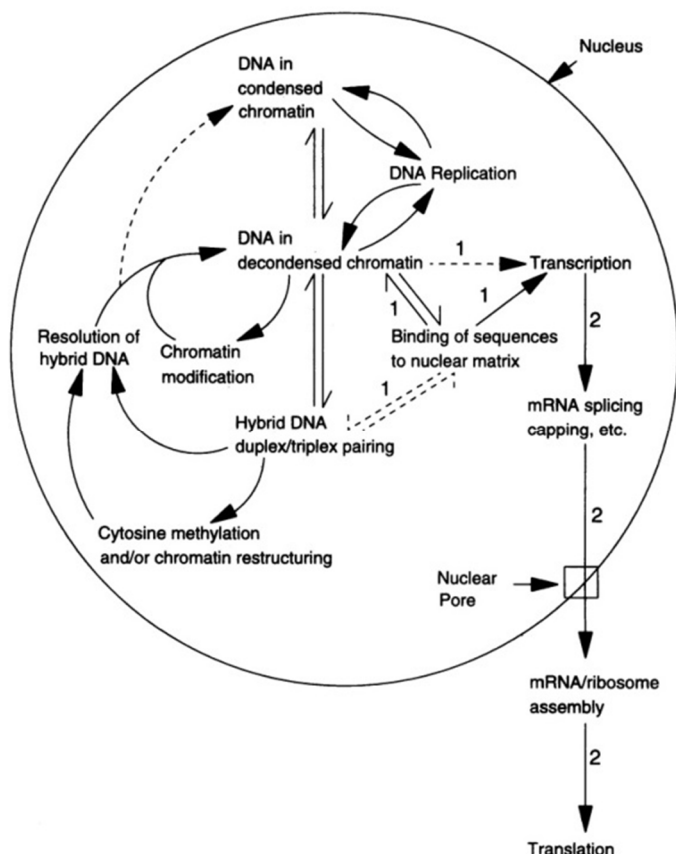


Válaszok Dr Szabados László bírálataira

Köszönöm doktori dolgozatomban alapos és szakértő bírálatát, valamint a feltett kérdéseket. A válaszomban első, áttekintést tartalmazó része az előadásomban is elhangzik.

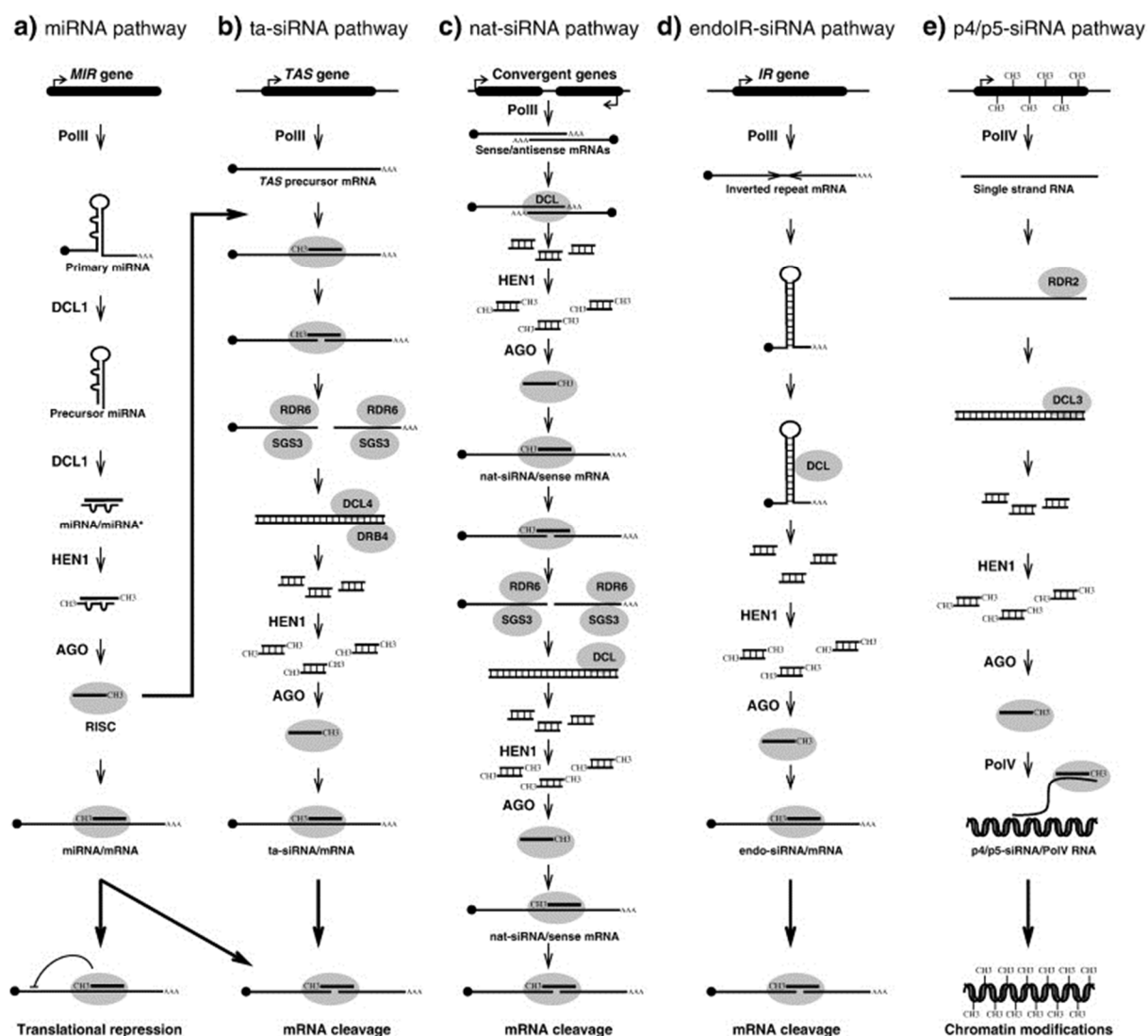
Melyek azok a területek, ahol a géncsendesítés mechanizmusának, szabályozásának korábbi és mostani modellje eltér illetve egyezik.

Az 1990-es évek végéig elterjedt nézet az volt, hogy a poszt-transzkripció géncsendesítés (PTGS) RNS szinten zajlik, míg a transzkripció géncsendesítésben (TGS) RNS részvételét kevesen feltételezték. A TGS jelenséget legtöbbször a kölcsönható homológ lokuszok fizikai kapcsolódásával magyarázták, de ektopikus DNS/DNS párosodás a PTGS modellekben is megjelent (pl Baulcombe and English 1996; Grant 1999; Matzke and Matzke 1990). Feltételezték, hogy szomatikus sejtekben, interfázisban a kromatin dekonzenzáció mellett DNS/DNS homológia keresési mechanizmus működik. Ezt a *Neurospora crassa* penészgombában működő RIP rendszer analógiája alapján képzelték el (Meyer 1996). A homológ DNS szakaszok hibrid DNS struktúrákat hoznának létre, ami a DNS illetve kromatin módosító enzimek működésével metilált DNS és represszív kromatin szerkezet kialakulását eredményezheti (TGS), vagy „aberráns RNS” átírását indukálja (PTGS). „Aberráns RNS”-ként a sejtmagon belül nem a megfelelő kompartmentben, nem a jellemző szekvencia kontextusban, vagy pl túlzott mennyiségben képződő mRNS-eket értettek. A nagy mennyiségben termelődő, és/vagy nem szabályos szerkezetű mRNS templátja lehet egy RNS függő RNS polimeráznak, ami antiszensz RNS szálat készít. Úgy gondolták, hogy antiszensz RNS származhat a természetes átírással ellentétes irányú promóter működéséből is. Az antiszensz RNS vagy a sejtmagban, vagy a citoplazmában a szensz mRNS szállhoz kapcsolódva annak lebomlását okozza, vagy gátolja működését (pl leolvasását). A szensz-antiszensz RNS duplex létrejöttét azonban direkt módon nem tudták kimutatni PTGS csendesített rendszerekben. Egy további korai hipotézis az volt, hogy a génkifejeződés gátlása vetélkedés eredménye valamilyen nem diffúzibilis, limitáló faktorért. Ilyen faktorként pl a sejtmagi mátrix elemeit, illetve a transzlációért vagy transzkripcióért felelős komponenseket feltételezték. Az 1. ábra egy korabeli modellt mutat be az inaktivált epigenetikus állapot továbbadásáról (TGS) illetve a csendesített gén mRNS-ének lebontásáról (PTGS). A modell hibrid DNS/DNS párosodáson, és a homológ szekvenciák sejtmagi mátrixhoz való kapcsolódásán alapul.



