



A burgonya tápértékének javítása: a cisztein- és a glutationtartalom megváltoztatásának hatása a növény agronómiai tulajdonságaira

STILLER IBOLYA – DANCS GÁBOR – BÁNFALVI ZSÓFIA

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Gödöllő

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinket a korábban izolált, bakteriális eredetű szerin-acetiltranszferázt (SAT) expresszáló *Solanum tuberosum* cv. *White Lady* növényekkel végeztük. A megemelkedett antioxidáns (glutation) szinttel összefüggésben teszteltük a vonalak stressz toleranciáját és megvizsgáltuk, hogy a SAT túltermeltetés befolyásolja-e más anyagcsere-folyamatokban szerepet játszó gének átírását.

Kulcsszavak: *Solanum tuberosum*, glutation, metabolit analízis, stressz tolerancia.

BEVEZETÉS

A burgonya a negyedik legfontosabb kultúrnövényünk. Tápértékét azonban csökkenti, hogy kéntartalmú aminosavakban, ciszteinben és metioninban szegény.

Korábbi kísérleteinkkel kimutattuk (Stiller *et al.* 2007), hogy a bakteriális, cisztein feedback gátlásra érzékeny szerin-acetiltranszferáz (SAT) enzim konstitutív túltermeltetésével átlagosan 1,5-szeresére emelkedik a *White Lady* magyar burgonyafajta cisztein- és glutationtartalma mind levélben, mind pedig gumóban. A SAT túltermelő vonalakat (SAT1 és SAT2) markermentes transzformációval állítottuk elő. Ez egyrészt, ha szükséges, lehetővé teszi újabb gének bevitelét, másrészt biztonságos és társadalmilag is elfogadható fajtát eredményez.

A cisztein jelentős része egy tripeptidbe, a glutationba (GSH) épül be. A glutationnak fontos szerepe van a különböző stresszhatások során felhalmozódó reaktív oxigéngyökök és a H₂O₂ eliminálásában (De Kok és Stulen 1993) és ezáltal a stressz elleni védekezésben. A cisztein bioszintézis befolyásolásával a GSH szint, és ezzel összefüggésben, a növények stressz toleranciája is növelhető (Sirko *et al.* 2004).

Mivel az élő szervezetekben működő anyagcsere-folyamatok egy komplex, összefüggő hálózatot alkotnak, az egyes enzimek mennyiségének megváltoztatása befolyásolhatja más, az adott anyagcsereúttal közvetlen vagy közvetett kapcsolatban lévő enzimek génjeinek átírását is.

Mindezek alapján, jelenlegi munkánk célja kettős volt: [1] annak vizsgálata, hogy a SAT túltermelő burgonyanövényeinkben a megemelkedett GSH szint javítja-e a stressz toleranciát, [2] az enzim túltermelése befolyásolja-e más anyagcsere-folyamatokban fontos szerepet játszó gének átírását és ezen keresztül a növény agronómiai tulajdonságait.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Oxidatív és ozmotikus stressz tolerancia vizsgálat

A stressz tolerancia vizsgálatokat *Blaszczyk et al.* (1999) alapján, különböző koncentrációjú H₂O₂ és NaCl oldatokkal, kontrollként pedig desztillált vízzel végeztük. A klorofill-tartalom meghatározása fotometrikan történt, acetonos extrakciót követően, a következő formula szerint:

$$\text{klorofilltartalom (mg/friss tömeg)} = (0,02 \times A_{645} + 0,008 \times A_{663}) \times V/\text{FW}$$

ahol V: térfogat (ml) és FW: friss tömeg (g).

Molekuláris biológiai technikák

Növéymintáinkból össz-RNS-t *Stiekema et al.* (1988) módszerével vontunk ki. A növényi RNS mintákból 20 µg-ot denaturáltunk és formaldehid-tartalmú agaróz gélben elválasztottuk. A gél blottolása és DNS próbával való jelölése *Dóczi et al.* (2002) szerint történt. A hibridizációkhoz [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP-vel jelölt, tisztított DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést „random priming” módszerrel vagy specifikus primereket felhasználva, PCR-rel végeztük.

A reverz northern vizsgálatokban tesztelt géneket PCR-rel felszorzoztuk, megfuttattuk. A gélből a DNS-t Hybond N+ membránra blottoltuk. A $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP-vel jelölt cDNS szintézist Access RT-PCR Introductory System Kit (Promega) felhasználásával végeztük. A hibridizációs körülmények ugyanolyanok voltak, mint a northern hibridizációnál.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

