

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Lepidium cDNS-könyvtárral transzformált Arabidopsis növények ozmotikus toleranciájának vizsgálata

Készítette: Balogh Gergő Mihály

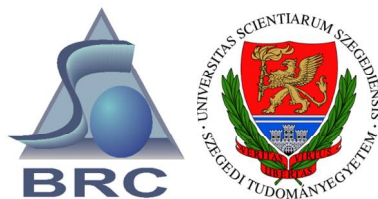
Biológia BSc, III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Szabados László

Belső konzulens: Dr. Szepesi Ágnes



2015.

Tartalom

1.	Bevezetés	1
2.	Irodalmi áttekintés	2
2.1.	Arabidopsis thaliana (lúdfű)	2
2.1.1.	Rövid története, szervezettani felépítése	2
2.1.2.	Lúdfű, mint genetikai vizsgálati objektum	2
2.2.	A növényi stressz	3
2.2.1.	A stresszről általában	3
2.2.2.	Lepidium crassifolium (sziki zsázsa)	3
2.3.	Egy indukálható rendszer elméleti háttere	4
2.3.1.	Az XVE-alapú ösztadiol indukció	4
2.3.2.	Szabályozott cDNS expressziós rendszer	5
2.4.	Klorofill fluoreszcencia használata a szűrés során	6
2.4.1.	A klorofill-a fluoreszcencia méréséről	6
2.4.2.	A jelenség háttere	7
2.4.3.	A fluoreszcencia-görbék elemzése	9
3.	Célkitűzések	12
4.	Anyagok és módszerek	13
4.1.	Vegyszerek, műszerek, enzimek és egyéb készítmények	13
4.2.	Módszerek	13
4.2.1.	Bakteriális technikák	13
4.2.2.	Növényi anyagon alkalmazott technikák	14
4.2.3.	Molekuláris biológia módszerek	15
4.2.4.	PCR technikák	16
4.2.5.	Bioinformatikai alkalmazások	17
5.	Eredmények	18
5.1.	Előzmény: a cDNS-könyvtár előállítása és a transzformált növények szelekciója	18
5.2.	A fotoszintetikus rendszerek vizsgálata Imaging PAM készülékkel	20
5.2.1.	PL142P06	20
5.2.2.	PL39P04 és PL120P04	21
5.2.3.	PL15P05	21
5.3.	A stressztoleranciáért felelős gének azonosítása	22
5.4.	A cDNS-inszertek újraklónozása 35S és RD29-promótert tartalmazó vektorokba	24
6.	Összefoglalás	28

1. Bevezetés

A Földön a fotoszintetizáló organizmusok nélkül nem jöhetett volna létre a jelenlegi ökoszisztéma. A magasabb rendű élettani folyamatokhoz elengedhetetlen az oxigén jelenléte, nélküle nem tudna még az emberiség sem létezni. Habár a fotoszintézisnek csak mellékterméke az oxigén, nem szabad elfeledkezni arról sem, hogy egyedül a növények képesek a napenergia közvetlen felhasználásával a szervetlen széndioxid és víz segítségével igen magas energiatartalmú szénhidrát molekulák előállítására. Ezen szénhidrátok egyszerű formájuk révén táplálékot nyújtanak szinte az összes alacsony illetve magasabb rendű organizmusnak, komplexebb formájuk pedig, mint például a keményítő, cellulóz, hosszabb távú energiatárolást tesz lehetővé. Az emberiség mióta elkezdte a keményítő tartalmú növények termesztését, célul tűzte ki azt is, hogy megpróbálja növelni a hozamot, kiterjeszteni a termelhetőség határait, bevonva olyan területeket is, ahol vagy túl nagy szárazság, túl hideg vagy túl sós talaj korlátozza a haszonnövények növekedését. Ehhez nem is olyan régen még csak a különböző keresztezési, nemesítési folyamatok álltak rendelkezésre, melyek időigényesek és nem várt tulajdonságok megjelenésével is jártak. A modern molekuláris növénybiológia az elmúlt csaknem 20-30 évben egy olyan mértékű fejlődésen esett át, aminek köszönhetően a megfelelő modellorganizmusok és technológiák alkalmazásával lehetőség nyílik egy adott biokémiai folyamat tanulmányozására, befolyásolására. Ezen kutatások egyik fő iránya a stresszbiológia, mely a stressz megértését, stressztűrőbb növények előállítását tűzte ki célul. A stressz a fotoszintézisre is nagy hatással van. Jelen dolgozat egy új vizsgálati módszer használhatóságát próbálja bemutatni, mely segítségével az ozmotikus stressz következtében megváltozott fotoszintetikus aktivitással kapcsolatos géneket lehet azonosítani.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Arabidopsis thaliana* (lúdfű)

2.1.1. Rövid története, szervezettani felépítése

Az *Arabidopsis thaliana* napjaink egyik leggyakrabban alkalmazott genetikai modellnövénye. Felfedezése Johannes Thal német orvos-botanikus nevéhez fűződik, aki 1577-ben írta le először a növényt *Pilosella siliquosa* néven. Linné az *Arabis* nemzetségbe sorolta. 1842-ben Gustav Heynold német botanikus javaslatára létrehozták az *Arabidopsis* (görög eredetű szó, jelentése: *Arabis*-ra emlékeztető) genust, melybe átsorolták a növényt.

A lúdfű egy, ritkán kétéves növény, kifejezett állapotban 20-25 cm magasságot érhet el. Zárvatermő, a kétszikűeken belül a keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjába tartozik. Hosszú, lándzsás levelei a növény alapi részénél törőzsában állnak, szárlevelei szórt állásúak. Levelei apró, háromágú szőrökkel borítottak. Virágai 3 mm átmérőjűek, sátorvirágzatot alkotnak. Száraz állapotban felnyíló becői 5-20 mm hosszúak, termésenként 20-30 magot tartalmaznak. Gyökérzete egyszerű felépítésű: egy függőleges elhelyezkedésű főgyökérből és több kiágazó oldalgyökérből áll.

A növény életciklusa rövid, mindössze 6-8 hét. Az apikális merisztémából kb. 1-3 hét után jön létre a virágzat. Fakultatív hosszúnappalos növény lévén reprodukív hajtásainak létrejöttéhez 14-16 órás megvilágítás az optimális, de rövidnappalon is képes virágokat hozni (viszont sokkal hosszabb idő alatt).

Egyetlen kifejezett növényen akár több száz becő is megtalálható, melyekben körülbelül 5000 darab, 0,5 mm hosszú mag van (Meinke és társai, 1998). Mészkerülő gyomtársulásokban fordul elő Európában, Dél-Amerikában, de egyes ökotípusai megfigyelhetők Kínában és Afrika egyes területein is (Koncz és Rédei, 1999).

2.1.2. Lúdfű, mint genetikai vizsgálati objektum

Biológusok és botanikusok már a XX. század eleje óta vizsgálják az *A. thalianát*. Az első rendszerezett mutánsgyűjteménye 1945-ben készült (Reinholz, 1947). Az elmúlt évtizedek során a lúdfű fontossága a növénybiológiában tovább nőtt: a genetikai, populációgenetikai, evolúciós és növényi fejlődésbiológiai kutatások fő célpontjává vált (az ecetmuslicához vagy a házi egérhez hasonló modell organizmusként használják).

Több tényezőnek is köszönhető az, hogy a lúdfű, mely alapján véve a mezőgazdaság számára értéktelen növény, ilyen fontos szerephez jutott. Először is –a növényeknél egyébként nem ritka– poliploidiaival szemben a lúdfű diploid, ami mind a géntérképezést, mind a DNS-szekvencia meghatározást sokkal egyszerűbbé teszi. Az 5 kromoszómán elhelyezkedő 157

Mb-nyi genomja a növények között az egyik legkisebb. Az Arabidopsis Genome Initiative 2000-ben fejezte be a teljes genom szekvenálását, melynek legfrissebb verziója jelenleg a TAIR-on (*The Arabidopsis Information Resource* – <http://www.arabidopsis.org>) érhető el. A lúdfű közel 27000 génnel rendelkezik, melyek 35000 fehérjét kódolnak. Az egyes ökotípusok szakaszosan ismétlődő DNS-szekvenciái jelentős különbséget mutatnak. Ez lehetővé teszi az ezen alapuló genetikai kapcsoltsági térképek elkészítését. A modellorganizmus nagy előnye, hogy *Agrobacterium tumefaciens* segítségével belőle nagyszámú T-DNS inszerciót hordozó transzgenikus vonalat lehet előállítani; továbbá rendelkezik a modellorganizmusok más általános tulajdonságaival is: rövid generációs idő (6 hét), nagyszámú mag (Meinke és társai, 1998).

2.2. A növényi stressz

2.2.1. A stresszről általában

A helyhez kötött életmód miatt, a növényeknek többféle stratégiát kell kidolgozniuk arra nézve, hogy a környezetükben bekövetkező változásokra megfelelő választ tudjanak adni. A növényeknek is hasonlóan fontos a megfelelő belső állapot megtartása, mint bármely többsejtű szervezet számára. Minden olyan külső körülmény, mely ezen homeosztatisztikus állapot felborításával jár, stresszet okoz. A stressz lényegében az élőlény számára nem megfelelő körülmények által kiváltott állapot. A stressz különböző jelátviteli utakat aktiválhat (Láng, 2007). A stressz jellegétől függően megkülönböztetünk biotikus és abiotikus stresszt. Előbbihez különböző élő szervezetek által kiváltott hatások tartoznak (baktérium, gomba, rovar, más állatok által okozott rágás), míg utóbbi lehet bármely az optimálistól eltérő környezeti faktor: meleg, hideg, túlzott mennyiségű víz, aszály, toxikus anyagok jelenléte, a talaj nem megfelelő ionösszetétele a pH megváltozása, túl nagy ozmotikus hatás (Láng, 2007). Munkánk során utóbbi tényező *Arabidopsis* növényekre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

2.2.2. *Lepidium crassifolium* (sziki zsázsa)

A különféle növények ozmotikus toleranciája élőhely típusonként eltérő. A NaHCO_3 -nak köszönhetően Na^+ ionokban erősen gazdag, magas pH-jú (10-11), kötött agyagos talajú, mezőgazdasági művelés szempontjából értéktelen szikes területek, melyek hazánk egyik speciális élőhelytípusát adják, egyedi növényflórával is rendelkeznek. Egyike a szoloncsák (a felszín közelében magas nátriumion-koncentrációjú) talajokon élő sótűrő növényeknek – az *Arabidopsis thaliana*-hoz hasonlóan szintén a keresztesvirágúak családjába tartozó – sziki zsázsa (*Lepidium crassifolium*). Az egyedek kissé pozsgásak, szürkészöldek, alacsonyak, virágzatuk terebélyes, mely fehér színű virágokat tartalmaz. (Simon és Seregélyes, 2012).