1. ábra Transz-inaktiváció (1: TGS) és ko-szuppresszió (2:PTGS) feltételezett mechanizmusai (Flavell 1994).

A korai elképzelések egyes elemei a mai géncsendesítési modellekben is megmaradtak. Ilyen pl az RNS függő RNS polimeráz részvétele, a dsRNS, DNS metiláció és represszív kromatin szerkezet jelentősége egyes folyamatokban. A géncsendesítés mechanizmusairól alkotott képünk a kis RNS-ek szabályozó szerepének felismerésével azonban gyökeresen megváltozott (Hamilton and Baulcombe 1999). A mai modellek sokkal pontosabb és részletesebb magyarázatát adják a géncsendesítés jelenségeinek. Mostani tudásunkkal elmondhatjuk, hogy a kölcsönható lokuszok korábban feltételezett DNS szintű kapcsolódása nem bizonyítható. „Aberráns RNS”-ek pedig részt vesznek egyes csendesítési folyamatokban, ezek azonban nem hibrid DNS templátról keletkeznek. A korábban feltételezettekkel ellentétben már tudjuk, hogy a TGS folyamata is RNS szabályozás alatt áll. A nem kódoló, döntően kisRNS-ek révén történő, ma ismert szerteágazó génszabályozási lehetőségeket Martinez de Alba és mtsai foglalták össze (2. ábra).

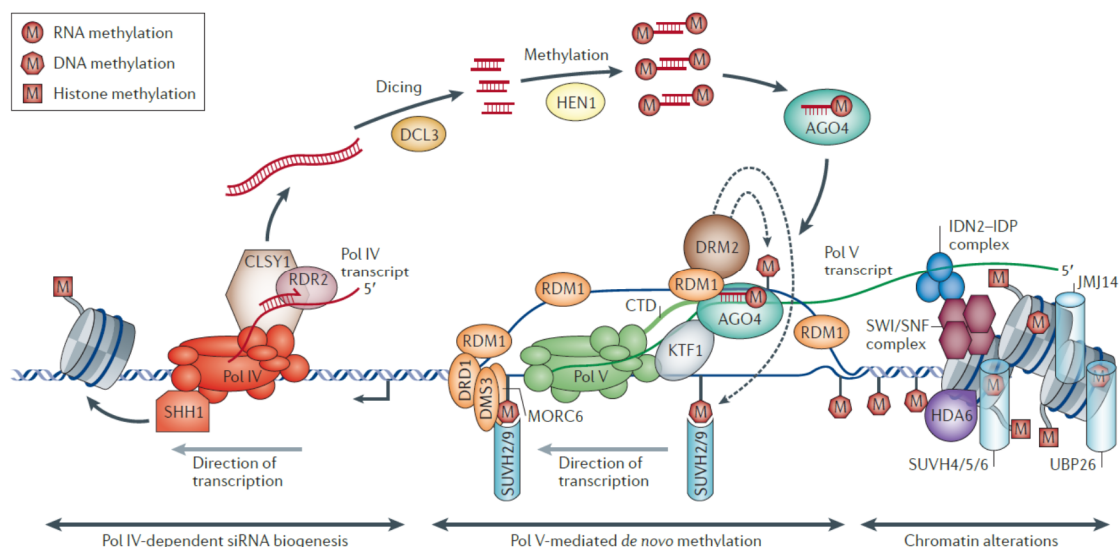


2. ábra miRNS (a) és siRNS (b-e) típusok képződésének és működésének összefoglalása (Martinez de Alba et al 2013).

A dolgozatom részét képező eredmények több ponton is kapcsolódnak a micro (mi)RNS-ek képzéséhez [a] ábrarész]. Az miRNS-eket kódoló *MIR* génekről primary miRNS-ek (pri miRNS-ek) íródnak át. A gének fordítottan ismétlődő szakaszai átírás után hajtú struktúrát vesznek fel. A pri-miRNS-ek érését, például az intronok kivágódását, a magi cap kötő komplex (Cap Binding Protein 20 és 80) valamint egy komplex részeként számos további kapcsolódó fehérje segíti. A képződő RNS prekuzort a DCL1 (DICER like 1) RNáz processzálja 21 nukleotid hosszú miRNS duplexekké. Ezek a 3' végükön metilálódnak (HEN1 metil transzferáz által), ami stabilizálja őket, majd a citoplazmába szállítódnak. Ott a duplex egyik szála AGO fehérjéhez kapcsolódva RISC komplexbe épül, ami azt a komplementer cél mRNS-hez kapcsolja. Ez vagy az mRNS hasítását, vagy transzlációjának gátlását eredményezi.

A dolgozatomban nem vizsgált ta-siRNS, nat-siRNS és endoIR-siRNS szabályozási útvonalakat [b-d] ábrarészek] itt nem részletezem. A heterokromatikus siRNS-ek képzését az e) ábrarész mutatja be. Ezek mai tudásunk szerint részt vesznek a TGS folyamatában döntő jelentőségű metilációs

mintázatok kialakításában. Ennek a folyamatnak a részletesebb áttekintését Matzke és Mosher (2014) alapján mutatom be (3. ábra).



3. ábra RNS függő DNS metiláció (RdDM) modell, amely tartalmazza a DNS és hiszton metiláció kialakulásának és fenntartásának lépéseit a kölcsönható lokuszok, képződő siRNS-ek és fehérje faktorok részvételével (Matzke and Mosher 2014).

A modell működése leegyszerűsítve: a csendesítő lokuszról Pol IV RNS polimeráz révén átíródó RNS szárból dsRNS (RDR2), majd DCL3 hasítással 24 nt siRNS-ek képződnek, amik egy AGO4-t tartalmazó fehérje komplex részeként a hozzájuk komplementer szekvenciájú naszcens, scaffold RNS-ekhez kapcsolódnak. Ezek a Pol V polimeráz termékei, amik kijelölik a cél lokuszt, ahol a fehérje komplex serkenti a DNS és hiszton metilációt. A Pol IV és Pol V polimerázok ugyanazon a szekvencián is működhetnek. Több RdDM cél szekvencia esetében is kimutatták a hiszton deacetiláció jelentőségét, valamint egyéb, represszív módosulásokat a kromatin szerkezetben. A modell érdekessége, hogy működése pozitív visszacsatolási lehetőségeket tartalmaz, azaz a már módosított (metilált) DNS és hisztonok további metilációt idéznek elő (DRM2). A SUVH2,9 fehérjék például a Pol V komplex kapcsolódását segítik már metilált DNS-hez. A hisztonokon történt módosítások jelentőségét mutatják Okano és mtsai (2008) eredményei, akik rizs gének és transz gének promótereit próbálták siRNS útján csendesíteni. Ennek során azt találták, hogy a DNS metilációja mellett a TGS-hez a heterokromatikus hiszton módosulások megjelenésére is szükség volt.

Hivatkozások:

Baulcombe DC, English JJ (1996) Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7(2):173-180(8)

Grant SR (1999) Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell*. 96(3):303-6

Matzke MA, Matzke AJM (1990) Gene interactions and epigenetic variation in transgenic plants. *Developmental Genetics* 11(3):214-223

Meyer P (1996) Repeat-induced gene silencing: common mechanisms in plants and fungi. Biol Chem Hoppe Seyler 377(2):87-95

Flavell RB (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(9):3490-6

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286(5441):950-2.)

