

Részletes zárójelentés PD-75169

Bevezetés

A stressz rezisztenciára és a fitoremediációra (talajtisztítás növényekkel) történő *in vitro* nemesítési technológiák közül a napjainkban géntechnológiát alkalmazó módszerek a leghatékonyabbak. A géntranszformáció útján létrehozott növények tulajdonságai jók, megfelelő fitoremediációs kapacitással rendelkeznek. Azonban a társadalom nagy része és a legtöbb környezetvédelemben dolgozó szakember elutasítja a genetikailag módosított növények (GM) használatát ezért alternatív módszereket is be kell vonni a növények tulajdonságainak javítására.

Fontos korlátja a remediációnak, hogy magas szennyezőanyag koncentrációnál nem alkalmazható, mert a szennyezőanyagok mennyisége a toxicitási küszöb alatt kell hogy maradjon. Ha a növények toleranciáját növeljük a szennyezőanyagokkal szemben, akkor a fitoremediációnak ezt a hátrányát mérsékelni tudjuk. Ezért a növények megnövelt stressz-toleranciája nagyobb fitoremediációs kapacitást is jelenthet.

A növények életciklusuk folyamán számos biotikus és abiotikus stresszhatásnak vannak kitéve mint pl. szárazság, hideg, légszennyezettség, nehézfém-szennyezés, herbicidek, kórokozók, stb. A legtöbb stresszfolyamat során a sejtekben reaktív oxigénformák keletkeznek, és a reaktív oxigénfajták túlsúlyba kerülve sejthalált indítanak be. Azok a növények, amelyek képesek ellenállni az oxidatív stressznek, ellenállóbbakká válnak a legtöbb biotikus és abiotikus stresszel szemben is.

A munkánk alapvető elgondolása az volt, hogy a növények oxidatív stresszel szembeni ellenállását fejlesszük, és ezáltal javítsuk az ellenállóságot olyan stresszformákkal szemben amelyek közvetve vagy közvetlenül reaktív oxigénformák felhalmozódását okozzák. Ezt a célunkat egyrészt *in vitro* szelekcióval illetve transzgénikus növények előállításával valósítottuk meg. Kutatásainkban *Arabidopsis thaliana* és nyárfá növényeket alkalmaztunk. Az elgondolásunk az volt hogy a kihasználva az *Arabidopsis thaliana* gyors növekedését és könnyű kezelhetőségét, a kísérleteket elsősorban vele végezzük el és az eredményes módszereket alkalmazzuk nyárfára. A továbbiakban növények szerint mutatjuk be az elért eredményeket.

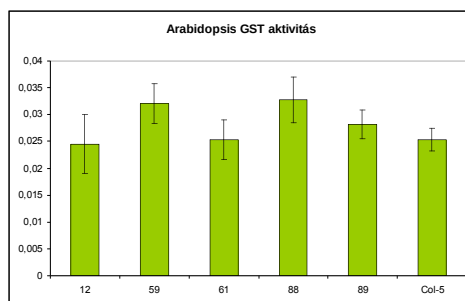
Arabidopsis thaliana növényen végzett kísérletek

Növényanyag

A kísérletekhez Columbia-0 és Columbia-5 ökotípusokat a kevesebb mennyiségű aszkorbinsavat termelő vtc mutánszt és a reaktív oxigén-formákra érzékeny *rcd1-1* mutánszt alkalmaztuk. A transzformációs munkákhoz a Columbia-5 ökotípust használtuk.

Transzformációs munkák

Első lépésben az *Arabidopsis thaliana* (Col-5) genetikai transzformációját végeztük el, amely során a kukorica *gstF4*, (glutathion S-transzferáz *phi4*, Acc. No. X79515) gén túltermeltetése volt a cél. A génszakaszt pCambia1301 bináris vektorba építettük be majd *Agrobacterium tumefaciens*-be való bejuttatást követően virágmerítéses módszerrel (floral dip) transzformáltunk. A kifejlődött magvakat higromicin tartalmú táptalajon csíráztatva szelektáltunk. A transzgén jelenlétét öröklődését és működését PCR és RT-PCR módszerekkel bizonyítottuk több generáción keresztül. Az *Arabidopsis thaliana* növényekben lemértük a glutathion S-transzferáz enzimek aktivitását CDNB (chloro-dinitro benzene) modell szubsztráttal (1. ábra). A méréseink nem mutattak különbséget az enzimaktivitások szintjei között a transzgénikus és kontroll növényekben. Azonban a további kísérleteink eredményei arra utalnak hogy a *gstF4* gén enzimterméke aktív. Ennek az lehet az oka hogy CDNB nem szubsztrátja a kukorica GSTF4 enzimjének.



