

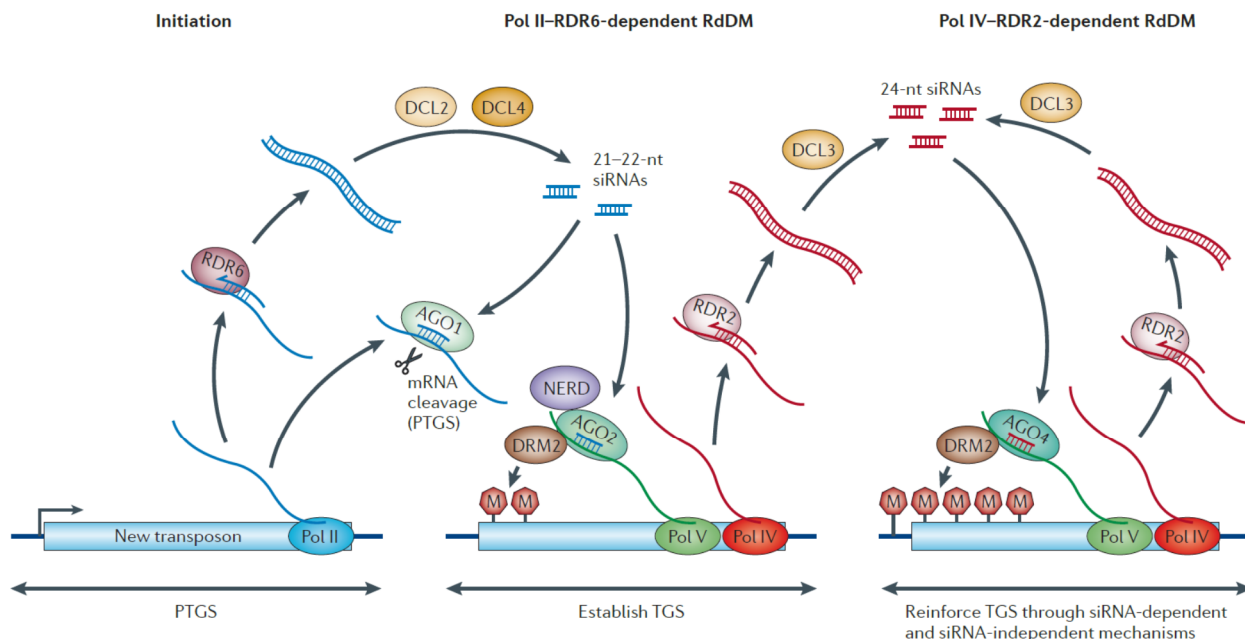
Válaszok Dr Silhavy Dániel bírálataira

Köszönöm doktori dolgozatomban szakértő bírálatát, a kérdéseket és értékes megjegyzéseket. A dolgozat szerkezetére vonatkozó kritikákat elfogadom. Az RdDM ma elfogadott modelljére vonatkozó összehasonlító áttekintést másik bírálóm kérésére is eleget téve beillesztettem az előadásomba.

1. A H2 TGS lókuszt igen komplex, több hibás beépülés eredménye. A szövegben utal rá, hogy a 271-es lókuszt helyzete, nem szerkezete révén válthat ki TGS-t. A jelenlegi ismeretünk szerint miként történhet a siRNS képzés a két lókuszon?