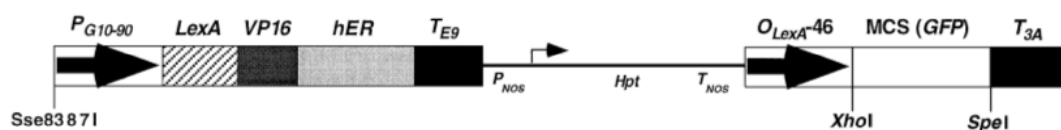
Csoportunk e növényből állított elő az elmúlt években egy teljes cDNS-könyvtárat, melyet felhasználva több mint 65000 független *Arabidopsis thaliana* transzgenikus vonalat állítottak elő, további vizsgálatok céljából.

2.3. Egy indukálható rendszer elméleti háttere

2.3.1. Az XVE-alapú ösztradiol indukció

Mind a biotechnológiában, mind molekuláris biológiai alap kutatásokban szükséges az, hogy egy gént a megfelelő időben és helyen tudjunk kifejezni. Mikrobákban ezen módszert már régóta, jó hatásfokkal alkalmazzák (pl. IPTG-indukció). Több indukálható génexpressziós rendszert előállítottak már növényekhez is, melyek általában valamilyen állati eredetű szteroid-receptoron, pl. patkány glükokortikoid receptoron (Aoyama és Chua, 1997), humán ösztrogén receptoron (Bruce és társai, 2000) vagy rovar ecdizon receptoron (Martinez és társai, 1999) alapulnak. Az így létrehozott kiméra transzaktivátorok ezután a megfelelő hormonokkal, vagy más agonista vegyülettel indukálhatóak.

Ahhoz, hogy egy indukálható expressziós rendszer megbízható legyen, több kritériumnak meg kell felelnie. Elsőként a konstrukciónak nagymértékben indukálhatónak kell lennie. A rendszernek specifikusnak kell lennie az indukálószerére, azaz csakis a jelenlétében történhet génexpresszió az általa szabályozott génről. A megbízhatóság harmadik eleme a génspecifitás, ami annyit tesz, hogy indukció esetén csak a kívánt gén vagy gének kapcsolódhatnak be, míg mások expressziós szintjeit közvetlenül nem befolyásolhatjuk a rendszerrel. Figyelembe kell venni, hogy a rendszer egyik eleme (pl. indukálószer) se hathat aspecifikusan a vizsgált élőlényre (nem avatkozhat be közvetlenül élettani folyamatokba, és katabolikus termékei sincsenek, vagy ha vannak is, azok sem toxikusak az élőlényre), csak a kifejezésre kerülő gén.



1. ábra: Az XVE vektor felépítése (Chua, 2000).

Kutatásunk során egy XVE-alapú, ösztradiollal indukálható rendszerrel dolgoztunk (Chua és társai, 2000; 1. ábra). A konstrukció három transzkripciós egységből épül fel. Az elsőben az G10-90 erős konstitutív promóter szabályozza az XVE fúziós gén kifejeződését, mely a következő elemekből áll: a LexA bakteriális represszor DNS-kötő doménjéből (DBD), a VP16 doménből (a transzkripció aktivációjáért felelős), és a humán ösztrogén receptor karboxil régiójából. A második egység nyolc példányban tartalmazza a LexA operátor

szekvenciáját, ezt pedig a 35S minimál promóter követi. A két transzkripció egység között szelekciós markergén található.

Az eredeti pER8-as (*Chua és társai, 2000; 1. ábra*) vektor higromicin rezisztenciagént tartalmazott, míg az általunk használt pTCO272 alapvektor, a nagyszámú mutáns gyors, hatékony szelekciója céljából a bar rezisztenciagént (bialaphos herbicid ellen) tartalmazza.

2.3.2. Szabályozott cDNS expressziós rendszer

A növényi genetikában széles körben elterjedt a T-DNS inszerciók használata, melyekkel különböző gének szabályozó vagy központi régióiba bejuttatott DNS-szakaszokkal vizsgálhatjuk egy-egy gén működését, funkcióvesztéses mutánsok formájában. Egy másik lehetőség a génfunkció tanulmányozására, hogy véletlenszerűen kiválasztott, vagy módosított cDNS-t juttatunk be egy másik növénybe *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzferrel. Funkcióvesztő- és nyerő fenotípusú mutánsok is megfigyelhetők az ilyen kísérletek során (*Ichikawa, 2006*). Ezen rendszerek CaMV35S (konstitutív kifejeződést biztosító) promóterrel szabályozott változatai mára széles körben elterjedtek (*LeClere és Bartel, 2001*). Csoportunkban néhány éve kezdődött egy másik módszeren alapuló rendszer használata. A kontrollált cDNS expressziós rendszer (továbbiakban COS=Controlled Overexpressing System) lényege, hogy az általunk bejuttatott gének csak megfelelő indukálószer jelenlétében fejeződnek (*Chua, 2000*). Az indukálhatóság azért is fontos, mert bizonyos gének konstitutív túltermelése különböző fiziológiai jelenségek aspecifikus megjelenésével járhat: például a stresszválaszok szabályozásában részt vevő gének folyamatos aktivációja megzavarhatja a sejtosztódást és a növényi fejlődést, steril, törpe növényeket eredményezve. (*Kasuga és társai, 1999; Gilmour és társai, 2000; Joseph és társai, 2014*). Az így bekapcsolt gének okozhatnak mind funkciónyerésen alapuló (a teljes hosszúságú cDNS overexpressziójával), mind funkcióvesztéssel járó fenotípust (töredékes vagy antiszensz cDNS-szakaszok túltermelésével a növény egyes génjei gátolhatók; *LeClere és Bartel, 2001*).

A módszerrel lehetőség nyílik más növényfajokból származó szekvenciák szabályozott kifejeztetésére és vizsgálatára pl. *Arabidopsis*-ban. Egy példa erre a *Thellungiella salsuginea* nevű halofita (sótűrő) növény, melynek teljes cDNS-könyvtárát transzformálták *Arabidopsis*-ba, ezáltal lehetőséget biztosítva sótűrésért felelős gének azonosítására (*Du és társai, 2008*). Hasonló logikát alkalmazva és hasonló céllal készült el laboratóriumunkban a *Lepidium crassifolium* cDNS-könyvtára, melyet Gateway technológiát alkalmazva, a fent leírt ösztradiol-indukálható vektorrendszerbe építettünk. A kész könyvtárat *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzferrel *Arabidopsis thaliana*-ba transzformáltuk (*Rigó, 2012*). A

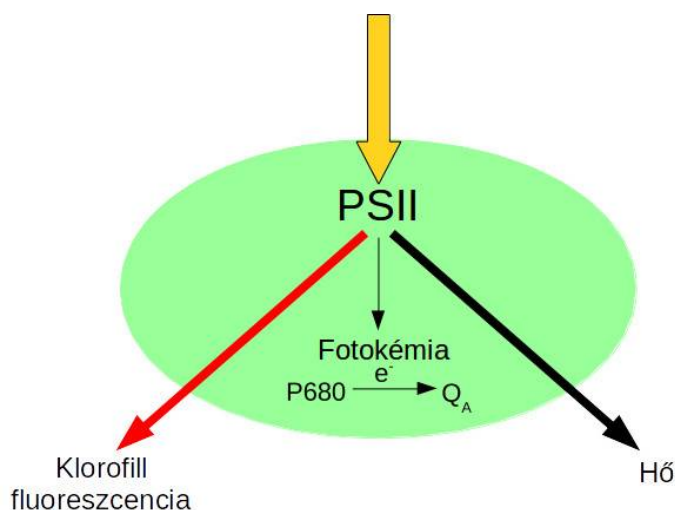
transzformáns növényeket Basta szelekciót követően felszaporítottuk, így lehetőség nyílik arra, hogy egy-egy vonalat többféle kísérleti rendszerben is megvizsgáljunk és teszteljünk.

A megfelelő kísérleti rendszerben azonosított cDNS-t, PCR reakcióval visszanyerhetjük, majd szintén a Gateway technikát alkalmazva más növényi expressziós vektorokba építhetjük. Ezen vektorok jellegüktől függően tartalmazhatnak konstitutív, vagy szerv, szövetspecifikus, illetve stressz során indukálódó promótereket is. Ezáltal a létrehozott konstrukciók nem csak az *Arabidopsis* modellnövény transzformálására használhatók, hanem egyéb növényfajokban is vizsgálhatók.

2.4. Klorofill fluoreszcencia használata a szűrés során

2.4.1. A klorofill-a fluoreszcencia méréséről

A fotoszintetikus aktivitás mérésére többféle lehetőségünk van. Mérhetjük a keletkező oxigén, valamint a felhasznált szén-dioxid koncentrációját; figyelhetjük a biomassza szárazanyag-tartalmának változását, esetleg csak a szénhidrátok mennyiségét. Emellett rendelkezésre áll az 60-as évek óta a klorofill-a fluoreszcencia vizsgálatának módszere. Kimutatható, hogy a sötétadaptált levelek megvilágítással indukált fluoreszcenciája mérhető módon korrelál a szén-dioxid megkötés mértékével (*Kautsky és Hirsch, 1960*). Ily módon a fotoszintetikus apparátus működése és hatékonysága könnyen és gyorsan, mindenféle invazív beavatkozás nélkül vizsgálhatóvá vált. A fluorometriás módszerek már önmagukban rengeteg információt szolgáltatnak a növényi fényhasznosítás állapotáról, de a vizsgálatok kiegészíthetők még a



2. ábra: A PSII klorofill pigmentjei által megkötött energia hasznosulásának három lehetséges útja.

(Baker, 2008)

gázösszetétel-változás mérésével (*Genty és társai, 1992*), valamint abszorpciós spektroszkópiával és infravörös termometriával.

A klorofill-a fluoreszcencia vizsgálatának alapja viszonylag egyszerűen megérthető. A levélben található klorofill molekulák által elnyelt fényenergia sorsa háromféle lehet: fotokémiai úton hasznosítja a növény, vagy pedig hő, illetve fluoreszcens fény formájában kisugározza (*Butler, 1978*). Ez a három energiaút egymással „verseng”, azaz azonos megvilágítás esetén, ha az egyik hatása nagyobb mértékben figyelhető meg, akkor a másik két útvonal felé kevesebb energia távozik a klorofill-molekulákról. Így a növényélettani szempontból legjelentősebb fotokémiai útvonalra jutó energiamennyiség a másik kettőből kiszámítható (2. ábra).

Bár a klorofill-a fluoreszcencia aránya a növényt ért fényhez képest viszonylag kevésnek mondható (a teljes abszorbeált fény 1-2%-a), a mérés viszonylag egyszerű. A fizikai törvényszerűségeknek megfelelően az elnyelt fényhez képest a fluoreszcencia hosszabb hullámhosszon jelenik meg. Megjegyzendő azonban, hogy a mérés során nem lehetséges a teljes kibocsátott fénymennyiség detektálása, így a módszer csak összehasonlító elemzésekben használható.

A fluoreszcencia mérésében nagy áttörést jelentett a PAM (Pulse Amplitude Modulation; modulált fényt alkalmazó) rendszerek megjelenése (*Quick és Horton, 1984*). Ezen mérőeszközökben a megvilágítást végző fényforrást egy elektronika nagy frekvenciával kapcsolja be-ki (így a felvillanás elég rövid ahhoz, hogy a növény fénybegyűjtő komplexei ne sérüljenek, de a rendszer telítődjön), míg a detektor a mérőfény által kiváltott fluoreszcencia hullámhosszára van hangolva. Ezáltal lehetővé vált nagyobb fényerejű környezetben (pl. szántóföldön) is a mérések elvégzésére.

