

SZENT ISTVÁN EGYETEM

GÖDÖLLŐ

**SZÁRAZSÁGTŰRÉS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ
BÚZAJAJTÁKBAN**

Doktori értekezés tézisei

Deák Csilla

BUDAPEST

2016

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Zámboriné Németh Éva

egyetemi tanár, DSc

Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Papp István

egyetemi tanár, DSc

Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar,

Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) igen érzékeny a szárazságstresszre, különösen a reprodukív fázisban. A búza szárazságtoleranciája összetett tulajdonság, amelyet több tényező határoz meg, ami a genotípustól és környezeti körülmények kölcsönhatásaitól függ.

A kutatók egyik célja megérteni és feltárni azokat a túlélési mechanizmusokat, amelyek növelik a növények szárazság toleranciáját azokon a területeken, ahol korlátozottak az öntözési lehetőségek, illetve ahol a száraz periódusok gyakoriak. A nemesítési törekvések többnyire a hozam növelésére irányulnak, olyan magas hozamú genotípusokra, amelyek képesek túlélni a szélsőséges környezeti változásokat, különösen azokban a régiókban, ahol a vízhiány gyakori.

Ahhoz, hogy megértsük a szárazságra adott válaszok molekuláris mechanizmusait, elengedhetetlen a szárazságtolerancia molekuláris szintű kutatása. Jelenleg többféle lehetőség közül választhatunk, melyek révén növelni tudjuk a búza szárazsággal szembeni ellenállóságát, stabil hozam mellett.

A szárazság elsődlegesen a sejtnövekedésre és a fotoszintézisre van kihatással. Ez utóbbi meghatározza a szemtermés mennyiségét a búzánál. Általánosan elfogadott az a tény, hogy ha a levelekben képes fennmaradni a fotoszintézis különösen, ha ez a zászlós levelekben történik, az nagymértékben kihatással van a hozamra.

Jellemző továbbá, hogy növekszik a viasz kutikuláris lerakódása is vízdeficit idején. Azok a növények, amelyek stressztoleránsak, gyakran eleve vastagabb kutikuláris viaszbevonattal rendelkeznek, mint a mérsékelt égövön élők, utóbbiak emiatt is érzékenyebbek a stresszre (Shepherd és Griffiths, 2006).

Amikor a növényt valamilyen stressz éri, újraprogramozza metabolikus és élettani folyamatait, amelyeket jelátviteli események hálózata idéz elő. A folyamat eredményeként a sejtmagban bizonyos gének kifejeződése meg fog változni, többek között az ún. dehidrin géneké. A vízvesztés káros következményeinek elkerülésében segítséget nyújtanak azáltal, hogy részt vesznek a membránok stabilizálásában stresszhatások alatt (Graether és Boddington, 2014). Gyökfagó tulajdonságuk is ismert, a dehidrin fehérjék képesek

csökkenteni az oxidatív károsodást, amelyet vízhiányos stressz okoz a növényben (Rorat, 2006).

A gének „mesterszabályozói” transzkripciós faktorokként (TF) ismeretesek. Számos, különböző típusú TF volt megtalálható a stresszekre indukálható gének között, ami azt sugallja, hogy többféle transzkripcionális szabályozó mechanizmus működik a szárazság-, hideg- vagy magas sóstressz jelátviteli útvonalakban (Kauzo et al. 2003).

A növények vízhiányos stresszre adott válaszai közül az egyik legmarkánsabb az abszcizinsav (ABA) bioszintézise. Az ABA fő szerepe, hogy szabályozza a növény vízgyensúlyát és ozmotikus stressz toleranciáját. Az ABA sztómazárást indukál vízhiány alatt, megelőzve ezzel az intracelluláris vízvesztést. (Mittler *et al.* 2010).

Munkánk elsődleges célja két szárazságtoleráns (Plainsman V. és Mv Emese) illetve két szárazságérzékeny (GK Élet és Cappelle Desprez) búza fajtánál fellelni azon fiziológiai és molekuláris bélyegeket, amelyek az eltérő szenzitivitásukat eredményezi elégtelen vízellátás esetén.

A fajták közötti különbségtétel céljából a következő vizsgálatokat végeztük:

- szárazság alkalmával szintetizálódó ozmoprotektánsok meghatározása
- a vízhiány gázcserére gyakorolt hatásának mérése
- egyes, szárazság esetén várhatóan megnyilvánuló gének kifejeződésének vizsgálata
- azon transzkripciós faktorok felkutatása, amelyek szabályozhatják az előbbieken említett gének kifejeződését
- a desszifikációs válaszokban kulcsfontosságú abszcizinsav hormonra való érzékenység meghatározása

Azonosítani és klónozni kívántunk továbbá egy búza gént, amely a szárazságtűrésben lényeges viaszborítottság kialakulásáért felelős lehet. Meg kívántuk határozni az ilyen jelölt gén kifejeződését kifejlett búza növény szerveiben, valamint vízhiányos stressz hatása alatt a zászlós levelekben.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletekben felhasznált növényanyag előállítása

A szárazságtűrés vizsgálatához a búzmagokat föld-homok-tőzeg keverékébe (3:1:1, v/v/v) vetettük, majd 7 hét 2 °C-on történő vernalizációt követően a csíranövények PGV-15 növénynevelő kamrákban (Conviron, Winnipeg, Kanada) nevelkedtek, őszi klimatikus program (T1) alatt (Jäger et al. 2015). A szárazságstresszt teljes vízmegvonással idéztük elő. A kontroll növények 21°C-on nevelkedtek, 10/14 óra világos/sötét megvilágítási ciklus alatt.

A PEG-el történő ozmotikus stressz kezeléshez való kísérleti anyag előállításához a vetőmagokat előneveltük Petri-csészékben fényszobában, majd hajtással és gyökérrel rendelkező csíranövényeket tíz nap letelte után hidropóniás rendszerben, Hoagland-tápanyagban (pH: 5,8) neveltük tovább (Hoagland és Arnon, 1950).

Az ozmotikus stressz kiváltására a Hoagland-tápanyagba növekvő koncentrációban 8 w/v %-os, 12 w/v %-os, 15 w/v %-os majd 18 w/v %-os 6000-es molekulatömegű polietilén glikolt (PEG, Duchefa) használtunk, a kontroll csoport kizárólag Hoagland tápanyagban fejlődött. A stressz kezelést a tápanyagra helyezést követő 10. napon kezdtük és a PEG koncentrációját hetente növeltük folyamatosan.

A növényanyag nevelését az *in vitro* ABA kezeléshez, Kurahashi és munkatársai 2009-ben közölt publikációjára támaszkodva végeztük. A kontroll csoport desztillált vizes, míg a kezelt vonalak növényei 10 µM, 20 µM és 50 µM koncentrációjú (±)-cisz, transz-abszizinsavval telített szűrőpapírokon fejlődtek ugyanazon körülmények között (23 °C).