A H2 és 271 lokuszok megfigyelt kromoszómális lokalizációja kísérleteink értékelésénél azt sugallta, hogy a heterokromatin közelsége kedvezhet a TGS kialakulásának. A genomi környezet befolyását az is valószínűsíthető, hogy bár a H2 lokuszt igen komplex szerkezetűnek találtuk, annak 2 jelentős méretű darabját külön transzformálva TGS érzékeny (K81) dohány vonalba, azok mégsem okoztak géncsendesítést. Jelenlegi ismereteink nem adnak egyértelmű útmutatást arra, hogy a genom szekvencia, vagy az érintett gén kifejeződésének milyen tulajdonságai indítják el az RdDM kialakulását. A DNS és hiszton metiláció jól dokumentáltan serkenti az RdDM effektor fehérjék kapcsolódását, és funkcionális komplexbe szerveződését. A nagy kiterjedésű, stabil heterokromatin közelsége azonban mai tudásunk szerint nem valószínű, hogy döntő tényező. Kísérleti rendszerünkben ugyanakkor az átíró RNS tulajdonságai mellett lehetségesnek tartom a szekvencia környezet befolyását a következők szerint: A H2 lokusz esetében jelentősége lehet az integrálódott DNS szakaszt határoló genomi régióban talált „gypsy” szerű retrotranszpozon szekvenciáknak. Bebizonyosodott ugyanis az, hogy a genomban az RNS Polimeráz V a transzpozon szekvenciákhoz asszociál, így jelen lehetett a H2 lokusz közelében.

Az RdDM-el kiváltott TGS a növényi sejtben megjelenő „invazív” DNS (pl. aktív transzpozonok, vagy transzgének) elleni elsődleges védekezési mechanizmusként működik. Az RdDM iniciációjára nézve a legvalószínűbb feltevés az „aberráns RNS” koncepcióhoz nyúl vissza, amely a képződő mRNS-ek egyes tulajdonságaival magyarázza a folyamat elindulását (1. ábra).



1. ábra Modell RdDM közvetített géncsendesítés iniciációjára (Matzke and Mosher 2014).

Az RNS Polimeráz II által átírt „aberráns mRNS” megjelenése (például az mRNS magas koncentrációja) esetén ezen a templáton az RDR6 polimeráz RNS szintézist indít, így dsRNS képződik. Ezt DCL2 vagy DCL4 enzimek 21 – 22 nt hosszú siRNS-ekké hasítják, amik az AGO1 fehérjével RISC komplexbe épülnek és az mRNS lebomlását okozzák (klasszikus PTGS út). Ha a képződött siRNS mennyisége túl nagy, az az AGO2 számára is hozzáférhetővé válik, ami a NERD (NEEDED FOR RDR2-INDEPENDENT DNA METHYLATION) fehérjével alkotott komplexként a DRM2 metiláz működését serkenti, így a DNS templát alacsony szintű metilációját okozza. Ez kedvez PolIV polimeráz kötődésének és helyileg elindítja a kanonikus RdDM folyamatot (RDR2, DCL3, 24nt siRNS-ek, AGO4, DRM2 részvételével), ami végül a szekvencia transzkripció csendesítéséhez vezet.

Hivatkozás:

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

2. A P19C vonalakban a si- és miRNS-ek szintje nőtt, míg a p19N vonalakban erősen csökkent. Ugyanakkor a kétféle vonal fenotípusa azonos volt. Hogyan magyarázható ez?

Feltételezhető, hogy a vizsgált NOSpro heterokromatikus siRNS-ek és MIR159 mellett az endogén siRNS-ek és további miRNS-ek szintje is hasonlóképpen változott meg a P19, csendesítést szupresszáló fehérjét kifejező lúdfű vonalakban. A P19 transzgenikus vonalak fenotípusának legvalószínűbb oka a funkcióképes miRNS-ek szintjének csökkenése. siRNS-ek hiányában (pl. az *ago* mutánsok többségénél) az egyedfejlődés normális úton zajlik (Vaucheret 2008), míg az alacsony miRNS szint az itt tapasztaltnál hasonló, markáns fenotípussal járhat. Ez megfigyelhető például *ago1* (Morel et al 2002) vagy a *cap binding protein* mutánsok esetében is, amik fenotípusa átfed a P19 fehérjét kifejező vonalakéval.

Véleményem szerint a sejtmagba irányított P19N fehérje az miRNS-ek nukleuszban történő, 3' terminális nukleotidon történő metilációját akadályozta meg (Lózsza et al 2008). Ennek védő hatása nélkül az miRNS szálak gyorsabban bomlottak le, alacsony szintjük akadályozta megfelelő működésüket. A P19C fehérje szintén csökkentette a funkcionális miRNS-ek mennyiségét, de úgy, hogy a citoplazmában a már metilált MIR159-hez kapcsolódva annak RISC komplexbe való épülését hátráltatta. Ezzel az miRNS további processzálása (lebomlása) is lelassulhatott. Valószínűnek tartom tehát, hogy a P19C vonalakban a működésben gátolt, P19-hez kötött MIR159 mennyiségének emelkedését figyelhettük meg.