2.4.2. A jelenség háttere

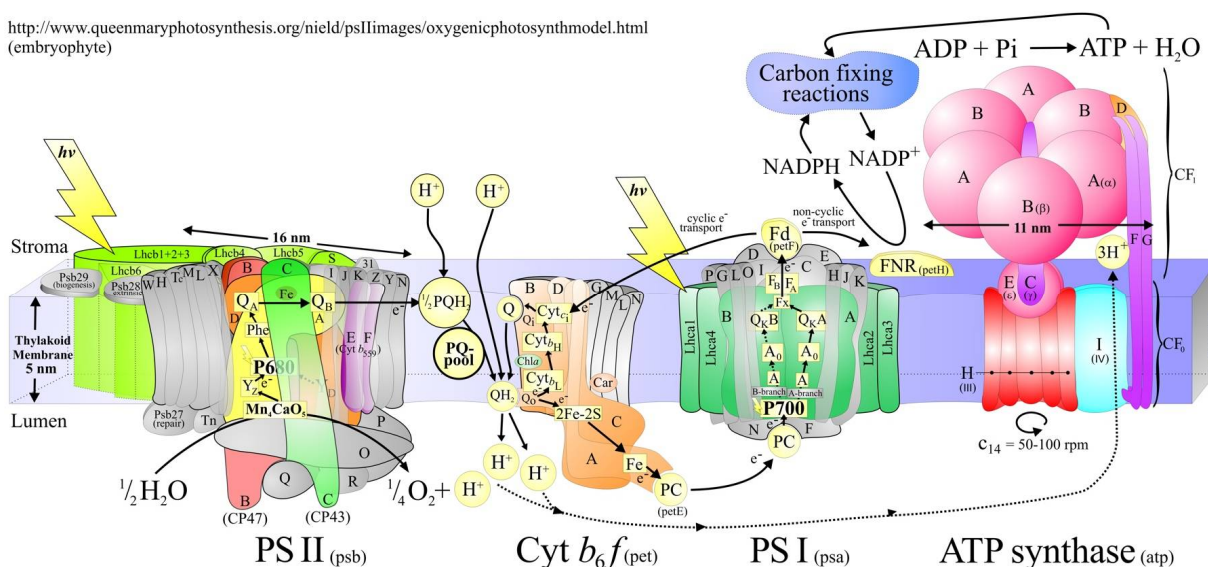
Több mint fél évszázada megfigyelték, hogy ha bármilyen fotoszintetikus aktivitással bíró mintát sötétből fénybe teszünk, 1 másodpercen belül a fluoreszcencia szintjének növekedése észlelhető (*Kautsky és társai, 1960*).

A fotoszintetikus útvonal elektronakceptor elemei, melyek az elektrontranszport-láncban a PSII után találhatók, a klorofilok által megkötött fényenergia hatására gerjesztett elektronok által redukálódnak (főként a plasztokinon és a Q_A). A Q_A redukált formája egészen addig nem képes újabb elektron fogadására, amíg nem oxidálódott. Ezt az állapotot nevezzük a Q_A zárt állapotának. Általánosságban kijelenthető, hogy minél nagyobb a zárt állapotban lévő

reakciócentrumok aránya a fotoszintetikus apparátusban, annál alacsonyabb a fotokémiai útvonalon történő energiafelhasználás, és annál inkább előtérbe kerül a fluoreszcencia (Butler, 1978), amennyiben a hőveszteséget változatlanak vesszük. Későbbiekben kimutatták, hogy a hőleadás mértéke is nagyban változhat, így a mérésekkor ezt is figyelembe kell venni (Krause és társai, 2004.)

A hirtelen megvilágítás után a növényt fényben tartva a fluoreszcencia szintje folyamatosan csökkenni fog, míg elér egy stabil állapotot. A csökkenés (fluoreszcencia-kioltás) két módon magyarázható. Fény hatására a szén-asszimilációért felelős enzimek aktiválódnak, valamint a sztómák kinyílnak. A CO₂-megkötéshez szükséges energiát a növény a fény által gerjesztett

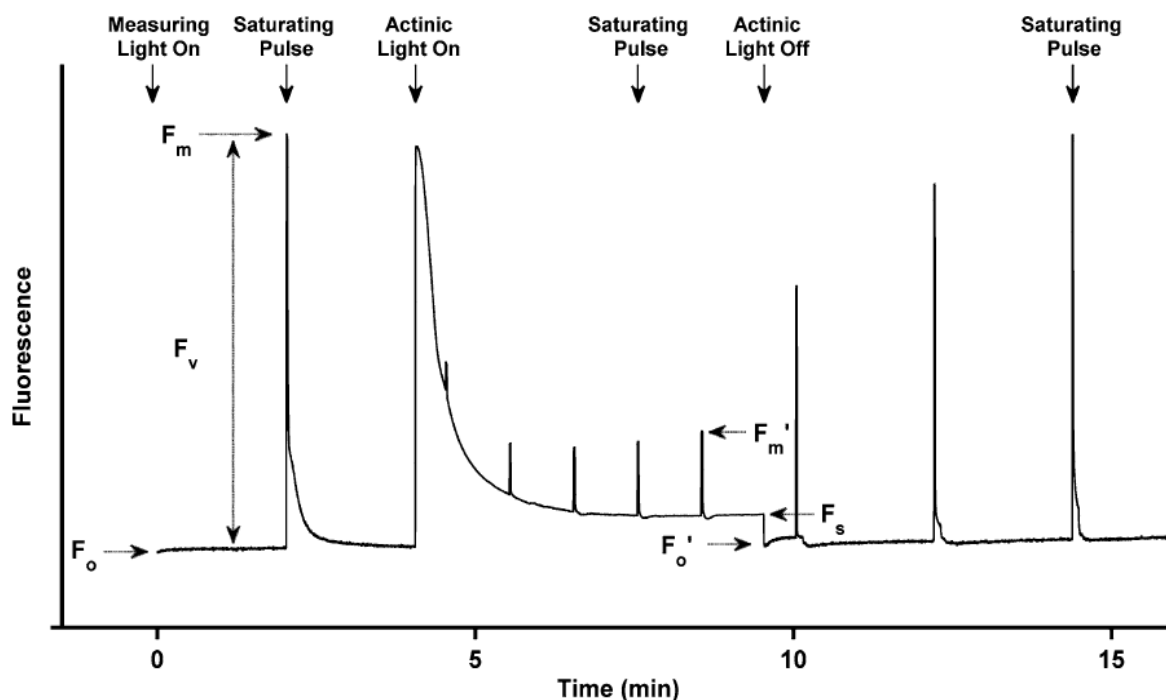
<http://www.queenmaryphotosynthesis.org/nield/psIIimages/oxygenicphotosynthmodel.html>
(embryophyte)



3. ábra: A fotoszintetikus apparátus részletes felépítése. A fluorometriás vizsgálatok szempontjából különös jelentőséggel a PSII bír; azon belül is a P680-ként jelölt klorofill-reakciócentrum és a Q_A, mely az elsődleges kinon elektronakceptor ezen a fotoszintetikus rendszeren belül. (Forrás: <http://www.queenmaryphotosynthesis.org/>)

elektronokból szerzi, melyek transzportja a fent említett 15-20 másodperc alatt megindul a PSII és PSI között. A fluoreszcencia-csökkenés ezen módját fotokémiai kioltásnak nevezzük. Fényben emellett megfigyelhető a hőleadás növekedése is, ami a nem-fotokémiai kioltás (NPQ; non-photochemical quenching) részeként észlelhető.

2.4.3. A fluoreszcencia-görbék elemzése



4. ábra: Egy tipikus PAM-görbe, mely egy vad típusú *Arabidopsis* mérésekor készült (Brooks és Niyogi, 2011).

A mérés során három különböző intenzitású fényt alkalmazunk: a gyenge mérőfényt ($<0,1 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$) a közepes intenzitású ($0-3000 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$), fotoszintetikusan aktív aktinikus fényt és a legerősebb szaturációs pulzust ($<18000 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$) (Brooks és Niyogi, 2011). Sötétadaptált levélben először az F_0 érték mérhető meg, amely a PSII klorofilltartalmának alap fluoreszcenciáját adja meg abban az esetben, ha a Q_A -centrumok mind nyitott állapotban vannak. Ennek mérésére a leggyengébb intenzitású mérőfényt alkalmazzuk, melynek a fotokémiára nézve elhanyagolható hatásai vannak. (4. ábra)

A fluoreszcencia mértéke csak akkor alkalmazható a fotoszintetikus apparátus teljesítményének mérésére, ha elkülönítjük egymástól a fotokémiai és nem fotokémiai kioltás értékeit. Ennek legcélravezetőbb módja, ha az egyik kioltást (általában a fotokémiai) kikapcsoljuk, így a fluoreszcencia mértékéből következtethetünk a nem fotokémiai kioltási folyamatok állapotára, amiből a fotokémiai jellemzők is visszafejthetők. Egyik lehetőség a fotokémiai kioltás kiiktatására a Diuron (DCMU) nevű gyomirtó vegyszer alkalmazása, mely PSII-gátlószerként nullára csökkenti a fotokémiai aktivitást. Ennél az irreverzibilis módszernél sokkal praktikusabb egy rövid ideig tartó, erős intenzitású, szaturációs pulzussal való besugárzás, mely ideiglenesen képes redukálni a PSII összes reakciócentrumát (Quick és Horton, 1984).

A fotokémiai kioltás inaktiválásával sötétadaptált levélben megkapható a maximális fluoreszcencia (F_m) értéke. Az F_m és F_0 közötti különbség a változó fluoreszcencia (F_v). Ezen értékekből megbecsülhető a csak „nyílt” reakciócentrumokat tartalmazó PSII maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m). Utóbbi érték normál körülmények között fejlődő növényekben 0,83 körüli átlagot mutat (*Björkmann és Demmig, 1987*), mely stresszhatás esetén jelentősen leeshet (*Woo és társai, 2008*).

Mint azt már Kautsky és társai is felismerték, a fotoszintetikusan aktív fénnyel való megvilágítás után a kezdeti magas fluoreszcencia érték (F'_m) fokozatosan visszaáll az aktinikus fényben megfigyelhető „steady-state” szintre (F_s). Az F'_m és F_s közötti különbséget szokás az irodalomban F'_q -nek jelölni, ami a fotokémiai kioltást jellemzi. Az F'_q/F'_m (legtöbb helyen Φ_{PSII} -ként szerepel) érték a PSII kvantumhasznosítását adja meg a szaturációs pulzus használata előtt; megmutatja, hogy a növény milyen hatékonysággal tudja fotokémiailag hasznosítani azt az intenzitású fényt, amelyhez adaptálódott a mérés során. Másképp fogalmazva a fotoszintetikusan aktív fényben működő levelek esetében ez az érték megegyezik azzal a fénymennyiséggel, melyet a PSII klorofill molekulái megkötnék és továbbadnak a fotoszintetikus transzportlánc felé, tehát egyben a lineáris elektrontranszport mértékét is jellemzi, és így ez az érték alkalmas a PSII működési hatékonyságának leírására is. Normál körülmények között a Φ_{PSII} közel egyenesen arányos a szén-dioxid asszimiláció mértékével. (*Genty és társai, 1989*). Az ettől való eltérések különböző stresszhatásokra utalhatnak (*Fryer és társai, 1998*).

