

TRANSZFORMÁCIÓVAL LÉTREHOZOTT ÁRPAFAJTÁK HIDEG- ÉS SZÁRAZSÁGTŰRÉSI STRESSZ-TOLERANCIÁJÁNAK ELŐZETES VIZSGÁLATAI

SOLTÉSZ ALEXANDRA¹, CRISTINA CROSATTI², LUIGI CATTIVELLI², BERZY
TAMÁS¹, GALIBA GÁBOR¹ ÉS VÁGÚJFALVI ATTILA¹

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

²Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország

A rizs *Osmyb4* génjének stressz-tűrésben betöltött szerepét vizsgáljuk árpa transzformációjával. Célunk a transzformáns növények megnövekedett stressz-rezisztenciájának igazolása, és végső soron stressz-toleránsabb árpafajták előállításá. Az árpa transzformációjához a gént egy indukálható promotérral bináris vektorba építettük. A transzformációt a tavaszi Golden Promise árpa genotípusból izolált éretlen embriókon végeztük el, *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével. Nyolc transzformáns növényt regeneráltunk és neveltünk fel. A sikeres transzformációt molekuláris módszerekkel bizonyítottuk. Génexpressziós vizsgálatokkal igazoltuk a transzgén működését, hideg-indukálhatóságát. A fenotipizálási vizsgálatok során a növényeken szárazság-, hideg-, és fagytesztet, valamint egy komplex stressz-tűrés vizsgálatot végeztünk el. Három olyan transzformáns vonalat találtunk, amelyekben a fotoszintézis intenzitása magasabb volt a vad típushoz képest a fagyasztást követően. Hirtelen, drasztikus szárazság stressz hatására ezeknek a vonalaknak a víztartó képessége is jobb volt. A csíra növények komplex stressz-tűrés vizsgálatá szerint ennek a három vonalnak a vigora nagyobb volt a kontrollénál stressz körülmények között, továbbá nagyobb volt a túlélési százaléku, és nagyobb hajtást képeztek.

Kulcsszavak: abiotikus stressz-tolerancia, *Myb4* gén, RWC, fagyállóság

TRANSFORMATION OF BARLEY FOR IMPROVED COLD AND DROUGHT TOLERANCE

A. SOLTÉSZ¹, C. CROSATTI², L. CATTIVELLI², T. BERZY¹, G. GALIBA¹,
A. VÁGÚJFALVI¹

¹Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár, Hungary; ²Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Fiorenzuola d'Arda, Italy

Barley plants were transformed to prove the effectiveness of the rice *Osmyb4* gene in stress tolerance. The final aim of the project is to verify the improved stress tolerance of the transformants and to develop more stress-resistant barley lines. The transgene was cloned into a binary vector with an inducible promoter, and immature embryos isolated from the barley variety Golden Promise were transformed using the *Agrobacterium*-mediated method. Eight transformant lines were regenerated; successful transformation and the expression of the transgene were confirmed by molecular methods. The transgenic plants were subjected to drought, cold and frost tolerance tests. Compared to the untransformed barley plants the photosynthetic intensity was higher in three of the transgenic lines after the frost test, and their drought tolerance proved to be enhanced as well. Moreover, these lines also showed better performance in a complex stressing vigour test (abiotic stress tolerance test).

Key words: abiotic stress tolerance, *Myb4* gene, transformation, barley

Bevezetés

A klasszikus növénynemesítési módszerek mellett a „molekuláris nemesítés” is egyre inkább teret kap napjainkban. A molekuláris biológia eszköztára lehetővé teszi, hogy célzottan, akár egyetlen gént is bejuttassunk abba a növénybe, melynek valamely tulajdonságát javítani szeretnénk. Az abiotikus stressz-tolerancia általában nem egyetlen, hanem jó néhány gén összehangolt működése eredményeként jön létre. Célszerű tehát, ha egy olyan gén transzformációjával próbáljuk meg az adott tulajdonság fokozását, mely több gén együttes működését szabályozza. Ilyen gének a transzkripciós faktorokat kódoló gének. Több sikeres kísérlet bizonyítja e módszer hatékonyságát; gazdasági szempontból fontos növényfajok, így pl. a rizs, a kukorica, vagy a búza olyan komplex stressz-toleranciáját is sikerült fokozni, mint a szárazság-, vagy éppen az alacsony hőmérsékleti stressz-tolerancia (Zhang *et al.* 2004).