1. ábra. GstF4 génnel transzformált *Arabidopsis thaliana* növényekben CDNB-model szubsztráttal mérhető glutation S-transzferáz aktivitás (Az x-tengelyen számok különböző transzgenikus vonalakat jelölik)

A transzformáns növényeket stressz-kísérleteknek vetettük alá ahol gyomirtó szereket illetve nehézfémeket alkalmaztunk. A kísérleteket három rendszerben, (i) steril körülmények között táptalajon, (ii) vízkultúrák rendszerben és (iii) cserépben földkeveréken végeztük el. A transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növények stressz-ellenállóságát a következő gyomirtószerekkel illetve nehézfémekkel szemben teszteltük: acetoklór, metolaklór, paraquat, cink, kadmium, hidrogén peroxid és NaCl.

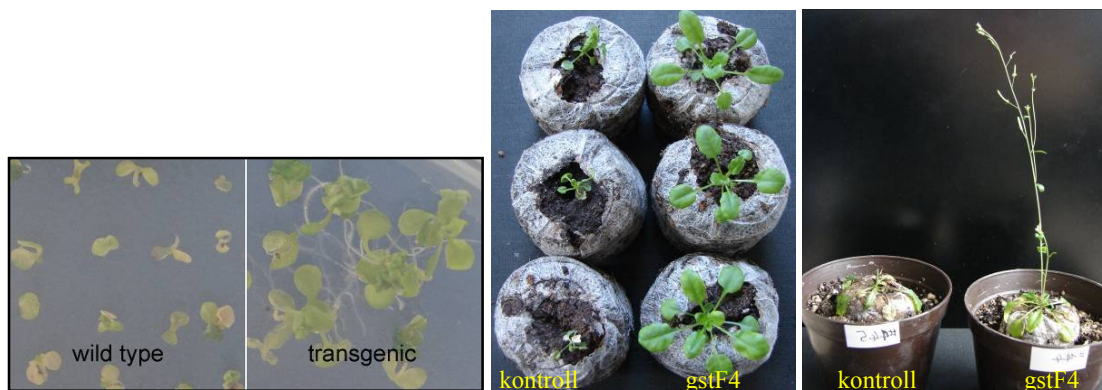
Acetoklór, metolaklór, acifluorfén és paraquat kezelések

A klóracetanilid típusú herbicideket (pl, acetoklór, metolaklór) széles körben használják gyomirtásra elsősorban kukorica és szója esetében. Régóta ismert, hogy a magasabbrendű növényekben e gyomirtószerek detoxifikálása glutationnal vagy homoglutationnal való konjugáció útján valósul meg amely reakciót a glutation S-transzferáz enzimek végzik. Acetoklór kezelést alkalmaztunk transzgenikus és kontroll *Arabidopsis* növényeken táptalajon, cserépben és vízkultúrában. Érdekes módon kizárólag vízkultúrák körülmények között sikerült kimutatnunk a transzgenikus növények stressz toleranciáját (2. ábra)



2. ábra. Vízkultúrák rendszerben nevelt kontroll és transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növények 10mM acetoklórral kezelve. A növényeket öt hetes korukban kezeltük. A fotók nyolc nappal a kezelés után készültek. Az acetoklór hatására a kontroll növények levelei kevésbé fejlődtek (balra). A transzgenikus növények gyökerei az acetoklór tartalmú tápoldatban is jól fejlődtek míg a kontroll növények gyökernövekedése visszamaradt (jobbra)

Metolaklórral történő kezelés során jelentős különbséget tapasztaltunk transzgenikus és kontroll növények között (3. ábra). A 200 μ M metolaklórt tartalmazó táptalajon steril körülmények között csíráztatott kontroll csíranövények nem növesztettek gyökeret és a fejlődésük a sziklevelek kifejlődése után megállt. Ezzel szemben a transzgenikus csíranövények növekedése teljesen normális módon ment végbe. Egy további kísérletben tőzegkockában (Jiffy) nevelt 4 és 6 hetes növényeket kezeltünk metolaklór (200mM) oldattal. A transzgen hatása itt is szembetűnő volt ugyanis a kontroll növények fejlődése a kezelést követően megállt míg a transzgenikus növények normális módon növekedtek tovább.