Bár a mérés és a kiértékelés során csak két paramétert vettünk figyelembe a fentiek közül, mivel ezek kontrollhoz viszonyított változásai jelezhetik leginkább az ozmotikus stresszre való rezisztenciáját egy növénynek (*Woo és társai, 2008*), megemlítendő még néhány más érték, melyet a PAM-technika segítségével nyerhetünk.

Az elektrontranszport-ráta (ETR) a PSII-n átáramló elektronok mennyiségét jelzi. Kiszámítható a $J = \Phi_{PSII} \times PFDa \times 0,5$ képlettel, ahol a PFDa az abszorbeált fény mennyiségét jelenti, a 0,5-ös szorzó pedig a két fotokémiai rendszer közötti egyenlő energia-megoszlást feltételezve került az egyenletbe. (*Maxwell, 1999*)

A fotokémiai kioltás (qP) a $qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F_0)$ képlettel számolható ki. Míg a Φ_{PSII} a megkötött energia fotokémiában felhasznált részét adja meg, addig a qP-vel megbecsülhető PSII nyitott reakciócentrumainak száma. Mivel qP maximális értéke 1, így az 1-qP megadja a zárt reakciócentrumok mennyiségét.

A q_L ugyancsak a fotokémiai kioltás egyik mérőszáma, azonban míg a q_P az úgynevezett „puddle (tócsa)” modellen alapul, addig a q_L a „lake (tó)” modellen. Előbbi szerint a külön egységet alkotó PSII-k antennapigmentjei között nincs, utóbbi szerint van kapcsolat. A $q_L = (F'_q/F'_v)(F'_o/F')$ képlettel számolható ki az fotokémiai kioltás ezen mérőszáma ($0 \leq q_L \leq 1$).

Ezen paraméterek mellett megemlíthető a nem-fotokémiai kioltás is, mely az alábbi képlettel számolva megadja a xantofill-közvetített hőkisugárzás mértékét (*Bilger és Björkmann, 1990*): $NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$. Értéke nullától végtelenig változhat, általában 0,5-3,5 körüli értéket vesz fel, növényfajtól és az egyed előéletétől függően (*Maxwell, 1999*). Hasonló paraméter a q_N ($0 \leq q_N \leq 1$), melynek kiszámításához az F_0 szükséges (*van Kooten és Snel, 1990*).

3. Célkitűzések

A munkám célja egy Imaging PAM fluorometrián alapuló vizsgálati rendszer alkalmazása, mely segítségével a fotoszintetikus apparátust érő stressz mérséklésében szerepet játszó gének azonosítására nyílik lehetőség egy cDNS könyvtárból.

Az előzőleg az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport által előállított, sziki zsázsa (*Lepidium crassifolium*) cDNS könyvtárat tartalmazó ösztradiol indukálható vonalakat PAM készülék segítségével szűrtük. Ezáltal olyan cDNS-eket kívántunk azonosítani, melyek szerepet játszhatnak az ozmotikus stressz okozta fotoszintetikus károsodás csökkentésében. Hogy az inszertek funkcióit jobban megértsük, a cDNS-ek szekvenciáit összehasonlító analízisnek vetettük alá, valamint új, ösztradiol független génkonstrukciókat hoztunk létre (35S, RD29), melyeket vad típusú Arabidopsis thalianákba juttattunk be. Az így készült transzformáns vonalakat szelektáltuk és felszaporítottuk.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Vegyszerek, műszerek, enzimek és egyéb készítmények

ACCU Gene, Applied Biosystems, BD (Becton, Dickinson), Biocenter Kft., Bio-Rad, Biosan, Duchefa Biochemie, Eppendorf, Fermentas, Fluka, Greiner, Heraeus, Invitrogen, Lasergene, Lonza, Merck, Millipore, Molar, MultiTarget Pharmaceuticals, Reanal, RETSCH GMBH, Roche, Sefar GMBH, Sigma-Aldrich, Sorvall, Stratagene, ThermoFisher Scientific Inc., Whatmann, Walz GMBH.

4.2. Módszerek

4.2.1. Bakteriális technikák

Kémiai kompetens sejt transzformálása

E. coli esetében ún. „hősokk” transzformációt alkalmaztunk, *Sambrook és társai, (1989)* leírását követve. Kísérleteink során a DH5 α [F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoRnupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (rK-mK+), λ^-] (*Hanahan 1985*) törzset használtuk.

Baktériumok szaporítása

Agar tartalmú szilárd LB médiumot használtunk (*Sambrook és társai, 1989*) az *E. coli* növesztéséhez 37°C-on, a plazmidnak megfelelő antibiotikummal, melyek koncentráció a következők voltak: Kanamicin 25mg/liter, Spectinomycin 50mg/l. Folyadékkultúra esetében a fent leírt agarmentes LB médiumot használtuk a megfelelő antibiotikummal, a növekedéshez szükséges optimális hőmérsékleten 250-300 fordulat/perc (rpm) sebességgel 24 órán keresztül. Kísérleteink során a GV3101/pMP90-es *Agrobacterium* törzset használtuk, melyet 28 °C-on YEB médiumban (*Koncz és társai, 1994*) növesztettünk a plazmidnak megfelelő antibiotikum jelenlétében: Gentamicin 25mg/l, Spectinomycin 100mg/l.

Agrobacterium hátrahívás konjugáció (Cindy és mtsai, 1994)

A bináris vektort tartalmazó donor *E. coli* törzset és az ún. „helper” törzset HB101-pRK2013 (*Ditta és társai, 1980*) 37 °C-on a megfelelő antibiotikumot tartalmazó szilárd LB médiumon növesztettük 24 órán át. A fogadó (donor) *Agrobacterium* törzset GV3101/pMP90 (*Koncz és Schell, 1986*) 2 napon keresztül 28 °C-on növesztettük szilárd agart tartalmazó YEB médiumon. A donor, helper és a recipiens baktérium törzsekből egyenlő mennyiséget LB szilárd táptalajon összekevertünk, majd 28 °C-on tartottuk egy éjszakán át. Másnap kis mennyiséget szélesztettünk a bináris vektornak megfelelő antibiotikumot tartalmazó YEB

médiumra a transzformált *Agrobacterium* szelektálása céljából. A lemezeket 28 °C-on tároltuk a telepek megjelenéséig. Ezután a szélesztést még egyszer megismételtük.

4.2.2. Növényi anyagon alkalmazott technikák

Arabidopsis thaliana magvak felületi sterilizése, nevelése

A magokat 1,5 ml-es eppendorf csőben fertőtlenítettük. 4-5%-os Domestos oldatban 10-15 percig ráztuk. A maradék fertőtlenítőszert, ötször megismételt 1 ml steril vizes mosás segítségével távolítottuk el a magokról. A csírázás szinkronizálása céljából a magokat 1-2 napig 4°C-on tartottuk. Ezután a kiszélesztettük a magokat ½ (MS)AR médiumra (2,2 g/l MS salt, Duchefa Biochimie-Kat. szám: M0231, 5 g/l szacharóz, pH= 5,7-5,8; agar 8 g/l). A lemezeket termosztát szobában tartottuk az alábbi körülmények között: 55% relatív páratartalom 12 óra fény, 12 óra sötét periódus, illetve a kiültetést követően üvegházban 23 °C-on 16 órás megvilágítás alatt neveltük.

PAM kísérleti nevelési körülmények

Az *Arabidopsis* magokat a fent említett módon felületi sterilizáltuk. Négyszögletes petricsészébe ½ (MS)AR médiumot öntöttünk amennyiben a kísérleti rendszer megkövetelte, a médiumot kiegészítve 5 µM ösztadiollal (Sigma E2758). Dermedés után előre meghatározott méretre vágott steril Sefar fátyolt helyeztünk (Sefar PETEX 07-20/13) a médium felszínére, majd a magokat meghatározott sorrend szerint egyesével kiraktuk. A fentebb említett nevelési körülmények között tartottuk a petri csészéket 9-10 napig 140 µE erősségű fényben. Ezt követően, ha a médium ösztadiolt tartalmazott, a növényeket steril körülmények között az alábbi oldattal permeteztük: 10 µM ösztadiol, 0.01%-os Silwet L-77 vízben oldva. Ezután visszahelyeztük a növényeket a termosztátszobába további 1-2 napig. Négyszögletes petri csészékbe ½ (MS)AR médiumot öntöttünk, de a táptalaj szacharózt nem tartalmazott, mert az hatással lenne a fotoszintetikus apparátus működésére. Az ozmotikus stresszt 600 mM szorbitollal modelleztük, és ha szükséges volt a táptalajt 5 µM ösztadiollal is kiegészítettük. A növényeket a fátyollal együtt átraktuk az új médiumra, majd visszahelyeztük további két napra a termosztátszobába.

PAM mérés

A 2 hetes növényeket Imaging Maxi-PAM Chlorophyll Fluorimeter (Walz, Németország) készülékkel mértük. Mérés előtt a lemezeket 20 percig sötétadaptáltuk, majd a petri csészék tetejét eltávolítottuk. A készüléket az alábbiak szerint állítottuk be: aktinikus fény intenzitása: 145 µE, szaturációs pulzus intenzitása: 2000 µE. Mérési módnak a fluoreszcencia kinetikát

választottuk. Az F_m érték felvétele után 350 másodpercig 145 μE aktinikus fényen mértünk és 40 másodpercenként adtuk a szaturációs pulzusokat. Ezután a regenerációs fázis következett ahol az aktinikus fény hiányában folytattuk a mérést és ahol a szaturációs pulzusok időben egyre ritkábbak voltak a készülék beépített protokolljának megfelelően.

A mérés kiértékelésekor a teljes növényt vizsgáltuk. Vonalanként 10-20 db növényt mértünk. Az ImagingWin (Walz) szoftver által kiszámolt értékeket exportáltuk és Microsoft Office Excel 2007 programmal elemeztük tovább.

***Arabidopsis thaliana* virágzat infiltrációs transzformálása (Clough és mtsai, 1998)**

A kísérlethez üvegházban nevelt, *A. thaliana* (Col-0) virágzó növényeket használtunk. A kívánt konstrukciót hordozó *Agrobacterium*-ot a transzformációt megelőző napon oltattuk le a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó YEB médiumban és 28 °C-on ráztuk. A baktériumsejteket 20 perc 6000 rpm-mel történő szobahőmérsékletű centrifugálással gyűjtöttük össze. Ezt követően a sejteket az úgynevezett infiltrációs médiumban (5% szacharóz, 0.01% Silwet L-77) szuszpendáltuk fel úgy, hogy az $\text{OD}_{600\text{nm}}$ értéke 0.8-1 között legyen. A növények virágzatát az *Agrobacterium*-ot tartalmazó infiltrációs oldatba merítettük pár percig, majd 24 órán keresztül lefedve tároltuk. A fent leírt virág transzformáció teljes folyamatát 7-10 nap múlva megismételtük. A magokat beérésüket követően összegyűjtöttük, majd pár hetes száradás, érés után szelektáltuk.