Hivatkozások:

Vaucheret H (2008) Plant ARGONAUTES. Trends Plant Sci. 13(7):350-8.

Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. Plant Cell 14(3):629-39.

Lózsza R, Csorba T, Lakatos L, Burgyán J (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. Nucleic Acids Res. 36(12):4099-107.

3. A CBP20 mutánsok szárazságtűrők és ABA hiperérzékenyek csírázáskor. Vizsgálták-e a sztómák ABA szenzitivitását?

A sztóma konduktancia *cbp20* növényekben megfigyelt alacsony értéke (dolgozat 29. ábra) azt valószínűsíti, hogy a mutánsban az endogén ABA hatására a gázcserenyílások stressz mentes környezetben is zártabbak maradnak. A sztómák ABA érzékenységét azonban direkt módszerrel nem vizsgáltuk. A *cbp20*-hoz hasonló fenotípusú *cbp80/abh1* mutáns zárósejtjein mikroszkópos megfigyeléssel exogén ABA hatására fokozottabb záródást tapasztaltak (Hugouveux et al 2002, Figure 8/A). Ugyanebben a kísérletsorozatban patch-clamp kísérletekkel kimutatták a zárósejtek kifelé irányuló anion csatornáinak fokozott aktivitását, és a befelé irányuló Kálium csatornák gátolt működését is (Hugouveux et al 2002, Figure 7/C,D).

Hivatkozás:

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.

4. A CBP20 mutánsok bőrszövege, kutikulája módosult. Hogyan hat a CBP20 mutáció a kutikula szintézisben részt vevő gének expressziójára, alternatív splicing mintázatára?

A magi cap kötő komplex mutánsaiban történő alternatív splicing eseményeket Laubinger és mtsai (2008) valamint Raczyńska és mtsai (2009) vizsgálták. CBP80/ABH1 (és SERRATE) kölcsönhatnak a spliceosome-al, ami befolyásolja egyes mRNS-ek (legtöbbször első) intronjának kivágódását. Ennek

szerpe van az intronnal rendelkező transzkriptumok géncsendesítés elleni védelmében is (Christie and Carroll 2011). A közlemények arról számolnak be, hogy a *cbp20* és *cbp80/abh1* mutánsok átfedő, de nem azonos változásokat okoztak a splicing mintázatban, ami a *serrate*, *hyl1* és *dcl1* mutánsokra is igaznak bizonyult (Raczynska et al 2014). Laubinger és mtsai (2008) 244 gén esetében mutatták ki, hogy az intron kivágódás hatékonysága valamelyik cap kötő fehérje mutánsban és e mellett a *serrate* esetében is változott. Ezek közül azokat az eseteket vizsgálva ahol a visszatartott intronok aránya a vad típushoz képest legalább 1,5-szeresre nőtt, nem találtam ismert, a kutikula fejlődéséért felelőssé tehető gént. A szekvenciák között ugyanakkor számos ismeretlen funkciójú szabályozó és egyéb gén szerepel, amelyek közül egyesek részt vehetnek a kutikula kialakulását meghatározó folyamatokban. Raczynska és munkatársai (2010) a megtartott intronok mellett egyéb alternatív splicing eseményeket is vizsgált *cbp20*, *cbp80* és *cbp20/80* mutánsokban. 101 érintett gén között azonban megint csak nem találtam olyant, amely jelen tudásunk szerint egyértelműen kapcsolatba hozható lenne a kutikula képződésével. Az alternatív splicing létrejötte mellett az mRNS szint változása kevesebb gént érint a cap kötő komplex mutánsokban. A *cbp80/abh1* mutáns esetében 8000 transzkriptum microarray analízisével csak 18 gén esetében találtak szignifikáns csökkenést, illetve 13 mRNS szintje emelkedett (Hugouvieux et al 2001). A közölt 18 db, csökkent mRNS szintű gén annotációja alapján ezek nem kódoltak a kutikula bioszintézis ismert résztvevőjét vagy szabályozóját. A magi cap kötő komplex egy később felismert, jelentős funkciója az miRNS-ek érésének befolyásolása, amire a következő kérdésre adott válaszban térek ki. Előre bocsátom azonban, hogy ez a szabályozási mód sem fedte fel eddig az nCBC effektor mechanizmusát a kutikula fejlődésre vonatkozóan.

