

dc\_741\_13

## **AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

# **A GÉNKIFEJEZŐDÉS, SZÁRAZSÁGTŰRÉS ÉS VÍZVESZTÉS EGYES MECHANIZMUSAI ÉS ÖSSZEFÜGGÉSEI MODELL- ÉS HASZONNÖVÉNYEK BEN**

**PAPP ISTVÁN**

**BCE Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék**



BUDAPESTI  
**CORVINUS**  
EGYETEM  
Kertészettudományi Kar

**BUDAPEST, 2014**

## **1. BEVEZETÉS**

A növényi kutikula, mint a hajtást a külvilág felé határoló felület számos növényi életfolyamatban meghatározó. A perisztómás párologtatás lényeges elem a szárazságtűrés komplex fenotípusában, míg a gyümölcsök kutikulán át történő vízvesztése a tárolás során fontos tényező (apadás). Munkásságom az alap kutatások felől közelített ehhez a gyakorlati vonatkozásban fontos problémakörhöz. Az elsőként bemutatott kísérletek során a transzkripciós géncsendesítés és RNS szabályozás mechanizmusaira szerettünk volna fényt deríteni. A későbbiekben egy módosult RNS szabályozású, szárazságtűrő lúdfű mutánszt izoláltunk és jellemeztünk, ahol a kutikula fejlődés jellemző változásait találtuk. Ezek a kutatási eredmények a kertészeti és gabona növények kutikulájának biológiájához vezettek, ahol a kutikula fejlődés meghatározóinak vizsgálata jelenleg is egyik fő kutatási területem.

## **2. A KUTATÁSOK TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI**

### **Transzkripciós géncsendesítés**

Kísérleteink közvetlen előzménye a transzkripciós géncsendesítés (TGS) felfedezése volt. A TGS mechanizmusára nézve vizsgálataink (1994-1996) előtt csak kevés adat volt hozzáférhető, az RNS szabályozás működésének molekuláris szintű részleteire csak jóval eredményeink publikálása után derült fény. A poszttranszkripciós (PTGS) és a transzkripciós (TGS) géncsendesítés felderítése egymással párhuzamosan zajlott. A TGS vonatkozásában ismert volt, hogy a promóter homológia kiváltotta csendesítés a transzkripció szintjén működik (Matzke et al 1989; Neuhuber et al 1994). A TGS-hez kapcsolódó jellemzőnek tartották a promóter metilációt, valamint azt hogy a csendesítő és csendesített konstrukciók szétválásakor (szegregációjakor) a csendesített promóter csak fokozatosan, néhány generáción keresztül nyeri vissza aktivitását. A metiláció kialakulásának mechanizmusairól ekkor még csak feltételezéseink voltak (Matzke and Matzke 1995). A DNS metiláció jelenségének a molekuláris hátterét célozta egyik kísérlet sorozatunk, melyben a szegregáció után újra megjelenő génkifejeződés és a promóter metiláció korrelációját terveztük molekuláris szinten követni. A PTGS és TGS csendesítésre is képes 271 dohány lokusz 35S promótere által terveztük a H2 lokusz érzékeny 35S promóterének TGS géncsendesítését (Matzke et al 1994; Vaucheret et al 1992), és a folyamat jellemzését molekuláris módszerekkel.

A kis RNS-ek géncsendesítésben betöltött szerepének felfedezése (Hamilton and Baulcombe 1999). után ilyen irányú kísérleteket kezdtünk TGS rendszerben is (2000-2002). Ebben az időszakban fény derült a transzkripciós és poszttranszkripciós géncsendesítés hasonlóságaira, amennyiben a dupla szálú RNS-ek (double stranded RNA; dsRNS) és kis interferáló RNS-ek (short interfering RNA, siRNS) részvételét mindkét folyamatban leírták (pl. Sijen et al 2001). A DNS metiláció megjelenését PTGS esetén, a kódoló, illetve átírt génszakaszokon is detektálták (Fagard and Vaucheret 2000). A TGS elnevezés mellett így időközben elfogadottá vált az általánosabb RNS függő DNS metiláció (RNA dependent DNA methylation; RdDM) kifejezés. A PTGS és RdDM vonatkozásában elkülönítették a különböző siRNS fajták szerepét. A PTGS-ben a rövidebb 21-22 nt hosszú siRNS-eknek, az RdDM mechanizmusában a hosszabb 24-26 nt-os siRNS fajtáknak tulajdonítottak jelentőséget (Hamilton et al 2002). Ismert volt, hogy a csendesítésben résztvevő dsRNS közttermékeket RNáz III aktivitású DICER enzimek hasítják tovább (Bernstein 2001). Az *Arabidopsis DCL1* gén gyenge mutációja a virág fejlődésében drámai változásokat okozott („carpel factory” mutánsok, Park et al 2002), működése pedig az miRNS-ek képződéséhez bizonyult szükségesnek (Reinhart et al 2002). Feltételezhető volt, hogy az *Arabidopsis* DCL enzimek különböző tulajdonságú kis RNS-ek processzáálásában vesz részt. Míg a DICER enzimek emlősben citoplazmás lokalizációjuk, növényben a sejten belüli kompartmentizációjuk nem volt ismert, erre nézve csak feltételezéseink voltak. Kísérleteink legfontosabb célja az volt, hogy kiderítsük, részt vesz-e a DCL1 enzim a TGS folyamataiban, illetve adatokat nyerjünk a folyamat sejten belüli lokalizációjáról. A csendesítés során TGS rendszerünkben 21, 22 és 24 nt hosszúságú siRNS-ek képződtek (Aufsatz et al 2002). Ezek termelődésének helye a sejten belül nem volt ismert, csakúgy mint szekvencia jellemzőik sem, és a hasításban résztvevő (feltehetőleg DCL) enzim is ismeretlen volt. Hogy vajon az siRNS-ek közül milyen hosszúságú termék volt hatékony az RdDM során, szintén felderítésre várt. A géncsendesítést gátló virális fehérjék hasznos eszközök a csendesítés mechanizmusainak felderítésében (Burgyán és Havelda 2011). Egy ilyen fehérje a paradicsom bokros törpülés vírus (Tomato bushy stunt tombusvirus; TBSV) P19 fehérjéje. A TBSV P19 fehérje egy tranziensen kifejezett dsRNS-ről képződő összes siRNS képződését gátolni tudta (Hamilton et al 2002). A hozzá nagymértékű (aminosav szinten 74%) hasonlóságot mutató cymbidium gyűrűsfoltosság vírus P19 fehérje specifikusan kapcsolódott a 2 nukleotid 3' túlnyúló véget tartalmazó 21-25 nt hosszú dsRNS-ekhez (Silhavy et al 2002). Ez a struktúra a dsRNS-ek DICER enzim által történt hasításának elsődleges termékeire jellemző. Ezek a megfigyelések a P19 fehérjéket az siRNS-ek

részvételével zajló géncsendesítés általános gátlóként valószínűsítették. Kísérleteinkben a P19 fehérjét különböző sejten belüli kompartmentumokba (sejtmag és citoplazma) irányított módon terveztük a géncsendesítés gátlására felhasználni.

### **Mutánsok szűrése pleiotróp bélyegek alapján**

Egy, a növény számára fontos jelút kiesése illetve aktivációja a közvetlenül érintett válaszon kívül más következményekkel is járhat (pleiotrópia). Ez befolyásolhatja a növény habitusát, növekedési sebességét illetve fázisait, stb. A pleiotróp bélyegek gyakran könnyebben észrevehetőek és így egyszerűbben kiválaszthatóak a mutáns-populációból, mint az esetleg fontos tulajdonság, ami mögöttük áll (Boyes et al 2001). Ezt kihasználva végezhető olyan szűrési kísérletek (screen-ek) ahol mutáns populációban látható fenotípusú, feltehetően pleiotropikus mutánsokat keresünk. Az így izolált mutánst ezután további vizsgálatoknak kell alávetni annak megállapítására, hogy van-e olyan tulajdonsága, ami tudományos vagy gyakorlati szempontból értékesé teszi.

### **A magi cap kötő komplex, mint a poszttranszkripció génszabályozás egyik szereplője**

A magi cap kötő komplex (nuclear Cap Binding Complex, nCBC) az RNS Polimeráz II által átírt mRNS-ek 5' végére szintetizált cap struktúrát köti. Az nCBC szerepéről és működéséről állati rendszerekben és élesztőben lehet tudni a legtöbbet. Itt a komplex legalább kettő – 80 illetve 20 kiloDalton molekulatömegű – alegységből áll. A két alegység együtt képes az mRNS 5' cap struktúrát megkötni. A *cbp20* mutánssal kapcsolatos első munkánk közzététele idején az nCBC komplexnek az mRNS splicingjában, 3' végének érésében, illetve az snRNS-ek magból való exportjában tulajdonítottak szerepet (Izaurrealde et al 1994, Cougot et al 2004). Emlősből az nCBC komplex működését stressztől és növekedési faktoroktól függőnek találták, szabályozása foszforilláció által történik (Wilson et al 1999). Ez alapján valószínűsíthető volt, hogy szerepe az mRNS érésében nem háztartási („house-keeping”) funkció, hanem egy poszttranszkripció szabályozási lehetőség. Az *Arabidopsis* nCBC nagy alegységet érintő *abh1* mutációt Hugouvieux et al. (2001) írták le. Élesztő kéthibrid kísérlettel ugyanők kimutatták, hogy az *Arabidopsis* CBP20 és CBP80 fehérjék kapcsolódni voltak képesek. Az élesztőben kifejezett fehérjék csak együtt tudták az mRNS cap struktúrát kötni *in vitro*, tehát hasonlóan viselkednek az élesztő ortológjaikkal (Hugouvieux et al. 2001).