Transzformáns *Arabidopsis* vonalak szelekciója:

A virág transzformációja után összegyűjtött és kitisztított magokból 500-500 μl -t beáztattunk 40-40 ml 100 μM gibberellin (GA_3 , Sigma) vizes oldatba. A magokat 2 napig hidegszobában vernalizáltuk, majd ezt követően, üvegházban vermiculit (10:1) keverékét tartalmazó virágfölddel teli 60X40cm szaporító ládák felszínére egyenletesen kijuttattuk. A csírázást követően a 300mg/l glufozinát-ammónium tartalmú oldattal (Finale 14SL) háromnaponta permeteztük, amíg a transzformáns növényeket egyértelműen azonosítani tudtuk. Vonalanként 24-24 rezisztens növényt egyedileg szétültettünk magfogás céljából.

4.2.3. Molekuláris biológia módszerek

Plazmid DNS tisztítása baktérium sejtéből

Plazmid DNS-t *Sambrook és mtsai (1989)* útmutatásait követve izoláltunk 3 ml egy éjszakán át nőtt *E. coli* kultúrából, amit a folyamat végén 50 μl RNáz tartalmú TE (10 mM Tris-HCl pH=8.0; 1 mM EDTA pH=8.0) oldatban oldottunk fel. Felhasználásig -20°C-on tároltuk.

DNS fragment tisztítása agaróz gélből

A PCR reakciót követően a mintákat 0,8%-os agaróz gélen ellenőriztük, ahol a különböző méretű DNS darabok elkülönülnek egymástól. A megfelelő fragmenteket gélből kivágtuk, és steril 1.5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük. A tisztítást GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific K-0692) segítségével végeztük el a kitben leírtak szerint. A tisztított DNS koncentrációját NanoDrop (ThermoFisher Scientific Inc.) készülékkel határoztuk meg.

BP/LR klonáz reakció

BP vagy LR Clonase (Invitrogen) enzim mixet használva és a gyártó útmutatásait követve végeztük el.

Növényi DNS tisztítás

Az in vitro körülmények között nevelt növényekből kb. 50-100 mg-ot lefagyasztottunk folyékony nitrogénben egy 3mm-es csapágygolyóval együtt, 1.5 ml-es Eppendorf csőben. Ezt követően a RETSCH MM301 rázó gép segítségével a mintákat porszerűvé homogenizáltuk. A DNS izolálásához az AquaGenomic (MultiTarget Pharmaceuticals) oldatot használtuk, követve a gyártó utasításait. A DNS csapadékot óvatos szárítás után 50µl TE oldatban oldottam fel, és -20°C-on tároltuk felhasználásig. Az DNS minőségét gélelektroforézissel, koncentrációját NanoDrop (ThermoFisher Scientific Inc.) készülékkel határoztuk meg.

4.2.4. PCR technikák

A beépült cDNS fragment azonosítása növényi mintán

A fentebb leírt módon izolált genomi DNS szolgált PCR templátként a következő reakcióban. A PCR reakció során a Phusion nagy másolási hűségű polimerázt (Thermo Scientific) és a pTCER8A és pTCER8B primerpárt használtuk. A kapott DNS fragmentet gélből izoláltuk a fentebb leírt módon, majd a koncentrációmérés után a p35S2 primert használva, az SZBK Szekvenáló Laboratórium segítségével meghatároztuk a nukleotid-sorrendet. Bioinformatikai alkalmazások segítségével kiértékeljük a kapott adatokat.

Kolónia PCR

Ez egy egyszerű és gyors módja annak, hogy eldöntsük, vajon a kérdéses konstrukció tartalmazza-e az általunk beklónozott DNS fragmentet. A PCR reakcióelegybe, amely tartalmazza a megfelelő primerpárt, Taq enzimet, puffert és dNTP mixet, kis mennyiségű baktériumot juttattunk, és a reakciót agaróz-gélelektroforézissel értékeljük ki.

4.2.5. Bioinformatikai alkalmazások

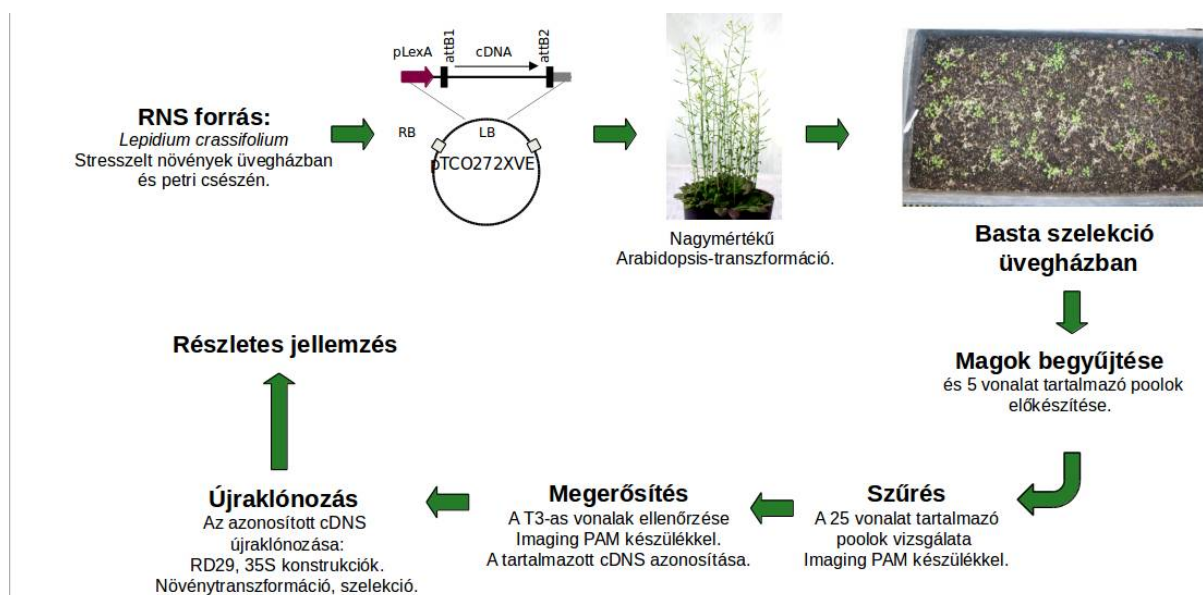
A munkánk során a következő alkalmazásokat használtuk: 1., DNS szekvencia elemzésre a Chromas lite (<http://technelysium.com.au/>), Lasergene és Vector NTI demo programcsomagokat, valamint internetes honlapokat, a 2., DNS és fehérjeszekvencia vizsgálatokhoz, irodalomgyűjtéshez: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) internetes honlapokat. 3., A Walz Imaging-PAM készülék használatához, valamint a mérésből kapott képek elemzéséhez a gyártó által fejlesztett Imaging Win 2.40b szoftvert használtam. CSV-formátumba történő exportálás után az adatokat Microsoft Excel 2007 és LibreOffice Calc 4.2 táblázatkezelő szoftverekben értékeltük ki.

A statisztikai számításokat is utóbbi irodai programcsomagok használatával végeztük el. A kétmintás kétszélű T-próba segítségével minden mérés esetében 10 vad típusú vonalat hasonlítottunk össze 20 transzgenikussal (szignifikancia-szint: 0,05).

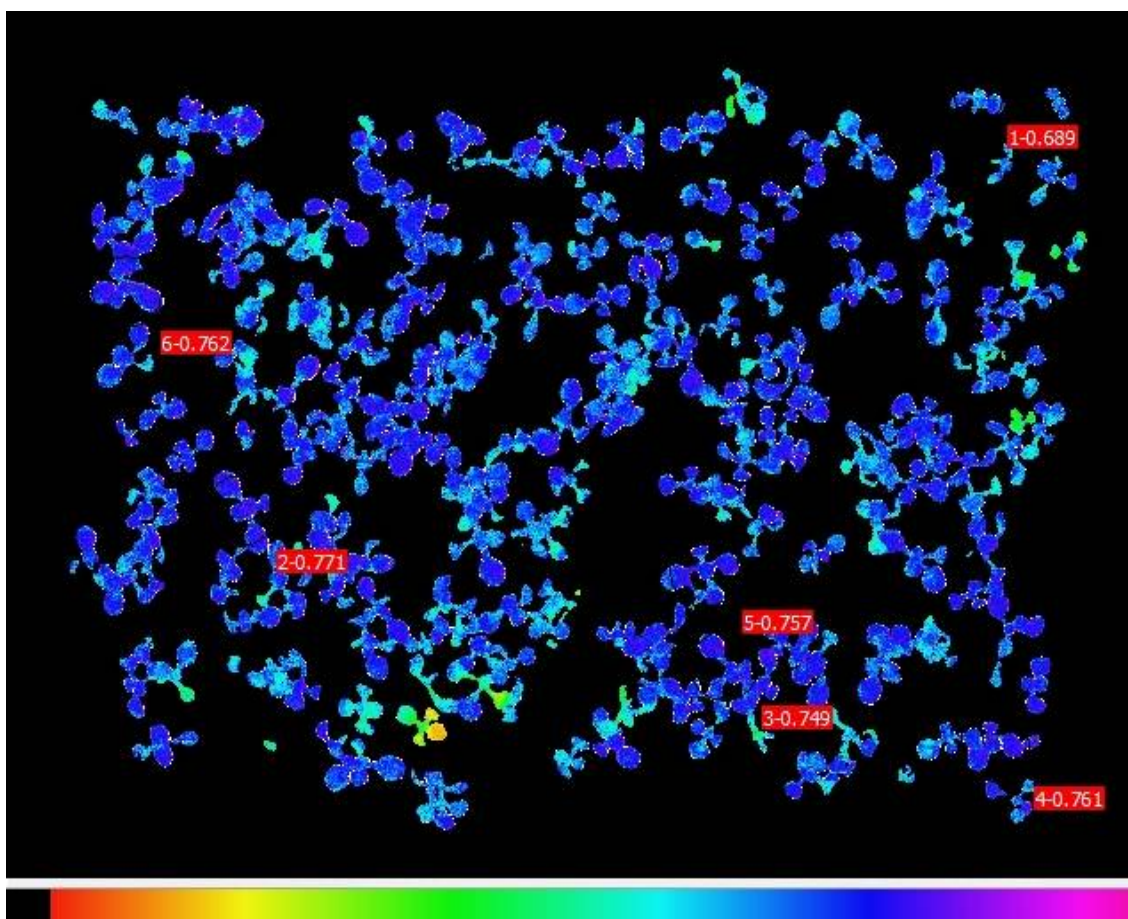
5. Eredmények

5.1. Előzmény: a cDNS-könyvtár előállítása és a transzformált növények szelekciója

Az Arabidopsis Molekuláris Genetikai csoportban az elmúlt években több folyóiratban is jelentek meg publikációk, melyek az ösztradiollal indukálható cDNS könyvtár széleskörű felhasználási lehetőségeiről szólnak (Joseph és mtsai, 2014, Pérez-Salamó és mtsai, 2014, Papdi és mtsai, 2008). Jelen dolgozatban Rigó Gábor által előállított sziki zsásza (*Lepidium crassifolium*) cDNS könyvtárral transzformált növénypopulációval dolgoztam. A könyvtár különböző típusú ozmotikus stressznek kitett növényi anyag (gyökér, levél és szár felhasználásával) készült. A könyvtár készítéséhez steril petricsészés, illetve üvegházi körülmények között nevelt növények levelét, szárát és gyökerét használtuk fel. A mintagyűjtés magas ozmotikum, só, illetve szárításos stresszkezelés után történt. Egy cDNS könyvtárat tartalmazó növénypopulációból lehetőség nyílik a különböző folyamatok befolyásolásában szerepet játszó gének izolálására. Az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoportban az elmúlt években kidolgoztak egy nagy áteresztőképességű rendszert egy cDNS könyvtárt tartalmazó növénypopuláció hatékony szűrésére, melynek főbb elemeit a következő ábra szemlélteti. A csoport munkájához a „Megerősítés” fázisában csatlakoztam (5. ábra).