3. ábra Kontroll és transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növények kezelése metolaklórral táptalajon (balra), Jiffy tűzegkockában (középen) és cserépben (jobbra)

Az acifluorfen kezelést ($0,06 \mu\text{M}$) táptalajon steril körülmények között alkalmaztuk. A különbség ebben az esetben a túlélő növények számában volt mérhető. Amíg a csírázást követően a kontroll növények 100 %-a elpusztult addig a transzgénikus növények közül 20 % gyengén ugyan de tovább fejlődött.

A transzgénikus növényeinket paraquat tartalmú táptalajon csíráztattuk. Ebbe a kísérletbe bevontuk a csökkent aszkorbinsavat termelő vtc mutáns is. Arra voltunk kíváncsiak vajon a megemelt GST aktivitásnak illetve az aszkorbinsavnak van-e közvetlen hatása a paraquat növényekre gyakorolt hatásának kivédésében. A táptalajba többféle koncentrációban adagoltuk a gyomirtószert de fejlődésbeli különbség a transzgénikus és kontroll növények között nem volt látható. Tehát valószínűsíthető hogy sem a GSTF4 enzim sem az aszkorbinsav nem vesz részt a paraquat detoxifikálásában.

Cink és kadmium kezelés

A cink a talajokban ritkán fordul elő toxikus mennyiségben sokkal jelentősebb problémát jelent a növény alacsony cink tartalma. A legtöbb mezőgazdasági talajban a cink együtt fordul elő a kadmiummal ami viszont egyértelműen toxikus elem viszont hasonlóan metabolikus úton jut be a növénybe. Ezért a stressz rezisztencián kívül arra is kíváncsiak voltunk hogy hogyan reagálnak a növények a kadmium és cink szimultán kezelésére. A kísérlet során cserépben nevelt 3 hetes növényeket kezeltünk cink-szulfáttal és kadmium szulfáttal. A kezelést követő második héten atom-emissziós módszerrel lemértük a növények föld fölötti részében a Zn, Cd, Fe és Ca tartalmat (1. táblázat).

1. táblázat Kezeletlen, illetve cinkkel ($300 \mu\text{M}$) és kadmiummal ($50 \mu\text{M}$) kezelt *Arabidopsis thaliana* növények (Col-0) elemtartalma (átlag $\pm$ standard hiba)

	Zn mg/kg	Cd mg/kg	Fe mg/kg	Ca száraztömeg %
kezeletlen	$114,33 \pm 5,78$	$6,76 \pm 0,93$	$305,33 \pm 45,24$	$3,25 \pm 0,09$
Zn+Cd+	$89,80 \pm 2,92$	$54,33 \pm 9,05$	$114,83 \pm 18,7$	$3,25 \pm 0,04$

A kezelés hatására a növények föld fölötti részében a cink tartalom kissé lecsökkent, míg a kadmium jelentősen megnövekedett. Ezek alapján megállapítható hogy a cinkkel és kadmiummal szennyezett talajokból a kadmium eltávolítható anélkül hogy a talajok cink-tartalma csökkenne.

A továbbiakban megvizsgáltuk a cink és kadmium gstF4 transzgénikus növényekre gyakorolt hatását. A cink stressz előidézésére cink szulfátot és cink kloridot is használtunk de a növényre gyakorolt hatásuk megegyezett. A kísérleteinket vízkultúrák rendszerben végeztük. A transzgénikus és kontroll

növények között fenotípusos eltérést nem tapasztaltunk. Megfigyeltük viszont, hogy viszonylag magas ZnSO_4 -koncentráció hatására növény zöld részei erősen megsárgulnak, növekedésük lelassul viszont a gyökereiken erőteljes hajszálgöyökér-növekedés volt megfigyelhető (5. ábra)



5. Ábra Cink szulfát (0,2 µM balra, 1,5 mM jobbra) hatása *Arabidopsis thaliana* növényekre vízkultúrárs rendszerben.

A kadmium (200 µM) transzgenikus növényekre gyakorolt hatását cserepes növényeken vizsgáltuk. Első kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a kadmium hatására a kontroll növényeken klorotikus foltok jelentek amelyek a transzgenikus növényeken kevésbé voltak intenzívek. A kísérlet során azonban azt is megállapítottuk, hogy a kadmiummal kezelt növények eltérő erősségű fénynél másképp reagálnak. Ennek az összefüggésnek a tanulmányozására további kísérleteket tervezünk.