Fotoszintézisre jellemző paraméterek műszeres mérése szárazság kezelt búzákon

A növényi gázcseré vizsgálatát LCi műszerrel történt, kétnaponta a vízmegvonási periódus alatt. Genotípusonként öt cserép növényeinek egy zászlós levelén, mivel az marad a legtovább metabolikusan aktív.

Relatív víztartalom (RWC) meghatározása

A leveleket ért ozmotikus stressz mértékét a relatív víztartalom vizsgálatán keresztül követtük a 18%-os PEG kezelést követően, melyhez a levél közepéről 2 cm-es szegmenseket használtunk. Majd meghatároztuk azok relatív víztartalmát.

Statisztikai elemzés

Az eredmények kiértékeléséhez statisztikai próbát alkalmaztunk, hogy megtudjuk van-e szignifikáns különbség az egyes mérések között. Az abszcizinsav gyökérnövekedés gátló hatására vonatkozó adatokat Welch féle ANOVA teszttel értékeltük ki. A levél RWC eredmények adatait a Microsoft Office 2013 Excel program T-próbájával elemeztük, mely során meghatároztuk a kezelések hatását az egyes genotípusokra nézve. A qRT-PCR alapján kapott expressziós szintek közötti különbség szignifikanciájának meghatározásához One-way ANOVA és post-hoc Tukey HSD tesztet alkalmaztunk.

Teljes RNS izolálás, RNS koncentrációk kiegyenlítése és cDNS írás

A kétféle (ABA-, szárazság-) kezelésnek alávetett illetve a nemstresszelt növényanyag RNS kivonása TRI Reagent-el (Molecular Research Center, Inc.) történt. Az RNS-eket a NanoDrop-pal mért koncentráció értékek alapján egyenlítettük ki. Az RNS-ek cDNS-é való átírására a Fermentas First Strand cDNA Kit-et alkalmaztuk.

RT-PCR és Valós idejű PCR (qPCR)

A célgénekkal folytatott kísérletek előtt, a cDNS koncentráció kiegyenlítés sikerességéről kontroll primerekkel végzett RT-PCR útján győződünk meg.

A folyamat során kapott termékeket 1,5%-os agaróz gélben választottuk el és GelGreen festéssel tettük láthatóvá. A fragmentumok molekulatömeg meghatározásához markerként a lambda fág DNS-ének PstI enzimmel történt emésztését használtuk fel.

Valós idejű PCR-t egy Corbett Research gyártmányú Rotor Gene 6000 készülékkel végeztük.

Genomi DNS kontamináció ellenőrzése

A cDNS-eket további vizsgálatnak vetettük alá, mellyel a genomi DNS maradványok meglétéről kapunk információt. Ezzel az eljárással kiszűrhető, hogy csak azokról a génekről kapjunk képet, amelyek az adott pillanatban megnyilvánulnak, s amelyekről érett mRNS keletkezik.

Az *Arabidopsis WIN/SHN1 (WAX INDUCER/SHINE1)* génnel homológ búza gén kiválasztása adatbázisok segítségével illetve annak klónozása

A kutatócsoportunk célja a búza kutikula kialakulás potenciális szabályozójának meghatározása és jellemzése volt a transzkripciós faktorok *WIN/SHN* családjának tagjai között (Jäger *et al.* 2015).

A BLAST program segítségével kerestünk a lúdfű *WIN/SHN1* génhez (NP_172988.1) hasonló szekvenciákat az NCBI *Triticum aestivum* EST adatbázisban.

A klónozás során az RT-PCR-el felszaporított búza gént (*TaSHN1*) elsőként restriktációs enzimmel hasítottuk. Az így nyert inszertet pBluescript KSII vektorba ligáltuk. A következő lépés a ligátum *Escherichia coli* baktériumba történő transzformálása volt.

Annak érdekében, hogy a klónozott DNS szakaszt tartalmazó vektort hordozó baktériumokat kisselektáljuk a baktérium telepek közül, agar lemezeket készítettünk Ampicilin 100µg/ml és IPTG X-Gal felhasználásával. A transzformáció révén kapott elegyet ezekre az antibiotikumot tartalmazó agar lemezekre szélesztettük ki. A megjelenő Ampicillin rezisztens, fehér színű kolóniákat ezután tovább vizsgáltuk, hogy a klónozni kívánt inszertet valóban tartalmazzák-e.

A génexpressziós adatok analízise

A real-time PCR eredmények kiértékelése a C_T (Threshold cycle = C_T) értékkel rokonítható TOP („Take Off Point”) pontok alapján történt. Ezen értékeket alapul véve, meghatározhatóak különbségek az egyes minták között.

Az eredményeket relatíve kvantifikáltuk, az alábbi egyenletet felhasználva:

$$\Delta C_T = C_T(\text{célgén}) - C_T(\text{referencia})$$

ahol a ΔC_T értéke megadja számunkra a kontroll és kezelt minták küszöbérték-ciklusszáma közötti különbségeket. Ezt követően az expresszióbeli különbség megállapítása a kettőnek az így nyert érték szerint negatív hatványra emelésével történt:

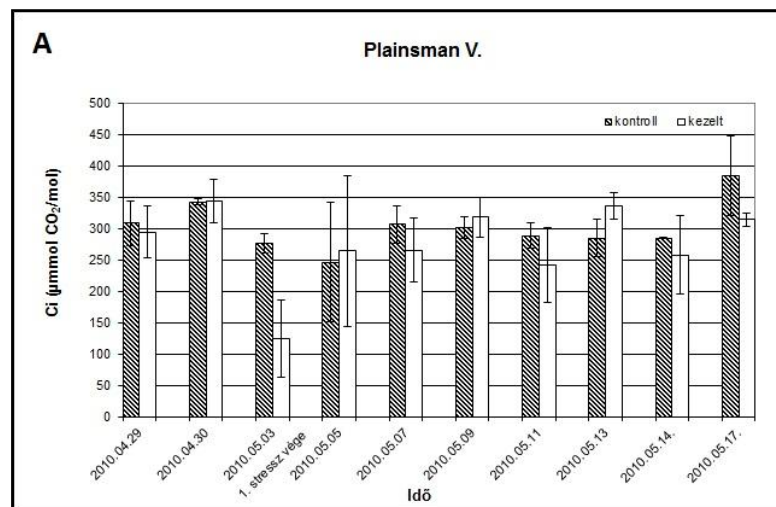
$$2^{-\Delta C_T}$$

Így megkaptuk, hogy a referencia génhez (*TaL*) képest mekkora a vizsgált gének expressziós szintje.