## **Transzkriptumok alternatív splicing és kis RNS függő szabályozása abiotikus stressz válaszokban**

A poszttranszkripció szabályozás lehetőségei közé tartoznak az aktuális transzkriptum készlet módosításai PTGS géncsendesítés, alternatív splicing és az RNS érésének, transzportjának illetve lebomlásának befolyásolásával. Ezeket a lehetőségeket a növény a stresszfüggő szabályozásban kiterjedten használja (Mazzucotelli et al 2008), az nCBC komplex működése pedig kapcsolhatónak bizonyult egyes ilyen, RNS szintű jelenségekhez. Az mRNS alternatív splicing az egyik legrégebben ismert poszttranszkripció szabályozási lehetőség. Ennek jelentőségét növényekben sokáig alábecsülték, mára azonban ismertté vált, hogy az így szabályozott transzkriptumok száma növényekben is jelentős, arányaiban összemérhető az állatokban tapasztaltakkal (Kazan 2003; Ner-Gaon et al 2007). Abiotikus stressz hatására lezajló alternatív splicingot növényben eddig aránylag kevés esetben írtak le (Floris et al 2009). Az nCBC-vel kapcsolatos jelenlegi ismereteink valószínűsítik, hogy ez a szabályozási lehetőség a jövőben még nagyobb hangsúlyt kaphat a stresszválaszok magyarázatában. A kis RNS-ek, és köztük a miRNS-ek részvétele az abiotikus stressz válaszokban jól dokumentált (pl. Liu et al 2008; Liu et al 2009; Sunkar et al 2006; Covarrubias and Reyes 2010; de Lima et al 2012). Feltételezhető, hogy az miRNS-ek egyik feladata az egyedfejlődés koordinációja a stresszválaszok alatt.

### **Vízért való versengés vízhiány esetén**

A víztakarékos növények a talaj és szöveik víztartalmát a párologtatás visszafogásával megtartani igyekeznek, míg a vízpazarlók a vízutánpótlás növelésével (pl gyors gyökernövekedéssel) kerülnek el, illetve jobban tolerálják a dehidrációt (Sade et al 2012). A modern növény-biotechnológiai kutatások gyakran a párologtatás csökkentésére irányulnak (Schroeder et al 2001). Szántóföldi körülmények között azonban a haszonnövények mellett más növények (pl gyomok) jelenlétével is számolni kell, amik a hozzáférhető vízért versengenek. Ezt a kompetíciót, különösen ha az különböző stratégiákat követő növények között zajlik, vizsgálataink előtt kevésbé jellemezték. Feltételeztük, hogy víztakarékos mutánsok (*cbp20*, *era1*) és a vad típusú (hozzájuk képest pazarló) növények között gyökér kontaktus esetén interakció zajlódhat le, ami befolyásolhatja a mutánsok vízháztartását, fenotípusát.

## Fotoszintézis limitáció

Vízhiány esetén a sztómák zárása nemcsak a párologtatás csökkentését okozza, hanem a CO<sub>2</sub> felvétel gátjaként hozzájárulhat a fotoszintézis limitációjához is. A fotoszintézis hatékonyságának romlását például a ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláció hatékonyságának csökkenése vagy oxidatív stressz okozta membránkárosodások (El-Tayeb 2006) is okozhatják. Hogy milyen mértékben felelősek a különböző faktorok a CO<sub>2</sub> megkötés gátlásáért sokáig vitatott volt (pl. Chaves 1991). Nagy valószínűséggel a különböző fajokban és eltérő környezeti körülmények, feltételek mellett más és más dinamikával zajlanak a stresszválaszok és élettani folyamatok. A manapság legelfogadottabb modell szerint fokozódó vízhiány esetén kezdetben a sztóma konduktancia, később viszont a CO<sub>2</sub> beépülés jelenti a szűk keresztmetszetet a fotoasszimilációban (Flexas and Medrano 2002). Hogy a sztóma konduktancia mekkora csökkenése okozza már a fotoszintézis gátlását, nagy gyakorlati jelentőségű. Ez a paraméter szántóföldi körülmények között a megengedhető vízhiány mértékét határozza meg (pl. deficit öntözésnél). Másrésztől iránymutatást ad arra nézve is, hogy a gázcsere mesterséges csökkentése (pl. transzgénikus módosítás segítségével) mennyiben fogja vissza a biomassza gyarapodás alapjául szolgáló fotoszintetikus folyamatokat. Kedvezőtlen esetben a vízgazdálkodás vonatkozásában nyert előnyt a produktivitás csökkenése túlkompenzálhatja. A *cbp20 Arabidopsis* mutáns gázcsereje korlátozott (Papp et al 2004), ami lehetőséget nyújtott a gázcsere és a fotoszintézis limitáció összefüggésének vizsgálatára ebben a modellrendszerben. Kísérleteinkben tehát arra kerestünk választ, vajon a korlátozott gázcsere a *cbp20* mutáció esetén hogyan befolyásolta a fotoszintetikus folyamatokat normál illetve korlátozott vízellátás esetén.

## A kutikula képződése, szerepe a szárazságtűrésben és a vízvesztésben

A kutikula, mint a növény föld feletti része és a külvilág közötti határfelület a növény életében fontos szerepeket tölt be. Ilyen például a perisztómás párologtatás, vízlepergetés, kártevők, kórokozók elleni védelem, káros UV sugárzás visszaverése (Nawrath, 2006; Jäger et al 2011; Deák et al 2010). A zöld növényi hajtások mellett a termések, gyümölcsök kutikulájának is alapvető élettani szerepei, és ebből következően nagy gazdasági jelentősége van. A kutikula szerkezetét és képződését régóta vizsgálják. Rétegelt, rendezett struktúrájú, egy kutin poliészter mátrixból és abba, illetve arra rakódó viasz komponensekből áll, kevésbé jellemzett összetevője ugyanakkor a nem depolimerizálható kután (Samuels et al 2008). Az ultrastruktúra és feltehetőleg a rétegek összetétele is változó fajonként, szervenként illetve

növekedési fázisok szerint is, erről azonban még csak részleges információk állnak rendelkezésre (Nawrath, 2006). A legtöbb ismeret az *Arabidopsis thaliana* kutikulájáról gyűlt össze (Jenks et al 2002), de egyéb fajokról is egyre több adatot közölnek (Buschhaus and Jetter 2011). A kutikula képződést (bioszintézist és transzportot) szabályozó gének közül többet is azonosítottak. Ezek között említhetők például a MYB családba tartozó MYB41 (Cominelli et al 2008) és MYB96 (Seo et al 2011), HD-ZIP (Javelle et al 2010) illetve AP2-ERF (Broun et al 2004) transzkripció faktorok (TF). A TF-ok mellett a kutikula alkotók képződésének poszttranszkripció szabályozását is valószínűsítik. Hooker et al (2007) azt találták, hogy a kutikula fejlődését befolyásoló *CER7* gén feltételezhetően egy exosome alegységként működő exoribonukleázt kódol. Adataikból arra következtettek, hogy ennek az RNS bontó komplexnek a működése valószínűleg egy szabályozó gén mRNS-én át a viasz bioszintézis egy korai kulcsenzimének (*CER3/WAX2/YRE*) szintjét befolyásolja.

Az alma hazánk gyümölcstermesztésének egyik legfontosabb terméke (~500 ezer tonna termés/év 2008-2010 között). Általában hosszú hűtött tárolás után kerül forgalomba, ami alatt a gyümölcs felszíni kutikulán át történő apadási veszteség jelentős lehet. E mellett a kutikula befolyásolhatja az alma egyes kórokozói, pl. a ventúriás varasodás (*Venturia inaequalis*) elleni ellenálló képességét, de a viaszosodás mértéke a vásárlók preferenciáira is hatással van. Az alma gyümölcs kutikula gazdasági jelentőségét több megfigyelés is alátámasztja. A gyümölcs felszínére mesterségesen felvitt vékony viaszréteg a tárolhatóságot és tetszetősséget is javítja (Meheriuk and Porritt 1972). A ‘Magyar Kormos Renet’, ‘Parker Pepin’, ‘Reinette Russet’ vagy ‘Saint Edmund’s Pippin’ a folyamatos kutikularéteg hiánya a parásodó bőrszövet szuberinizációja ellenére gyors vízvesztéshez vezet. Az alma kutikulájával kapcsolatban a molekuláris biológia területén is születtek figyelemreméltó eredmények. Egyes fajták viasz összetételét már leírták (Verardo et al 2003), a kutikula struktúráját pedig konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgálták (Veraverbeke et al 2001). A kutikuláris viaszok képződése az etiléntermeléssel párhuzamosan zajlik, és attól függőnek bizonyult (Ju and Bramlage 2001). Az alma gyümölcsben kifejeződő gének számbavételét több microarray kísérlet is célozta. A gyümölcshúsban kimutatható mRNS-eket levelek és virágok mRNS készletével vetették össze, illetve érés során indukálódó géneket kerestek (Costa et al 2010). Ezeknek a vizsgálatoknak további lendületet adhat az alma genom szekvencia közelmúltbeli közzététele (Velasco et al 2010).

A búza a világ egyik legnagyobb mennyiségben termesztett haszonnövénye. Szárazságtűrésre való nemesítése a globális klímaváltozás miatt aktuális feladat, amiben hazánk is jelentős

eredményeket ért el (Dudits 2006). Gabonafélékben a modellnövények révén nyert információk segítségével, illetve térképezésen alapuló módszerekkel sikerült egyes kutikulához köthető géneket azonosítani (pl. Yu et al. 2008; Hu et al. 2009). A kutikula párologtatást szabályozó szerepét árpa levélen Richardson et al (2005, 2007) vizsgálták. Eredményeik szerint a kutin réteg és egy kisebb mennyiségű viasz alapvetően meghatározza a vízvesztés mértékét, amit a további lerakódó viaszok már döntően nem befolyásolnak. A kutikula képződését szabályozó transzkripciós faktorok közül a modellnövényekben legjobban jellemzett példa az AP2/ERF típusú WIN/SHN géncsalád, amelyhez közvetlenül a kutin bioszintézis serkentése köthető (Kannangara et al. 2007). Gabonafélékben eddig árpában (Taketa et al. 2008) és rizsben (Wang et al. 2012) írtak le a WIN/SHN családdhoz tartozó transzkripciós faktorokat. Búzában Kosma és munkatársai (2010) azonosítottak a kutikula képződésben feltehetően szereplő géneket hesszeni légy kártételével kapcsolatban. Ezek között volt a búzában eddig egyetlenként leírt, a kutikuláris folyamatokat valószínűleg szabályozó transzkripciós faktor, egy MYB30 homológ gén. Ennek kifejeződése és egyes specifikus viasz komponensek megjelenése között a szerzők összefüggést tudtak kimutatni.