Egyebek

További kísérleteket végeztünk hidrogén-peroxiddal és NaCl-al de nem tapasztaltunk különbséget. Tesztelni fogjuk továbbá a transzgenikus növényeink kórokozókkal szembeni viselkedését.

Ezeket kívül megkezdtük az *Arabidopsis* növények transzformálását szuperoxid-dizmutáz és kataláz génekkel. E növények értékelése folyamatban van.

Szürkenyárral (*Populus × canescens*) végzett kísérletek

Az irodalomban leírtak szerint a paraquat herbiciddel szembeni, nagy antioxidáns kapacitású növények *in vitro* szelektált klónjai az oxidatív stresszel szembeni rezisztenciát is mutattak, melyet többféle biotikus és abiotikus stressz idézett elő. Ezekben a kísérletekben, a paraquat-rezisztens növényekben a betegséggel előidézett nekrotikus tünetek visszaszorultak. Igazolódott, hogy a paraquat-rezisztens növény antioxidáns kapacitása szignifikánsan nagyobb a kontroll növényekénél. A burgonyában végzett korábbi kísérleteinkben paraquat-rezisztens burgonyaklónokat szelektáltunk, amelyek többféle burgonyabetegséggel szemben mutattak rezisztenciát, megemelt antioxidáns kapacitással. A módszerrel nagy hatékonyságú növény-nemesítési szelekciós eljárást vezettünk be, amellyel multirezisztens, nagy antioxidáns aktivitású növényeket lehet előállítani. A hosszú életidejű fajok között azonban kevés eredmény áll rendelkezésre, ezért munkánkban nagy fitoremediációs kapacitású, paraquat rezisztens, szürkenyár (*Populus × canescens*) klónok előállítása volt a cél.

Növényanyag

A vizsgálatokhoz a szürkenyárhibrid (*Populus tremula × Populus alba = Populus × canescens*) klónjait alkalmazzuk (INRA No.717-1-B4) E klónnak előnyös tulajdonsága hogy rendkívül jól mikroszaporítható. A klónok szaporítása nodális szegmentekkel *in vitro* módszerrel történt. A regenerálódott hajtásokat gyökérindukáló táptalajra helyeztük. A gyökeres növényeket cserépbe ültettük ki és üvegházban neveltük tovább.

Paraquat stressz in vitro:

Az *in vitro* szelekciós kutatások elmúlt éveiben kevés figyelem fordult a fás növényekre, a regeneráció nehézségei miatt. Máig nem sikerült a tudományban stabil paraquat-toleráns nyárfaklónokat szelektálni, ezért kísérleteink első részében a paraquat biológiai hatását vizsgáltuk és határoztuk meg a letális és szubletális dózisokat levélkorong tenyésztben.

A 4×10^{-3} M – 4×10^{-6} M koncentrációkon a levélkorongok 8 nap elteltével mind kifehéredtek. A 4×10^{-7} M paraquat koncentrációnál a levélkorongok csak részlegesen fehéredtek ki (szubletális dózis), elszórt fehér foltok jelentkeztek a zöld levélen. Az összes többi alacsonyabb koncentrációnál vizuálisan nem tapasztaltunk eltérést a paraquat nélküli kontrollhoz képest, mindenhol zöldek maradtak a korongok. A fentiek alapján megállapítható, hogy a nyár levélkorongok számára a 4×10^{-6} M paraquat koncentráció letális, a 4×10^{-7} M a szubletális, a 4×10^{-8} M pedig már vitális, ezért a vizsgálatokat a szubletális tartományban végeztük

A szubletális dózison (4×10^{-7} M) sikeres volt a paraquat toleráns klónok szelekciója *in vitro* hajtásteresztben. A regeneránsokat gyökeresítő táptalajra helyeztük, majd a gyökeres példányokat hajtássokszorozással felszaporítottuk, és hajtásteresztben ellenőriztük a paraquat-tolerancia stabilitását. A túlélő növények arányát százalékban fejeztük ki (2. táblázat).