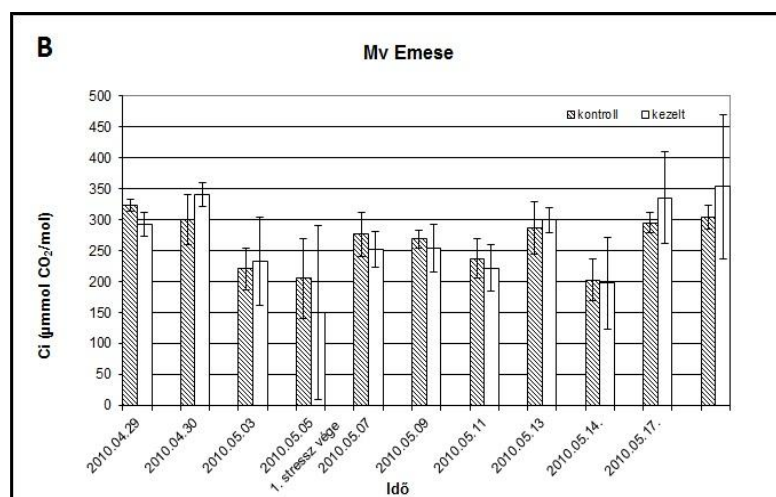
3. EREDMÉNYEK

Szárazságkezelt búza növények gázcsere paramétereinek mérése

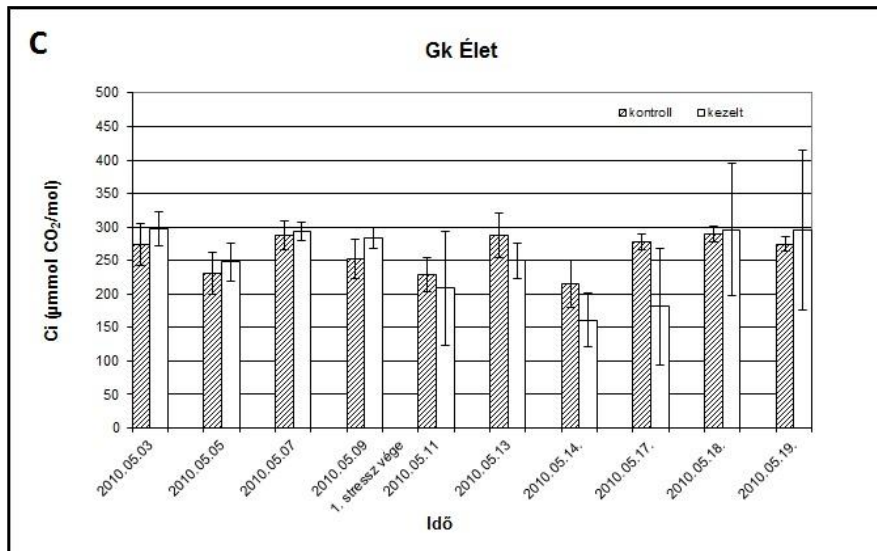
A fotoszintetikus apparátus viszonylag védett a környezeti hatásokkal szemben, de károsodás érheti súlyos vagy hosszantartó stressz esetén. Így az erre irányuló műszerrel való mérés lehetőséget ad a stressz okozta károsodás meghatározására. Fitotronjainkban szárazságstressz alatt nevelkedett búzákon végzett mérési eredményeket (azokból is a C_i értékeit) a következő ábrák foglalják össze (**1, 2, 3, 4 ábra**). Az 1-4 ábrán átlag és +/- SD értékek vannak ábrázolva.



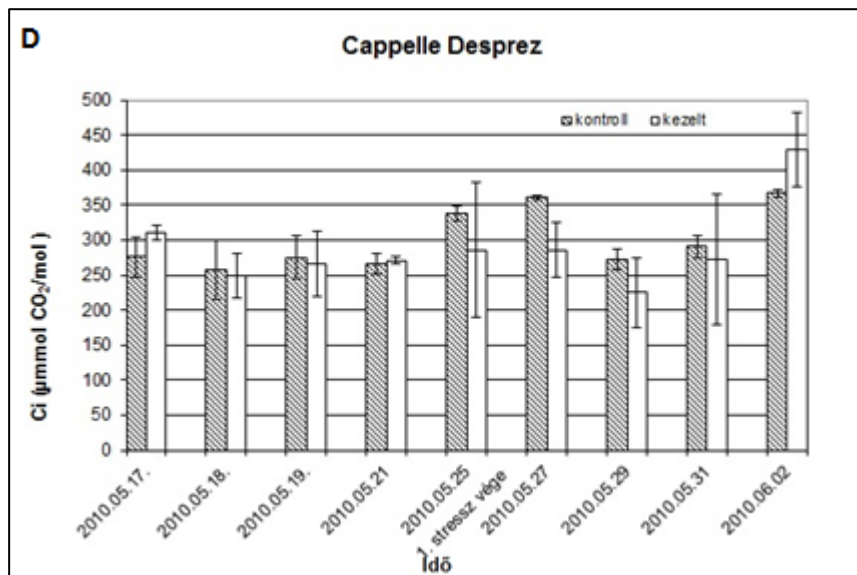
1 ábra: Intercelluláris CO₂ koncentráció (C_i) Plainsman V. fajtánál



2 ábra: Intercelluláris CO₂ koncentráció (C_i) Mv Emese fajtánál



3 ábra: Intercelluláris CO₂ koncentráció (Ci) Gk Élet fajtánál



4 ábra: Intercelluláris CO₂ koncentráció (Ci) Cappelle Desprez fajtánál.

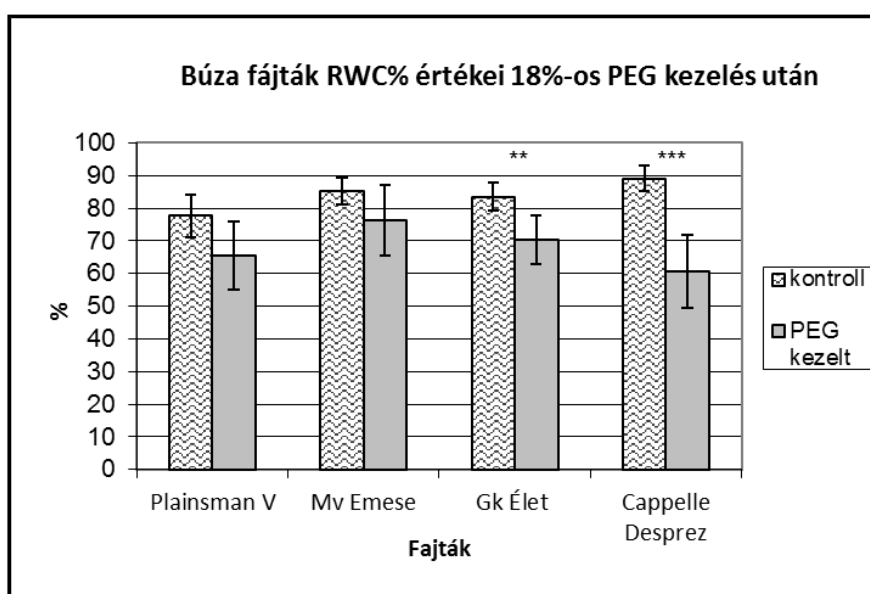
A diagramok alapján elmondható, hogy a Plainsman V toleráns fajta esetében a levél belső terében mért CO₂ koncentráció a kontrollhoz képest jelentős csökkenését figyelhettük meg az első stressz kezelés végén. Ezzel szemben a többi genotípusnál (cvs. Mv Emese, GK Élet, Cappelle Desprez) ez nem volt jellemző.