Martínez de Alba AE, Elvira-Matelot E, Vaucheret H (2013) Gene silencing in plants: a diversity of pathways. BBA 1829(12):1300–1308

Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nat Rev Genet. 15(6):394-408.)

Okano Y, Miki D, Shimamoto K (2008) Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. Plant J. 53(1):65-77

Vannak-e olyan területek, ahol az újabb ismeretek fényében alapvetően újra kellett gondolni az korábbi adatok értelmezését?

A bemutatott modellek szerint is a géncsendesítés mechanizmusáról, szabályozásáról alkotott korábbi (1990-1999) és mostani elképzelésünk számos ponton eltér. Az új ismeretek alapján a kísérleti eredményeink egy részét ma már másként, vagy más hangsúlyokkal értelmezzük. Feltételeztük, hogy a megfigyelt DNS metiláció ok-okozati összefüggésben áll a TGS jelenségével. Ma már tudjuk, hogy a DNS metiláció nem elégséges feltétele a csendesítésnek, ahhoz hiszton módosítások is döntően hozzájárulnak. A megfigyelt metilációs mintázatban a szimmetrikus helyzetű citozinok domináltak. Ismertté vált azonban, hogy a RdDM elsődleges folyamataiban minden helyzetben metilálódnak citozinok, *de novo* metiláció hiányában azonban a fenntartó metilázok ezek közül csak a szimmetrikus helyzetűeket tartják meg. A TGS-ben résztvevő T-DNS-ek integrációs helyeinek elemzésekor (Eduardo Moscone FISH kísérletei nyomán) a H2, K81, 271 lokuszok rendre a dohány T1, T2 és T3 kromoszómáinak hosszú karjain voltak elhelyezhetők. Ez alapján feltételeztük, hogy a kölcsönható transzgének hasonló kromoszómális pozíciója a feltételezett interfázisos DNS/DNS párosodást könnyítheti meg. A hibrid DNS teória elvetésével ez a feltevés nem bizonyult fenntarthatónak.

A mai ismereteink alapján hogyan lehet magyarázni a CBC complex (illetve az RNS kötő fehérjék) szerepét az abszcizinsav jelátvitel módosításában, és ezen túl a szárazságtűrés szabályozásában, mi lehet a legvalószínűbb mechanizmus?

Az nCBC komplex működése a szárazságtűréshez vezető válaszok szabályozásában máig sincs teljesen feltárva. Jelenlegi ismereteink összhangban vannak azzal a feltételezéssel, hogy a komplex az abszcizinsav jelátvitel által befolyásolt módon az RNS processzálo mechanizmus részeként járul hozzá a szárazságtűrés összetett fenotípusához. Az nCBC komplextől a válaszokig vezető feltételezett molekuláris mechanizmusokat Silhavy Dániel 3., 4. és 5. kérdéseire adott válaszaimban is érintem. A

cbp80/abh1 mutáns zárósejtjeiben a kalcium szint emelkedés és a résztvevő ioncsatornák ABA válaszaik fokozottak voltak, endogén vagy exogén ABA hatására a sztómák gyorsabb záródását mutatták ki (Hugouvieux et al 2002). A *cbp20* mutáns dolgozatomban bemutatott bőrszöveti fenotípusa szintén kapcsolható az ABA hatásához. A paradicsom *sitiens* mutánsában és lúdfűben például az ABA a kutikula fejlődését és átjárhatóságát alapvetően módosította (Curvers et al 2010; Kosma et al 2009). Az nCBC-t követő jelátviteli lépésekben illetve a célgének kifejeződésének módosításában szerepelhet az átírás szintjének változása, alternatív splicing, a transzkriptumok miRNS (siRNS) általi szabályozása, valamint egyéb, még csak részben ismert génregulációs módok (pl lincRNS-eken keresztül). A kevés olyan gén közül, amelyek átírási szintje a *cbp80/abh1* mutánsban változott (Hugouvieux et al 2001), az AtPP2CA túltermelése részlegesen menteni tudta a mutáns ABA túlérzékeny fenotípusát (Kuhn et al 2006). Ez arra utal, hogy ez a gén szerepel az ABA nCBC által közvetített jelátviteli útjában. Több miRNS (pl. miR156, miR159, miR167, miR319) érett formájának mennyisége a *cbp* és *serrate* mutánsokban lecsökkent, a pri-miRNS szinteket pedig gyakran magasabbnak találták. Egyes esetekben (pl miR159a, miR162a, miR166b, miR168a, miR172b) ko-immunprecipitációval direkt módon is bizonyítani lehetett az miRNS prekursorok valamelyik nCBC fehérjéhez történő kapcsolódását (Kim et al 2008). Ez meggyőzően bizonyítja az nCBC komplex szerepét az miRNS-ek érésében. Ugyanebben a munkában azt találták, hogy az ABA hormon direkt módon növeli a lúdfű CBP20 és CBP80 fehérjék stabilitását, azok mennyiségét tehát poszttranszlációs úton szabályozza. Az abszcizinsavtól az nCBC komplexen át haladó jelátvitel egyes további lépéseit vizsgálva Kim és munkatársai (2008) kimutatták, hogy az ABA hatására egyébként indukálódó miR159 szintje a *cbp80/abh1* mutánsban nem nőtt meg, ami egybevág az nCBC komplex feltételezett funkciójával. A miR159 (egyik) célgénje az ABA válaszokat pozitívan szabályozó MYB33, amelynek mRNS szintje a mutánsokban megnő. Ez első látásra ellentmondásnak tűnik, ha az nCBC komplex működését az ABA stimulálja. A jelenség magyarázata lehet, hogy a jelátvitelnek ez az ága csírázás során az ABA válasz lecsengését segíti, a hormon homeosztázis és a meginduló növekedés érdekében. Feltételezik, hogy a MYB33 (és MYB101) célgének állhatnak a lúdfű nCBC mutánsok csírázáskori ABA túlérzékenységeinek hátterében. Fontosnak tartom ugyanakkor megjegyezni, hogy a *serrate* mutánsban (amely nem szárazságtűrő) a miR159 mennyisége alacsonyabb a *cbp* mutánsokénál, így már csak ezért sem valószínű, hogy ez a microRNS típus az nCBC mutánsok szárazságtűrő fenotípusának magyarázatául is szolgálhatna. Az nCBC mutánsokban megváltozott kifejeződésű miRNS-ek közül több olyat találunk, ami érintett lehet a növényi vízhiányos stressz válaszban (Covarrubias and Reyes 2010, Table 1). Ezek cél génjei változatos módon kapcsolhatók a stressz válaszokhoz, hatásukkal azonban a mutáns fenotípus egyszerű módon nem magyarázható. Lehetséges természetesen, hogy a vizsgálatokhoz használt módszerekkel egyelőre nem kimutatott, vagy még ismeretlen funkciójú miRNS-ek adnak majd ilyen magyarázatot. Ugyanakkor a lúdfűben bizonyítottan kifejeződő 2708 lincRNS jelentős részének (956-nak) expressziója változik a *cbp* mutánsokban (Liu et al 2012). Ismert továbbá, hogy a lincRNS-ek egy jelentős része stressz (pl szárazság) szabályozott (Di et al 2014). Biztosak lehetünk benne tehát, hogy a jövőben az nCBC komplex működési mechanizmusának újabb oldalait ismerhetjük még meg.

Hivatkozások:

Hugouvieux V, Murata Y, Young JJ, Kwak JM, Mackesy DZ, Schroeder JI (2002) Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiol.* 130(3):1276-87.

Curvers K, Seifi H, Mouille G, de Rycke R, Asselbergh B, Van Hecke A, Vanderschaeghe D, Höfte H, Callewaert N, Van Breusegem F, Höfte M (2010) Absciscic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 154(2):847-60.

Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, Joubès J, Jenks MA 2009 The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151(4):1918-29.

Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder J (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106:477-487.

Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol.* 140(1):127-39.

Kim S, Yang JY, Xu J, Jang IC, Prigge MJ, Chua NH (2008) Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant Cell Physiol.* 49(11):1634-44.

Covarrubias AA, Reyes JL. (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ.* 33(4):481-9.

Liu J, Jung C, Xu J, Wang H, Deng S, Bernad L, Arenas-Huertero C, Chua NH (2012) Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24(11):4333-45.

Di C, Yuan J, Wu Y, Li J, Lin H, Hu L, Zhang T, Qi Y, Gerstein MB, Guo Y, Lu ZJ. (2104) Characterization of stress-responsive lncRNAs in *Arabidopsis thaliana* by integrating expression, epigenetic and structural features. *Plant J.* 80(5):848-61.

A szárazságtűrés mellett a CBC complex befolyásolja-e másféle környezeti stresszhatásokkal (hideg, meleg, só, fény, nehéz fém, stb.) szembeni ellenállóképességet?

A közelmúltban Kong és munkatársai (2014) közöltek adatokat a magi cap kötő fehérjék szerepéről a lúdfű sótűrésében. A *cbp20*, *cbp80*, de különösen a *cbp20 cbp80* kettős mutánsok sótűrését a vad típusnál gyengébbnek találták. A vizsgálatokat proteomikai megközelítéssel egészítették ki, amik eredményei az nCBC komplex működésének legkevésbé ismert szintjére, az effektor komponensekre világítanak rá. Eredményeik szerint a mutánsok és a vad típusú lúdfű proteome-ja stressz mentes körülmények között 40, só kezelés hatására 77 fehérje esetében különbözött. Az így azonosított proteinek közül több ismert szerepű illetve jellemzően annotált fehérje sokrétű funkciót láthat el: pl. auxin jelátvitel, epigenetikus kromatin és hiszton módosítások, RNS szintézis, sumoyláció és ubiquitináció, alap és energia-metabolizmus, sejtszótódás, hormon és stresszválaszok, fehérje foszforilláció-defoszforilláció. A fehérje szintű változások több esetben megfigyelhetők voltak az mRNS-eken kimutatott alternatív splicing folyamatokkal. Stressz mentes állapotban és só stressz hatása alatt is megfigyelték például, hogy egy GST enzim szintje alacsonyabb, míg alternatív splicing-ja erősebb volt a mutánsokban. A mutánsokban a vad típushoz képest a prolin szint sóstressz mellett kisebb emelkedést mutatott, míg a bioszintézisében részt vevő P5CS1 [Δ (1)-Pyrroline-5-Carboxylate

Synthetase 1] gén korrekt transzkriptum szintje nem, csak alternatív splice variánsainak mennyisége emelkedett meg. A proteome adatokból kiindulva kísérletesen igazolták, hogy a mutánsokban sóstressz hatására a fehérjék sumoylációja és ubiquitinációja kisebb mértékű volt, mint a vad típusban. Mindezen adatok alapján a sótűrészhez vezető biokémiai és élettani válaszok kialakulásában az nCBC komplex kulcsszerepet játszik.

Hivatkozás:

Kong X, Ma L, Yang L, Chen Q, Xiang N, Yang Y, Hu X (2014) Quantitative proteomics analysis reveals that the nuclear cap-binding complex proteins arabidopsis CBP20 and CBP80 modulate the salt stress response. J Proteome Res. 2;13(5):2495-510.

Nem arról van szó, hogy mivel a vegyes ültetési kísérlet cserépben történt, a rendelkezésre álló, korlátozott földmennyiséget a gyorsabban párologtató növények gyorsabban szárították ki, ezért a víztakarékos mutánsok előnye nem tudott megnyilvánulni? Ebben az esetben viszont elképzelhető, hogy szántóföldön, ahol nem szűk, korlátozott víztartalmú cserépben nevelt növényekről és ezen kívül monokultúráról van szó, egy hasonló stratégiával rendelkező mutáns, fajta felmutathat bizonyos szárazságtűrést, hisz a csökkentett párologtatás, vízfelhasználás segítheti a növények túlélését.

Egyetértek a Bíráló megjegyzésével. Egy víztakarékos faj/fajta szántóföldi környezetben, monokultúra esetén véleményem szerint is felmutathat akár jelentős mértékű szárazságtűrést. A megfigyelt jelenség pl a gyomosodás egyik élettani hatását mutathatja, illetve olyan társulások, vagy polikultúras termesztési rendszerek esetében van jelentősége, ahol több, különböző vízfelhasználási stratégiájú faj fejlődik egymás mellett (ld pl. Fotelli et al 2001). Ahhoz, hogy a leírt kölcsönhatás létrejöhön átfedő gyökérzetre van szükség, ami szomszédos növények között például fás társulásokban vagy más esetekben is a termesztés során gyakran teljesül. A szántóföldön rendelkezésre álló talajvíz készlet legtöbbször korlátozott. Kísérleti összeállításunk nyilván sarkítja ezt a korlátot, amivel a versengő növények közötti kölcsönhatást markáns módon tudtuk kimutatni. Ez nyilván csak egy szempontból és túlzó módon modellezi a szántóföldön is megjelenő összefüggéseket, ahogyan azt egy másik Bírálóm kérdésére válaszolva is kifejttem.

Hivatkozás:

Fotelli MN, Geßler A, Peuke AD, Rennenberg H. (2001) Drought affects the competitive interactions between *Fagus sylvatica* seedlings and an early successional species, *Rubus fruticosus*: responses of growth, water status and $\delta^{13}\text{C}$ composition. New Phytologist, 151:427–435.

Van-e kísérletes adat a vizsgált mutánsok vagy hasonló stratégiával rendelkező növények szántóföldi eredményeiről?

A vizsgált mutánsokhoz hasonló, transzgénikus módon létrehozott burgonya vonal esetében van irodalmi utalás szántóföldi kísérletekre, erre egy következő kérdésre adott válaszban térek majd ki. A víztakarékos *cbp* mutánsok szárazságtűrése visszafogott gázcseréjükön alapul. A növények

szárazságtűrési stratégiája alapulhat a párologtatás csökkentésén, ami többek között intenzív sztóma szabályozással történhet (izohidrikus növények). A másik véglet a vízpazarló (anizohidrikus) stratégia, amely a gázcsere nyílások zárását korlátozottabban használja, a növény vízpotenciálját vízhiány esetén csökkenteni engedi. A növények többsége a két véglet közötti válaszokat mutat, az nCBC mutációk a viselkedést izohidrikus irányba tolták el. Több fajon belül is a fajták, genotípusok viselkedése jelentősen eltérhet. Jól dokumentáltak például a szőlő fajták ilyen különbségei (pl Hochberg et al 2013), de például nyárfa (Almeida-Rodriguez et al 2010) illetve búza esetén is jelentős eltéréseket találtak (Schoppach and Sadok 2012; Gallé et al 2013). Az eltérő stratégiák eredményessége több tényezőtől függ. Általánosan elfogadott, hogy mérsékelt vízhiány esetén az anizohidrikus stratégia eredményesebb, míg erős szárazságban az izohidrikus növények teljesítenek jobban. Ennek oka az, hogy az anizohidrikus viselkedés során a sztómák tökéletlen/későbbi záródása mellett a fotoszintetikus aktivitást tovább fent tudja tartani a növény, bár vízpotenciálja e közben csökken. Fotoasszimilátumokra való fokozott igény esetén, például virágzáskor, terméskötéskor, terméssel erősen terhelt állapotban a növények növelik az anizohidrikus viselkedés arányát – később zárják a gázcsere nyílásokat. Ezért vízigényük nő, vízhiány esetén a vízpotenciál csökkenés veszélye fokozott, a vízhiányra érzékenyebbé válnak (Sadras and Trentacoste 2011).