A kutikula és a szárazságtűrés kapcsolatát modell és haszonnövényekben is kiterjedten vizsgálták. Búzában Rawson és Clarke (1988) szerint vízhiányos körülmények között a kutikulán át történő vízvesztés aránya magassá válik, ami a struktúra potenciális jelentőségét bizonyítja ebben a fajban is. Gabonaféléknél eddig elsősorban a kutikula viasz összetevőinek lehetséges szerepét vizsgálták a szárazságstressz alatti hozamsökkenéssel, illetve a reziduális párologtatással kapcsolatban. González és Ayerbe (2010) a hozam és a felületről leoldható viasztartalom között pozitív, míg a hozam és reziduális párologtatás között negatív összefüggést mutattak ki. Mások azonban megkérdőjelezték a felületi viaszok meghatározó szerepét mind a reziduális párologtatással mind a szárazságtűréssel kapcsolatban (Larsson and Svenningsson 1986; Merah et al. 2000). A kutikula másik fő alkotója, a kutin mátrix tekintetében nincs tudomásunk összehasonlító vizsgálatokról gabonafélék esetében. Meg kell továbbá jegyezni, hogy az előbbieken bemutatott vizsgálatokat a búza nagyszámú, eltérő genotípusán végezték, amelyek szárazságstressz alatti viselkedése nem feltétlenül egyforma. Schoppach and Sadok (2012) jelentős különbségeket tártak fel különböző búzafajták esetében a sztómazárás dinamikájában, Gallé et al (2013) közölt eredményei pedig alátámasztják a búzafajták között ilyen különbségek meglétét. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a kutikuláris párologtatás jelentősége sem minden genotípusban egyöntetű. A fent bemutatott



eredményeket áttekintve arra a következtetésre juthatunk, hogy a különböző fajok, sőt fajták kutikulái között a szárazságtűrésben játszott szerepet tekintve jelentős különbségek lehetnek.

#### A kutatások célkitűzései

- A transzkripciós géncsendesítés molekuláris mechanizmusainak felderítése: a DNS metiláció szekvencia szintű vizsgálata, TGS-ben résztvevő lokuszok szerkezetének jellemzése, siRNS szekvenciák meghatározása TGS rendszerben.
- A DCL1 enzim sejten belüli lokalizációjának meghatározása. *dcl1* mutáció és kompartmentekbe irányított virális szupresszor fehérje TGS siRNS-ekre és egy miRNS-re gyakorolt hatásainak összehasonlítása.
- Megváltozott stressztűrésű *Arabidopsis* mutánsok azonosítása pleiotróp tulajdonságok szűrésével.
- Egy újonnan izolált szárazságtűrő, víztakarékos mutáns (*cap binding protein 20*) jellemzése genetikai, élettani, stresszélettani és ökofiziológiai vonatkozásban. Kísérlet hasonló fenotípus létrehozására géncsendesítéssel paradicsomban.
- A *cbp20* mutáns bőrszövetének részletes anatómiai vizsgálata, különös tekintettel a kutikulára.
- Víztakarékos mutánsok szárazságtűrő fenotípusának jellemzése vízért való versengés esetén.
- Gyümölcs kutikula összehasonlító morfológiai vizsgálata almafajtákban, és a kutikula képződés folyamataiban feltehetően résztvevő gének azonosítása.
- A kutikula mikromorfológiájának összevetése eltérő szárazságtűrésű búzafajták között.
- Egy, a kutikula fejlődését szabályozó búza transzkripciós faktor funkcionális azonosítása.

### 3. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. **A dohány 271/H2 transzkripció géncsendesítési (TGS) rendszerben a promóter homológián alapuló géncsendesítés a csendesített promóter meiotikusan örökölhető DNS metilációjával járt együtt, amely elsősorban CG és CNG kontextusú citozin bázisokat érintett.** Dohányban a TGS jelenségét 271 x H2 keresztezés során tanulmányoztuk. A H2/271 F1 dohánynövényeket vad típusú dohánnyal visszakeresztezve a (35S promóteren jelentkező) TGS hatás alól felszabaduló H2 lokuszok miatt Hygromycin rezisztenciát kellett volna tapasztalnunk, ami azonban a BC1 növényeknél nem jelent meg. A csendesítő konstrukció eltávolításával a 271 transzgénikus vonalakban jelenlevő antiszensz nitrit reduktáz gén (NiR) poszttranszkripció géncsendesítő hatása (PTGS) viszont azonnal megszűnt. Egy H2-t öröklő, de a HptII gén átírásában gátolt, Hygromycin érzékeny vonal és az eredeti H2 növény 35S promóterein biszulfít szekvenálást végeztünk. Az eredmények azt mutatták, hogy a 271 lokusz hatásának előzetesen kitett H2 lokusz (H2\*BC1#5) 35S promóter szekvenciája a növények következő generációjában, a csendesítő lokusz jelenléte nélkül is magasabb szintű citozin metilációt mutatott a H2 lokusznál (Park et al 1996). A sűrűbben metilált H2\*BC1#5 lokusz azonban nem mutatott további csendesítésre való képességet. A metilált citozin nukleotidok elsősorban szimmetrikus (CG vagy CNG) pozícióban voltak. Eredményeink jelentőségét az adta, hogy egy növényi TGS rendszerben először tudtunk nukleotid szintű információt adni a célszekvencia metilációs változásairól valamint a hatás meiotikus örökölhetőségét is kimutattuk.

2. **A transzkripció géncsendesítést kiváltani képes H2 dohány lokusz szerkezete erősen komplexnek bizonyult, több, egyes esetekben töredékes promóter szekvenciát és prokarióta, nem T-DNS eredetű szakaszokat tartalmazott.** A H2 dohány lokusz a 35S promóterének TGS érzékenysége mellett NOS promóterével arra szenzitív lokuszban transzkripció géncsendesítést volt képes kiváltani (Matzke et al 1989). Ilyen, TGS-re érzékeny NOS promótert hordoz a  $K_{\beta 1}$  lokusz, amit H2 a promóter metilációja mellett teljesen csendesíteni volt képes. A részben rezisztens  $K_{\alpha}$  lokuszon H2 részleges metilációt okozott, amivel összhangban a TGS itt csak részben volt hatékony (Jakowitsch et al 1999). A TGS rendszerben szereplő aktív, érzékeny és részben rezisztens lokuszok szerkezetének megismerése céljából a transzgének és az azokat határoló genomi DNS-en szekvencia szintű vizsgálatokat végeztünk (Jakowitsch et al 1999). A H2 lokusból származó egyik szekvencia egy teljes T-DNS ('H' konstrukció) mellett annak egy részét fordított ismétlődés formában tartalmazta. A lokusz további részei 'H' T-DNS fragmenseket, nem T-DNS, bináris

vektor szekvenciákat és rövid dohány genomi DNS darabokat tartalmaztak, az eredeti konstrukciótól eltérő elrendezésben. Ezek között a szegmensek között a NOS promóter 4 teljes, és 2 további töredékes kópiáját találtuk meg, amelyek közül egyesek prokarióta szekvenciákkal voltak összefüggőek. A feltárt strukturális bélyegek részben magyarázatot kínáltak a H2 lokusz TGS géncsendesítést kiváltó tulajdonságára. A lokusz komplex szerkezete magában foglalta a T-DNS egy (NOS promótert tartalmazó) szakaszának fordított ismétlődését, valamint a NOS promóter legalább 6 teljes vagy részbeni kópiáját. A szekvencia GC gazdag, prokarióta, de nem T-DNS eredetű szakaszokat is tartalmazott. Ez a komplex szerkezet, beleértve a T-DNS egy részének fordított ismétlődését, gazdag forrást nyújt aberráns RNS-ek átírására, amelyek géncsendesítést serkentő hatása a későbbi kutatásokban is igazolódott. A teljes H2 lokusz citogenetikai vizsgálatokkal egy interkaláris heterokromatikus régió mellett volt lokalizálható a T1 kromoszóma hosszú karján (Jakowitsch et al 1999). Feltételezhető, hogy strukturális és pozíciótól függő hatások együttesen hozhatók összefüggésbe a H<sub>2</sub> lokusz NOS promóteren erős TGS-t kiváltó tulajdonságáért. A transzkripció géncsendesítésre érzékeny K<sub>81</sub> és nem érzékeny K<sub>α</sub> lokuszok szerkezetét is vizsgáltuk. A K<sub>81</sub> lokuszt teljes terjedelmében nem tudtuk klónozni, a klónozott szekvencia azonban viszonylag egyszerű szerkezetű volt. A teljes K<sub>81</sub> konstrukció mellett bináris vektor szekvenciákat, és két rövid T-DNS szakaszt tartalmazott. A K<sub>α</sub> lokusz egy duplikációk és átrendeződések nélküli, egyszerű K<sub>α</sub> konstrukciót tartalmazott, amelyhez vektor szekvenciák sem kapcsolak. A klónozások során ismertté vált, TGS-re érzékeny illetve részben rezisztens célszekvenciák nem tartalmaztak a H2 lokuszra jellemző komplex strukturális bélyegeket. A K<sub>81</sub> és a K<sub>α</sub> lokuszokat határoló növényi genom szakaszok Southern blot vizsgálatok szerint egyszeres vagy alacsony kópiaszámúak voltak, nem tartalmaztak feltételezhető transzpozon vagy mikroszatellit szekvenciákat, ismétlődéseket. FISH technikával a K<sub>81</sub> lokusz genomi helyzete volt meghatározható, ami a T2 kromoszóma hosszú karjára lokalizálódott, környezetében nem volt nyilvánvalóan heterokromatikus régió. A lokuszok viszonylag egyszerű struktúráját és szekvencia kontextusát megkülönböztető bélyegként értékeltük a H2 lokuszhoz képest.