Ez az ellentét vélhetően a szárazság toleráns Plainsman V növények fenntartott fotoszintetikus aktivitásával magyarázható, amely így nagyobb arányban elhasználja a levél belső légterének szén-dioxidját.

Búza csíranövények kezelése PEG-el

A polietilén-glikollal történő kezelés végén mért relatív víztartalom (RWC) meghatározása megmutatja, hogy a vizsgált levélben a kontrollhoz és a többi fajtához képest milyen a víztartalom változása.

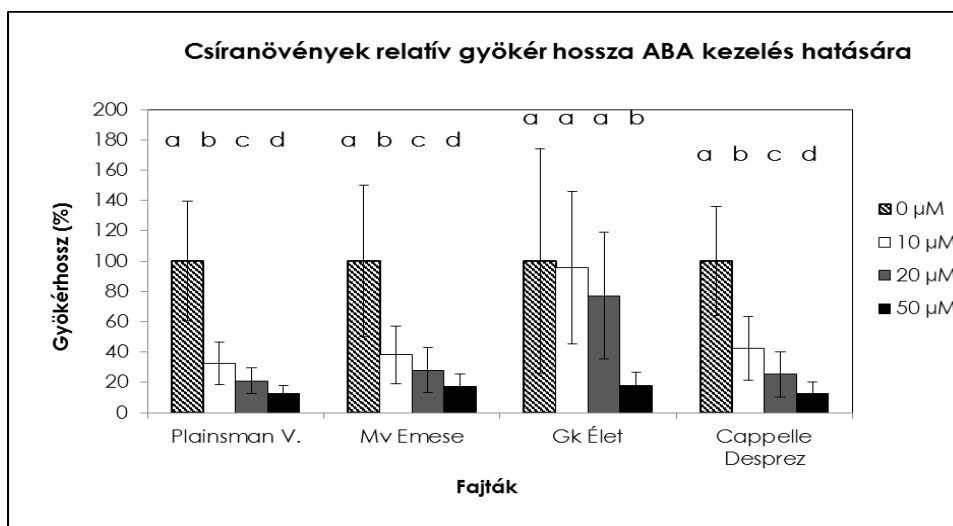
A várakozásunkkal ellentétben a genotípusok közül a Plainsman V toleráns fajtánál tapasztaltuk az egyik legalacsonyabb relatív víztartalmat 18%-os PEG kezelést követően (három biológiai ismétlést alapul véve, ebből egy jellemzőt mutatok be) **5. ábra**. Az érzékeny fajták esetében a Gk Élet magasabb RWC% szinteket mutatott a szenzitív Cappelle Desprez-hez viszonyítva.



5. ábra: Relatív víztartalom értékei százalékban kifejezve kontroll körülmények között és ozmotikus stressz hatására (Átlag és +/- SD értékek vannak ábrázolva. A kontroll és kezelt értékek különbsége ** Szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten, *** Szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten)

Csíranövények növekedésének vizsgálata eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokon

A csíranövény gyökér hossz növekedés gátlás mérése egy egyszerű módja a külsőleg alkalmazott ABA iránti érzékenység jellemzésének (Thole *et al.* 2014). Ez alapján jártunk el a kísérletünkben (**6. ábra**).

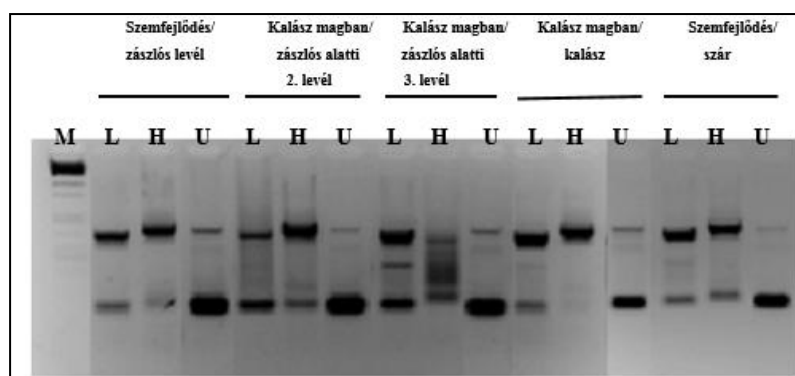


6. ábra: A csíranövények gyökérhossz növekedésének vizsgálata kontrollként szolgáló desztillált vízben és különböző ABA (10, 20 és 50 μM) koncentrációjú oldatokon nevelve. Átlag és +/- SD értékek vannak ábrázolva. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan térnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.

Az exogén ABA kezelésnél az alacsonyabb koncentrációknál figyelhetünk meg különbségeket. A Gk Élet fajta gyökérszete szignifikánsan kevésbé érzékeny a 10 és 20 μM ABA hormonkezelés növekedés visszatartó hatására, a többi genotípussal szemben. Hasonlóképpen viselkedtek a genotípusok az ismétlésként végzett további kísérletekben is. A két szárazság toleráns fajta és a Cappelle Desprez gyökérszete alul maradt a Gk Élettel szemben az alacsony ABA koncentrációk esetén.

Kontroll RT-PCR primerek alkalmazhatóságának tesztelése szárazságkezelt búzában

A célgénekkkel folytatott hiteles génexpressziós vizsgálathoz ún. konstitutív gének használatosak indító szekvenciaként, melyhez irodalmi adatok révén (Paolacci et al. 2009) jutottunk hozzá, s teszteltük azokat a búza mintáinkon (**7. ábra**).