Hivatkozások:

Hochberg U, Degu A, Fait A, Rachmilevitch S. (2013) Near isohydric grapevine cultivar displays higher photosynthetic efficiency and photorespiration rates under drought stress as compared with near anisohydric grapevine cultivar. *Physiol Plant*. 147(4):443-52.

Almeida-Rodriguez AM, Cooke JE, Yeh F, Zwiazek JJ. (2010) Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiol Plant*. 140(4):321-33.

Schoppach R, Sadok W (2012) Differential sensitivities of transpiration to evaporative demand and soil water deficit among wheat elite cultivars indicate different strategies for drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 84:1-10.

Gallé Á, Csiszár J, Benyó D, Laskay G, Leviczky T, Erdei L, Tari I. (2013) Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: biosynthesis and function of ABA in stress responses. *J Plant Physiol*. 1;170(16):1389-99.

Sadras VO, Trentacoste ER. (2011) Phenotypic plasticity of stem water potential correlates with crop load in horticultural trees. *Tree Physiol*. 31(5):494-9.

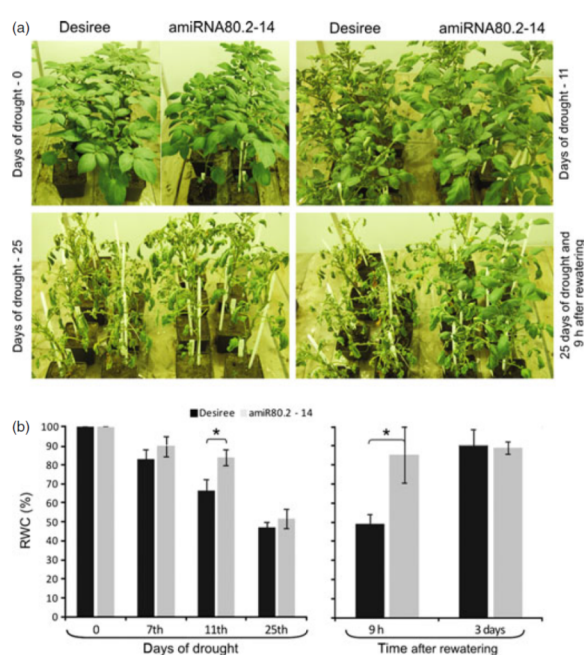
Milyen mértékű volt az előállított paradicsom illetve burgonya vonalak CBP20 valamint CBP80 génjeinek csendesítése? Milyen módszerekkel mérték a kapott vonalak szárazságtűrését? Elképzelhető-e, hogy egy alacsony transzkript szint elegendő a CBC aktivitásának fenntartásához, és emiatt nem kaptak az Arabidopsis mutánsokhoz hasonló eredményt?

Dolgozatom eredményeinek megvitatása során néhány mondatban említettem a paradicsom CBP20 génjének csendesítésére tett kísérletünket. Erre vonatkozó tételt dolgozatom „Új tudományos eredményei” azonban nem tartalmaznak. Kérem, Bírálóm vegye itt figyelembe válaszomat Silhavy

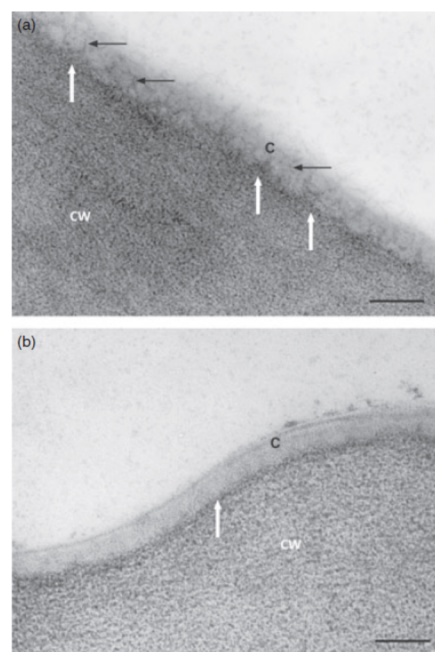
Dániel hasonló kérdésére. Burgonya transzformációs kísérlet, illetve a *CBP80* gén csendesítésére irányuló munka a dolgozatomban nem szerepel.

Más laboratóriumok tudták-e bizonyítani a CBC komplexel kapcsolatos genetikai módosítások hasznosíthatóságát? A modellnövényeken kapott, a CBC-vel kapcsolatos ismeretek alapján milyen stratégiával, módszerrel lehetne a haszon növények szárazságtűrését javítani?

Pieczynski és munkatársai (2013) közöltek eredményeket burgonya *CBP80* gén csendesítési kísérletükről. A gént mesterséges miRNS-t termelő transzgén segítségével csendesíteni tudták. Ez a beavatkozás a transzformált burgonya vonalak szárazságstressz toleranciáját javítani volt képes (4. ábra). A csendesítés a lúdfű nCBC mutáns fenotípushoz hasonló változásokat idézett elő a transzgénikus burgonya növény levélszőrözöttségét, sztóma sűrűségét és azok ABA érzékenységét, valamint a kutikula struktúráját tekintve. A vizsgálatok során a *CBP80* csendesített burgonya levél kutikuláját kompaktabbnak találták, és az a vad típusal ellentétben mikrocsatornákat nem tartalmazott (5. ábra).



4. ábra Vad típusú és *CBP80* csendesített burgonya vonal fenotípusa (a) és RWC értékei (b) szárítás és újraöntözés során (Pieczynski et al 2012, Figure 2).



5. ábra Vad típusú (a) és *CBP80* csendesített (b) burgonya levél adaxiális felszínének TEM felvételei (Pieczynski et al 2012, Figure 5). c – kutikula, cw – sejtfal, nyilak – mikrocsatornák a kutikulában, vonal: 100 nm

A kísérlet bizonyította, hogy legalábbis ebben a haszonnövényben a *CBP80* funkció kiesése képes volt az ABA jelátvitel módosítása mellett a szárazságtűrést is megnövelni.

Hogy a mai nemesítési gyakorlatban közvetlenül alkalmazható nCBC mutáns vonalakat kapjunk, a fenti kísérletekben alkalmazott transzgenezis helyett más biotechnológiai stratégiát kellene alkalmazni. Mivel az elérni kívánt tulajdonság egy gén funkciójának elvesztésével jön létre, ez idegen DNS beépítése nélkül is megvalósítható. Az erre alkalmas módszereket illetve biotechnológiai eljárásokat egy későbbi kérdésre adott válaszban ismertetem.

Az nCBC mutánsok ismert tulajdonságait figyelembe véve, az így előállított mutánsok stressz toleranciáját (például sótűrését) kiemelten vizsgálni kell majd.

Hivatkozás:

Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzeslowska M, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. (2013) Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnol J.* 11(4):459-69.

A dolgozat megírása, beadása óta eltelt időszakban születtek-e olyan előzetes eredmények, amelyek alapján valószínűsíthető, hogy az Arabidopsis rendszer alkalmas lesz az alma kutikula gének funkcionális analízisére?

A dolgozatban említett, alma *MdLACERATA1* transzgént túltermelő lúdfű vonalak előzetes vizsgálatai során a kutikula permeabilitásában illetve sötét adaptált vízvesztésében nem találtunk a vad típustól való eltérést. További kísérletekben a kutikula ultrastruktúráját tervezzük összehasonlítani a vad típussal transzmissziós elektron mikroszkóp (TEM) segítségével. A SALK mutáns gyűjteményből beszereztünk egy, a lúdfű *Lacerata* gént érintő T-DNS knock-out vonalat későbbi komplementációs kísérletek céljára. Az *MdLCR1* és *TaSHN1* túltermelő vonalak keresztezésével létre kívánunk hozni továbbá kettős transzgenikus növényeket, amelyek kutikuláris fenotípusa szerencsés esetben utalhat az *MdLCR1* gén funkciójára.

