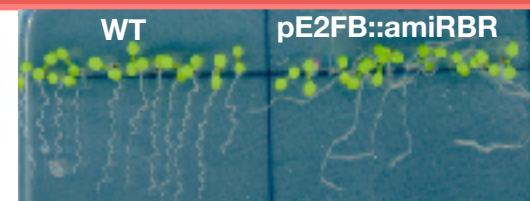




Őszi Erika¹, Horváth Beatrix², Magyar Zoltán¹
¹ MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged, Magyarország
² Wageningen University, Wageningen, Hollandia

Bevezetés

A retinoblasztoma-rokon fehérje (RBR) szabályozza a növényekben is az osztódás és a differenciálódás közti egyensúlyt. Transzgenikus *Arabidopsis* növényekben megpróbáltuk az RBR funkciót specifikus mikroRNS segítségével gátolni. Az egyik ilyen vonal gyökerei nem a gravitációs ingernek megfelelően növekedtek (1.Ábra). A transzgenikus vonal további jellemzése azonban arra engedett következtetni, hogy feltehetően egy az RBR-től független, az auxin transzportban szerepet játszó gént rontottunk el.



1. Ábra Vad típusú és transzgenikus növények

Módszerek

Transzgenikus növényeket hoztunk létre, ahol az RBR-re specifikus mikroRNS segítségével próbáltuk az RBR funkcióját gátolni (2. Ábra). Az RBR-re specifikus amiRBR az E2FB promóter mögé lett klónozva.



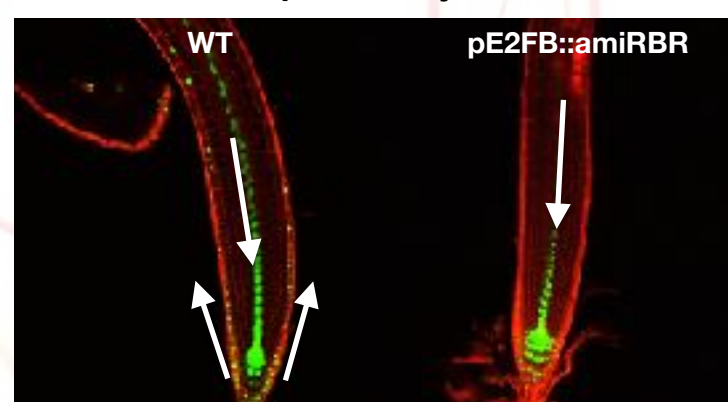
2. Ábra Az RBR specifikus mikroRNS célszakasza (CSZ) az RBR mRNS-en.

Specifikus anti-RBR ellenanyaggal immunoblot eljárás segítségével vizsgáltuk az RBR fehérje szint alakulását a transzgenikus növényekben. A transzgenikus vonalat kereszteztük, egy a mikroRNS-re érzéketlen vonallal (pRBR:gRBR-GFP), ahol hiányzik az RBR 3' nem transzlálódó vége.

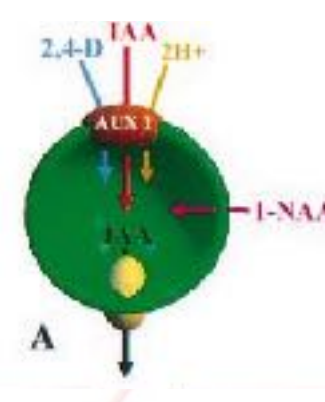
Az auxin jelenlétét a transzgenikus gyökérben az auxin-riporter pDR5-GFP bekeresztezését követően vizsgáltuk, amely egy nukleáris lokalizációjú GFP származék kifejeződését kontrollálja. A GFP jel erőssége és megoszlása az auxin lokális koncentrációjától függ.

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a gyökérnövekedést, ha kívülről különböző auxin származékokat (IAA, 2,4-D, NAA) adunk a növényekhez.

A transzgenikus vonalba bekereszteztük az auxinra szenzitív mesterséges DR5 promótert. Az auxin maximum a kontrol növényhez hasonlóan a nyugvó centrum és az alatta található gyökérsüveg sejtrétegekben volt megfigyelhető. Ezzel szemben, az oldalirányú laterális gyökérsüveg sejtekben teljesen eltűnt a GFP jel (5. Ábra), ami arra enged következtetni, hogy az auxin laterális transzportjában résztvevő transzport fehérjék működése sérülhetett.