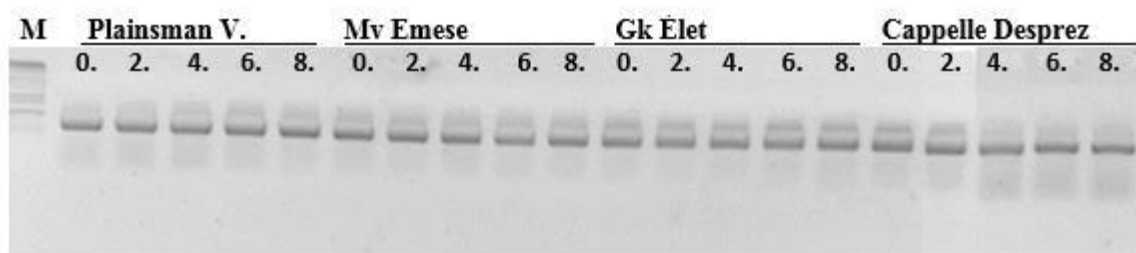
7. ábra: Három féle lehetséges kontroll primerrel végzett RT-PCR a búza hajtás különböző szerveiből vételezett mintákon. Jelölések: L – TaL Ka, Kb; H – TaH Ka, Kb; U – ubiquitin R3, F3 primerpárok, marker (M sáv).

A fentiek alapján elmondható, hogy TaH (*H) primer bizonyult a legstabilabban amplifikáló szekvenciának, amely az irodalmi adatok szerint is jól felhasználható a későbbi cDNS kiegyenlítésre.

Genomi DNS szennyezés ellenőrzése a cDNS mintákban

A szűréshez olyan célszekvencia szükséges, amely intront kell, hogy tartalmazzon, amely az mRNS érése során kivágódik. E szakaszok szűrése erre a célra tervezett primerekkel végzendő, amely esetünkben a TaG primer pár volt (Ciaffi et al. 2006).

Mivel itt a genomi célszekvencia alapján várt termék 618 bp, a cDNS-ről képződő termék pedig 266 bp nagyságú, a gélen látható (8. ábra) fragmentek alapján így megállapítható volt, hogy a cDNS-ek mentesek voltak a gDNS-től, nem tartalmazták az intron szekvenciát (8. ábra).

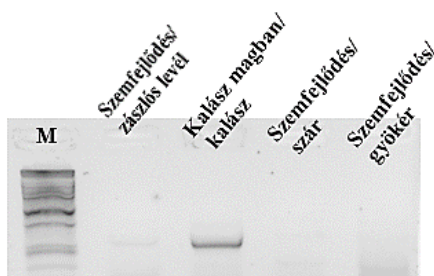


8. ábra: 2012 fitotron melletti szárított minták genomi DNS szűrése arra alkalmas primerekkel

TaSHN1 gén kifejeződésének vizsgálata a búza különböző szerveiben

Az *Arabidopsis* génekhez való hasonlóságot felhasználva más fajokban, esetünkben búzában mint haszonnövényben is vizsgálódhatunk génszinten.

Szekvencia homológia alapján BLAST program segítségével kiválasztottuk a búza adatbázisból a jelölt génünket (triDFLB: tplb0011g14), arra primereket. Célunk a szervenkénti megnyilvánulás tesztelése volt, amely már ismert lúdfűnél, ott főleg a virágzatban történik.



9. ábra: A búza különböző fejlődési fázisaiban vizsgált TaSHN1 gén expressziós mintázata.

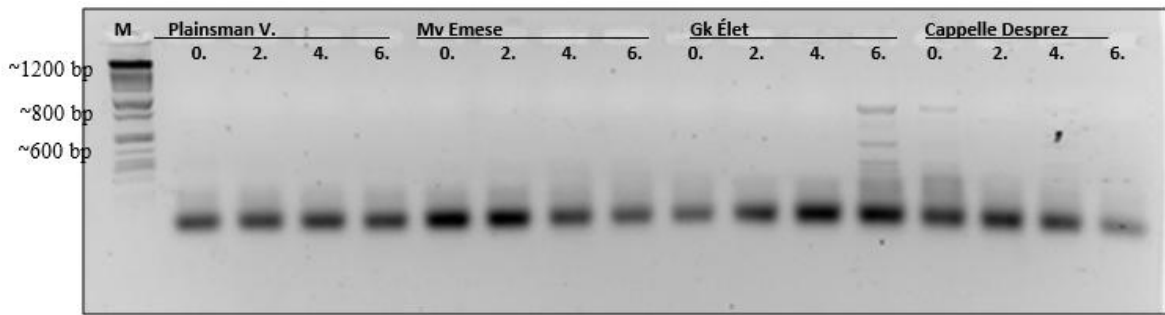
Marker (M sáv).

A gélképen jól látszik, hogy a szervek közül a kalászban nyilvánul meg a lúdfű WIN/SHN1 kutikuláris viaszokat szabályozó gén búza homológja (TaSHN1) a 'kalász magban' fejlődési állapotban.

Tehát elmondható, hogy a feltevésünk helytálló volt, az *Arabidopsis*-al homológ búza gén szintén főleg a virágzatban fejeződik ki, ami azt valószínűsíti, hogy ortológ, azaz hasonló funkcióval rendelkezik, mint a lúdfűnél.

A TaSHN1 gén kifejeződésének tesztelése vízhiányos búzákon

Mivel tanulmányaim fő irányvonala a búza szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó gének kutatása, így kézenfekvő volt, hogy a szárazságstresszelt búza növényekben is teszteljük az *Arabidopsis* WIN/SHN1-el homológ búza gént.



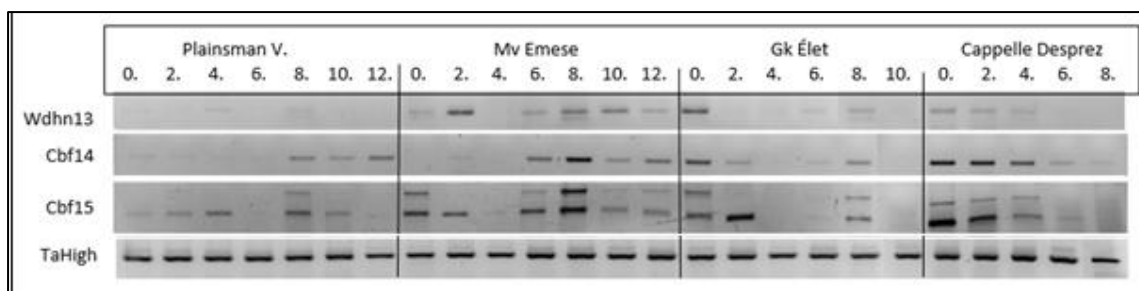
10. ábra: TaSHN1 gén primereivel (buSWk1 és buSWk2) végzett RT-PCR reakció géleképe szárított mintákon (2012 a/ kísérlet). Marker (M sáv).