Hivatkozások:

Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Räscher 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.

Raczynska KD, Simpson CG, Ciesiolka A, Szewc L, Lewandowska, D, McNicol J, Szweykowska-Kulinska Z, Brown JWS, Jarmolowski A (2010) Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 38(1):265-278.

Christie M, Carroll BJ (2011) SERRATE is required for intron suppression of RNA silencing in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*. 6(12):2035-7.

Raczynska KD, Stepien A, Kierzkowski D, Kalak M, Bajczyk M, McNicol J, Simpson CG, Szweykowska-Kulinska Z, Brown JW, Jarmolowski A (2014) The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana* *Nucleic Acids Res*. 42(2):1224-44.

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.

5. A CBP20 és a SERRATE mutánsok fenotípusa hasonló, de a SERRATE nem szárazságtűrő. Mi lehet ennek az oka? A SERRATE mutáció menti a LACERATA kutikula szintézis gén hiányában megjelenő fenotípusos jelek jelentős részét. Ismert-e, hogy a CBP20/LACERATA dupla mutáns hogyan viselkedik?

A *serrate* pleiotróp lúdfű mutánst az egyedfejlődési fázisaiban és levélmorfológiában mutatott bélyegei alapján írták le (Clarke et al 1999). SERRATE a DCL1 és HYL1 fehérjékkel együtt részt vesz az miRNS-eket processzáló komplex működésében (Lobbess et al 2006). A *serrate* mutánsban a legtöbb vizsgált miRNS processzálása erősen gátolt (Yang et al 2006). A *cbp20* és *cbp80/abh1* mutánsokban szintén gátolódik több pri-miRNS érése, azonban az miRNS fajtákra a mutációk nem egyformán hatékonyak (Kim et al 2008). A *cbp* és *serrate* mutációk a korábbiakban leírtak szerint az mRNS-ek alternatív splicingját is különbözőképpen befolyásolták. Ugyanezek a mutációk egy még kevésbé ismert, nem kódoló RNS típus, a lincRNS-ek képződésére is átfedő, de nem azonos módon hatnak (Liu et al 2012). Mivel az nCBC mutánsokban még sem az ABA válaszok (pl. sztóma zárás) potenciációja, sem a kutikula fejlődés serkentése nem teljesen feltárt mechanizmussal zajlik, jelenleg nem tudjuk a szárazságtűrésben megmutatkozó különbség okát megadni. A *serrate* mutáció gátló hatása az miRNS-ekre erősebb és átfogóbb mint a *cbp* mutációké, de megemelkedett stressztűrést rajta nem mutattak ki (ABA túlérzékenységet viszont igen). Ezért valószínűbbnek tartom, hogy a jobb stressz toleranciához vezető döntő tulajdonságok inkább az mRNS(-ek) alternatív splicing-jának tudhatók be a *cbp* mutánsokban. Az is elképzelhető, hogy a hatás valamiképpen a lincRNS-ek működéséhez kapcsolható, erről azonban jelenleg csak nagyon korlátozott információ áll rendelkezésünkre.