Egyetlen transzkripciós faktor transzformációjával nem csak egyfajta stressz-tolerancia fokozható. A rizsből izolált *Osm4* génnel transzformált *Arabidopsis* transzgenikus növények megnövekedett szintű fagyállóságot, szárazság-, só-, UV-, és ózon toleranciát mutattak (Vannini *et al.* 2004, 2006).

Kísérletünk célja az volt, hogy árpában is igazoljuk az *Osm4* gén stressz-tűrésben betöltött szerepét, illetve munkánk végső célja az, hogy transzformációval javítsuk az árpa abiotikus, elsősorban szárazság- és alacsony hőmérsékleti stressz-toleranciáját. E munka kezdeti lépéseként létrehoztuk a transzgenikus növényeket, azok molekuláris és fenotípusos vizsgálatait megkezdtük.

Anyag és módszer

A transzformációs munkához a rizs *Osm4* génjét a pMDC99 bináris vektorba építettük. Ebben a vektorban a transzgen előtt nem található promóter, ez tette lehetővé számunkra, hogy egy általunk választott indukálható promótert építsünk be a konstrukcióba. Az *Arabidopsis thaliana*-ból izolált *Cor15a* promótert használtuk, amely különböző abiotikus stresszekre indukálódik (Baker *et al.* 1994). A transzformációt a tavaszi Golden Promise árpa genotípusból izolált éretlen embriókon végeztük el, *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével.

A fagytesztet kontrollált körülmények között, növénynevelő kamrában hajtottuk végre 3 hét edzést követően, a növények egyleveles állapotában, mind a 8 transzformáns vonalon, valamint a vad típusú Golden Promise árpagenotípuson. A fagyasztás két különböző hőmérsékleten, -10°C és -12°C-on történt, 17 órán keresztül. A levelek fagy hatására bekövetkezett károsodását a II. fotokémiai rendszer (PSII) fotokémiai kapacitásának mérésével határoztuk meg, az Fv/Fm klorofill fluoreszcencia paramétert felhasználva (Rizza *et al.* 2001). A méréseket Pulse Amplitude-Modulated fluorométerrel (PAM 200, Walz, Effeltrich, Germany) végeztük el a fagyasztás előtt, közvetlenül a fagyasztás után, és 24 ill. 48h-val a fagyasztást követően, 1h sötétadaptáció után.

A relatív víztartalom (RWC: Relative Water Content) meghatározását Schonfeld *et al.* (1988) módszere szerint végeztük el, ozmotikus stressznek kitett, és kontroll körülmények között nevelt növényeken, az 1., 5., 8. számú transzformáns vonalakon és a vad típusú Golden Promise genotípusú árpa növényeken, 6-6 növényt vizsgálva minden egyes mintavételi időpontban. Az addig feles Hoagland-oldaton nevelt növényeket a tápoldatról kiemeltük, leszárítottuk a gyökereiket papírtörülközővel, azután a növényeket 3 órán keresztül vízellátottság nélküli stressznek tettük ki, és óránként meghatároztuk a relatív víztartalmukat. Mértük a levágott levelek friss tömegét (FW), azután 24 h-ra vízbe helyeztük őket, sötétben, így megkaptuk a vízzel telített

levél tömegét (TW). 24. órás, 65°C-os szárítást követően pedig a levelek száraz tömegét (DW) mértük meg. Az adatokból az RWC értéket az alábbi képlet segítségével kaptuk meg: $RWC = (FW - DW) / (TW - DW)$. A növényeket a kísérlethez feles erősségű módosított Hoagland-oldaton (Nagy és Galiba 1995) neveltük, kontrollált körülmények között, növénynevelő kamrában (Martonvásár, Fitotron).