A kísérlet során 618 bp hosszúságú génszakaszt váruunk, amely a fent látott **24. ábrán** nem detektálható. Az összes szárításos kísérlet esetében a géleképek „üresnek” mondhatóak voltak, vagyis a gén nem nyilvánult meg fokozottan a vízvesztés hatására (sőt két minta kivételével egyáltalán nem). Mivel a szárazságkezelt növények mindegyikén munkatársaim egyértelműen kimutatták a viaszoltság növekedését, feltételezhetjük, hogy azért más, a *TaSHN1* géntől különböző szabályozó gén lehet felelős.

A szárazságstressz alatt kifejeződő szabályozó és effektor gének további vizsgálata

A következőkben bemutatott kísérleteink arra irányultak, hogy az irodalmi adatok alapján szárazságstressz alatt búzában feltehetőleg megnyilvánuló gének kifejeződése miként változik a vízhiányos periódus alatt. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az esetleges változások összefüggésbe hozhatók-e a fajta szárazságtűrésének fokával, illetve a dehidrin gének és a CBF transzkripciós faktorok kifejeződése között van-e összefüggés.

Kísérleteinkben transzkripciós faktorokat, nevezetesen a CBF-eket (C-repeat binding factor) is vizsgáltunk, ugyanis e gének expresszióját a dehidrin gén indukciójához kapcsolják például a *Brachypodium distachyon* szárazság tolerancia válaszában (Ryu *et al.* 2014).

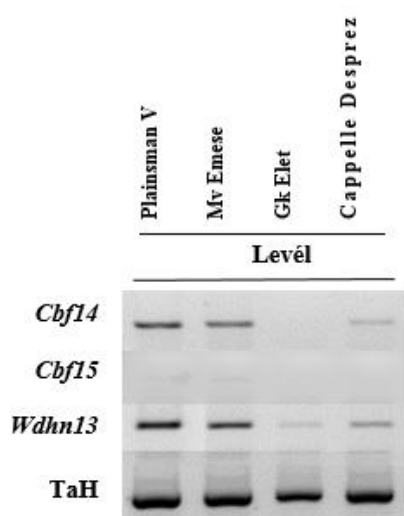


11. ábra: RT-PCR eredménye kétnaponta történő mintavételezéssel a négy genotípusnál, 2011a/ kísérletben szárított mintákon.

A *Cbf14*, *Cbf15* és a *Wdhn13* gének az Mv Emesénél indukálódtak legerősebben és kifejeződésük kisebb volt Plainsman V és Gk Élet esetében a szárításos kezelés késői fázisában (6-8 naptól). A *Wdhn13* alig detektálható Plainsman V-nél és az Mv Emesénél szintén alacsony szinten fejeződik ki (**11. ábra**). Az mRNA mennyiségben csökkenés figyelhető meg mindegyik génnél a Cappelle Desprez esetében. A *Cbf14*, *Cbf15* és *Wdhn13* gén expressziós változásaiban jelentős, de nem szigorú párhuzamot vélhetünk felfedezni.

Kísérleteink megmutatták, hogy a *Wdhn13*, *Cbf14* és *Cbf15* nagy vonalakban koordinált indukciója történik vízmegvonás alatt, ami az Mv Emese fajtában a legerőteljesebb. Ez az expresszió úgy tűnik, hogy két fázisú; a kezdeti kifejeződés után, majd a teljes vízmegvonás után kb. egy héttel fejeződnek ki újra a gének.

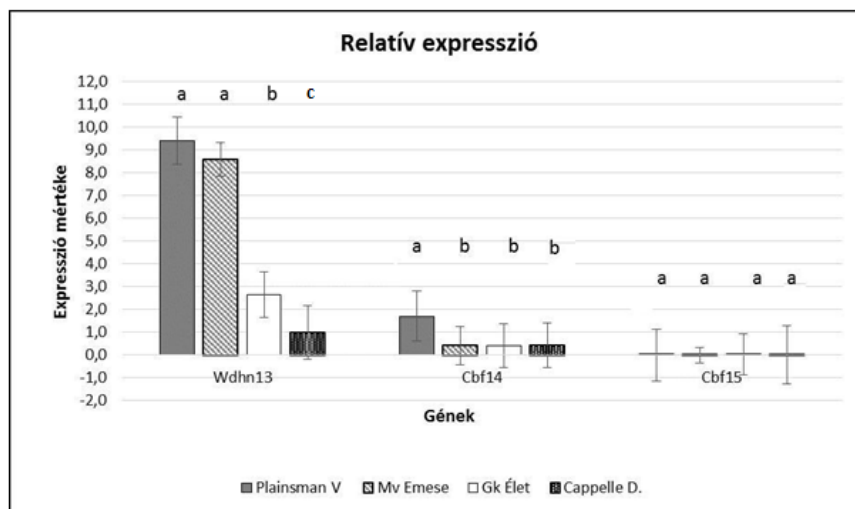
Nem stresszelt, fiatal búza növényeken végzett expressziós vizsgálat a szárazság stressz válaszban vélhetően szerepet játszó génekkel



12. ábra: Csíranövényeken végzett génexpressziós vizsgálat

A csíranövényekben a *Cbf14* expresszálódott, a *Cbf15* nem, ami nem várt eredmény volt a felnőtt, szárazság stresszelt növényeknél megfigyelt génkifejeződés ismeretében. A fenti eredményeink azt sugallják, hogy a két gént különböző mechanizmusok szabályozhatják szárazság stressz alatt is. Lehetséges, hogy a stresszhormon szint kismértékű ingadozásai indukálják a *Cbf14* és a *Wdhn13* expresszióját a fiatal növényekben. Kísérletünk kapcsolatot mutat a *Cbf14* és *Wdhn13* expressziója között.

A kísérletet megismételtük real-time PCR-el is, hogy megbizonyosodjunk a tapasztalt génkifejeződések mennyiségi viszonyait illetően, és hogy a szemi kvantitatív RT-PCR eredményeink valódiságát általában bizonyítani tudjuk (**13. ábra**).



13. ábra: Csíranövényeken végzett qPCR eredménye. Átlag és +/- SD értékek vannak ábrázolva. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan eltérnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.

A qPCR-el kapott eredmények nagy mértékben alátámasztják az RT-PCR-nél látott expressziós mintázatot (29. ábra). A legmagasabb expressziós szintet a *Wdhn13* gén esetében a toleráns genotípusoknál láthatjuk (Plainsman V, Mv Emese). A *Cbf14* génnel szemben a *Cbf15* génnél genotípustól függetlenül alacsony marad a kifejeződés. A qPCR eredményeket számszerűsítve elmondható, hogy a Plainsman V esetében a *Wdhn13* kifejeződése 9x-es, míg az Mv Emesénél ez 8,5x-os a másik két fajtához képest (Gk Élet, Cappelle Desprez).

A *Wdhn13* és a *Cbf14* koexpresszióját tekintve elmondható, hogy bár kifejeződési szintjük között vannak különbségek, viszont a *Cbf15* standard érték körüli megnyilvánulását alapul véve, a *Cbf14* kifejeződési szintje mégis jelentősnek mondható.