Voisin és munkatársai (2009) feltételezték, hogy egyes kutikulát érintő mutánsok (*lcr*, *fdh*, *bdg*) egymáshoz hasonló fenotípusa egy, a sejt integritást védő, a sebzési válaszhoz hasonló, az eredeti defektushoz képest másodlagos kutikula proliferáció következtében alakulhat ki. *in silico* analízissel ennek a válasznak részeként azonosították SERRATE fehérjét (és így az RNS érésben működő fehérje komplexet). A *se bdg*, *se lcr* kettős mutánsokban valóban nem jelentek meg a *bdg* és *lcr* mutáns fenotípusok egyes elemei (szerv fúziók, *se lcr* esetében a permeabilitás növekedése). A kísérletek végső konklúziója az volt, hogy az RNS processzáló enzim komplex részt vesz (legalábbis bizonyos helyzetekben) a kutikula képzésben. Ennek további bizonyítására valóban érdemes lenne létrehozni a *lcr cbp20* kettős mutánst. Ha a feltételezés igaz, akkor a *cbp20* mutációnak is hatással kell lennie a *lacerata* növények fenotípusára. Ezt a keresztezést egyenlőre még nem végeztük el, a javaslatot azonban megkívánandónak tartom, és köszönöm.

Hivatkozások:

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.

Lobbess 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.

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.

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.

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.

Voisin D, Nawrath C, Kurdyukov S, Franke RB, Reina-Pinto JJ, Efremova N, Will I, Schreiber L, Yephremov A (2009) Dissection of the complex phenotype in cuticular mutants of Arabidopsis reveals a role of SERRATE as a mediator. PLoS Genet. 5(10):e1000703.

6. A CBP20 csendesített paradicsom nem volt szárazságtűrő. Mi igazolja, hogy a csendesített vonalban biológiailag releváns szinten csökkent a CBP20 szint?

A CBP20 csendesített paradicsom növények előállítása és vizsgálata nem tárgya a dolgozatnak, a kísérletek eredményeit nem foglaltam a dolgozat „Új tudományos eredményei”-nek pontjai közé. A félreértést az okozhatta, hogy a kísérleteket említő néhány mondat az „Eredmények és megvitatásuk” fejezetben szerepel. Ez azonban szándékom szerint a megvitatás kitekintés jellegű megjegyzése, amely az egyéb ott említett, mások (Jarmolowski csoport) által leírt hasonló kísérletek kiegészítésére szolgált. Belátom azonban hogy ez nem volt célravezető, elnézést kérek bírálóimtól, és kérem, hogy az ott leírt mondatokat bírálatuknál ne a doktori munka eredményeként vegyék figyelembe.

7. A CER7 exosoma komponens hiánya a CER3 viasz bioszintézis kulcsgén expressziójának esését és a viasz felhalmozódás csökkenését idézi elő. A CER7 mutáns menthető az RDR és SGS3 mutációval, ami azt sugallja, hogy a CER7 a ta-si RNS silencing útvonal antagonistája, illetve azt, hogy a ta-si útvonal gátolja a CER3 expressziót. A CBP20 milyen szerepet játszik a ta-si útvonalban, illetve ismert-e a CBP20/CER7 dupla mutáns fenotípusa?

CBP20, CBP80 és SERRATE részvételét ta-si RNS csendesítési útvonalban Kim és munkatársai (2008) vizsgálták. A Yoshikawa és munkatársai (2005) által leírt ta-si útvonalban résztvevő miR173 és miR390 szintje, csakúgy mint az siR255 és siR2142 mennyisége csökkent mindhárom mutánsban (leginkább *serrate*-ban). Ebből arra következtethetünk, hogy az nCBC komplex pozitív hatással van a ta-si RNS-ek képzésére, valószínűleg az érett miRNS-ek szintézisének keresztül. Bár a mutánsokban az siRNS-ek képzése csökkent, *cbp80/abh1* mutáns háttérben (*rdr6* és *sgs3* háttérrel ellentétben) egy PTGS csendesített 35Spro- β -glükuronidáz gén mégsem reaktiválódott (Kim et al 2008). Ez arra utalt, hogy a vizsgált sense PTGS folyamatban az nCBC funkciója nem volt döntő tényező.