5. Ábra A transzgenikus gyökérben (jobb oldali) megváltozott a laterális auxin gradiens



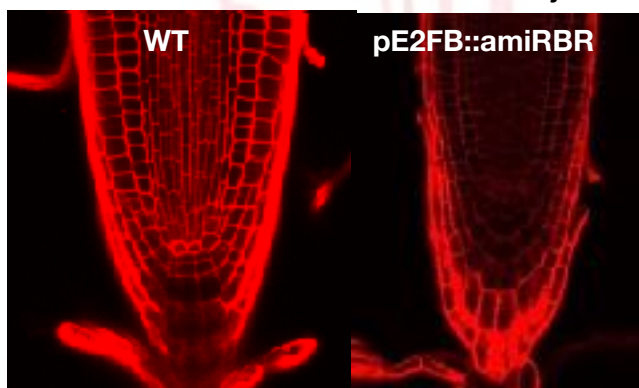
6. Ábra A különböző auxinok bejutási útja

A különböző auxinok más úton képesek bejutni a sejtekbe. Az IAA és a 2,4-D aktívan, az AUX1 segítségével jut be, míg az I-NAA diffúzióval (6. Ábra).

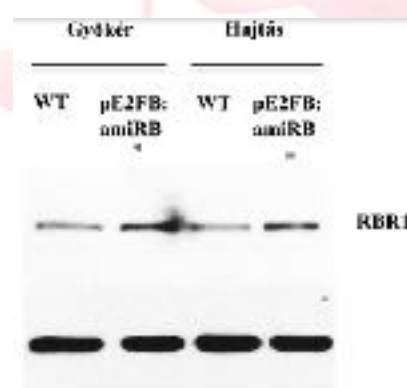
Az általunk vizsgált növényekben a 2,4-D magasabb koncentrációban képes volt belépni a sejtbe, míg alacsonyabb koncentrációban nem gátolta a gyökér növekedését. Elképzelhető, hogy nem az AUX1 működése sérült. Lehetségesnek tartjuk azt is, hogy a pE2FB::amiRBR növényekben az AUX1 transzportter egy új mutációjáról van szó. Azonban ezeknek a feltételezéseknek az igazolásához további kísérletek szükségesek.

Eredmények

A transzgenikus növények gyökerei agravitropikus növekedésűek, azonban más makroszkópos elváltozást nem mutatnak (3. Ábra). Feltételeztük, hogy ebben a növényi vonalban gyökér specifikusan sikerült csökkentenünk az RBR szintjét.



3. Ábra A transzgenikus növény gyökércsúcsi régiója nem mutat elváltozást a vad típusú növényekhez képest



4. Ábra Az RBR fehérje szint nem csökkent a transzgenikus mutánsokban (Western blot)

A pE2FB::amiRBR mutáns növényekben az RBR fehérje szintje sem a hajtásban, sem a gyökérben nem mutatott csökkenést (4. Ábra).

Megpróbáltuk komplementálni a transzgenikus vonal fenotípusát, ezért kereszteztük ezt a vonalat az RBR-GFP expresszáló vonallal. A keresztezést követően az utódok megtartották a specifikus agravitropikus gyökérfenotípust, tehát az RBR-GFP nem tudta komplementálni a gyökér növekedési rendellenességet. Nem zárhatjuk ki, hogy az RBR-GFP várokozásunk ellenére nem képes minden RBR funkciót betölteni.

Megbeszélés

1) A pE2FB::amiRBR vonalban nem csökkent az RBR szint és a fenotípus sem emlékeztet az RBR csendesítésekor leírt elváltozásokra. Tehát a súlyosan agravitropikus gyökér növekedéséért valószínűleg nem az RBR gátlása a felelős.

2) Az auxin kezelésnek kitett transzgenikus növények auxin érzékenysége megváltozott, amiből arra következtettünk, hogy valamelyik auxin transzport fehérje működése sérülhetett.

3) Az AUX1 auxin influx transzport fehérje hasonló bár némileg eltérő fenotípusa miatt elképzelhető, hogy egy másik auxin transzportter érint a mutáció.

Támogatók:

A kutatást támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K-105816). Őszi Erika Msc-s tevékenységét az Emberi Erőforrások Támogatáskezelő Nemzeti Tehetség Programjának támogatásával került megvalósításra.