3.1. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Kimutattuk, hogy a Plainsman V fajta zászlós leveleiben vízhiányos stressz hatására a CO₂ koncentráció a vizsgált többi fajtánál erőteljesebben csökkent.
- Sikerült megbízhatóan működő kontroll géneket azonosítani búza RT-PCR és qPCR kísérletekhez, továbbá olyan genomi szennyeződés vizsgálatához alkalmas primerpárt alkalmaztunk, mellyel szűrhető a genomi DNS kontamináció búza cDNS mintákban.
- Teljes vízmegvonás alatt a *Wdhn13* dehidrin és a *Cbf14* és *Cbf15* transzkripciós faktor gének nagy vonalakban koordinált indukciója történt, ami az Mv Emese fajtában volt a legerőteljesebb. A génextpresszió két fázisú volt, a kezdeti kifejeződés után a gének kb egy héttel ismét megnyilvánultak. A *Wdhn13* gén expressziója nem stresszelt csíranövények levelében a toleráns fajtákra (Plainsman V, Mv Emese) volt jellemző. A *Cbf15* gén megnyilvánulása egyik fajta csíranövényeiben sem volt tapasztalható stresszmentes körülmények között.
- *in silico* azonosítottuk és klónoztuk a kutikula fejlődésért felelős *Arabidopsis* *WIN/SHN1* transzkripciós faktorról ortológ búza gént, és annak szervek szerinti kifejeződési mintázatát búzában meghatároztuk. További eredményeink szerint a gén a vízhiányos stressz hatására nem lépett működésbe egyik genotípus zászlós levelének középső régiójában sem.
- A vizsgált toleráns és érzékeny búza genotípusok között, gyökérnövekedés gátlás hatáson alapulva, az Élet fajta abszcizinsavra való relatív érzéketlenségét állapítottuk meg.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Vízhiány hatása a gázcserére

Az általunk vizsgált fajták közül a Plainsman V esetében figyeltünk meg Ci értékének csökkenését az első vízmegvonásos kezelés végén. Ezt az eredményt támasztják alá a Fábíán és munkatársai (2013) valamint Paul és munkatársai (2016) által végzett kísérletek is, amelyben vízhiánynak tettek ki általunk is vizsgált búza fajtákat. A szárazságérzékeny Cappelle Desprez fajta tekintetében saját adataink illetve Fábíán *et al.* (2013) eredményei között eltérés figyelhető meg, ugyanis ebben a genotípusban kísérleteink során mi nem detektáltunk csökkenést a Ci

értékekben. Fábrián és munkatársai (2013) kutatási eredményei tehát a Plainsman V fajta tulajdonságait tekintve egybevágtak a mi vizsgálatainkból leszűrhető következtetésekkel, megerősítik azt. A fentieket összegezve feltételezzük, hogy az általunk vizsgált genotípusok közül a szárazság toleráns Plainsman V növények az alkalmazott első vízhiányos periódus végén feltehetően tovább képesek voltak fenntartani a fotoszintetikus aktivitást, ami magasabb széndioxid fixációt és alacsonyabb Ci értékeket eredményezett.

Ozmotikus stressz hatásának vizsgálata

Számos tanulmány született a vízhiánnyal szembeni eltérő szenzitivitású gabonafélék ozmotikus stresszre adott válaszáiról. Guóth és munkatársai (2010) a szárazság toleráns Mv Emese illetve az általunk is vizsgált egyik érzékeny genotípus Gk Élet válaszait vizsgálták ozmotikus stresszre nézve, 400 mOsm-os polietilén-glikol mellett. Az Mv Emese vízpotenciálja kevésbé csökkent, de nem változott meg szignifikánsan a stressz körülmények között a 21 napig folyó kísérlet során. Szemben a Gk Élettel, ahol az eltérések szignifikánsak voltak. Továbbá a levél vízpotenciál értékek jellemzően alacsonyabb szintet mutattak a kontroll növényekhez képest.

A kísérleteinkben kapott eredmények összhangban vannak a fentiekben felvázoltakkal, miszerint a Gk Élet, szenzitív fajtaként erősebben reagált az ozmotikus stresszre, mint a toleráns Mv Emese genotípus. A Plainsman V toleráns fajtaként ismert genotípus az ozmotikus stresszt nem tűrte jól, így vélhetően más szárazságtűrési módszert alkalmaz.

Csíránövények gyökerének növekedése eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokban

Kísérleteink során a GK Élet fajta esetében intenzív növekedés volt megfigyelhető 10 és 20 μM -os hormon koncentrációnál, szemben a többi fajtával. Ez az ABA-ra való érzéketlenség valószínűleg hozzájárul a fajta alacsonyabb szárazságtűréséhez.

A gyökér növekedés ABA gátlására való érzéketlenségét Guóth és munkatársai is (2010) megfigyelték a GK Élet fajtáknál. A külsőleg alkalmazott PEG kezelés során azt tapasztalták, hogy az aránylag magas endogén ABA szint a GK Élet gyökér növekedését kevésbé gátolta, mint a toleráns Emese fajtánál.

WIN/SHN1 gén vizsgálata a búza fejlődési állapotaiban

Ismeretes, hogy az *Arabidopsis* kutikula kialakulásában nagy szerepet játszik a WAX *INDUCER/SHINE* (*WIN/SHN*) fehérje, mely egy az APETALA2/ERF típusú transzkripciós faktor (Aharoni *et al.* 2004). Broun és munkatársai (2004) lúdfűben vizsgálták a gén

kifejeződését. Az RT-PCR eredményeként a virágban találták annak a legnagyobb kifejeződését (a levélben és szárban megfigyelt kis mennyiségű géntermék mellett).

Szervekenkénti kifejeződési vizsgálataink szerint a *TaSHN1* gén kifejeződése a búza virágzatban magas volt. Mivel a virágrészek gyors fejlődése során a kutikula komponensek és a viaszok fokozott képződése is jellemző, az ebben szerepet játszó gének magas expressziója nem meglepő.

A búza *TaSHN1* gén kifejeződésének vizsgálata szárazságkezelt búzánál

Búzával folytatott kísérleteinkben szárazság stresszt alkalmaztunk négy genotípuson. Kíváncsiak voltunk, vajon a stresszkezelés során bekövetkező viaszfedettség növekedés együtt jár-e a *TaSHN1* gén esetleges indukciójával. Ezért a kontroll és stresszkezelt búzák zászlós leveleiből nyert mintákon a *WIN/SHN1*-el homológ búza génre (*TaSHN1*) specifikus RT-PCR reakciót végeztünk. A génexpressziós vizsgálat eredménye az volt, hogy nem kaptunk a tesztelt gén kifejeződésére utaló jelet egyik genotípus esetében sem.