Az *Arabidopsis* rendszer alkalmasságát más fajból származó kutikula gének funkcionális vizsgálataira számos esetben bizonyították. A módszer a haszonnövények génjeinek jellemzésében mára rutinszerűnek mondható. Csak két friss példát említek erre: Declercq és munkatársai (2014) két cseresznye (*PaLACS2*, *PaATT1*), Wang és munkatársai (2015) egy uborka (*WAX2*) kutikula képződéssel kapcsolatos gén jellemzésére használtak lúdfű heterológ expressziót.

Hivatkozások:

Declercq M, Alkio M, Sprink T, Schreiber L, Knoche M. (2014) Effect of sweet cherry genes *PaLACS2* and *PaATT1* on cuticle deposition, composition and permeability in *Arabidopsis*. *Tree Genetics & Genomes* 10(6):1711-1721

Wang W, Liu X, Gai X, Ren J, Liu X, Cai Y, Wang Q, Ren H. (2015) *Cucumis sativus* L. *WAX2* Plays a Pivotal Role in Wax Biosynthesis, Influencing Pollen Fertility and Plant Biotic and Abiotic Stress Responses. *Plant Cell Physiol.* 56(7):1339-54.

Az irodalmi adatok, esetleg saját megfigyelések alapján meg lehet-e határozni, el lehet-e különíteni olyan növény rendszertani csoportokat, amelyeknél a kutikula szerepe meghatározó a stressztűrés szempontjából?

Nem látok összefüggést a kutikula stressztűrésben betöltött meghatározó szerepe és rendszertani kategóriák között, az inkább a tolerancia mechanizmusokkal függhet össze. Úgy gondolom, hogy a szárazságtűrésben a vízhiányra dinamikusán reagáló, a gázcserenyílásokat gyorsan záró fajokban, fajtákban lehet fontos a kutikula vízáteresztő képessége. Ezen belül is ott lehet jelentős a viasz képződés szerepe a víz visszatartásban, ahol a kutikula egyébként kevésbé fejlett, permeábilisabb. Más esetekben a termelődő viaszok fő funkciója a beeső napsugárzás szétszórása, ezáltal a növény túlzott felmelegedésének elkerülése. Relaxált sztóma válasz esetén a perisztómás párologtatás jelentősége kisebb, a fényvisszaverő funkció még inkább előtérbe kerül.

A vizsgálatok során klónozták és jellemezték a búza TaeSHN1 génjét, ami nagyfokú hasonlóságot mutat az Arabidopsis kutikulájának kialakulását szabályozó WIN/SHN transzkripció faktorokhoz. A gén expressziójának vizsgálatakor kiemelik, hogy csak a virágzatban találtak transzkriptet (81. oldal), ugyanakkor a 44. ábra arról tanúskodik, hogy a 3. levél hüvely által takart régióban is van gén kifejeződés. Ez az ellentmondás némi magyarázatra szorul.

A szervenkénti génkifejeződés vizsgálatánál a levél mintát (az ilyenkor szokásos módon) a zászlóslevél levéllemez közepi régióból vettük. Ez megfelelő volt a gén NCBI adatbázisban szereplő EST profiljával való összehasonlításhoz, ahol az RNS minták szintén nagy valószínűséggel a levéllemeznek ugyanebből a régiójából származtak. Az így végzett, szervenkénti RNS profil összehasonlítás a gén ortológ funkcióját valószínűsítette. A későbbiekben, amikor a funkcióhoz kapcsolódóan finomabb felbontásban is szeretnénk volna génexpressziós adatokat nyerni, már nemcsak a levéllemez közepéről, hanem a levélhüvellyel takart régióból is tisztítottunk RNS-t.

A TaeSHN1 túltermelő transzgenikus növények vízvesztése nagyobb volt mint a vad típusú Arabidopsis vonalaké, ami pont ellentétes az Arabidopsis saját WIN/SHN1 génjének túltermeltetése során kapott eredményekkel.

Mind a búza ortológ, mind a lúdfű saját WIN/SHN1 gének növelték a levelek sötét adaptált vízvesztését, a kutikula vízre való permeabilitását (ld saját eredményeink; Broun et al 2004; Aharoni et al 2004). A TaSHN1 transzgenikus növények szárazságtűrése nem különbözött a vad típusú növényekétől, míg a lúdfű saját WIN/SHN1 génjének túltermeltetése a szárazságtoleranciát növelte. A búza transzgén esetében ez (a kutikula tulajdonságait tekintve) nem váratlan eredmény, a lúdfű WIN/SHN1 gén esetében azonban azt jelenti, hogy a fokozott szárazságtűrési fenotípus nem a kutikuláris tulajdonságokkal, hanem mással magyarázható. Ezért született meg az a feltételezés, hogy a túltermelő növények csökkent sztóma sűrűsége állhat a stressz tolerancia háterében (Yang et al 2011). A magam részéről azonban úgy gondolom, hogy az egyes WIN/SHN gének transzgenikus kifejezésekor jelentkező, szárazságtűrést fokozó hatás magyarázatát eddig még nem sikerült megtalálni.

Hivatkozások:

Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL. (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(13):4706-11.

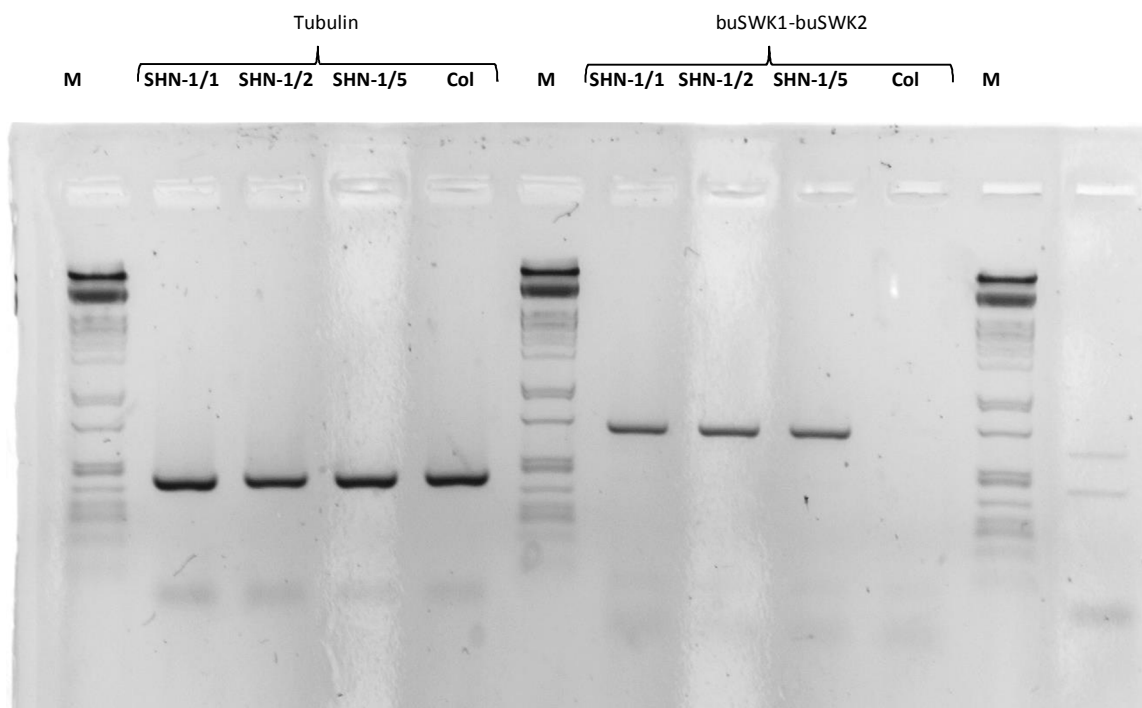
Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A. (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* 16(9):2463-80.

Yang J, Isabel Ordiz M, Jaworski JG, Beachy RN. (2011) Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. *Plant Physiol Biochem*. 49:1448-55.