A komplex stressz-tűrési vizsgálatot (CSVT: Complex Stressing Vigour Test) Barla-Szabó és Dolinka (1988) módszere szerint végeztük el. A kísérlethez az 1., 5., 8. transzformáns vonalakat és a vad típusú Golden Promise árpagenotípusokat használtuk. A komplex stresszt követően megszámláltuk a normálisan, az abnormálisan és a nem kicsírázott magok számát. A normálisan csírázott növényeket két kategóriába csoportosítottuk: nagy vigorú (Nv), illetve közepes vigorú (Kv) csoportokat hozva létre (Barla-Szabó és Dolinka, 1988).

Eredmények és következtetések

A rizs *Osm4* génjével sikeresen transzformáltunk a Golden Promise tavaszi árpat. Megkezdtük a növények tesztelését, előkísérletként a vonalakon fagy-, és szárazságtesztet, valamint egy komplex stressz-tűrési vigor teszt vizsgálatot végeztünk el.

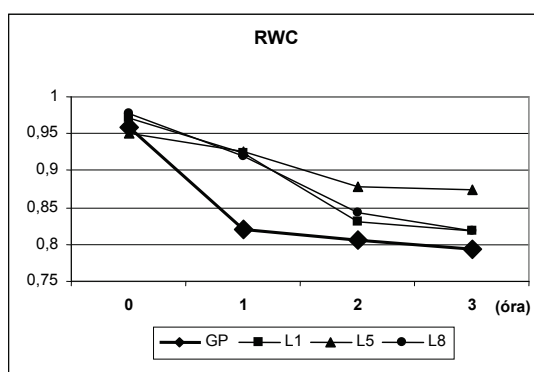
A transzformációhoz használt árpa egy fagyérzékeny, tavaszi fajta, ezért vizsgáltuk, hogy a beépült transzgén javít-e a transzformált vonalak fagy-tűrésén. A fagyasztást valamennyi transzformáns vonalon és a vad típusú árpan is elvégeztük. A különböző hőmérsékleteken elvégzett fagyteszt során a növények túlélését nem tudtuk vizsgálni, mert a fagyasztást követő néhány nap múlva valamennyi növény elpusztult. Az Fv/Fm klorofill fluoreszcencia paraméter mérésével következtetünk a vonalak faggyal szembeni toleranciájára (Rizza et al. 2001). A fagytesztet követően egy ill. 2 nappal különbséget találtunk az egyes vonalak Fv/Fm értékében. Az 5. és 8. transzformáns vonalakban a fagyasztást követő 24, ill. 48h után az Fv/Fm paraméter értéke közel akkora volt, mint a fagyasztást megelőzően, míg a többi transzformáns vonalban, és a vad típusban ez az érték lecsökkent (1. táblázat).

genotípus	SE	SU	24 h	48 h
GP	0,746	0,731	0,414	0,426
1. vonal	0,734	0,721	0,57	0,507
5. vonal	0,743	0,748	0,701	0,687
8. vonal	0,724	0,73	0,694	0,713

1. táblázat A transzgenikus vonalak és a Golden Promise (GP) Fv/Fm paraméterei a hideg-stressz előtt (SE), után (SU), illetve a fagytesztet követő első (24 h) és második (48 h) napon.

Bár az 5. és 8. vonal egyedei is elpusztultak a fagytesztet követő héten, de a fagyasztás utáni 48 órában a II. fotorendszerük még szinte zavartalanul működött. Elképzelhető, hogy az 5. és 8. transzformáns vonal magasabb fagyasztási hőmérsékleten, vagy hosszabb edzést követően nagyobb túlélést mutatna a vad típusal szemben, ezért a fagyasztási kísérleteket a paraméterek változtatásával megismételjük.

A három kiválasztott transzformáns vonalat és a vad típusú árpát hirtelen, drasztikus szárazság stressznek vetettük alá, és óránként meghatároztuk a relatív víztartalmukat. Egy órával a stressz kezdete után mindhárom transzformáns vonal relatív víztartalma nagyobb volt, mint a vad típusé, és a kísérlet során végig magasabb értéket mutattak (1. ábra), különösen az 5-ös vonal. Ebben a kísérletben valamennyi transzformáns vonal jobb szárazság-tűrésűnek bizonyult, mint a nem transzformált Golden Promise fajta. A transzformáns vonalak ozmotikus stresszre adott válaszát részletesebben fogjuk tanulmányozni olyan kísérletben, amikor az egyes tápoldatok különböző koncentrációkban polietilén-glikolt (PEG) tartalmaznak (Molnar *et al.* 2004). Abban a vizsgálatban az RWC kísérlet mellett a transzgen expressziós szintjét is meghatározzuk majd.