**3. Az *Arabidopsis* MIR159 miRNS processzálásának legalább egyes lépései a sejtmagban zajlanak. A TGS siRNS-eket szekvencia jellemzőik alapján a DCL1-től eltérő enzim processzálhatta. A DCL1 fehérje sejtmagi lokalizációjú, és nem szükséges a TGS folyamataihoz (Papp et al 2003b).** A P19 virális eredetű, géncsendesítést szupresszáló fehérje citoplazmás (P19C) és módosított, NLS-t tartalmazó formáit (P19N) fejeztük ki

NOSpro TGS csendesített lúdfüben, aminek azonban a 24 nt hosszú kis RNS-ek mennyiségére és a TGS-re nem volt észrevehető hatása. A sejtmagban kifejezett P19N fehérje eredményeképpen a MIR159 mennyiségének kb 60 %-os csökkenése volt kimutatható, ami P19C transzgén hatására nem következett be. Ez az eredmény a MIR159 képződés legalább egyes lépéseinek sejtmagi lokalizációját valószínűsíti. NOSpro TGS csendesített növényekből klónozott NOSpro siRNS fajták méret szerinti gyakorisága jó egyezést mutatott a Northern jel erősségével. A 21 és 24 nt hosszú fragmensek hibridizációs jele volt a legerősebb, és ezekből a méretekből klónoztuk a legtöbb siRNS szekvenciát. Az siRNS-ek struktúrája nem tért el jelentősen a korábban megismert hasonló kis RNS-ekétől. Az 5' végállású nukleotidok a 24 nt hosszú siRNS-ek esetében azonban főleg Citozinoknak bizonyultak, szemben a 21 nt siRNS-eknél tapasztalt Adenozin preferenciával és a Tang et al (2003) által klónozott 21 nt siRNS-ek 5' nukleotid eloszlásával. Ez a különbség arra utalt, hogy a kísérleteinkben meghatározott szekvenciájú 21 illetve 24 nt hosszú siRNS-eket a DCL1-től eltérő enzim processzálhatta. Ezt megerősítette az is, hogy a tesztelt *dcl1* mutációknak nem volt hatásuk TGS csendesített NPTII illetve NOS gének kifejeződésére és metilációjára. A DCL1 fehérje sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása céljából a gén kódoló szakaszának nagyobb részét tartalmazó cDNS-hez GFP jelzőgént kapcsolunk. A fúziós konstrukciót konstitutív promóter után kapcsolva azt bioliztikus módszerrel hagyma epidermisz sejtekbe transzformáltuk. A GFP fluoreszcens jel megjelenése alapján a tranziensen kifejezett fúziós fehérje sejtmagi lokalizációjú volt. Ebből arra következtethettünk, hogy a DCL1 fehérje maga is sejtmagi lokalizációjú.

**4. Pleiotróp morfológiai bélyegek alapján T-DNS mutagenizált lúdfü populációból megváltozott stressztűrési mutánsokat izoláltunk. Ezek közül részletesen jellemeztünk egy új, ABA túlérzékeny, szárazságtűrő, víztakarékos mutánst (*cap binding protein 20*, *cbp20*). A *cbp20* mutáns genetikai lézióját az RNS szabályozás egyik kulcsfontosságú komplexén, a magi cap kötő komplexen belül a *Cap binding protein 20* génre lokalizáltuk.** Új, megváltozott stressztűrési *Arabidopsis* mutánsok izolálása céljából egy T-DNS mutagenizált populációt vizsgáltunk, amit Koncz Csaba laboratóriumában (Max Planck Institut, Köln) állítottak elő. 500 egyedileg fenntartott mutáns vonal utódait a T2 generációban vizsgáltuk fenotípusuk alapján Boyes és munkatársai (2001) módszerét alkalmazva. A későbbi utódgenerációkban is stabilan megjelenő, monogénesen öröklődő fenotípusos bélyegek szerint számos mutánst sikerült azonosítani. Ezek többsége a részletes vizsgálatok alapján nem függött össze nyilvánvaló módon a stressztűrési folyamataival. Az enyhe

morfológiai változásokat hordozó mutánsokat biotikus és abiotikus stresszeknek tettünk ki. Egy ilyen mutáns (*cbp20*) a vad típusnál szeldeltebb levélszélét és valamelyest kompaktabb habitust mutatott. A komplex fenotípushoz tartozott még a lassúbb növekedés és későbbi virágzás is. A mutáns a vad típusal való keresztezést követően monogén recesszív öröklésmentet mutatott. *cbp20* növényünket kereszteztük a hasonló levél fenotípust mutató *serrate* (Clarke et al 1999) mutánsal is. Az F1 generáció vad fenotípusa alapján bizonyossá vált, hogy a *cbp20* és *serrate* mutációkat két különböző lokusz határozza meg, azok nem allélikusak. Ezt követő stresszélettani vizsgálataink alapján a *cbp20* növények szárazságtűrésüket tekintve a vad típusnál kedvezőbb tulajdonságúnak bizonyultak. A fenotípus jelentősége miatt az izolált mutánsok közül a *cbp20* részletes vizsgálatát folytattuk a továbbiakban is. A *cbp20* növények csírázását vizsgálataink szerint olyan alacsony ABA koncentráció is gátolta, amely a vad típusú Columbia növényekét még nem, a mutáns tehát ABA túlérzékenynek bizonyult. A mutáció genetikai hátterének felderítése céljából vad típusal való keresztezés után az F2 generációban követtük mind a morfológiai, mind a szárazságtűrési fenotípusokat, amik a T-DNS-el kapcsoltan öröklődtek. A T-DNS-t határoló genomi flanking régiók mentéses klónozás utáni szekvencia analízise szerint a T-DNS a *Cap Binding Protein 20 (CBP20)* gén első exonjába ékelődött be. További lépéseket jelentett a mutáció jellemzésében a mutáns teljes hosszúságú cDNS-el való komplementációja, és a gén citokininnel való indukálhatóságának kimutatása (Bacsó and Papp 2008). A szárazságtűrési fenotípus élettani hátterének megvilágítása céljából megvizsgáltuk a *cbp20* mutáns sztóma konduktanciáját. Ez a paraméter a mutáns növényekben a vad típusnál szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a komplementált vonalban a vad típushoz hasonló értékeket mértünk. A szárazságtűréshez vezető élettani folyamatok további jellemzése céljából mértük a vízhiányos stressznek kitett *cbp20* mutáns és kontroll növények földszúlyainak változását, ami az általuk párologtatott víz mennyiségére utal. Az eredmények szerint a *cbp20* mutáns növények jobb szárazságtűrése víztakarékos stratégiájuknak volt köszönhető. A *cbp20* melletti másik ismert nCBC mutáns *abh1/cbp80* esetében kimutatták, hogy a gázcsereenyílások zárósejtjei a vad típusnál érzékenyebben reagáltak ABA-ra (Hugouvieux et al 2002). Ez a jelenség lehet a jobb vízmegtartás egyik, de nem feltétlenül kizárólagos magyarázata. Kim et al (2008), valamint tőlük függetlenül Laubinger et al (2008) a *cbp20* és *abh1/cbp80* mutánsokban egyes pri-miRNS-ek érésében és bizonyos mRNS-ek splicing-jában találtak hibákat. Laubinger et al (2008) a *cbp20*, *abh1/cbp80* és a *serrate* mutánsok mRNS splicing folyamataiban átfedő, de nem azonos változásokat találtak. Több független vizsgálat is megerősítette, hogy a

SERRATE fehérje is szükséges az miRNS processzáló enzim komplex részeként egyes pri-miRNS-ek éréséhez (Yang et al 2006, Lobbes et al 2006, Machida et al 2011). Christie et al (2011) feltételezik továbbá, hogy SERRATE részt vesz a géncsendesítés szabályozásában is. Elképzelésük szerint a hatékonyan kivágódó intronok képesek a növény saját, intront tartalmazó génjeit megvédeni a géncsendesítéstől, míg az idegen, pl transzpozon vagy virális eredetű, intron nélküli gének nem élvezik ezt az előnyt. A géncsendesítés szupressziója viszont vizsgálataik alapján függött az ABH1 és a SERRATE fehérjék jelenlététől, így ez az eredmény közvetlen kapcsolatot jelent az nCBC komplex és a géncsendesítés között. A közelmúltban Wang et al (2013) direkt kapcsolatot mutattak ki az általuk vizsgált NOT2 valamint a DCL1, SERRATE, CBP80 és CBP20 fehérjék között. E mellett a DCL1 sejtmagi lokalizációját az ő kísérleteik is megerősítették. Eredményeik további bizonyítékát adják annak, hogy ezek a fehérjék egy komplexben vesznek részt a frissen átírt miRNS transzkriptumok processzálásában. Az nCBC funkciója a splicing és az miRNS képződés befolyásolása mellett az RNS szabályozás egy újabban felfedezett rétegén keresztül is megnyilvánulhat. A hosszú intergenikus nemkódoló RNS-ek (Matsui et al 2008, Kuhn et al 2008) képződésére a *Cbp20*, *Cbp80* és *Serrate* gének működése is hatással van (lincRNS-ek, Liu et al 2012).

**5. Megállapítottuk, hogy a *cbp20* mutáns bőrszövege a vad típustól eltérően fejlődik. A különbségek között kutikula vastagodást találtunk, ami együtt járt a reziduális párologtatás csökkenésével.** A *cbp20* mutáns vízháztartásával kapcsolatos esetleges epidermális bélyegek után kutatva a levél bőrszövetét részletes anatómiai vizsgálatnak vetettük alá. Fénymikroszkópos megfigyeléseink szerint a mutáns bőrszövege szignifikánsan több epidermisz sejtet, levélszórt és gázcsereenyírást tartalmazott mint a vad típus, a sztóma index azonban változatlan maradt. A sztómák és zárósejt anyasejtek fejlődésében is rendellenességeket találtunk. Kifejlett *cbp20* levelek abaxiális bőrszövetét transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgálva a vad típussal összehasonlításban jelentős (78,2%) kutikula vastagodást figyeltünk meg. Annak eldöntésére, vajon a vastagabb kutikula befolyásolja-e a perisztómás transpiráció mértékét, sötét adaptált 4 hetes növények (teljes rozetták) vízvesztéseit hasonlítottuk össze. Ilyen körülmények között a *cbp20* növények a vad típusnál szignifikánsan lassabban veszítettek vizet, ami arra enged következtetni, hogy a mutáció hatására a kutikula vízre való való permeabilitása csökkent. A *cbp20* mutáns kutikulájának vizsgálata során nyert eredményeink tehát alátámasztják azt az érdekes lehetőséget, hogy a kutikula fejlődésében szerepe van az RNS szabályozásnak.

6. A *cbp20* és egy további ABA túlérzékeny, víztakarékos lúdfű mutáns (*eral*) esetében is kimutattuk, hogy a csökkentett párologtatással járó szárazságtűrő fenotípus fokozottabban párologató növények szomszédságában, azokkal vízért való versengés esetén nem jelenik meg. A vízmegtartó stratégiát követő növények a természetben illetve a termesztésben is a szántóföldön versengésre kényszerülnek a rendelkezésre álló vízutánpótlásért. Ezt a helyzetet modelleztük kísérleteinkben, amikor *cbp20* és *eral* vízzel takarékos, ABA túlérzékeny mutánsokat valamint vad típusú (mint hozzájuk képest vizet pazarló) növényeket kompetíciós elrendezésben ültettünk és tettünk ki vízhiánynak. Eredményeink szerint a víztakarékos növények kedvező tulajdonsága a vízért való versenyhelyzetben nem érvényesült (Bacsó et al 2008a). Elkülönítetten nevelve a víztakarékos növények a várt fenotípust mutatták; csökkentett párologtatásuk miatt vízvesztésük lassúbb volt, életfolyamataikat hosszabb ideig fent tudták tartani vízhiány esetén. Vegyes ültetési helyzetben azonban a szárazságstressznek kitett mutánsok leveleinek víztartalma a vad típusú növényekével együtt süllyedt, a növények egyszerre pusztultak el. Annak kizárására, hogy a vízutánpótlás megvonásának dinamikája befolyásolja az eredményt, részleges öntözési kísérletet végeztünk. A kísérlet eredményét a csökkentett vízutánpótlás nem befolyásolta lényegesen, eltekintve attól, hogy annak lefolyása így hosszabb ideig tartott. Eredményeink felhívták a figyelmet arra, hogy a kísérleti körülmények között jól teljesítő növényvonalak a szántóföldön megjelenő esetleges versenyhelyzet során elveszíthetik vízforgalmi sajátosságukból fakadó előnyüket (Pardo 2010).