Feltételezhető, hogy búzánál is helytálló hogy a *TaSHN1* génen kívül más szabályozó gének illetve transzkripciós faktorok játszhatnak jelentősebb szerepet a szárazság stressz indukált kutikula gyarapodás folyamatában.

Szárazság indukálta génexpresszió elemzése

A kiválasztott búza fajtákat az élettani méréseken kívül génexpressziós vizsgálatoknak is alávetettük. Az általunk vizsgált genotípusokkal több publikációban is találkozhatunk, amik egybevágnak a Plainsman V és Mv Emese toleráns illetve a Gk Élet és Cappelle Desprez szenzitív tulajdonságával vízhiányos stressz esetén (Guóth *et al.* 2009; Jäger *et al.* 2014).

Kísérleteink azt mutatták, hogy az Mv Emese fajtában vízhiánynál a *Wdhn13*, *Cbf14* és *Cbf15* gének nagy vonalakban koordinált kifejeződése történik. Ez a kifejeződés úgy tűnik, hogy két fázisú, a kezdeti (nem egyöntetű) expresszió lecsengését követően a teljes vízmegvonás után kb. egy héttel (a Cappel Desprez kivételével) újra indukálódtak a gének. Ez a második válaszgén kifejeződési maximum az Mv Emese fajta esetében volt a legkifejezettebb.

A *DHN* és a *Cbf* gének kifejeződése között több más esetben is párhuzamosságot mutattak ki (pl. Kume és munkatársai [2005] hideg stressz alkalmazása során). A *Wdhn13* gént több TF is szabályozza. A *Cbf* gének részvétele szárazságstressz alatt a *Wdhn13* gén

transzkripcionális szabályozásában jól egyezik az általunk kapott eredményekkel. A szárazság stresszelt búza növényekben a *Wdhn13* valószínűleg *Cbf* gének által szabályozott.

IRODALOMJEGYZÉK

AHARONI A., DIXIT S., JETTER R., THOENES E., VAN ARKEL G., PEREIRA A. (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(9): 2463–2480. p.

BROUN P., POINDEXTER P., OSBORNE E., JIANG C-Z., JOSE' LUIS RIECHMANN J. L. (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *PNAS*, 101:4706–4711- p.

CIAFFI M., PAOLACCI AR., D'ALOISIO E., TANZARELLA OA., PORCEDDU E. (2006) Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences. *Gene*, 366(2):209-18. p.

FÁBIÁN A., JÄGER K., BARNABÁS B. (2013) Developmental stage dependency of the effect of drought stress on photosynthesis in winter wheat (*triticum aestivum* L.) varieties. *Acta Agronomica Hungarica*, 61(1):13–21. p.

GUÓTH A., BENYÓ D., CSISZÁR J., GALLÉ Á., HORVAÁT F., CSEUZ L., ERDEI L., TARI I. (2010) Relationship between osmotic stress-induced abscisic acid accumulation, biomass production and plant growth in drought-tolerant and -sensitive wheat cultivars. *Acta Physiol Plant*, 32:719-727. p.

GUÓTH A., TARI I., GALLÉ Á., CSISZÁR J., PÉCSVÁRADI A., CSEUZ L., ERDEI L. (2009) Comparison of the Drought Stress Responses of Tolerant and Sensitive Wheat Cultivars During Grain Filling: Changes in Flag Leaf Photosynthetic Activity, ABA Levels, and Grain Yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2):167-176. p.

JÄGER K., MISKÓ A., FÁBIÁN A., DEÁK C., KISS-BÁBA E., POLGÁRI D., BARNABÁS B., PAPP I. (2015): Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the *Arabidopsis* leaf cuticle. *Biologia Plantarum*, 59(1):29-36. p.

JÄGER K. , FÁBIÁN A., EITEL G., SZABÓ L., DEÁK C. , BARNABÁS B., PAPP I. (2014) A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology*, 171(14):1256-1266. p.

KUME S., KOBAYASHI F., ISHIBASHI M., OHNO R., NAKAMURA C., TAKUMI S. (2005) Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. *Genes Genet Syst.*, 80(3):185-97. p.

MITTLER R. (2010) Abiotic stress. Stress-sensing mechanisms in plants. Early-aciting stress sensor provide the initial signal for the stress response. In: Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A. (Edit.) *Plant physiology and development*.

PAOLACCI A. R., TANZARELLA O. A., PORCEDDU E., CIAFFI M. (2009) Access Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10:11

PAUL K., PAUK J., DEÁK Z., SASS L., VASS I. (2016) Contrasting response of biomass and grain yield to severe drought in Cappelle Desprez and Plainsman V wheat cultivars. *Peer J*, 4 (1708):1-24. p.

RYU J. Y., HONG S. Y., JO S. H., WOO J.-C., LEE S., PARK C.-M. (2014) Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol*, 14:15

THOLE JM., BEISNER ER., LIU J., VENKOVA SV., STRADER LC. (2014) Abscisic Acid Regulates Root Elongation Through the Activities of Auxin and Ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3 (Bethesda)*, 4(7):1259-74. p.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓ

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Cs. Deák, K. Jäger, V. A. Nagy, R. Oszlányi, B. Barnabás, I. Papp (2016) C-repeat binding factor and dehydrin genes are induced co-ordinately in drought tolerance response of wheat cultivars (accepted)

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Cs. Deák, K. Jäger, A. Fábrián, V. Nagy, Zs. Albert, A. Miskó, B. Barnabás, I. Papp (2011) Investigation of physiological responses and leaf morphological traits of wheat genotypes with contrasting drought stress tolerance. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1):69-71

Cs. Deák, Katalin Jäger, Attila Fábrián, István Papp (2010) Low and high ways from post-transcriptional RNA regulation to drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 5(12): 1539 - 1542

További IF-es cikkek

K. Jäger, A. Fábrián, G. Eitel, L. Szabó, Cs. Deák, B. Barnabás, I. Papp (2014): A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress

K. Jäger, A. Miskó, A. Fábrián, Cs. Deák, A. Molnár, D. Polgári, B. Barnabás, I. Papp (2014): Expression of a WIN/SHN type regulator of wheat triggers disorganized proliferation of the Arabidopsis leaf cuticle. *Biologia Plantarum*

Konferencia összefoglalók („abstract”)

Cs. Deák, K. Jäger, V. Nagy, A. Fábrián, A. Miskó, Zs. Albert, B. Barnabás, I. Papp (2012): Morphological traits and physiological responses of four wheat genotypes with contrasting drought susceptibility. *Pannonian Plant Biotechnology Workshops Advances in Plant Breeding and Plant. Biotechnology in Central Europe*, Jun 4–6, 2012, Debrecen, Hungary

Book of Abstracts, pp 31-32