5. ábra: cDNS-könyvtár alkalmazása stressztoleranciáért felelős gének azonosításában.



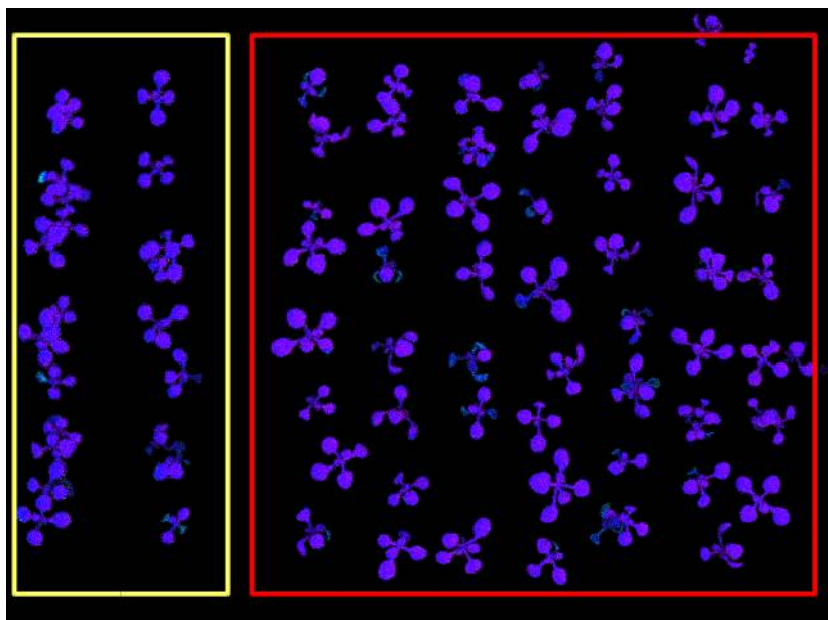
6. ábra: cDNS-inszerciót tartalmazó növények szűrése Imaging PAM technikával. A jobb felső sarokban a Columbia (vad típus), a jobb alsóban pedig a pozitív kontroll növények láthatók. Az összes többi egyed cDNS-inszerciót tartalmazó transzformáns (a képen ozmotikus stresszre nézve mind hiperszenzitív, mind toleráns egyedek is megfigyelhetők).

Munkatársaim előzőleg a cDNS könyvtárral történő transzformáció után Basta szelekcióval válogatták ki a lehetséges transzformáns vonalakat. Az ötösével felszaporított független transzformáns növényvonalakból ötöt egyenletesen összekeverve előállították a 25-ös poolt. Ez a típusú magkeverés lehetőséget ad egy adott magpopuláció többféle módon való szűrésére. Például, ha egy populációban találtak egy bizonyos stresszre jól reagáló vonalat, anélkül, hogy egy generációt várniuk kellett volna, más körülményekre is megvizsgálhatták az adott magpopulációt.

Jelen esetben az ozmotikus stressz fotoszintetikus folyamatokra való hatásainak tanulmányozását tűztük ki célul. Valkai Ildikó az elmúlt évek folyamán optimalizálta azt a kísérleti rendszert, mely segítségével a rövidtávú ozmotikus stressz hatását tudtuk vizsgálni steril kontrollált, könnyen reprodukálható körülmények között *Arabidopsis thaliana*-ban Imaging-PAM készülék segítségével. A 6. ábrán ennek a módszernek gyakorlati kivitelezése

látható, az elsődleges, 25-ös növénypopuláción bemutatva. A kísérleti rendszer úgy lett beállítva, hogy egy-egy Petri-csészén lehetőség volt 25 növény utódainak vizsgálatára.

5.2. A fotoszintetikus rendszerek vizsgálata Imaging PAM készülékkel



7. ábra: Az alábbi mérések során alkalmazott elrendezés. Bal oldalon (sárga keretben) a vad típusú Columbia, míg jobb oldalon (piros keretben) a tesztelt vonal látható.

A 4.2.2. pont alatt említett körülmények között nevelt növényeket Walz Imaging PAM készülék segítségével (a készülékhez tartozó MAXI-detektor használatával) vizsgáltam. Több független méréssorozatot is végrehajtottunk, az eredmények pontosabb kiértékelése céljából. Az utolsó méréseket teljes mértékben egyedül végeztem, a többi Valkai Ildikó saját munkája, illetve közösen végrehajtott mérések voltak. A 7. ábrán a növények elrendezése látható a kísérletek során alkalmazott lemezeken.

5.2.1. PL142P06

A kontroll $\frac{1}{2}$ AR-es és $\frac{1}{2}$ AR+ösztadiolos lemezeken se F_v/F_m , se $Y(II)$ alapján nem figyelhető meg szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbség. Szorbitolon ösztadiol hiányában a vártak megfelelően mindkét paraméter értéke jelentősen visszaesett. Ozmotikus stressz és az indukálószer együttes jelenlétében egyértelműen megjelenik a vonal toleranciája az inszertet nem tartalmazó vad típusú Columbiához képest mindkét vizsgált paraméter alapján. Az ösztadiolfüggés itt tehát jól megfigyelhető. (1. táblázat)

		Columbia		PL142P06	
		Átlag	SE	Átlag	SE
$\frac{1}{2}$ AR	Fv/Fm	0,802	0,004	0,800	0,003
	Y(II) ss 145PAR	0,313	0,010	0,283	0,007
$\frac{1}{2}$ AR +E	Fv/Fm	0,790	0,004	0,788	0,004
	Y(II) ss 145PAR	0,319	0,008	0,312	0,005
S	Fv/Fm	0,709	0,011	0,701	0,007
	Y(II) ss 145PAR	0,257	0,008	0,245	0,005
S+E	Fv/Fm	0,662	0,007	0,752*	0,010
	Y(II) ss 145PAR	0,234	0,007	0,270*	0,006

1. táblázat: A Columbia és a PL142P06 fotoszintetikus paramétereinek összehasonlítása (a sárgával kiemelt értékek esetében a t-próba szignifikáns különbséget mutatott).

5.2.2. PL39P04 és PL120P04

A PL39P04, valamint a PL120P04 vonalakat egy lemezen teszteltük le (2. táblázat). A kontroll lemezeken 1-2 századnyi eltérések voltak megfigyelhetők a Columbia és a vonalak között mind Y(II)-ben, mind F_v/F_m -ben, melyet a t-próba már szignifikáns különbségként jelzett. Szorbitolos, nem indukált körülmények között a vonal még rosszabb értékeket is mutatott, mint a vad típus, de a különbség a számítások alapján itt nem volt jelentős. Ösztradiol jelenlétében egyértelműen látszik mindkét vonal javulása mind a PSII maximális kvantumhatékonyságában, mind a kvantumhasznosításában, míg a Columbia alacsonyabb értékeket mutat.

		Columbia		PL39P04		PL120P04	
		Átlag	SE	Átlag	SE	Átlag	SE
$\frac{1}{2}$ AR	Fv/Fm	0,792	0,002	0,810	0,001	0,805	0,001
	Y(II)	0,280	0,006	0,270	0,007	0,282	0,007
$\frac{1}{2}$ AR +E	Fv/Fm	0,789	0,002	0,810	0,002	0,798	0,002
	Y(II)	0,289	0,013	0,294	0,007	0,296	0,006
S	Fv/Fm	0,710	0,012	0,694	0,008	0,693	0,007
	Y(II)	0,253	0,009	0,239	0,004	0,239	0,004
S+E	Fv/Fm	0,688	0,010	0,757	0,002	0,748	0,004
	Y(II)	0,248	0,007	0,286	0,004	0,290	0,004

2. táblázat: A Columbia, PL39P04 és PL120P04 fotoszintetikus paramétereinek összehasonlítása.

5.2.3. PL15P05

Az első mérésben az F_v/F_m értékeket tekintve ozmotikus stressz nélküli körülmények között kb. hasonló értékeket mutat mind a Columbia, mind a PL15P05 vonal. Szorbitolon a PL15P05 jelentősen jobb maximális kvantumhatékonysággal rendelkezik, mint a vad típus. Ez a

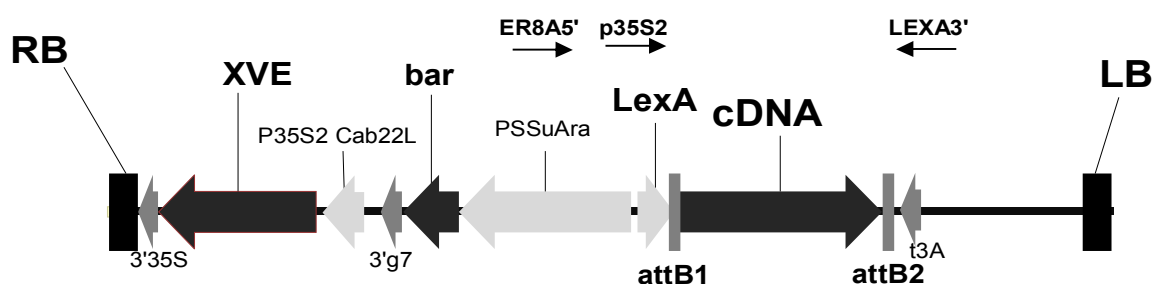
különbség ösztadiol hatására még nagyobbá válik. A Y(II) értékekben jelentős eltérés csak az ösztadiol nélküli ½ AR-nél észlelhető a Columbia javára (3. táblázat).