7. A *cbp20* mutáns csökkentett gázcseréje jó vízellátás mellett a fotoszintetikus aktivitást nem befolyásolta, a fotoszintézis limitációja nem jelentkezett. A korlátozott gázcsere melletti fotoasszimilációs képesség jellemzésére összehasonlítottuk a mutáns fotoszintetikus paramétereit a vad típuséval (Bacsó et al 2008b). Stresszmentes növények esetében (vízmegvonási kísérlet 0. napja) a *cbp20* mutáns fotoszintetikus rátája nem volt statisztikailag szignifikáns mértékben alacsonyabb a vad típusénál. A vízmegvonás 2. és 4. napjain a különbség továbbra sem volt szignifikáns, ezekben az esetekben azonban már a mutáns  $P_N$  értékeinek átlaga magasabb volt a vad típusénál. A *cbp20* növények alacsonyabb párologtatása a 3. napra a föld gravimetrikus víztartalmában jelentős különbséget hozott létre. A vízhiány hatására a vad típusú növényeken a 4-5. napon váltak nyilvánvalóvá a hervadás külső jelei. A *cbp20* mutáns a kísérlet során a várt módon visszafogott párologtatást mutatott, amit a tenyészedeények földsúlyainak lassúbb csökkenése is bizonyít. A 0. napon mért fotoszintetikus ráta szerint a *cbp20* mutáns fotoasszimilációja jó vízellátás mellett

statisztikailag nem volt megkülönböztethető a vad típusétól. Ez azt bizonyítja, hogy habár a mutáns sztóma konduktivitása szignifikánsan alacsonyabb a vad típusú növénynél (Papp et al 2004), a fotoszintézis sztóma limitációja nem jelentkezett. Érdekes módon a *cbp20* növények nem fotokémiai kioltása jó vízellátás mellett, valamint a vízmegvonási kísérlet 3. napjáig meghaladta a vad típusban mért értékeket. A fotokémiai kioltás kezdeti növekedése mindkét genotípusban megfigyelhető, ez a más fajokban is megfigyelt jelenség valószínűleg az enyhe stresszre bekövetkező védekezési reakció része (Hurry and Huner 1992, Janda et al 1994), amit később az érték csökkenése követ (da Silva and Arrabaça 2004). Összességében kísérletünkben azt a legfontosabb következtetést vonhattuk le, hogy a gátolt gázcserét mutató *cbp20* mutáns fotoszintetikus aktivitása megfelelő vízellátottság mellett nem különbözött szignifikánsan a vad típustól. A fotoszintézis limitáció tehát ebben az esetben nem korlátozta a biomassza felépülését. A mutáció ugyanakkor jelentős védelmet biztosított a fotoszintetikus apparátus számára vízhiány esetén. Ez biztató arra az nézve, ha a lúdfű mutánshoz hasonló tulajdonságú haszonnövények lehetséges gyakorlati alkalmazhatóságát próbáljuk előzetesen felbecsülni.

**8. Az *Arabidopsis* modellrendszer alapján az alma genomból olyan géneket szelektáltunk, amelyek működése feltehetően a kutikula képződéséhez kapcsolódik. A kiválasztott szekvenciák közül többnek a kifejeződését döntően a gyümölcshéjra jellemzőnek találtuk. Így olyan jelölt géneket azonosítottunk, amelyeknek valószínűsíthető a szerepe az alma gyümölcs kutikula képződésében (Albert et al 2013b).** A kutikula képződésben feltételezhetően szereplő gének, transzkripciós faktorok azonosítását az alma esetében a közelmúltban közzétett teljes genom szekvencia megkönnyítette. Ezeknek az adatoknak ismeretében célul tűztük ki az alma gyümölcs héjban kifejeződő, kutikulával feltehetően kapcsolatos funkciójú gének meghatározását. A molekuláris vizsgálatok előtt megmértük a gyümölcsök viaszosodását, hogy biztosak lehessünk abban, hogy a kiválasztott fejlődési fázisban valóban folyik a kutikula anyagainak képződése a gyümölcs felszínén. Ebből a célból két kiválasztott almafajta ('Prima' nyári, és 'Florina' téli) gyümölcseinek felszínéről a viaszokat szerves oldószerrel leoldottuk, majd elvégeztük azok mennyiségi meghatározását a termésfejlődés több fázisában. A felületegységre jutó viasz mennyiség a két fajtánál összemérhető volt, a termelődés dinamikája a téli fajtánál intenzívebbnek bizonyult. Mértük továbbá az almák apadását laboratóriumi tárolási körülmények között (száraz levegőben, RH ~50%) annak érdekében, hogy a vízmegtartás esetleges különbségeit felderítsük. Eredményeink a téli fajta gyümölcseinek jobb vízmegtartását mutatták, de a



különbség nem volt nagymértékű. Fénymikroszkópos vizsgálataink szerint a Florina fajta kutikulája 100% szedési érettségnél szignifikánsan vastagabb volt, mint a Prima fajtáé. A felszíni viaszrétegek esetleges szerkezeti különbségeinek feltárása céljából a két vizsgált fajtán konfokális lézer scanning mikroszkóppal végeztünk megfigyeléseket. A lipideket szelektíven festő Auramin O kezelés után a 'Florina' gyümölcs kutikulájának felszínén, míg a 'Prima' fajtánál a viaszbevonat alsó rétegeinél volt megfigyelhető intenzívebb festődés. Az irodalmi adatok szerint a kutikuláris membrán legkülső, vékony rétegének kitüntetett szerepe van a vízvesztés gátlásában („limiting skin” Schönherr and Riederer 1989). Ez a megfigyelés tehát összhangban áll a 'Florina' gyümölcsök fentebbi kísérletben leírt visszafogottabb apadási rátájával. Az alma viaszalkotók és a kutin bioszintéziséért felelős gének azonosítása céljából először *in silico* analízist végeztünk lúdfű szekvenciák segítségével az alma genomi adatbázisban. Az alma genomban több gén szekvenciája jelentős hasonlóságot mutatott a lúdfűben funkcionálisan jellemzett, kutikulával kapcsolatos szerepű génekkel. A lúdfű génekhez hasonló alma homológok kifejeződését a gyümölcs két szövettáján (héj és hús) valamint a levélben követtük RT-PCR módszerrel. Kísérleteinkben több, feltételezett KCS gén kifejeződését mutattuk ki Gegesi-Zöld fajta gyümölcének héjában. Jellemeztük e mellett az alma egy *CER1* homológjának kifejeződési mintázatát, amelynek valószínűsíthető szerepe a zsírsav dekarbonilációs bioszintézis útvonalban lehet (Albert et al 2011a; Albert et al 2011b; Albert et al 2013a). A későbbiekben a vizsgálatokba további, a hosszúláncú lipidek szállításáért, módosításáért, illetve a folyamatok szabályozásáért felelős egyéb géneket is bevontunk. Az évjárathatás kiszűrése érdekében kísérleteinket két évben is megismételtük. A vizsgált gének jelentős részében kizárólagos, vagy döntő mértékű expressziót figyelhettünk meg a héjban (Albert et al 2013b). A kifejeződés specifikitása egyes gének esetében az évjárattól is függött (*LACS2*, *LCR*). Mindkét évben döntően héj specifikusan fejeződött ki például a *CER1* gén (Aarts et al. 1995; Bernard et al. 2012) alma homológja. A szemikvantitatív RT-PCR során tapasztalt kifejeződési különbségek validálása céljából a *Lacerata* gén alma homológjának esetében az eredményeket real-time PCR módszerrel igazoltuk. Az enzim működésének terméke C29 alkán, amely valóban jelen van a 'Florina' almahéj viaszai között. A lúdfű *CER4* gén egy alkoholképző VLCFA specifikus zsírsav CoA redukált kódol (Rowland et al. 2006). A 2011 évi kísérletben az alma *CER4* homológja héj specifikusan fejeződött ki. A Florina alma viaszok között nagy arányban találunk C30, C28 és C26 elsődleges alkoholokat (Verardo et al. 2003), amelyek a *CER4* aktivitás feltételezett termékei lehetnek. A *LACS2*, *LCR* és *WIN/SHN1* homológ szekvenciák koordinált

kifejeződést mutatnak két, egymást követő évben végzett független kísérletben. Ez azért figyelemre méltó, mert mindhárom génnek ugyanabban a biokémiai folyamatban, a kutin bioszintézisben tulajdonítanak (katalitikus vagy szabályozó) szerepet.