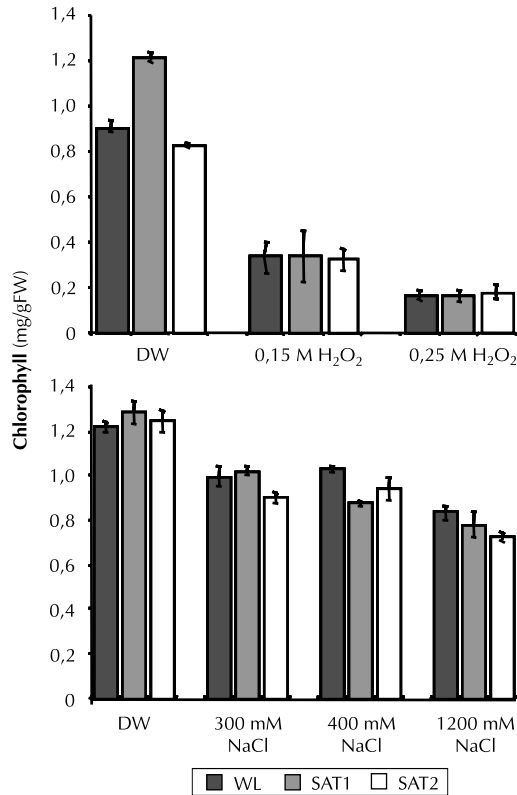
Jelenlegi munkánk egyik célja az volt, hogy megvizsgáljuk, a SAT túltermelés hatására megnövekedett GSH mennyisége elegendő-e az ozmotikus és oxidatív stressz tolerancia javításához.

Stressz hatására a klorofilltartalom csökken, ami fotometrikan detektálható. Az abszorbancia mérési eredmények azonban azt mutatták, hogy H₂O₂ és NaCl kezelésekre a SAT transzgenikus növények ugyanolyan érzékenyek, mint a nem-transzformált *White Lady* (1. ábra). Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy esetünkben a GSH mennyisége csak 1,4–1,5-szerese a kontrollénak. Dohányban 2–4-szeres GSH szintemelkedés az antioxidáns

1. ábra A SAT transzgénikus *White Lady* vonalak stressztűrő képességének vizsgálata
 WL: *White Lady*, SAT1, SAT2: transzgénikus *White Lady* vonalak, DW: desztillált víz

Figure 1. Stress tolerance of transgenic plants

WL: *White Lady*, SAT1, SAT2: transgenic WL lines, DW: distilled water



mennyiségével összhangban megemelte a növények H₂O₂ tűrőképességét (Blaszczyk *et al.* 1999). Valószínű azonban, hogy ilyen szintű emelkedést burgonyában csak a cisztein gátlásra érzéketlen, mutáns SAT gén bevitelével tudnánk elérni.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a SAT túltermelés génexpressziós szinten hogyan befolyásolja a sejtek egyéb anyagcsere-folyamatait. Ezért reverz northern kísérletben megvizsgáltuk a SAT túltermelés hatását a laboratóriumunkban megtalálható 116 cDNS-nek megfelelő génre. A vizsgált gének többsége a szénhidrát metabolizmusban és aminosav anyagcsereben játszik szerepet. A transzgénikus vonalak RNS-ével hibridizálva számos olyan jelet kaptunk, amelyek intenzitásukban eltértek a *White Lady* próbával kapottaktól.

A reverz northern kísérletek előnye, hogy viszonylag rövid idő alatt nagy mennyiségű gént tudunk analizálni. Korábbi tapasztalataink azonban azt mutatták, hogy az így kapott eredmények sokszor tévesek, ezért ezeket, pl. northern hibridizációval, ellenőrizni kell. Az

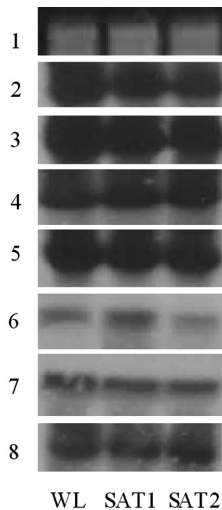
első ellenőrző northern vizsgálatokat főleg olyan génekkel végeztük (2. ábra), amelyek valamilyen szinten kapcsolatba hozhatók a cisztein bioszintézissel. Így vizsgáltuk a cisztein-szintáz expresszióját, ami a SAT-tal komplexet képezve vesz részt a cisztein szintézisében; a cisztein-proteázt, ami a fehérjelebontáson keresztül különböző fiziológiai és fejlődési folyamatok szabályozásában vesz részt; a metionin-szintázt, ami a metionin kialakulását katalizálja. Vizsgáltuk még a fruktóz-1,6-biszfoszfátot, ami a glükoneogenezisben a fruktóz-1,6-bisfoszfátot alakítja fruktóz-6-foszfáttá; a Hannapel-típusú MADS box fehérjét, ami egy transzkripció faktor (Becker *et al.* 2003), és burgonyában a vegetatív szervek fejlődéséhez szükséges, valamint a citoszolikus aszkorbát-peroxidáz gén expressziós mintázatát is, ami a hidrogén-peroxid eliminálásában játszik fontos szerepet.