		Columbia		PL15P05	
		Átlag	SE	Átlag	SE
½ AR	Fv/Fm	0,803	0,003	0,804	0,008
	Y(II) ss 145PAR	0,315	0,009	0,279	0,011
½ AR +E	Fv/Fm	0,799	0,007	0,814	0,002
	Y(II) ss 145PAR	0,253	0,006	0,263	0,006
S	Fv/Fm	0,705	0,014	0,732	0,017
	Y(II) ss 145PAR	0,210	0,005	0,204	0,008
S+E	Fv/Fm	0,705	0,020	0,774	0,003
	Y(II) ss 145PAR	0,236	0,007	0,222	0,004

3. táblázat: A Columbia és a PL15P05 fotoszintetikus paramétereinek összehasonlítása.

5.3. A stressztoleranciáért felelős gének azonosítása

A fentebb említett ösztadiol indukálható rendszer minden eleme ismert, ezért megfelelő primerpárok tervezésével lehetőség nyílik arra, hogy a tartalmazott cDNS-t visszanyerjük. A stratégiát a 8. ábra szemlélteti.

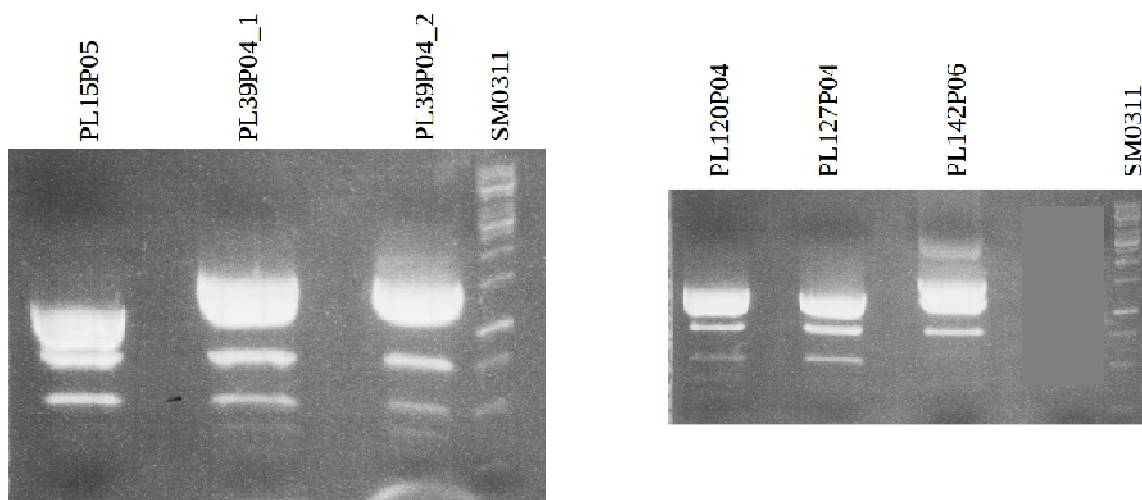


8. ábra: Az ösztadiol indukálható konstrukció sematikus rajza a felhasznált primerek feltüntetésével.

Munkánk során petri csészén felnevelt növényvonalakból genomi DNS-t izoláltunk, az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. Az 8. ábrán látható ER8A5' és a LEXA3' primerpárok segítségével az alábbi PCR reakciót hajtottunk végre, magas másolási hűségű Phusion DNS polimeráz használatával: 98 °C 1 perc; 35X [98 °C 15 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 perc], 72 °C 4 perc, 4°C ∞.

A kapott termékeket agaróz-gélelektroforézissel választottuk el (0.8% Agaróz 0.5XTBE) ismert molekulasúlyú markert használva viszonyítási alapként. A DNS fragmenteket etídium-bromid festéssel tettük láthatóvá UV megvilágítás alatt. A kapott eredmény a 9. ábrán látható.

A DNS darabot steril szikével a lehető legkisebb agaróz kockaként a gélből kivágtuk, majd az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján genomi DNS-t izoláltunk. A tisztított fragmentek koncentrációját NanoDrop készülékkel határoztuk meg. A p35S2 primert használva, az SZBK Szekvenáló Laboratórium segítségével meghatároztuk a nukleotid-sorrendet. A nukleotid szekvenciák alapján a TAIR adatbázis BLAST homológia kereső



9. ábra: A méret szerint elválasztott DNS fragmentek az SM0311 molekulalétra mellett.

szolgáltatásának segítségével azonosítottuk a géneket. Általánosságban elmondható, hogy az azonosított *Lepidium* gének 83-91% azonosságot mutattak a megfelelő *Arabidopsis* génekkel, ami a két faj közeli rokonságára utal.

Mivel a vizsgált növényvonalak egy ipari projektből származnak, az érvényes szerződés miatt a génekre vonatkozó adatokat nem közzé lehetek. Az alábbiakban így csak egy általánosabb leírást adhatok az inszertekről, melyek a 4. táblázatban láthatóak.

Vonal neve	PCR fragment mérete (kb)	Gén	<i>Arabidopsis</i> gén homológia (%)	cDNS	R/S vonal száma
PL15P05	0,7 kb	A	83	Teljes	20
PL39P04	1,1 kb	B	90*	Teljes	21 és 22
PL120P04	1,0 kb	C	94	Teljes	23
PL127P04	0,8 kb	D	89	Teljes	16
PL142P06	1,2 kb	E	91	Teljes	17
	?	F	81*	bizonytalan	18

4. táblázat: Az azonosított *Lepidium* cDNS klónok jellemzői.

Megjegyzések:

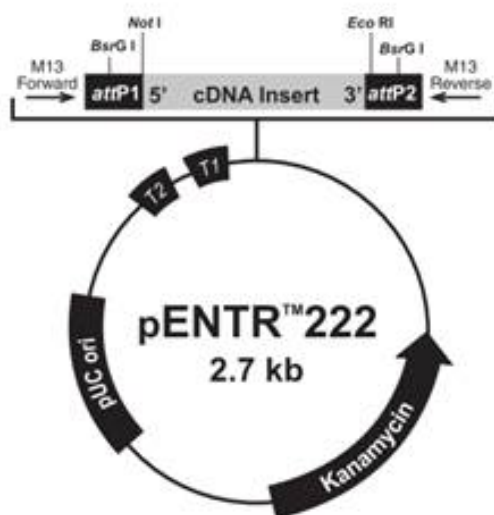
- 1) A PL15P05, PL39P04, PL120P04 és PL142P06 vonalakról a PAM-mérést én

készítettem, valamint én végeztem az újraklónozásukat 35S- és RD29-promótert alkalmazó konstrukciókba.

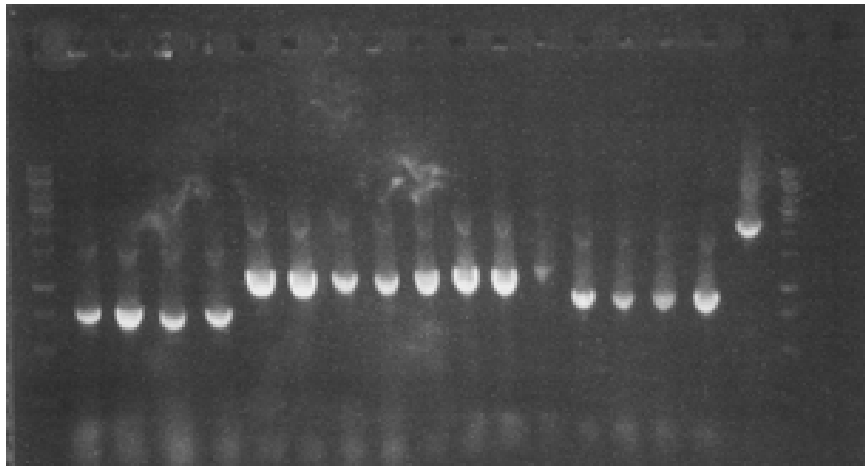
- 2) A PL39P04-ből két párhuzamos újraklónozást is végrehajtottam. Az inszert mindkét esetben ugyanaz.
- 3) A PL142P06-ban két inszert is található. Az F-jelű esetében a kapott szekvencia nem tiszta, így annak nukleotidsorrend-meghatározását meg kell ismételni.
- 4) A homológia értékei az ORF megtalálása után készített várt fehérjeszekvenciákon alapulnak, kivéve a csillaggal jelölteket, melyek esetében csak nukleotidsorrend-alapú összehasonlításokra volt lehetőség.
- 5) Az R/S az RD29, valamint 35S promótert alkalmazó konstrukcióba klónozott és azzal transzformált vonalak rövid neve.

5.4. A cDNS-inszertek újraklónozása 35S és RD29-promótert tartalmazó vektorokba

Annak érdekében, hogy az inszertek stressztoleranciában való részvételét alaposabban jellemezhessük, az ösztadiol indukálható rendszeren kívül két másik konstrukció létrehozása is a tervek között szerepelt. Ennek első lépéseként, mivel a fragmentek rendelkeztek a Gateway klónozó kazettával, a gyártó ajánlásait követve a pDONR222 vektorba juttattuk őket a BP Clonase enzim segítségével, létrehozva a megfelelő cDNS-t tartalmazó úgynevezett pENTR222 klónt (10. ábra).



10. ábra: A cDNS-t tartalmazó pENTR konstrukció sematikus ábrázolása.

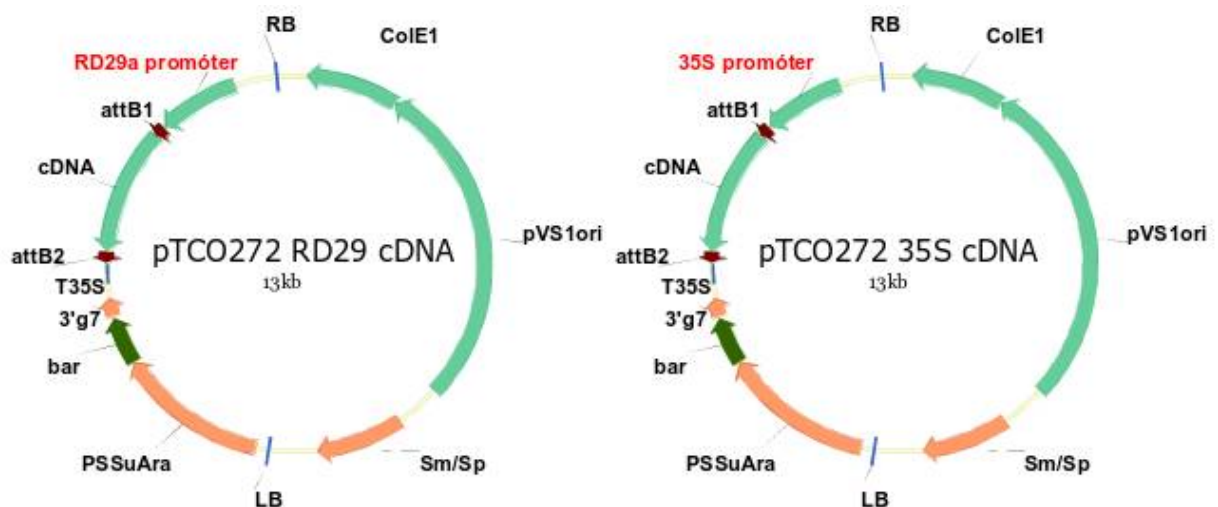


21. ábra: Balról jobbra 4-4 független kolónia PCR analízise
látható: PL15P05, PL39P04/1, PL39P04/2 valamint a PL120P06.
A legutolsó sorban az SM0311 molekula létra futott.