Lam és munkatársai (2012 és 2015) a ta-si RNS csendesítési útvonalak új szabályozóját azonosították a CER7 exosome exoribonukleáz komponensben, amely feltehetően az siRNS-ek bontásával, többek között a CER3 viasz bioszintézis gént is szabályozza. A CER3 gént ta-si útvonalon keresztül szabályozó siRNS-ek eredete nem ismert, valamint az sem, hogy az ezek képződéséért feltehetően felelős miRNS az nCBC komplex szabályozása alatt áll-e. Mindezen érdekes összefüggések tisztázása felé fontos lépés lenne a *cbp20/cer7* dupla mutáns létrehozása, ami egyelőre még sajnos nem áll rendelkezésre. Érdemes lenne továbbá célzottan a CER3 gén mRNS szintjét pontosan meghatározni az nCBC és *serrate* mutánsokban.

Hivatkozások:

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.

Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 19(18):2164-75.

Lam P, Zhao L, McFarlane HE, Aiga M, Lam V, Hooker TS, Kunst L (2012) RDR1 and SGS3, components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159(4):1385-95.

Lam P, Zhao L, Eveleigh N, Yu Y, Chen X, Kunst L (2015) The exosome and trans-acting small interfering RNAs regulate cuticular wax biosynthesis during Arabidopsis inflorescence stem development. *Plant Physiol.* 167(2):323-36.

8. A dolgozat egyik legérdekesebb megfigyelése, hogy CBP20 és ERA1 csökkent párologtatással jellemezhető szárazságtűrő mutánsok elvesztik szárazságtűrő képességüket, ha vad növényekkel versenyeznek. Bár a megfigyelés nagyon érdekes, hiszen rámutat, hogy a szárazságtűrőként szelektált vonalak más nevelési körülmények között könnyen elveszíthetik a szárazságtűrő jellegüket, ennek lehetséges okairól a konkrét kísérlettel kapcsolatban nem sokat mond a dolgozat. Vegyes ültetési helyzetben a CBP20 mutáns fenotípus vonások közül melyek alakulnak ki és melyek nem? (pl. a megváltozott bőrszöveti struktúrája sem alakul ki, vagy a morfológia különbségek megvannak, de a sztóma konduktancia és perisztómális párologtatási különbségek eltűnnek stb.). Ezzel kapcsolatban felmerül, mennyire tekinthető egy tényleges szántóföldi versenyhelyzetnek ez a kísérlet?

A kísérletek során a *cbp20* és *era1* növények szemmel látható bélyegei nem változtak, a mutációk mikromorfológiai illetve élettani következményeit vegyes ültetési helyzetben külön nem vizsgáltuk. Ezt azért nem tartottuk szükségesnek, mert a növények nevelése során azok a vízmegvonás kezdetéig bőséges vízellátást kaptak, így vízhiány és versenyhelyzet addig az időpontig nem alakult ki. Feltételeztük, hogy a versenyhelyzetben tapasztalt kölcsönhatás a mutánsok különböző vízgazdálkodási stratégiájából eredt, hiszen a vízmegvonási periódus során a növények fejlődése már nem volt számottevő. Nem tartottuk valószínűnek, hogy az ültetési mintázat önmagában a mutánsok morfológiai vagy élettani bélyegeit érdemben változtatta volna. Mára azonban már ismertek olyan kísérleti eredmények is, amelyek szerint stresszmentes környezetben is kialakulhatnak bizonyos kölcsönhatások szomszédos növények között az átfedő gyökérszónán keresztül (Vysotskaya et al 2011). A közölt megfigyelések szerint a talaj és xylém nedv pH emelkedése szomszédos saláta és paradicsom növényekben ABA közvetített, fokozott sztóma záródást okozott. Hogy ilyen kölcsönhatás lejátszódik-e az általunk alkalmazott lúdfű kísérleti rendszerben nem tudjuk, erre nézve méréseket nem végeztünk. Az általunk leírt jelenség más jellegű, legegyszerűbben a növény/talaj/növény rendszer vízpotenciál szintű kapcsolatával magyarázható. A bemutatott kísérleti rendszerünk természetesen csak korlátozottan modellez egy, a szántóföldön kialakuló komplex versenyhelyzetet. A vizsgálatokat azonban fontosnak tarjuk, hiszen a haszonnövények vegyes kultúrái esetén eredményeinknek gyakorlati jelentősége lehet. Nyilvánvaló ugyanakkor, hogy kísérletsorozatunkat a kölcsönhatások leírásának csak egy kezdeti lépésének tekinthetjük. Kísérleteink e mellett arra is rámutattak, hogy a vizsgált mutáns fenotípusok hátterében kizárólag a víztakarékos stratégia áll. A növények vízpotenciáljának csökkenése esetén ugyanis sem az *era1*, sem a *cbp20* növények nem mutatták a szárazságtűrés jeleit.