2. ábra A reverz northern kísérletekben eltérő expressziót mutató gének ellenőrzése northern analízissel

WL: *White Lady*, SAT1 és SAT2: transzgénikus WL vonalak 1: rRNS,

2: cisztein-szintáz, 3: cisztein-proteáz, 4: metionin-szintáz, 5: aszkorbát-peroxidáz, 6: fenilalanin-ammónia-liáz, 7: fruktóz-1,6-biszfoszfátáz, 8: Hannapel típusú MADS box gén

Figure 2. Northern analysis of clones with altered expression pattern in reverse northern WL: *White Lady*, SAT1 and SAT2: transgenic WL lines, 1: rRNA, 2: cysteine synthase, 3: cysteine protease, 4: methionine synthase, 5: ascorbate peroxidase, 6: phenylalanine ammonia lyase, 7: fructose-1,6-bisphosphatase, 8: Hannapel-type MADS box gene



Számos irodalmi adat utal rá, hogy a fenilalanin-ammónia-liáz géncsalád transzkripciója rendkívül gyorsan és intenzíven változik minden belső és külső hatásra (Liang *et al.* 1989). Mivel a reverz northern kísérletben egy enyhe különbséget láttunk ennek a génnek az expressziójában is, ezért ezt is bevontuk a northern vizsgálatokba.

A előbb említett gének mindegyikével elvégeztük a northern analízist, azonban egyik gén expressziója sem különbözött a *White Lady* kontrollétól (2. ábra). Összességében megállapíthatjuk tehát, hogy a SAT enzim túltermelésének nincs szignifikáns hatása az általunk vizsgált gének transzkripciójára, ami mezőgazdasági szempontból előnyösnek mondható, hiszen valószínűleg ezzel magyarázható az is, hogy a transzgénikus növények nem különböznek a *White Lady*től fenotípusban, gumóhozamban, méretben és csírázási képességben (Stiller *et al.* 2007).

Improving the nutritional value of potato: Elevation of cysteine and glutathione contents and their effects on agronomically important traits

IBOLYA STILLER – GÁBOR DANCS – ZSÓFIA BÁNFALVI

Agricultural Biotechnology Centre
Gödöllő

SUMMARY

In this study, previously isolated serine-acetyltransferase (SAT) overexpressing *Solanum tuberosum* cv. *White Lady* plants were investigated. Effect of elevated antioxidant (glutathione) level on abiotic stress tolerance and the influence of SAT overexpression on transcript levels of other enzymes involved in amino acid biosynthesis and sugar metabolism were examined.

Keywords: glutathione, metabolite analysis, *Solanum tuberosum*, stress tolerance.

IRODALOM

- Becker, A. – Theissen, G. (2003): The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 464–489.
- Blaszczyk, A. – Brodzik, R. – Sirko, A. (1999): Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *The Plant Journal* **20**, 237–243.
- De Kok, L. J. – Stulen, I. (1993): Role of glutathione in plants under oxidative stress. In sulfur nutrition and assimilation in higher plants, regulatory, agricultural and environmental aspects the Hague: SBP Academic Publisher, 125–138.
- Dóczy, R. – Csanaki, C. – Bánfalvi, Z. (2002): Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*. *Plant Cell and Environment* **25**, 1197–1203.
- Hawkesford, M. – Hoefgen, R. – Galili, G. – Amir, R. – Angenon, G. – Hesse, H. – Rentsch, D. – Schaller, J. – Van Der Meer, I. – Rouster, J. – Bánfalvi, Z. – Polgár, Z. – Szabados, L. – Szopa, J. – Sirko, A. (2004): Optimising nutritional quality of crops. In: *Plant Genetic Engineering Vol 7: Metabolic engineering and molecular farming* (Ed. Jaiwal P K) Studium Press LLC Huston, Texas 77272, USA, 85–116.

- Liang, X. W. – Dron, M. – Cramer, C. L. – Dixon, R. A. – Lamb, C. J. (1989): Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 14486–14492.
- Sirko, A. – Błaszczyk, A. – Liszewska, F. (2004): Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants: a survey of effects. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1881–1888.
- Stiekema, W. J. – Heidekamp, F. – Dirkse, W. G. – Van Beckum, J. – De Haan, P. – Ten Bosh, C. – Louwerse, J. D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology* **11**, 255–269.
- Stiller, I. – Dancs, G. – Hesse, H. – Hoefgen, R. – Bánfalvi, Z. (2007): Improving the nutritive value of tubers: Elevation of cysteine and glutathione contents in the potato cultivar *White Lady* by marker-free transformation. *Journal of Biotechnology* **128**, 335–343.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

STILLER Ibolya
Lab International Magyarország Kutató Központ Kft.
H-8200 Veszprém–Szabadságpuszta
E-mail: sikolyka@yahoo.co.uk

DANCS Gábor
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
E-mail: dancs@abc.hu

BÁNFALVI Zsófia
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
E-mail: banfalvi@abc.hu