A BP reakciót követően a reakcióelegyet *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtbe juttattam kémiai transzformáció útján. A transzformáns baktériumokat kanamycin-tartalmú táptalajon szelektáltam.

A felnőtt telepekből konstrukciónként 4-4 telepet kolónia PCR segítségével ellenőriztem az M13REV(-26) és M13_UNIV primerpár alkalmazásával, az alábbi reakciókörülmény szerint: 95 °C 5perc, 35X [95 °C 15 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 perc], 72 °C 4 perc, 4°C ∞. A kapott PCR terméket agaróz-gélelektroforézist követően értékeltük ki, melynek eredményét a 11. ábra szemlélteti.

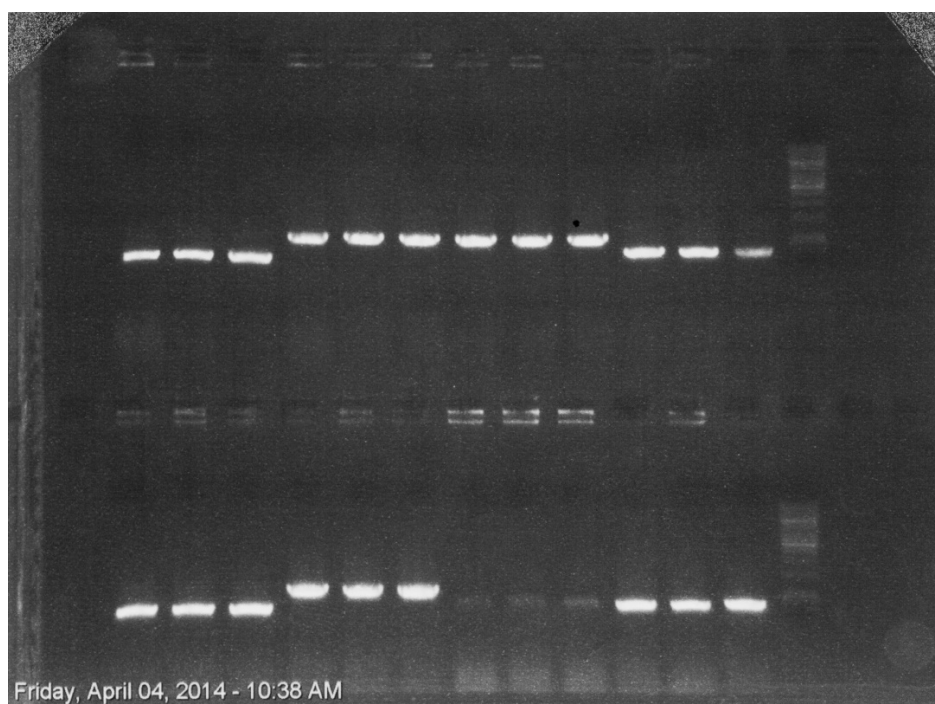
A felnőtt telepekből az Anyag és módszer részben leírtak alapján plazmidot izoláltunk, majd



12. ábra: Az RD29, illetve 35S promótert tartalmazó vektorok fizikai térképei.

szekvenáltatással ellenőriztük a nukleotidsorrendet. Ezt követően a hibátlan konstrukciókból a cDNS-inszertet a gyártó útmutatásait követve LR Clonase enzim segítségével kétféle növényi expressziós vektorba vittem át: az egyik a stressz indukálható RD29 promótert, a másik egy konstitutív expressziót biztosító 35S promótert tartalmazott. Ezután az előzővel megegyező módon transzformáltuk a plazmiddal a kompetens *E. coli* sejteket. A transzformáns baktériumokat sztreptomycinon szelektáltuk. A kész konstrukciók sematikus ábrázolása 12. ábrán látható.

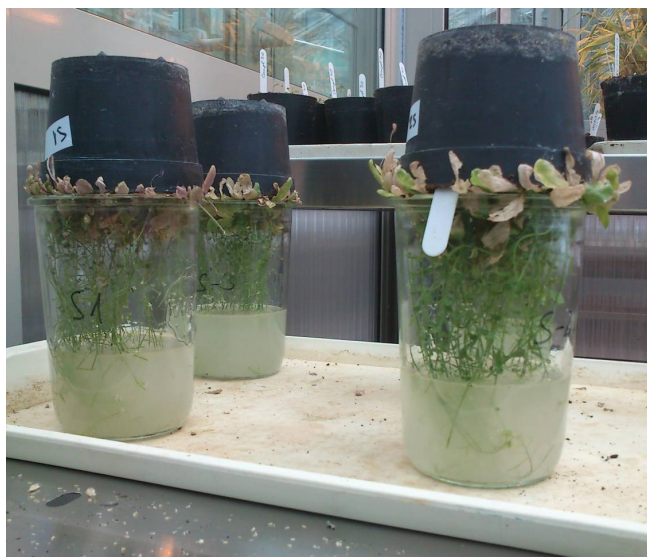
A felnőtt telepekből konstrukciónként 3-3 telepet kolónia PCR segítségével ellenőriztem, az primerpárok használatával: pTCO272_RD29-es konstrukciók: RD29B5' és a T35S3', a pTCO272_35S konstrukciók esetében 35Snew5' és T35S3' primerpárt használtam az alábbi reakciókörülmény szerint: 95 °C 5perc, 35X [95 °C 15 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 perc], 72 °C 4 perc, 4°C ∞. A kapott PCR terméket agaróz-gélelektroforézist követően értékeltük ki, melynek eredményét a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: A felső sorban az RD29 promóteres konstrukciók, míg az alsóban a 35S konstrukciók kolónia PCR képei láthatóak. Balról jobbra PL15P05, PL39P04/1, PL39P04/2 valamint a PL120 P06. A legutolsó sorban az SM0311 molekula létra futott.

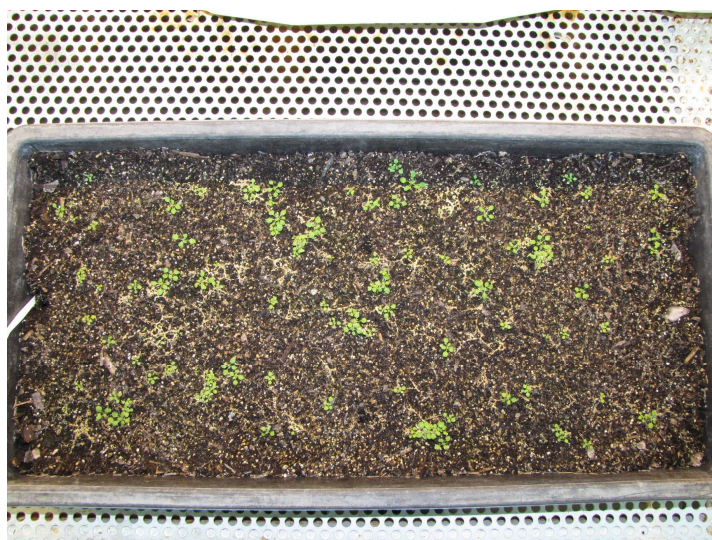
Konstrukciónként egyet-egyet szekvenáltatással ellenőriztünk a plazmidok izolálása után. A jó konstrukció kiválasztása után az Anyag és módszer részben leírtak szerint az úgynevezett *Agrobacterium* háromszülős konjugáció módszere segítségével juttattuk be a kívánt konstrukciót a Gv3101/pMP90-es *Agrobacterium* törzsbe. Az *Agrobacterium* vonalakkal vad

típusú *Arabidopsis thaliana*-virágot transzformáltunk infiltrációs technikával. A hatékonyság növelése céljából a folyamatot ugyanazokon a növényeken 10 nap elteltével megismételtük. A 14. ábrán az infiltráció gyakorlati kivitelezése látható.



*14. ábra: Az infiltrációs növénytranszformáció
gyakorlati kivitelezése.*

A transzformáción átesett növények magjait összegyűjtöttük, szaporítóládákba elvetettük, majd a csírázás után a transzformánsok kisselektálása érdekében glufozinát-ammónium tartalmú oldatot alkalmaztunk (15. ábra). Az életben maradt növények közül 24-24 növényt külön cserepekbe ültetve felneveltünk (melyek azóta magot hoztak, jelenleg ezek begyűjtése folyik).



*15. ábra: Transzformáns növények szelekciója
szaporítóládában.*

6. Összefoglalás

A növényi fotoszintetikus folyamatok érzékenyen reagálnak a külső környezeti tényezők megváltozására és különösen az abiotikus és biotikus stresszhatásokra. A kutatócsoport melynek munkájába bekapcsolódtam azt a feladatot tűzte ki célul, hogy egy ipari projekt keretében a szárazság tűrésben szerepet játszó új géneket azonosítsanak. Ehhez egy olyan cDNS könyvtárat állítottak elő, mely egy extrém szikeseken élő, a magas pH-t toleráló növény, a sziki zsázsa (*Lepidium crassifolium*) génkészletét tartalmazta. Ezt a könyvtárat *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípusú növényekben fejeztették ki egy ösztradiol által indukálható expressziós rendszer alkalmazásával.

Az előállított növényanyagot többféle módon szűrték többek között moderált ozmotikus stressz kezelést is alkalmazva. Az ozmotikus stressz növényekre gyakorolt hatását vizsgálva kidolgoztak egy klorofill-a fluoreszcencia alapú szűrési módszert mellyel több vonalat is azonosítottak. Ezek közül a vonalak közül kaptam meg néhányat (PL15P05, PL39P04, PL120P04, PL142P06, PL127P04) további vizsgálatok elvégzése céljából. Az általam végzett mérések is kimutatták, hogy az ösztradiol indukció következtében a növények fotoszintetikus paraméterei kevésbé változtak az ozmotikus kezelés hatására. Több paramétert is vizsgáltunk, de az irodalmi adatokkal összhangban csak a PSII maximális kvantumhatékonyságában (F_v/F_m) és a PSII adott aktinikus fényintenzitáson mért hatásfokában találtunk mérhető változást, mely a szűrés alapjául szolgálhatott (más paraméterek is változtak, azok azonban nem voltak alkalmasak a szűrésre). Míg a vad típusú Col-0 növények esetében 48 óra 600mM szorbitol kezelés következtében közel 15%-al csökkent a PSII maximális kvantumhatékonysága, addig a kiválasztott vonalak esetében ez csökkenés csupán 4-5% volt. Az Y(II) értékekben nem volt ilyen határozott a különbség, de a szignifikáns különbségek reprodukálhatóak voltak. A PL39P04 és a PL120P04 esetében az indukciós rendszer bizonytalansága miatt a teszteket többször is megismételtük. A leellenőrzött vonalakból sikeresen izoláltuk, azonosítottuk és újraplónoztuk a beépült *Lepidium* cDNS fragmenteket. Az adott gének részletesebb jellemzésére a létrehozott 35S illetve RD29 promóteres génkonstrukciót tartalmazó transzgenikus növények lesznek megfelelőek.