkatársai (2009) az *uvr8* gént konstitutívan expresszálták *Arabidopsis thaliana*-ban, majd az UV-B kezelést követően vizsgálták a HY5 és CHS gének (l. Bevezetés) expresszióját, valamint az antociánok mennyiségének változását a hipokotilban. 6 órás UV-B megvilágítást követően a két gén expressziója 3-4-szer volt magasabb a túlexpresszálo vonalakban a kontrollhoz (vad típus) képest. Egyes túlexpresszálo vonalakban az antociánok mennyisége UV-B kezelés nélkül is

meghaladta a kontrollét. Az UV-B kezelt túlexpresszázó vonalak pedig a kezelt kontrollhoz képest tízszeres mennyiséget tartalmaztak. Mi azonban eddig nem alkalmaztunk extra UV-kezelést, hiszen a T0 növényeink egészséges felnevelését, és maximális magprodukciójukat kívántuk biztosítani, hogy kellő mennyiségű kísérleti alanyunk legyen a jövőben. Említésre méltónak illetve ígéretesnek tartjuk, hogy $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ erősségű látható és valószínűleg nagyon alacsony intenzitású UV-B fényt kibocsájtó gyári növénynevelő kamráinkban nevelt (a szakirodalomban az UV kezelésekhez extra UV-fénycsőket építettek a fitotron kamrákba). GUNB vonalainkban 68 %-kal több antocián termelődött, mint a kontrollban. Az utódgenerációk esetében kontrollált UV-kezeléseket tervezünk, ami eddig eredményeink alapján még fokozottabb antocián termelést, s így még szembetűnőbb különbséget fog eredményezni. A szakirodalomban antociánok maghéjspecifikus termeltetésére is találtunk példát, bár kizárólag kétszikű példát, ahol ellentétben a mi munkánkkal az antocián szintézis út végső lépését módosították. Kavinich és mtsai. (2012) munkájukban szója maghépben szimultán szupresszálták szója ANTHOCYANIDIN REDUCTASE 1 és 2 (*ANR1* és *ANR2*) génjét, melyek fontos lépései a proantocianidin szintézisnek. Ennek hatására csökkent az antocianidinek redukciója, és így specifikus antocián pigmentek halmozódtak fel a maghépben, proantocianidinek helyett. Ezáltal a maghép lilább lett. Amennyiben az általunk korábban elkezdett és mostanra felépített elrendezés nem vagy kevésbé válna be, akkor céljaink eléréséhez érdemes lehet átvenni ennek a munkának a hasznos elemeit. Hosszú távon viszont mindenképpen tanulságos lehet a mi munkánkból az UVR8 vizsgálata egyszikű rendszerben, amire még nem találtunk példát a szakirodalomban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS:

A transzgénikus növények megkülönböztetése a nem transzgénikusoktól minden esetben elvárt. Egy jó látható vizuális marker segítségével, akár költséges molekuláris biológiai módszerek nélkül megakadályozható lenne, hogy a transzgénikus növények nem kívánatosan kerüljenek a termesztési- vagy fogyasztási láncba. Munkánk célja olyan transzgénikus árpa előállítás volt, amelynek szemtermése ránézésre megkülönböztethető vad típusú fajtársaiétól. Ehhez létrehoztunk két stabil transzformációra alkalmas kazettát, amelyek az árpa *germin* gén promóterei révén biztosíthatják az *Arabidopsis thaliana uvr8* gén szemterméshéj specifikus expresszióját árpában. Az *uvr8* gén az UV-B védelemben játszik szerepet, amely védelem fontos tényezője az antociánok felhalmozása. Az antocián molekulák neutrális pH-n lila vagy kék színűek, ezért alkalmazhatóak vizuális markerként. Az első konstrukciónál az árpa *germinB*, a másodikonál a *germinF* mögé építettük be az *Arabidopsis uvr8* génjét. Terminátorként mindkét esetben *nos*-t használtuk. Konstrukcióinkat agrobaktérium közvetítette transzformációval juttattuk éretlen árpaembriókba, ezekből kallusztenyészetet hoztunk létre, amelyből antibiotikumos szelekcióval növényeket regeneráltunk. Mindkét konstrukcióval több független transzgénikus vonalat állítottunk elő. A beépített transzgén, láthatólag nem okozott káros élettani folyamatokat (pl. növekedésgátlást) a növény számára, ellenben a megnövekedett antocián mennyiség segítheti a biotikus és abiotikus stressz védelmet.