Az Arabidopsis WIN/SHN1 illetve a búza TaeSHN1 túltermelő vonalakat egy kísérletben hasonlították össze, vagy ezek független irodalmi adatok? Változott-e az Arabidopsis saját WIN/SHN1 génjének transzkript szintje a TaeSHN1 gént túltermelő vonalakban? Elképzelhető-e hogy a tapasztalt fenotípus valamilyen géncsendesítés, interferencia következménye?

Az *Arabidopsis* WIN/SHN1 gént túltermelő vonalak tulajdonságait irodalmi forrásból ismerjük, míg a búza ortológ génre nézve saját kísérleteink eredményei állnak rendelkezésünkre.

A lúdfű saját WIN/SHN1 génjének kifejeződését nem vizsgáltuk, de nem tartom valószínűnek, hogy géncsendesítés lépett volna fel a búza transzgén hatására. Csendesítés esetében a transzgén kifejeződése is lecsökkent volna, azonban annak kifejeződését RT-PCR-el ki tudtuk mutatni (6. ábra).



6. ábra *TaSHN1* transzgénikus és vad típusú lúdfű vonalak RT-PCR analízise, M: molekulásúly marker, buSWK1 és buSWK2: *TaSHN1*-re specifikus primerek (várt fragment hosszak: tubulin4 gén 426 bp, *TaSHN1* gén 702 bp).

A kapott eredmények alapján úgy tűnik, hogy a búza TaeSHN1 génnek funkcióját búzában, vagy legalábbis egyszikű fűfélékben (pl. rizs, brachipodium) célszerű vizsgálni. Van-e ilyen kutatási programjuk esetleg eredményük? A rizs vagy Brachipodium mutáns gyűjteményekben hozzáférhető-e SHN1 mutáns? Ha igen, van-e a mutációhoz kapcsolható funkcionális adat?

Olyan saját, folyamatban levő kutatási programunk, amely a *WIN/SHN* génnek szerepét fűfélékben vizsgálná nincsen. A gabonafélék ilyen mutánsaival, illetve túltermelő vagy csendesített vonalakkal kapcsolatban azonban hozzáférhetőek irodalmi adatok. Taketa és munkatársai (2008) az árpa csupasz szemtermés fejlődését meghatározó génként (*Nud*) egy *WIN/SHN* családba tartozó transzkripciósfaktort azonosítottak. Eredményeik szerint a gén működésének hatására a szemtermés felszínén a fejlődés során egy lipid réteg képződik, ami a pericarium és a pelyva összetapadását segíti elő. Ennek hiányában alakul ki a csupasz szemtermés fenotípusa. Rizsben a *WIN/SHN* géncsalád 4 tagját azonosították, amik közül kettőt funkcionálisan is jellemeztek. Az *OsWR1* szekvenciája a leghasonlóbb a lúdfű *WIN/SHN1* génhez (Wang et al 2012). Túltermelése rizsben a kutikula permeabilitás csökkenése mellett a szárazságtűrés növekedését okozta. A géncsökkentett fenotípus ennek ellenkezője volt. A túltermelő vonalakban a viasz bioszintézishez, de más, stressz toleranciához kapcsolható gének indukcióját is okozta. Hasonló fenotípust eredményezett rizsben az *OsWR2* gén túltermelése is (Zhou et al 2014). Mindkét *OsWR* gén esetében a túltermelő növények stressztűrése javult, míg növekedésük visszafogottabb volt a vad típusnál. Az *OsWR2* a viaszok mellett a kutin bioszintézisét is serkentette. Érdekes eredményt hozott a lúdfű *WIN/SHN2* transzgén kifejezése rizsben. A viaszoltóság és stressztűrés fokozódása mellett a transzgénikus növények sejtfalának összetétele is megváltozott. A cellulóz mennyisége nőtt, míg a lignin csökkent (Ambavaram et al 2011). A szerzők közleményükben a transzgénikus módosítás lehetséges biotechnológiai hasznosíthatóságát emelik ki.

Hivatkozások:

Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, Kanamori H, Kawasaki S, Takeda K. (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4062-4067.

Wang Y, Wan L, Zhang L, Zhang Z, Zhang H, Quan R, Zhou S, Huang R. (2012) An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol Biol.* 78(3):275-88.

Zhou X, Jenks MA, Liu J, Liu A, Zhang X, Xiang J, Zou J, Peng Y, Chen, X. (2014) Overexpression of transcription factor OsWR2 regulates wax and cutin biosynthesis in rice and enhances its tolerance to water deficit. *Plant Molecular Biology Reporter* 32(3):719-731.

Ambavaram MM, Krishnan A, Trijatmiko KR, Pereira A. (2011) Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. *Plant Physiol.* 155(2):916-31.

A haszonnövényekben is alkalmazható módszerek közül milyen technológiák azok amelyek célszerűek lehetnek a vizsgált tulajdonságok megváltoztatása céljából? A klasszikus GMO alkalmazása nemesítési célokra politikai okokból jelenleg kizárt. Ugyanakkor több olyan újabb módszer is rendelkezésre áll, ami genetikai transzformáció nélkül is alkalmazható alkalmazott kutatások céljaira (TILLING, Eco TILLING, Genom editing, etc.). Véleménye szerint milyen stratégia, technológia alkalmazása lenne célszerű illetve reális a vizsgált, gazdasági szempontból is jelentős tulajdonságok javítása érdekében?

A vizsgált tulajdonságok közül a sejtmagi cap kötő komplex funkcióvesztéses mutánsai által mutatott fokozott szárazságtűrést és visszafogott vízvesztést kézenfekvő lenne haszonnövényekben indukálni. Az ún. „Új növénynemesítési technikák” közül több is alkalmazható a kívánt genetikai változás elérésére (Lusser et al 2011). A dolgozatomban szereplő RNS függő DNS metiláció (RdDM) technikát egyelőre még csak ilyen irányú kísérletekben alkalmazzák, fajta előállításra kevésbé. A dolgozatomban szintén szereplő RNS interferencia alapú géncsendesítési módszerrel (cisz-genezis) viszont sikeresen állítottak elő a gumó barnulásában (egy polifenol oxidáz gén működésében) és az aszparagin bioszintézisben gátolt burgonyát (Chawla et al 2012). Ezt a fajtát (Innate™) 2014 őszén az USA-ban köztermesztésbe vonáshoz szükséges engedélyre jelentették be, és az FDA nem GMO státuszúnak ismerte el. Míg az ilyen cisz-genezissel létrehozott változatok az USA-ban szabad utat kaptak, ezek, és az egyéb módosított genomú (de nem transzgénikus) haszonnövények megítélése (és szabályozása) az EU-ban egyelőre még kérdéses.



7. ábra Innate Russet Burbank (balra) és Russett Burbank (jobbra) burgonyagumók 30 perccel hámozás után.

A növényi genomok célzott szerkesztésének egyéb lehetőségei közül a cink ujj nukleáz technológia, a TALE vagy CRISPR/Cas nukleázok alkalmazása vagy a szintetikus oligonukleotidokkal indukált mutagenézis is alkalmas lehet az általunk kívánt mutáció létrehozására.

Hivatkozások:

Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E. (2011) New Plant Breeding Techniques: State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development European Commission's Joint Research Centre (JRC) Institute

Chawla R, Shakya R, Rommens CM. (2012) Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. Plant Biotechnol J. 10(8):913-24.

További megjegyzések, kérdések.

A dolgozatom szerkesztésével kapcsolatos kritikákat jogosnak ismerem el, azokat elfogadom.

A 20. oldalon az *Arabidopsis LACERATA* gén által kódolt CYP86A8 enzim aktivitásáról ír (zsírsav hidroxiláció), és illusztrációként a 6. Ábrára hivatkozik. A 21. oldalon lévő 6. ábra a *lacerata* mutáns fenotípusát mutatja be, viszont az említett zsírsav oxidáció illusztrációja hiányzik.