2. táblázat. Paraquat toleráns klónok szelekciója szürkenyár hajtásteresztben

paraquat (M)	vad típus (%)
0,00	96,0 %
$3,3 \times 10^{-7}$	20,0 %
$6,6 \times 10^{-7}$	5,0 %
$9,9 \times 10^{-7}$	1,6 %

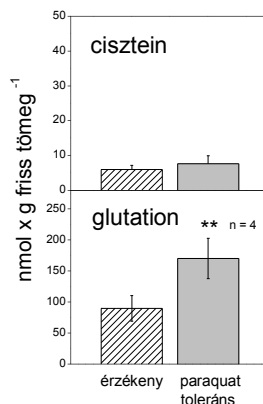
Részletesen megvizsgáltuk a nyárfa szövetek antioxidáns kapacitását, amely az egyik meghatározó paraméter a növények általános stressz-tűrőképességében. Elsőként három meghatározó antioxidáns enzim aktivitását vizsgáltuk a paraquat-toleráns és kontroll nyárfa levélszöveiben. Ezek az antioxidáns enzimek az oxidáló hatású hidrogén-peroxidot, valamint különböző szerves peroxidokat képesek lebontani a növényi sejtekben. Az enzimaktivitásokat spektrofotometriásan mértük. A paraquat-toleráns és normál nyárfák kezeletlen leveleinek aszkorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz és glutation S-transzferáz aktivitása között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (3. táblázat).

A paraquat-toleráns és normál nyárfa levelek cisztein és glutation (GSH) tartalmát HPLC módszer segítségével a monobromobimán származékképző reagens alkalmazásával határoztuk meg.

3. táblázat Glutation S-transzferáz, aszkorbát-peroxidáz és glutation-reduktáz enzimek aktivitása paraquat toleráns és vad típusú klónokban.

<u>Enzim</u>	<u>Paraquat-toleráns</u> (PQT)	<u>Vad típusú (érzékeny)</u> (WT)
Aszkorbát-peroxidáz	$8,2 \pm 2,6$	$7,6 \pm 0,9 \mu\text{mol g FW}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Glutation reduktáz	$0,41 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,08 \mu\text{mol g FW}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Glutation S-transzferáz	$1,8 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,4 \mu\text{mol g FW}^{-1} \text{ min}^{-1}$

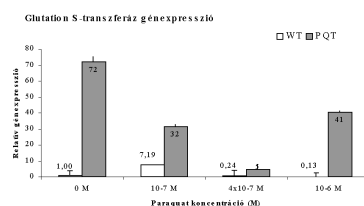
A glutation (GSH) tartalom lényegesen magasabb volt a paraquat toleráns (PQT) vonal leveleiben, ami arra utal, hogy ennek a növénynek fokozottabb a toleranciája oxidációs stresszel és különböző GSH segítségével lebomló herbicidekkel szemben (acetoklór, metolaklór, atrazin, aciflorfen stb). A levelek cisztein tartalma nem tért el a szignifikáns módon a két vonal levelei között (6. ábra).



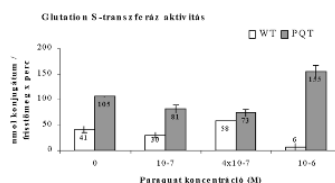
6. ábra Paraquat-toleráns (PQT) és érzékeny (WT) nyárfa levelek cisztein és glutation tartalma

A paraquat toleráns (PQT) klónok bizonyítására és jellemzésére levélkorong tesztet alkalmaztunk. A két nyárfavonal steril tenyésztéseiből vágott levélkorongokat *in vitro* tenyésztetben a paraquat gyomirtószert tartalmazó WPM táptalajon tenyésztettük (paraquat: 4×10^{-7} M.) Három hetes tenyésztési időt követően a paraquatot tartalmazó táptalajon a vad típusú (WT) levélkorongok megbarnultak, míg a toleráns vonalak zöldek maradtak.

A teszt során mértük a *gst* gén expresszióját és a *gst*-kódolt enzim-fehérje, a GST enzimaktivitását. A paraquat toleráns klón *gst* génexpressziója stressz mentes (paraquat-mentes táptalaj) körülmények között 71,4-szeres mértékű *gst* expressziót mutatott, amely aktivitás 10^{-7} M paraquat-stresszben is magasabb volt a kontrollnál (WT) (közel négyszeres: 7,1 / 31,5), míg a szubletális koncentrációban (4×10^{-7} M) közel 22-szeres (0,2 / 4,5). A 'fehérítő' koncentrációban (10^{-6} M) a kontroll (WT) vonal minimális *gst* aktivitása mellett (0,1 relatív egység) a Paraquat toleráns klón még 40,5-szeres *gst* expressziót mutatott (7. ábra). Ez utóbbi eredmény jelzi, hogy a kloroplaszt-mentes (kifehéredett) PQT mintákban a *gst*-expresszió, mint vészreakció még igen magas mértéket mutat, amely együtt járt a GST enzim funkciójának extrém mértékű növekedésével (154,1 nM konjugátum) (8. ábra) is.