**9. Négy búzafajta vizsgálata alapján különbségeket mutattunk ki eltérő szárazságtűrésű genotípusok levél epidermiszének kutikula vastagsága között. A búza zászlós leveleinek kutikulája, a lúdfű modellnövényvel ellentétben, szárazságstressz hatására nem vastagodott meg. A 'Cappelle Desprez' búzafajta esetében a levél vékony kutikulája szárazságstressz érzékenységgel járt együtt (Jäger et al 2014a).** Kísérleteinkben szárazságtűrő (Plainsman V, Mv Emese) és érzékeny (GK Élet, Cappelle Desprez) búzafajtákat hasonlítottunk össze annak érdekében, hogy meghatározzuk a toleranciával kapcsolatba hozható élettani tulajdonságok és morfológiai bélyegek különbségeit. Fitotronban nevelt búza növényeket a virágzás fázisában két egymást követő periódusban vízhiánynak tettünk ki. A kezeléseket előtt és után transzmissziós elektron mikroszkóppal megmértük a zászlós levelek kutikula vastagságát, mint a párologtatás szempontjából feltételezett módon releváns morfológiai paramétert. A kutikuláris mátrix vastagság értékei az ismételt szárítási ciklusok hatására nem változtak. Ez gyökeresen eltér a lúdfű modellnövényben tapasztaltaktól, ahol a vízhiányos stressz a kutikula mátrix vastagodását okozta, ami együtt járt a reziduális párologtatás csökkenésével is (Kosma 2009). Ez a megfigyelés a modell és haszonnövények stressz válaszaiban esetenként meglevő gyökeres eltérésekre hívja fel a figyelmet. A fajták kutikula vastagság értékei között ugyanakkor jelentős különbségeket találtunk, a szárazságra érzékeny 'Cappelle Desprez' kutikulája szignifikánsan vékonyabbnak bizonyult a többi fajtáénál. A vékony kutikula tehát egy olyan bélyeg, amely a vizsgálatainkba vont fajták közül csak az egyik szárazságérzékeny genotípusban mutatkozott. A vastag kutikula viszont nem mindig járt együtt fokozott szárazság toleranciával. A szárazságtűrés nyilvánvalóan komplex tulajdonság, ami több faktor együttes hatására alakul ki. Így olyan élettani tényezőket is kerestünk kísérleteinkben, amelyek további hozzájárulást jelenthetnek a fajták eltérő stressz válaszához. Egyes antioxidáns enzimaktivitások (Gallé et al 2009) és a fejlődő magvak ABA szintjének (Guóth et al 2009) tekintetében a vizsgált fajtáknál már ismertek voltak jellemző különbségek. Egy további releváns élettani tulajdonság az ABA érzékenység, amelynek meghatározása céljából a vizsgált fajták csíranövényeinek gyökér növekedését ABA jelenlétében mértük. Közlés alatt álló vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy a 'GK Élet' fajta a többinél jelentősen alacsonyabb szintű gyökér növekedés gátlást mutatott ABA jelenlétében, ami az ABA válaszadó képesség alacsony szintjét mutatja. Összességében

megállapíthatjuk, hogy a búzafajták vízhiánnyal szembeni toleranciája vagy érzékenysége több tényező együttes hatása révén alakul ki. Kísérleteink során a vizsgált fajtákban olyan élettani és a levél bőrszövettel kapcsolatos morfológiai bélyegeket tártunk fel, amelyeknek nagy valószínűséggel jelentőségük van a stressztűrés folyamataiban, és hozzájárulnak a tolerancia tapasztalt különbségeihez. A 'Cappelle Desprez' fajta szárazságstressz érzékenységéhez vékony kutikulája, míg a 'GK Élet' szenzitivitásához más faktorok, például az ABA érzéketlenség járulhat hozzá.

**10. Lúdfű modellnövény rendszerből származó információk alapján kiválasztottuk a búza *TaeSHN1* gént, amelynek expresszióját a búzalevélben specifikusan a még hüvellyel takart, alapi részben mutattuk ki. A gén lúdfűben történő kifejezésével a kutikularéteg túltermelését, és eddig még nem leírt strukturális változását idéztük elő. A kutikula rétegelt ultrastruktúrájának megzavarása a permeabilitás növekedésével járt együtt. Összességében kifejeződési mintázata és a *TaeSHN1* túltermelő lúdfű fenotípusa alapján funkcionálisan azonosítottuk a gént, mint a kutikula képződését befolyásoló búza transzkripciós faktort (Jäger et al 2014b). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a *WIN/SHN* génekhez köthető funkciókat búzában egy a *TaeSHN1*-hez nagy hasonlóságot mutató géncsalád látja el. A búza kutikula fejlődés genetikai szabályozóit keresve az *Arabidopsis* modell rendszerben már ismert, ilyen szerepű transzkripciós faktorok egyik családját (*WIN/SHN*) használtuk kiindulásként. Az *Arabidopsis thaliana* *WIN/SHN1* szekvencia segítségével a Triticeae Full-Length CDS DataBase adatbázisban (Mochida et al., 2009) azonosítottuk a tplb0011g14 gént, amelyet a továbbiakban *TaeSHN1*-nek nevezünk.. A *TaeSHN1* fehérje 58.1%-ban azonos az *Arabidopsis* *WIN/SHN1* (Aharoni et al 2004, Broun et al., 2004), illetve 72.8% ban az ortológ *OsWR1* rizs transzkripciós faktorokkal (Wang et al 2012). Megvizsgáltuk a *TaeSHN1* gén kifejeződését 4 búza genotípusban a 3. levél hüvely által takart régióban, ahol a kutikula bioszintézise zajlik. Itt mind a négy vizsgált búzafajta esetében a gén kifejeződését tapasztaltuk, míg a levél lemez közepi részeken a *TaeSHN1* mRNS jelenlétét jelző RT-PCR termék nem jelent meg (Jäger et al 2014b). A 'Cappelle Desprez' fajta levélalapjából nyert RT-PCR terméket klónoztuk, a klónok között a *TaeSHN1* szekvenciát és néhány nukleotidot érintő egyedi szekvencia variánsait találtunk. Az eredményekből valószínűsíthető, hogy búzában a lúdfűhöz hasonlóan a *TaeSHN1* génhez nagyban hasonlító kis géncsalád működik. A *TaeSHN1* gén levélalapi kifejeződése arra utal, hogy szerepe lehet a kutikula képződés folyamataiban. Hogy funkciójára nézve közvetlenebb bizonyítékot kapjunk, teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját növényi expressziós vektorba**

klónoztuk át, és *Arabidopsis* növénybe transzformáltuk. A transzgénikus növényvonalak többsége a WIN/SHN transzkripció faktorok túltermelésére jellemző csillogó levélfelszín mutatta (Jäger et al 2014b). A *TaeSHN1*-t túltermelő növényvonalak közül egyet a levél kutikula mikromorfológia szintjén is jellemeztünk. A transzgénikus növények levél kutikulája a vad típusnál vastagabb volt, ami a kutikula alkotóinak túltermelését mutatta. A kutikula matrix szerkezete ugyanakkor erős dezorganizációt mutatott, ami eddig nem tapasztalt új fenotípus a WIN/SHN túltermelő növényeknél. A *TaeSHN1*-t expresszáló lúdfű vonal levél kutikulájának permeabilitását a rozetták sötétben mért vízvesztésével (az RWC értékek csökkenésével) jellemeztük. Az így meghatározott reziduális párologtatás a vad típusnál szignifikánsan magasabbnak bizonyult, a kutikula a vad típusnál nagyobb mértékben volt vízre átjárható (Jäger et al 2014b). A kutikula permeabilitását két további módszerrel is vizsgáltuk. A klorofill kioldás és a Toluidin Kék festődés vizsgálatok eredményei megerősítették a kutikula jobb árjárhatóságát. A *TaSHN1* túltermelő növények vízgazdálkodásának jellemzése céljából azok szárazságtűrését is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint a transzgénikus növények nem lettek ellenállóbbak a vízhiánnyal szemben és egy hosszabb szárítási periódus utáni újraöntözést követően sem mutattak jobb eredményt a vad típusnál. Yang et al (2011) feltételezik, hogy a lúdfű saját *WIN/SHN* génjeinek túltermelésekor fellépő fokozott szárazságtűrést a sztómasűrűség fellépő csökkenése okozhatja. A búza *TaSHN1* kifejezésekor a lúdfű sztómaszám kismértékű csökkenését tapasztaltuk (Jäger et al 2014b), ami nem mond ellent a fenti hipotézisnek. Összességében olyan búza szekvenciát azonosítottunk (*TaSHN1*), amely feltételezhetően egy kis géncsalád tagjaként fejeződik ki a búza levélalapi régiójában, a kutikula képződésének helyén. A *TaeSHN1* gén lúdfűben kifejezve képes volt a levél kutikula képződését befolyásolni. Ez a gén tehát a lúdfű WIN/SHN gének ortológjaként nagy valószínűséggel részt vesz a búza levél kutikula kialakulásának szabályozásában az egyedfejlődés során.

#### 4. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A kutatások több, a kertészeti biotechnológia és agrártudományok szempontjából hasznosítható eredményre vezettek. Az izolált *cbp20* mutáns szárazságtűrő fenotípusa funkcióvesztéses mutáció eredménye. Így lehetőség van haszonnövények mutagenizált populációjából pl TILLING eljárással, célzottan, nem transzgénikus mutáns kiválasztására, ami az esetleges GMO mentes mezőgazdasági hasznosítás lehetőségét is nyitva hagyja. Bár a vizsgált két Solanaceae fajban (paradicsom, burgonya) a *CBP20* homológok csendesítése nem vezetett szárazságtűrés kialakulásához, más haszonnövényekben erre lehet még esély (Papp et al 2003a). Az alma és búza növényekre vonatkozó további kutatási eredményeink közül is több alkalmazható a gyakorlatban. A kutikula, illetve viasz képződésben fontos gének meghatározása a bélyegekhez kapcsolódó genetikai markerek kifejlesztésére ad lehetőséget. Ezek a későbbiekben nemesítési programokban lesznek használhatók pl marker asszisztált szelekció alapjait képezhetik. Alma esetében ez különösen nagy előnyt jelent majd, hiszen a gyümölcsön megjelenő tulajdonságok egy keresztezés esetén itt csak évek múlva válnak vizsgálhatóvá. Búzában a kutikula fejlődéséért felelős szabályozó gén azonosítása szintén egy jelölt gént mutat meg, amely egy lehetséges faktorként vehető számításba a szárazságtűrő genotípusok nemesítésében. A gabonafélék közül árpában már folynak erőfeszítések a kutikula képződéssel kapcsolatos gének genetikai térképre helyezése céljából (Li et al 2013). A búza szárazságtűrésre nemesítésében egy eddig kevésbé vizsgált paraméterként a levél kutikula mátrix vastagság figyelembe vétele javasolható. Nemesítési vonalak jellemzésére alkalmas további módszerként értékeljük az ABA érzékenységet becsülő gyökér növekedési gátlás tesztet, amely csíranövényeken végezhető, gyors, valamint kevésbé eszköz és anyagigényes. A vékony kutikula és a csíranövények ABA érzéketlensége a gyenge stressztűrést valószínűsítő indikátorok. Az itt bemutatott bélyegek és kísérleti módszerek segítségével a szárazságtűrés komplex fenotípusának természetesen csak egy-egy meghatározójára nézve nyertünk információt, abban jónéhány további faktor szerepe biztosan megjósolható.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A dohány 271/H2 transzkripció géncsendesítési rendszerben a promóter homológián alapuló géncsendesítés a csendesített promóter meiotikusan örökölhető DNS metilációjával járt együtt, amely elsősorban CG és CNG kontextusú citozin bázisokat érintett.
2. A transzkripció géncsendesítést kiváltani képes H2 dohány lokusz szerkezete erősen komplexnek bizonyult, több, egyes esetekben töredékes promóter szekvenciát és prokarióta, nem T-DNS eredetű szakaszokat tartalmazott.
3. Az *Arabidopsis* MIR159 miRNS processzálásának legalább egyes lépései a sejtmagban zajlanak. A TGS siRNS-eket szekvencia jellemzőik alapján a DCL1-től eltérő enzim processzálhatta. A DCL1 fehérje sejtmagi lokalizációjú, és nem szükséges a TGS folyamataihoz.
4. Pleiotróp morfológiai bélyegek alapján T-DNS mutagenizált lúdfű populációból megváltozott stressztűrési mutánsokat izoláltunk. Ezek közül részletesen jellemeztünk egy új, ABA túlérzékeny, szárazságtűrő, víztakarékos mutánst (*cap binding protein 20*). A *cbp20* mutáns genetikai lézióját az RNS szabályozás egyik kulcsfontosságú komplexén, a magi cap kötő komplexen belül a *Cap binding protein 20* génre lokalizáltuk.
5. Megállapítottuk, hogy a *cbp20* mutáns bőrszövege a vad típustól eltérően fejlődik. A különbségek között kutikula vastagodást találtunk, ami együtt járt a reziduális párologtatás csökkenésével.
6. A *cbp20* és egy további ABA túlérzékeny, víztakarékos lúdfű mutáns (*eral*) esetében is kimutattuk, hogy a csökkentett párologtatással járó szárazságtűrő fenotípus fokozottabban párologtató növények szomszédságában, azokkal vízért való versengés esetén nem jelenik meg.
7. A *cbp20* mutáns csökkentett gázcsereje jó vízellátás mellett a fotoszintetikus aktivitást nem befolyásolta, a fotoszintézis limitációja nem jelentkezett.
8. Az *Arabidopsis* modellrendszer alapján az alma genomból olyan géneket szelektáltunk, amelyek működése feltehetően a kutikula képződéséhez kapcsolódik. A kiválasztott szekvenciák közül többnek a kifejeződését döntően a gyümölcshéjra jellemzőnek találtuk. Így olyan jelölt géneket azonosítottunk, amelyeknek valószínűsíthető a szerepe az alma gyümölcs kutikula képződésében.