RT-PCR segítségével igazoltuk a promóterek szemterméshéj specifikus expresszióját; a szemterméshéjből származó minták pozitívak lettek, ellenben a levélből származókkal. Munkánk legfontosabb eredménye, hogy az eddig csak gyári fitotron kamrában (extra UV-B megvilágítás nélküli) nevelt transzgénikus növények szemtermései is láthatóan különböznek az azonos körülmények között nevelt vad típusétól. Vizsgáltuk az antocián- és karotinoidszint változását szemterméshéjban a kalász érése során. A legmagasabb antociánszintet a virágzás után 26 nappal detektáltunk, amely azután csökkent. *GerminB* konstrukcióval transzformált növények esetében magasabb antocián mennyiségeket mértünk a kontrollhoz képest, amíg a *germinF* konstrukcióval transzformált növények esetében alacsonyabbat. Eddigi eredményeik ellentmondanak a szakirodalomban tapasztalhatóval, ahol a *germinF* promóter erősebb aktivitását mutatták ki. A karotinoidok mennyisége a szemtermés érése során folyamatosan csökkent. A kontroll növényekben a transzgénikusokénál magasabb karotinoid szint volt mérhető. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy megemelkedett antociánszint esetén, talán

alacsonyabb karotinoid mennyiség is elegendő az antioxidáns funkciók ellátásához. Munkánk során tehát sikeresen létrehoztunk olyan transzgénikus árpa növényeket, amelynek szemtermése ránézésre megkülönböztethető vad típusú fajtársaiétól. Kimutattuk, hogy még a teljesen érett fejlődési állapotban is több antocián volt a transzgénikus növények szemterméshéjában, így hossza tárolás esetén is megmaradhat a jelölő értéke. A génkonstrukciónk alkalmas lehet például ehető vakcinát termelő genetikailag módosított növények jelölésére, amelyeknél különösen fontos a költséghatékonyság, valamint a kontrollált termesztési és feldolgozási körülmény. Ezen kívül említésre méltó lehet, hogy tudomásunk szerint a miénk az első munka, ahol egyszikű háttérben vizsgálják az utóbbi években széles körben kutatott UV-B receptor működését. A továbbiakban tervezzük a transzgénikus növények további vizsgálatait: antocián- és karotinoid mennyiségi mérések folytatása, antioxidáns enzimek mérése, UV-B kezelések és ezek hatásának vizsgálata.

6. SUMMARY

As considerable public concern exists about transgenic crops, labeling of genetically engineered food is required in many countries. A well characterised visible marker could enable visual detection of transgenic plants that may replace expensive molecular biological techniques regularly used for monitoring. The aim of this project was to generate transgenic barley lines which were markedly distinct from wild type counterparts. This goal was attempted to be achieved by over-expressing *uvr8* gene that codes the receptor of UV-B light. Upon UV-B exposure, expression of genes involved in protection (e.g. anthocyanin biosynthesis) or reparation of harmful effects of UV-B light increase. Anthocyanins, non photosynthetic plant pigments are typically colourful molecules hence they are suitable as visual marker. Two transformation cassettes were assembled carrying testa or epicarp specific promoter-driven *Arabidopsis thaliana uvr8* gene. They were named GUNF (contains barley *germinF* promoter) and GUNB (contains *germinB* promoter), respectively. *Nos* was utilised as transcription terminator in both cases. For barley transformation immature barley embryos were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harbouring GUNF or GUNB. After antibiotic selection, tissue culture steps and plant regeneration several plantlets were regenerated with each construct. Many independent transgenic lines were produced with both

constructs. The presence of transgene was successfully confirmed by PCR and the transcription was also verified in the seed coat by RT-PCR. The caryopses of these plants were visually different, being more purple than wild type seeds, growing under the same visible light conditions. We examined anthocyanin and carotenoid content of seed coat in the course of spike development. Anthocyanin content of GUNB seeds has exceeded the wild type throughout caryopsis development, whilst GUNF's anthocyanin content lagged behind them. Transgenic plants contained less carotenoid than wild types. The importance of our study is given by that a construction was established suitable for labelling transgenic crops e.g. edible vaccines, those particularly require reduced cost and controlled production technologies. It also should be noted that this is the first study the widely investigated *uvr8* gene in monocot system. Further work is still in progress, such as antioxidant enzyme assays, UV-B treatment and investigation of its effect on *uvr8* containing transgenic plants.

8. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ

Zelenyánszki Helga

- A konstrukcióépítés egyes lépéseiben Sebestyénnel és témavezetőnkkel közel egyenlő arányban vettünk részt, a leírt módszerek mindegyikét alkalmaztam a munka során.
- Növénytranszformálás során izoláltam és transzformáltam árpa embriókat és részt vettem a növényregenerálási lépésekben, növényi táptalajok elkészítésében.
- Nyertem ki RNS-t, amit cDNS-é írtam át, valamint genomi DNS-t a GUNF növényekből; a mintákat PCR-el ellenőriztem.
- Részt vettem az antocián és karotinoid kinyerésekben és mérésekben, az adatok kiértékelésében.