7. ábra A *gst* gén expressziója (RT-qPCR) a szürkenyár (*Populus x canescens*) természetes (WT) és paraquat-toleráns (PQT) klónjában (n=6) három koncentrációs hajtástesztben 10^{-7} M, 4×10^{-7} M és 10^{-6} M paraquat mellett



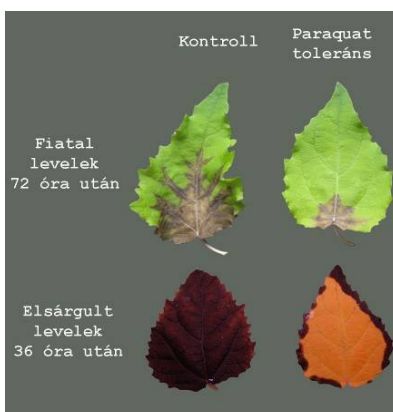
8. ábra A GST enzim aktivitása a paraquat-toleráns (PQT) és a kontroll (WT) szürkenyár klónok ellenőrző hajtásteszteiben, háromféle paraquat koncentráció mellett (10^{-7} M, 4×10^{-7} M, 10^{-6} M), 1% szacharóz tartalmú *in vitro* táptalajon

Miután laboratóriumi körülmények között bebizonyosodott hogy a paraquat toleráns vonalak alkalmasabbak lehetnek fitoremediációra, ezeket a vonalakat mikroszaporítással felszaporítottuk majd szabadföldi kiültetésre kerültek.

A további laboratóriumi tesztekhez paraquat (9. ábra), metolaklór és acifluorfén gyomirtószerekkel használtunk. Tesztjeinket üvegházi körülmények között nevelt háromhónapos növények levelein végeztük. A leveleket gyomirtószeres különböző koncentrációjú oldataiba helyeztük és felvételeztük a látható elváltozásokat. Ezt követően spektrofotometriás módszerrel mértük a levelekben az *aszorbát-peroxidáz*, *glutathion S-transzferáz* és a *kataláz* enzimek aktivitását.

A vegyszerek okozta fenotípusos elváltozás eltérő mértékű volt a paraquat-toleráns és kontroll nyárfaklónban. Három antioxidáns enzim aktivitását vizsgálva a klónok levélszövetekben, mindhárom vegyszer (paraquat, metolaklór és acifluorfén) esetében kimutattuk a nagymértékű stressz indukciót, valamint igazoltuk a klónok eltérő stressz reakcióját.

Az eredmények azt igazolják, hogy az *in vitro* szelektált paraquat-toleráns nyárfaklónokban olyan szinerg tulajdonságok is megjelentek, amelyek hatékony stressz-ellenállóságot eredményeztek más hatásmechanizmusú szerekkel szemben is. A szabadföldi kísérletek eredményei szükségesek annak eldöntéséhez, hogy ezek a tulajdonságok *in vivo* körülmények között is megjelennek-e. A kutatások hosszú távon a gyakorlatban is alkalmazható, magas stressztűrő képességű nyárfaklónok létrehozását eredményezhetik.



9. Ábra. A paraquat toleráns és kontroll szürkenyár klónok összehasonlító tesztelése paraquattal szembeni ellenállóságra. A levelek levélnyelét paraquat oldatba (10^{-4} M) helyeztük és folyamatos megvilágításnál figyeltük a nekrosis terjedését.

Egyebek

Mivel az *Arabidopsis* növények transzformálása *gstF4* génnel eredményes volt ezért kísérletet tettünk a nyárfába való bevitelére is. Azonban a szaporítás során a transzgén kiszegregálódott növényekből. A kísérletet ezek után már nem folytattuk, ugyanis a genetikailag módosított fákkal történő szabadföldi kísérletezés a jogi környezet miatt világszerte egyre nehezebbnek tűnik, ezért esetleges hasznosításuk középtávon sem volna lehetséges.