Hivatkozás:

Vysotskaya L, Wilkinson S, Davies WJ, Arkhipova T, Kudoyarova G. (2011) The effect of competition from neighbours on stomatal conductance in lettuce and tomato plants. *Plant Cell Environ.* 34(5):729-37.

9. Az alma kutikuláris vizsgálatokkal kapcsolatos megjegyzések, kérdések.

Az alma génkifejeződés adatainak bemutatására vonatkozó kritikákat elfogadom.

A szövegben Gegesi-Zöld szerepel, az ábrán Prima és Florina fajták: miért?

Kísérleteinket a minták hozzáférhetősége miatt kezdetben Gegesi-Zöld fajtán végeztük. Az ott kidolgozott módszereket azután Prima (nyári) és Florina (téli) almafajták transzkriptom vizsgálatára alkalmaztuk. A dolgozat szövege ezt nem emeli ki, valóban félreérthető, ezért elnézést kérek.

A 40. ábra qRT-PCR kísérletei melyik év mintáiból származnak, csak ennek ismeretében lehet összehasonlítani a szemi-kvantitatív és kvantitatív PCR eredményeket.

A qPCR-hez a 2011-es almamintákból származó cDNS templátokat használtunk.

Miért a *Lacerata* gént választották, és mik a heterológ expresszió eredményei?

A feltételezett alma *Lacerata* gén klónozására azért esett a választás, mert az (a Prima fajta esetében) markáns héjspecifikus kifejeződést mutatott. További okunk volt erre, hogy a lúdfű *LCR* gén jól jellemzett és mutáns *Arabidopsis* növények (a SALK gyűjteményből) hozzáférhetőek. A *LCR* heterológ expresszió eredményeit Szabados László kérdésére válaszolva ismertetem.

Azt írja, hogy a C29 alkán jelen van a Florina viaszai között. A Primából hiányzik vagy nem vizsgálták?

Alma fajták gyümölcsseinek kutikuláris viasz összetételére nézve csak kevés összehasonlító vizsgálat ismert. Verardo és munkatársai (2003) három fajtát hasonlítottak össze ilyen szempontból, amelyek egyike a Florina volt. A hexánnal leoldott lipidek C29 alkán tartalma Florinában 78,2%, Golden B-ben 75,8%, míg Ozark Gold-ban 71,6%. Elmondhatjuk tehát, hogy a C29 alkán több almafajta gyümölcs viaszában is meghatározó komponens. Ez alapján valószínű, hogy a Prima fajta viaszai között is nagy arányban jelen van, erre nézve azonban irodalmi vagy mért adat nem áll rendelkezésünkre.

Hivatkozás:

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.

10. Vízhiány hatására az *Arabidopsis* kutikulája megvastagodik, míg a búzáé nem. Mit lehet tudni más fajok esetén a vízstressz-kutikula termelődés kapcsolatáról? Az elérhető transzkriptóm eredmények mennyiben magyarázzák ezt a különbséget,

Vízhiányos stressz hatására a kutikula képződés intenzitásában és/vagy összetételében számos faj esetében történnek változások. Ez jól dokumentált a viaszoltság vonatkozásában, amiről Shepherd és

Wynne Griffiths (2006) közöltek áttekintést (1. Táblázat). Ebben azt mutatják be, hogy a fajok nagyobb részében (de nem mindenhol) a szárazság stressz viasz termelődéssel, és a reziduális párologtatás csökkenésével járt együtt.