9. Négy búzafajta vizsgálata alapján különbségeket mutattunk ki eltérő szárazságtűrésű genotípusok levél epidermiszének kutikula vastagsága között. A búza zászlós leveleinek kutikulája, a lúdfű modellnövényel ellentétben, szárazságstressz hatására nem vastagodott meg. A 'Cappelle Desprez' búzafajta esetében a levél vékony kutikulája szárazságstressz érzékenységgel járt együtt.

10. Lúdfű modellnövény rendszerből származó információk alapján kiválasztottuk a búza *TaeSHNI* gént, amelynek expresszióját a búzalevélben specifikusan a még hüvellyel takart, alapi részben mutattuk ki. A gén lúdfűben történő kifejezésével a kutikularéteg túltermelését, és eddig még nem leírt strukturális változását idéztük elő. A kutikula rétegelt ultrastruktúrájának megzavarása a permeabilitás növekedésével járt együtt. Összességében kifejeződési mintázata és a transzgénikus lúdfű fenotípusa alapján funkcionálisan azonosítottuk a *TaeSHNI* gént, mint a kutikula képződését befolyásoló búza transzkripciós faktort. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a *WIN/SHN* génekhez köthető funkciókat búzában egy a *TaeSHNI*-hez nagy hasonlóságot mutató géncsalád látja el.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

### Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények:

- Albert Z, Deák C, Miskó A, Tóth M, Papp I 2011a Development of cDNA normalization system and preliminary transcription analysis of KCS genes in apple tissues. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 59(3):9-12.
- Albert Z, Ivanics B, Molnár A, Deák C, Miskó A, Tóth M, Papp I 2011b Characterization of gene expression in apple, connected potentially to cuticular wax production. *Acta Biologica Szegediensis* 55(1):59-61.
- Albert Z, Ivanics B, Molnár A, Deák C, Miskó A, Tóth M, Papp I 2013a Expression analysis of KCS genes potentially involved in cuticular wax production in the apple cultivar 'Gegesi Zöld'. *Acta Horticulturae (ISHS)* 981:205-208.
- Albert Z, Ivanics B, Molnár A, Miskó A, Tóth M, Papp I 2013b Candidate genes of cuticle formation show characteristic expression in the fruit skin of apple. *Plant Growth Regulation* 70:71–78.
- Bacsó R, Janda T, Galiba G, Papp I 2008a Restricted transpiration may not result in improved drought tolerance in a competitive environment for water. *Plant Science* 174:200-204.
- Bacsó R, Molnár A, Papp I, Janda T 2008b Photosynthetic behaviour of *Arabidopsis* plants with a Cap Binding Protein 20 mutation under water stress conditions. *Photosynthetica* 46(2):268-272.
- Bacsó R, Papp I 2008 Investigation of the regulation of the *CBP20* gene in *Arabidopsis*. *Acta Biologica Szegediensis* 52(1):153-154.
- Deák C, Jäger K, Fábrián A, Nagy V, Albert Z, Miskó A, Barnabás B, Papp I 2011 Investigation of physiological responses and leaf morphological traits of wheat genotypes with contrasting drought stress tolerance. *Acta Biologica Szegediensis* 55(1):69-71.
- Deák C, Jäger K, Fábrián A, Papp I 2010 Low and high  $\psi$  ways from post-transcriptional RNA regulation to drought tolerance. *Plant Signal Behav.* 5(12):1549-52.
- Jäger K, Fábrián A, Eitel G, Szabó L, Deák Cs, Barnabás B, Papp I 2014a A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology* 171:1256–1266.
- Jäger K, Fábrián A, Tompa G, Deák C, Höhn M, Olmedilla A, Barnabás B, Papp I 2011 New phenotypes of the drought-tolerant *cbp20 Arabidopsis thaliana* mutant have changed epidermal morphology. *Plant Biol. (Stuttg)* 13(1):78-84.
- Jäger K, Miskó A, Fábrián A, Deák Cs, Kiss-Bába E, Polgári D, Barnabás B, Papp I 2014b Expression of a WIN/SHN type regulator of wheat triggers disorganized proliferation of the *Arabidopsis* leaf cuticle. *Biologia Plantarum in press* A publikáció 2014 Aug 20-án elfogadásra került, az erről szóló értesítést mellékletként a pályázathoz csatolom. A publikációs folyamatban a pályázat beadásának időpontjáig a cikk még DOI számot nem kapott, ezért az MTMT tudományos statisztikában nem szerepel.
- Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJ 1999 Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters *in trans*. *Plant J.* 17(2):131-40.



Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette F, Matzke AJM 2004 Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3):129-141.

Papp I, Koncz C, Nagy F 2003a Fokozottan szárazságtűrő növény / Drought resistant plant P0303778 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés

Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJM 2003b Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology* 132:1382-1390.

Papp I, Mur LA, Dalmadi A, Dulai S, Koncz C 2004 A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 55(5):679-86.

Park YD, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJ, Matzke MA 1996 Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9(2):183-94.

#### **Egyéb idézett közlemények:**

Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A 1995 Molecular characterization of the *CERI* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7(12):2115-27.

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.

Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M 2002 RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 Suppl 4:16499-506.

Bernard A, Domergue F, Pascal S, Jetter R, Renne C, Faure JD, Haslam RP, Napier JA, Lessire R, Joubès J 2012 Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell* 24(7):3106-18.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818):363-6.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorkach J 2001 Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13:1499-1510.

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.

Burgyán J, Havelda Z 2011 Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16(5):265-72.

Buschhaus C, Jetter R 2011 Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? *J Exp Bot.* 62(3):841-53.

Chaves MM 1991 Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1-16.

- Christie M, Carroll BJ 2011 SERRATE is required for intron suppression of RNA silencing in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 6(12):2035-7.
- Clarke JH, Tack D, Findlay K, Van Montagu M, Van Lijsebettens M 1999 The SERRATE locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in *Arabidopsis*. *Plant J.* 20(4):493-501.
- Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C 2008 Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J.* 53(1):53-64.
- Costa F, Alba R, Schouten H, Soglio V, Gianfranceschi L, Serra S, Musacchi S, Sansavini S, Costa G, Fei Z, Giovannoni J 2010 Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening. *BMC Plant Biol.* 10:229.
- Cougot N, van Dijk E, Babajko S, Séraphin B 2004 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem Sci.* 29(8):436-44.
- Covarrubias AA, Reyes JL 2010 Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ.* 33(4):481-9.
- da Silva JM, Arrabaça MC 2004 Photosynthesis in the water-stressed C4 grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. *Physiol. Plant.* 121:409-420.
- de Lima JC, Loss-Morais G, Margis R 2012 MicroRNAs play critical roles during plant development and in response to abiotic stresses. *Genet Mol Biol.* 35(4 (suppl):1069-77.
- Dudits D Ed. 2006 A búza nemesbítésének tudománya. MTA-SzBK – Winter Fair Kft, Szeged
- El-Tayeb MA 2006 Differential response of two *Vicia faba* cultivars to drought: growth, pigments, lipid peroxidation, organic solutes, catalase and peroxidase activity. *Acta Agron Hung.* 54: 25-37.
- Fagard M, Vaucheret H 2000 (Trans)Gene silencing in plants: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51:167-194.
- Flexas J, Medrano H 2002 Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot.* 89(2):183-9.
- Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B 2009 Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *Int J Mol Sci.* 10(7):3168-85.
- Gallé A, 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.* May 20. doi:pii: S0176-1617(13)00187-9. 10.1016/j.jplph.2013.04.010.
- Gallé Á, Csiszár J, Secenji M, Guóth A, Cseuz L, Tari I, Györgyey J, Erdei L 2009 Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. *Journal of Plant Physiology* 166: 1878-91.
- González A, Ayerbe L 2010 Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley. *Euphytica* 172(3):341-349.