Lukács Márk Sebestyén

- Szerepet vállaltam a konstrukció építéshez szükséges növényi anyag előkészítésében.
- Részt vettem a transzformációs kazetta elkészítésének minden lépésében, a gének izolálásától az agrobaktérium transzformációig.
- Ellenőriztem a transzformáció hatékonyságát a GUNB-s növényeken; mind DNS mind RNS szinten.
- Témavezetőmmel optimalizáltam az antocián- és karotinoid kinyerést, majd méréseket végeztem és elkészítettem a statisztikai adatokat.
- Hozzájárultam az eredmények kiértékeléséhez.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki mindenkinek, aki az ELTE TTK Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén segítette munkánkat. Név szerint tanszékvezetőnknek, prof. Dr. Szigeti Zoltánnak, csoportvezetőnknek, Dr. Tamás Lászlónak, témavezetőnknek Éva Csaba doktorjelöltnek, laboránsunknak Szabóné Gáti Zsófiának és az ötös labor többi tagjának, valamint Merényi Zsoltnak a szemtermés fotókért.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA** (2008) High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant methods* **4**: 1-12
- Bernier F, Berna A** (2001) Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 545–554
- Brown BA, Jenkins GI** (2008) UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature Arabidopsis leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology* **146**: 576–588
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Luo J, et al** (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature biotechnology* **26**: 1301–8
- Demeke T, Perry D, Scowcroft W** (2006) Adventitious presence of GMOs: scientific overview for Canadian grains. *Canadian Journal of Plant Science*. doi: 10.4141/P05-11 : 1-24
- Desikan R, Horák J, Chaban C, Mira-Rodado V, Witthöft J, Elgass K, Grefen C, Cheung M-K, Meixner AJ, Hooley R, et al** (2008) The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in Arabidopsis guard cells. *PloS one* **3**:1-15
- Eva C, Csoti I, Tamas L** (2008) Agrobacterium-mediated barley transformation. *Acta Biol Szegediensis* **52**: 49–51
- Favory J-J, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, et al** (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *The European Molecular Biology Organization Journal* **28**: 591–601
- Federico ML, Iñiguez-Luy FL, Skadsen RW, Kaeppler HF** (2006) Spatial and temporal divergence of expression in duplicated barley germin-like protein-encoding genes. *Genetics* **174**: 179–90
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, et al** (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 4803–4807
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **53**: 814–27

- Gould KS** (2004) Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2004**: 314–320
- Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual review of plant biology* **57**: 761–80
- Hails R** (2000) Genetically modified plants - the debate continues. *Trends in ecology & evolution* **15**: 14–18
- Heijde M, Ulm R** (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in plant science* **17**: 230–7
- Jordan B** (1996) The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Advances in botanical research* **22**: 97–162
- Kaiserli E, Jenkins GI** (2007) UV-B Promotes Rapid Nuclear Translocation of the Arabidopsis UV-B-Specific Signaling Component UVR8 and Activates Its Function in the Nucleus. *The Plant Cell* **19**: 2662–2673
- Kovinich N, Saleem A, Rintoul TL, Brown DCW, Arnason JT, Miki B** (2012) Coloring genetically modified soybean grains with anthocyanins by suppression of the proanthocyanidin genes ANR1 and ANR2. *Transgenic research* **21**: 757–71
- Li X, Gao M-J, Pan H-Y, Cui D-J, Gruber MY** (2010) Purple canola: Arabidopsis PAP1 increases antioxidants and phenolics in Brassica napus leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**: 1639–45
- Lichtenthaler HK** (1987) Plant Cell Membranes. *Methods in enzymology* **148**: 350 – 382
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, Van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J** (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9897–902
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos CH, Van Tunen AJ, Verhoeyen ME** (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature biotechnology* **19**: 470–4
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes. *The Plant Cell* **2**: 279–289
- Neill SO, Gould KS** (2003) Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* **30**: 865
- Oravecz A, Baumanna A, Máté Z, Brzezinskaa A, Molinierec J, Oakeleyc EJ, Ádámd É, Schäfer E, Nagy F, Ulma R** (2006) CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in Arabidopsis. *Science* **18**: 1975–1990

- Paine J a, Shipton C a, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, et al** (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature biotechnology* **23**: 482–7
- Ramessar K, Capell T, Christou P** (2008) Molecular pharming in cereal crops. *Phytochemistry Reviews* **7**: 579–592
- Reddy AM, Reddy VS, Scheffler BE, Wienand U, Reddy AR** (2007) Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metabolic engineering* **9**: 95–111
- Rizzini L, Favory J-J, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, et al** (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science (New York, NY)* **332**: 103–6
- Shrawat AK, Becker D, Lörz H** (2007) Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* **172**: 281–290
- Takeda J** (1990) Light-induced Synthesis of Anthocyanin in Carrot Cells in Suspension. *Journal of Experimental Botany* **41**: 749–755
- Walmsley a M, Arntzen CJ** (2000) Plants for delivery of edible vaccines. *Current opinion in biotechnology* **11**: 126–9
- Weigel D, Glazebrook J** (2006) Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. Cold Spring Harbor Laboratory Press doi: 10.1101/pdb.prot 4666
- Wilson S, Blaschek K, De Mejia E** (2005) Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. *Nutrition Reviews* **63**: 47–58
- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, et al** (2012) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* **8**: 1–7
- Wu S, Druka A, Horvath H, Kleinhofs A, Kannangara CG, Wettstein D von** (2000) Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 685–698
- Yonekura-Sakakibara K, Saito K** (2006) Review: Genetically modified plants for the promotion of human health. *Biotechnology letters* **28**: 1983–91
- Zhang M, Barg R, Yin M, Gueta-Dahan Y, Leikin-Frenkel A, Salts Y, Shabtai S, Ben-Hayyim G** (2005) Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**: 361–71