A LACERATA fehérje funkcióját az idézett Wellesen és munkatársai (2001) élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) bizonyították. A heterológ rendszerben kifejezett fehérje ^{14}C jelölt szubsztrátokból az 1. táblázat szerinti mennyiségben termelt ω -hidroxilált terméket. Az eredmények szerint C12 -C18 zsírsavakat fogadott el szubsztrátként, legnagyobb mennyiségben palmitinsavat és sztearinsavat.

Fatty acid substrate	ω -Hydroxylated fatty acid production, pmol·min ⁻¹ per mg of protein
Laurate (C12:0)	91 ± 26
Myristate (C14:0)	185 ± 53
Palmitate (C16:0)	320 ± 20
Oleate (C18:1)	283 ± 22
9,10-Epoxystearate	ND
Jasmonate	ND

Results are means with standard deviations; ND, not detectable.

1. Táblázat A lúdfű LCR fehérje (CYP86A8) katalitikus aktivitása élesztő mikroszómákban (Wellesen et al 2001).

Hivatkozás:

Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A. (2001) Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega-hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17):9694-9.

A 47. oldalon a P19 fehérje citoplazmatikus illetve sejtmagi változatának hatását hasonlítja össze. A P19N (sejtmagi változat) mind a siRNS-ek, mind a MIR159 mennyiségét csökkentette, míg a P19C (citoplazmatikus változat) esetében a kontrollnál magasabb siRNS és miRNS szint látható. Mi lehet ennek a jelenségnek az oka? A szövegben csak a sejtmagi változat negatív hatásáról van szó.

A kérdést Silhavy Dániel Bírálóm is feltette, kérem hogy a neki adott választ vegye figyelembe.

Az 51. oldalon bemutatott 20. ábra szerint a DCL1 fehérje a sejtmagban lokalizálódik. Van-e arra nézve adat, hogy a többi DCL fehérje (DCL2-4) a sejten belül hol található?

Az újabb eredmények szerint a heterokromatikus 24nt hosszú siRNS-eket processzáló DCL3 fehérje a sejtmagon belül a perinukleáris Cajal testekben lokalizálódik (Costa-Nunes et al 2014). Ez a felismerés kiterjeszti a Cajal testeknek RNS érésben már korábban ismert funkcióit. A DCL3 enzim tehát a sejtmagban helyileg elkülönül a csendesítő és cél szekvenciáktól (transzpozonoktól és repeat-ektől). A DCL2 és DCL4 fehérjéket szintén a Cajal testekben lokalizáltak találták, ami egyelőre nincs összhangban szerepükkel a citoplazmában replikálódó RNS vírusok géncsendesítésében (Bologna and Voinnet 2014).

Hivatkozások:

Costa-Nunes P, Vitins A, Pontes O. (2014) Connecting the dots of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 22(2):225-40.

Bologna NG, Voinnet O. (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol.* 65:473-503.

A 62. oldalon a CBC komplexnek a kis RNS fajtákra (siRNS, miRNS) való hatását illetve az ABA szabályozás kapcsolatát ismerteti. A cbp20 illetve cbp80 mutánsokban kimutatott változások csak az ABA szabályozással kapcsolatba hozható miRNS és siRNS típusokra igazolhatóak, vagy ezen mutációk hatása nem szelektív, a CBC komplex más kis RNS-ek szintjét is befolyásolja. A szövegben ezzel kapcsolatban van egy utalás a Table S1- re, ezt viszont nem találtam.

Az említett Table S1 táblázat a Laubinger és munkatársai (2008) publikáció része, elnézést kérek, hogy a hivatkozás formátuma nem volt erre nézve egyértelmű. Eredményeik (és más fentebb említett publikációk) szerint az nCBC komplex mutánsaiban a kis RNS készlet egy részének processzálása gátolt. Ezek közül néhány kapcsolható az ABA szabályozáshoz (pl miR159, miR169), míg mások szerepe különböző, például az egyedfejlődés szabályozása (miR156; Yu et al 2015).

Hivatkozások:

Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Ratsch G, Weigel D. (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(25):8795-800.

Yu S, Lian H, Wang JW. (2015) Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Curr Opin Plant Biol.* 27:1-7.

A 74-75. oldalon található 38-39. ábrákon feltüntetett génekről hiányzik egy-egy rövid összefoglaló. A jobb érthetőség kedvéért egy-két mondatban le kellett volna írni, hogy mi a tesztelt gén funkciója, milyen fehérjét kódolnak, és miért érdekesek a kutikula fejlődés szempontjából.

Egyetértek Bírálómmal. Bár a gének egy részének legvalószínűbb szerepéről van ismertetés a dolgozat szövegében, de egy táblázatban össze kellett volna foglalni a feltételezett génfunkciókat.

Ennek pótlásától itt terjedelmi korlátok miatt eltekintek, de az eredeti publikációban (Albert et al 2013), a 75 – 76. oldalon ez minden vizsgált génre nézve megtalálható.

Hivatkozás:

Albert Z, Ivanics B, Molnár A, Miskó A, Tóth M, Papp I (2013) Candidate genes of cuticle formation show characteristic expression in the fruit skin of apple. *Plant Growth Regulation* 70:71–78.

A 44. ábrán mi a “b” és a “m” jelölés?

Elnézést kérek az olvasótól, a magyarázat a magyar nyelvű képaláírásból kimaradt:

b – basal, a levél alapi, hüvely által takart része

m – middle, levéllemez középi régió

A 84. oldalon található 47. ábra a viaszkristályok megjelenését mutatja be a *TaSHN1* túltermelő növényeken. Mi a bizonyíték, hogy a megfigyelt struktúrák valóban viasz kristályok? Vannak erre vonatkozó biokémiai, analitikai adatok?

A növényi hajtások felszíneken található kristályos képződmények kémiai összetételéről bőséges ismeretünk van. Fűfélék esetében az epikutikuláris viaszok főleg hosszúláncú alkoholokból állnak, búzánál a fő összetevő a sztearil alkohol. E mellett további, esetenként fajta specifikus komponensek is találhatóak a búza viaszok között, ami a képződő kristályok morfológiai sokféleségét okozza. A struktúrákat a kémiai analízis mellett oldatból visszakristályosítással, valamint nagyfelbontású mikroszkópos technikákkal (pl atomerő mikroszkóp) is vizsgálták (Koch et al 2006). A *TaSHN1* transzgénikus növények levélfelszínén megfigyelt struktúrák a kutikula felső rétegével egybefüggőek, nehéz elképzelni, hogy a viaszoltságtól függetlenül alakultak ki. Viaszanalízis céljából a transzgénikus és kontroll növények leveléről mintákat oldottunk le, amiket Dr Eke Zsuzsanna (ELTE, TTK, Kémiai Intézet) GC-FID és GC-MS módszerekkel vizsgált. Eredményei szerint a *TaSHN1* transzgénikus levél viasz alkotói között a nonakozán (C29) és hentriakontán (C31)/tetratriakontán (C34) alkán komponensek aránya megnőtt. Ez egybevágott Broun és munkatársai (2004) eredményeivel, akik a lúdfű *WIN/SHN1* gén túltermelésekor a viaszfedettség növekedésének legnagyobb részét éppen a nonakozán és hentriakontán komponenseknek tulajdonították. Ugyanők a *WIN/SHN1* túltermelő növények levélfelszínén hozzánk hasonlóan szintén viaszkristályok megjelenését tapasztalták.

Hivatkozások:

Koch K, Barthlott W, Koch S, Hommes A, Wandelt K, Mamdouh W, De-Feyter S, Broekmann P. (2006) Structural analysis of wheat wax (*Triticum aestivum*, c.v. 'Naturastar' L.): from the molecular level to three dimensional crystals. *Planta*. 223(2):258-70.

Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL. (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(13):4706-11.

Budapest, 2015 Szeptember 2

Dr Papp István