1. ábra Az RWC kísérlet eredménye. Az ábrán használt jelzések: GP: a vad típusú Golden Promise; L1, L5, L8: az 1., 5. és 8. transzformáns vonalak.

A komplex stressz-tűrés vizsgálat (alacsony hőmérséklet, oxigénhiányos körülmények) eredményét a 2. táblázatban foglaltuk össze.

genotípus	S (db)	Nv (%)	Csh (mm)	Kv (%)	Abn (%)	Ncs (%)	Ktrl.cs. (%)
GP	200	56	21,7	8	11	25	95
1. vonal	100	67	31,1	21	7	5	100
5. vonal	100	71	19,3	15	8	6	100
8. vonal	100	64	23,7	11	12	13	80

2. táblázat A transzgenikus vonalak (1, 5, és 8) és a Golden Promise (GP) CSVT eredménye. S: a tesztelt magvak száma; Nv: a nagy vigorú növények százalékos adata; Csh: az 5 leghosszabb csíra átlagos hossza; Kv: a kis vigorú növények százalékos adata; Abn.: abnormálisan csírázott magok százalékos adata; Ncs: a nem csírázott magok százalékos adata; Ktrl.cs.: a kontroll körülmények közötti csírázási százalék.

Mindhárom transzformáns vonal életképesebbnek bizonyult a vad típussal szemben, e vonalak esetében nagyobb csírázási százalékot tapasztaltunk a komplex stressz-kezelés mellett, mint a vad típus esetében, e növények nagyobb hajtást képeztek, nagyobb százalékuk tartozik a „nagy vigorú” kategóriába. A

statisztikai analízis elvégzéséhez a kísérletet a mintaszám növelésével megismételjük.

Az előkísérleteink biztató eredményeket mutatnak arra vonatkozóan, hogy az *Osmyb4* génnel transzformált árpavonalak - vagy legalábbis néhány transzformáns vonal - ellenállóbb az abiotikus stresszekkel szemben, mint az eredeti Golden Promise fajta. A kísérleti körülmények optimalizálásával és nagyobb mintaszám alkalmazásával kívánjuk vizsgálni, hogy valóban statisztikai különbség van-e az egyes transzformáns vonalak és a vad típus abiotikus stressztoleranciájában.

Köszönetnyilvánítás

A munka egy MTA – CNR (Olasz Tudományos Kutatási Tanács) pályázat (2007-2009) keretében folyik; köszönjük az AGRISAFE 203288 sz. EU7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatását is.

Irodalom

- Baker, S.S., Wilhelm, S.K., Thomashow, F.M. (1994): The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, **24**: 701-713.
- Barla-Szabó G., Dolinka B. (1988): Complex stressing vigour test: a new method for wheat and maize seeds. *Seed Science and Technology*, **16**: 63-73.
- Molnár I., Gáspár L., Sárvári É., Dulai S., Hoffmann B., Molnár-Láng M., Galiba G. (2004): Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, **31**: 1149-1159.
- Nagy Z., Galiba G. (1995): Drought and salt tolerance are not necessarily linked: a study on wheat varieties differing in drought resistance under consecutive water and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*, **145**: 168-174.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A.M., Cattivelli, L. (2001): Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding*, **120**: 389-396.
- Schonfeld, A., Johnson, R.C., Carver, F.B., Mornhinweg, W.D. (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, **28**: 526-531.
- Vannini, C., Iriti, M., Bracale, M., Locatelli, F., Faoro, F., Croce, P., Pirona, R., Di Maro, A., Coraggio, I., Genga, A. (2006): The ectopic expression of the rice *Osmyb4* gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69**: 26-42.
- Vannini, C., Locatelli, F., Bracale, M., Magnani, E., Marsoni, M., Osnato, M., Mattana, M., Baldoni, E., Coraggio, I. (2004): Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, **37**: 115-27.
- Zhang, J.Z., Creelman, R.A., Zhu, J.K. (2004): From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiology*, **135**: 615-21.