- 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* 28:167–176.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D 2002 Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21(17):4671-9.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC 1999 A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441):950-2.
- Hooker TS, Lam P, Zheng H, Kunst L 2007 A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(3):904-13.
- Hu X, Zhang Z, Li W, Fu Z, Zhang S, Xu P 2009 cDNA cloning and expression analysis of a putative decarboxylase TaCer1 from wheat (*Triticum aestivum* L.) *Acta Physiologiae Plantarum* 31:1111–1118.
- 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.
- 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.
- Hurry VM, Huner NP 1992 Effect of cold hardening on sensitivity of winter and spring wheat leaves to short-term photoinhibition and recovery of photosynthesis. *Plant Physiol.* 100(3):1283-90.
- Izaurrealde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW 1994 A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78:657-668.
- Janda T, Kissimon J, Szigeti Z, Veisz O, Páldi E 1994 Characterization of cold hardening in wheat using fluorescence induction parameters. *J Plant Physiol.* 143: 385-388.
- Javelle M, Vernoud V, Depège-Fargeix N, Arnould C, Oursel D, Domergue F, Sarda X, Rogowsky PM 2010 Overexpression of the epidermis-specific homeodomain-leucine zipper IV transcription factor Outer Cell Layer1 in maize identifies target genes involved in lipid metabolism and cuticle biosynthesis. *Plant Physiol.* 154(1):273-86.
- Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B. 2002 Cuticular waxes of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book.*;1:e0016. doi: 10.1199/tab.0016.
- Ju Z, Bramlage WJ 2001 Developmental changes of cuticular constituents and their association with ethylene during fruit ripening in ‘Delicious’ apples. *Postharvest biology and technology* 21(3):257-263.
- Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Höfte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P 2007 The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 19(4):1278-94.
- Kazan K 2003 Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci.* 8(10):468-71.

- 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.
- 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.
- Kosma DK, Nemacheck JA, Jenks MA, Williams CE 2010 Changes in properties of wheat leaf cuticle during interactions with Hessian fly. *Plant J.* 63(1):31-43.
- Kuhn JM, Hugouvieux V, Schroeder JI 2008 mRNA cap binding proteins: effects on abscisic acid signal transduction, mRNA processing, and microarray analyses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 326:139-50.
- Larsson S, Svenningsson M 1986 Cuticular transpiration and epicuticular lipids of primary leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 68(1):13-19.
- 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.
- Li C, Ma X, Wang A, Nevo E, Chen G 2013 Genetic mapping of cuticle-associated genes in barley. *Cereal Research Communications* 41(1):23-34.
- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D 2009 Ectopic expression of miR396 suppresses *GRF* target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiol Plant.* 136(2):223-36.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC 2008 Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14(5):836-43.
- 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.
- Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J 2006 SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep.* 7(10):1052-8.
- Machida S, Chen HY, Adam Yuan Y 2011 Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Res.* 39(17):7828-36.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, et al, Seki M 2008 *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol.* 49(8):1135-49.
- Matzke AJ, Neuhuber F, Park YD, Ambros PF, Matzke MA 1994 Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol Gen Genet.* 244(3):219-29. Erratum in: *Mol Gen Genet* 1995 Apr 20;247(2):264.
- Matzke MA, Matzke AJ 1995 How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* 107(3):679-685.
- Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJ 1989 Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8(3):643-9.

- Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L 2008 Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 174(4):420–431.
- Meheriuk M, Porritt SW 1972 Effects of waxing on respiration, ethylene production, and other physical and chemical changes in selected apple cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* 52(2):257-259.
- Merah O, Deléens E, Souyris I, Monneveux P 2000 Effect of glaucousness on carbon isotope discrimination and grain yield in durum wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185(4):259-265.
- Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Ogihara Y, Shinozaki K 2009 TriFLDB: a database of clustered full-length coding sequences from Triticeae with applications to comparative grass genomics. *Plant Physiol.* 150(3):1135-46.
- Nawrath C 2006 Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr Opin Plant Biol.* 9(3):281-7.
- Ner-Gaon H, Leviatan N, Rubin E, Fluhr R 2007 Comparative cross-species alternative splicing in plants. *Plant Physiol.* 144(3):1632-41.
- Neuhuber F, Park YD, Matzke AJ, Matzke MA 1994 Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol Gen Genet.* 244(3):230-41. Erratum in: *Mol Gen Genet* 1995 247(2):264.
- Pardo JM 2010 Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol.* 21(2):185-96.
- Rawson HM, Clarke JM 1988 Nocturnal transpiration in wheat. *Functional Plant Biology* 15(3):397-406.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP 2002 MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16(13):1616-26. Erratum in: *Genes Dev* 2002 16(17):2313.
- Richardson A, Franke R, Kerstiens G, Jarvis M, Schreiber L, Fricke W 2005 Cuticular wax deposition in growing barley (*Hordeum vulgare*) leaves commences in relation to the point of emergence of epidermal cells from the sheaths of older leaves. *Planta* 222:472-83.
- Richardson A, Wojciechowski T, Franke R, Schreiber L, Kerstiens G, Jarvis M, Fricke W 2007 Cuticular permeance in relation to wax and cutin development along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf. *Planta* 225: 1471-81.
- Rowland O, Zheng H, Hepworth SR, Lam P, Jetter R, Kunst L 2006 CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(3):866-77.
- Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M 2012 Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant Signal Behav.* 7(7):767-70.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R 2008 Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol.* 59:683-707.
- 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.

- Schönherr J, Riederer M 1989 Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. In Reviews of environmental contamination and toxicology pp 1-70. Springer New York.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ 2001 Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410(6826):327-30.
- Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park MJ, Go YS, Park CM 2011 The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(3):1138-52.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JN, Kooter JM 2001 Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol*. 11(6):436-40.
- Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyán J 2002 A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*. 21(12):3070-80.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK 2006 Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*. 18(8):2051-65. Erratum in: *Plant Cell*. 2006 Sep;18(9):2415.
- 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.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD 2003 A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*. 17(1):49-63.
- Vaucheret H, Kronenberger J, Lepingle A, Vilaine F, Boutin JP, Caboche M 1992 Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J*. 2(4):559-69.
- Verardo G, Pagani E, Geatti P, Martinuzzi P 2003 A thorough study of the surface wax of apple fruits. *Anal Bioanal Chem*. 376(5):659-67.
- Veraverbeke EA, Van Bruaene N, Van Oostveldt P, Nicolaï BM 2001 Non destructive analysis of the wax layer of apple (*Malus domestica* Borkh.) by means of confocal laser scanning microscopy. *Planta* 213(4):525-33.
- Wang L, Song X, Gu L, Li X, Cao S, Chu C, Cui X, Chen X, Cao X 2013 NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25(2):715-27.
- 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.
- Wilson KF, Fortes P, Singh US, Ohno M, Mattaj IW, Cerione RA 1999 The nuclear cap-binding complex is a novel target of growth factor receptor-coupled signal transduction. *J Biol Chem*. 274(7):4166-4173.

- Yu D, Ranathunge K, Huang H, Pei Z, Franke R, Schreiber L, He C 2008 Wax Crystal-Sparse Leaf1 encodes a beta-ketoacyl CoA synthase involved in biosynthesis of cuticular waxes on rice leaf. *Planta* 228:675-85.
- Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H 2006 SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47(6):841-50.
- 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.

### Egyéb saját szakkikkek:

- Albert Z, Beh M, Kuznyák L, Papp I 2013 Ripening of kiwi fruits by ethylene treatment. *Acta Horticulturae (ISHS)* 981:699-703.
- Albert Z, Erős-Honti Z, Solymossy G, Kuznyák L, Miskó A, Deák C, Ladányi M, Terbe I, Papp I 2012 Epidermal and exodermal tissue structures are characteristic for the long shelf-life 'Kárpia' pepper cultivar. *Acta Alimentaria Vol 41 (Suppl.):*1–11.
- Bacsó R, Janda T, Galiba G, Papp I 2008 Study of the fitness from the *cbp20* mutant *Arabidopsis*. *Cereal Research Communications* 36:2091-2094.
- Compel P, Papp I, Bibo M, Fekete C, Hornok L 1999 Genetic interrelationships and genome organisation of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. *Virus Genes* 18(1):49-56.
- Compel P, Papp I, Fekete C, Hornok L 1997 Characterization of dsRNA elements in *Fusarium poae*. *Cereal Res. Communications* 25 (3):265-266.
- Dorgai L, Papp I, Papp P, Kalman M, Orosz L 1993 Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41. *Nucl Acids Res* 21:1671.
- Fekete C, Giczey G, Papp I, Szabo L, Hornok L 1995 High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiology Letters* 131:295-299.
- Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke MA, Matzke AJM 1997 Molecular and cytogenetic analysis of stably and unstably expressed transgenic loci in tobacco. *Plant Cell* 9:1251-1264.
- Jakowitsch J, Papp I, Matzke MA, Matzke AJM 1998 Identification of a new family of highly repetitive DNA, NTS9, that is located predominantly on the S9 chromosome of tobacco. *Chromosome Research* 6:649-659.
- Majláth I, Szalai G, Papp I, Vanková R, Janda T 2011 Atnoa1 mutant *Arabidopsis* plants induce compensation mechanisms to reduce the negative effects of the mutation. *Journal of Plant Physiology* 168(11):1184-1190.

- Majláth I, Szalai G, Papp I, Vanková R, Janda T 2011 Atnoa1 mutation may induce temperature acclimation mechanisms in *Arabidopsis thaliana*.  
Acta Biologica Szegediensis, 55(1):113-116.
- Matzke M, Aufsatz W, Gregor W, van der Winden J, Papp I, Matzke AJM 2001 Ion transporters in the nucleus?  
Plant Physiology 127: 10-13.
- Matzke M, Weiger TM, Papp I, Matzke AJM 2009 Nuclear membrane ion channels mediate root nodule development.  
Trends in Plant Sci. 14(6):295-298.
- Matzke MA, Moscone EA, Park Y-D, Papp I, Oberkofler H, Neuhuber F, Matzke AJM 1994 Inheritance and expression of a transgene insert in an aneuploid tobacco line.  
Mol Gen Genet. 245:471-485.
- Mur LAJ, Aubry S, Mondhe M, Kingston-Smith A, Gallagher J, Timms-Taravella E, James C, Papp I, Hörtensteiner S, Thomas H, Ougham H 2010 Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*.  
New Phytologist 188(1):161–174.
- Papp I, Dorgai L, Papp P, Jonas E, Olasz F, Orosz L 1993 The bacterial attachment site of the temperate *Rhizobium* phage 16-3 overlaps the 3' end of a putative proline tRNA gene.  
Mol Gen Genet. 240:258-264.
- Papp I, Iglesias VA, Moscone EA, Michalowski S, Spiker S, Park Y-D, Matzke MA, Matzke AJM 1996 Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy.  
The Plant Journal 10(3):469-478.
- Semsey S, Papp I, Buzas Z, Patthy A, Orosz L, Papp P 1999 Identification of site-specific recombination elements *int* and *xis* of the *Rhizobium* temperate phage 16-3.  
Journal of Bacteriology 181(14): 4185-4192.