Plant species	Stress	Effect on wax quantity	Cuticular transpiration	Composition or characteristic associated with adaptation	Reference
Sorghum (<i>Sorghum bicolor</i>) ^a	W (RES)	↑ (× 1.15)	↓ (RES > SUS)	Bloom (glaucous)	Jordan <i>et al.</i> (1983, 1984)
	W (SUS)	↑ (RES > SUS)	↓	Bloomless	
Durum wheat (<i>Triticum turgidum</i>); common wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	W (RES)	↑ Ears (× 1.73) ↑ Sheaths (× 1.2) ↑ Flag leaves (× 1.51)			Johnson <i>et al.</i> (1983)
Maize (<i>Zea mays</i>) ^b	W	↑ (× 1.35) after 10 d ↑ (× 1.43) after 20 d			Premachandra <i>et al.</i> (1991)
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	W, S	↑			Xu <i>et al.</i> (1995)
Oats (<i>Avena sativa</i>)	W (RES)	↑ (RES > SUS)	↓ (RES > SUS)	Primary alcohols ↑ (mainly C ₂₆) Alkanes ↓ (possible switch to formation of β-diketones) Total fatty acids ↑ (free, esterified) Primary alcohols ↑ (mainly C ₂₆) Alkanes ↑ Total fatty acids = (free, esterified) Alkanes ↑ (× 10) (C ₂₄ → C ₃₄) ^c Alkanes ↑ (× 2.5) (C ₂₄ → C ₃₀) ^c Alkanes ↓ (× 0.3) (C ₂₄ /C ₂₆ → C ₂₈ /C ₃₀) ^c Higher proportion of longer (C ₃₄ –C ₃₇) alkanes Primary and sec-alcohols; β-diketones ↑ Alkanes ↓ (possible conversion to s-alcohols and β-diketones) More fatty acids, absence of alcohols More aldehydes More alcohols, aldehydes and ketones	Bengston <i>et al.</i> (1978); von Wettstein-Knowles (1972)
	W (SUS)	↑	↓		
Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>)	W (RES)	↑ Leaves (× 1.69) ↑ Bracts (× 1.47) ↑ Bolls (× 1.04)			Bondada <i>et al.</i> (1996)
Austrocedrus chilensis	W (RES)	↑	↓		Dodd <i>et al.</i> (1998)
Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	S (RES)	↑	↓		Rao <i>et al.</i> (1981)
56 weed species (mostly dicotyledenous)	W	No effect	↑		Rama Das <i>et al.</i> (1979)
15 angiospermous weed species	W	No effect	↓		
Grape (comparison of intact wax with wax fractions and individual compounds on artificial membranes)	W	No effect	↓ (Equally effective) ↓ (Less effective) = (Ineffective)	Intact wax or paraffin wax; aldehyde and hydrocarbon fractions; alcohol fraction (mainly C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₈) Fatty acid fraction (mainly C ₂₄ , C ₂₆); C ₁₈ primary alcohol	Rao <i>et al.</i> (1980) Grncarevic & Radler (1967)
Caatinga (<i>Capparis yco</i> , <i>Ziziphus joazeiro</i>) (a) Caatinga (<i>Aspidosperma pyrifolium</i>); Cerrado (<i>Tocoyena formosa</i>), (b) Cerrado (<i>Aristolochia esperanza</i>)	W	No effect	↓ (Most effective) ↓ (Least effective)	Oleanic acid; C ₁₈ fatty acid n-Alkanes, triterpene alcohols (a) Ursolic acid (b) hentriacontan-16-one	Oliveira <i>et al.</i> (2003)

W, water stress; S, salinity stress; RES, resistant; SUS, susceptible or least resistant; ↓ reduction or ↑ increase in value; = relatively unchanged.

^aDryland conditions compared with well watered.

^b40 d old at start of stress treatment.

^cShift in homolog distribution from shorter to longer chain lengths.

1. Táblázat Víz és só stressz hatása kutikuláris viaszokra (Table 6, Shepherd és Wynne Griffiths 2006)

Egy további, jól dokumentált példa Sánchez és munkatársai (2001) tanulmánya, amelyben 20 borsó fajtát és nemesítési vonalat vizsgáltak. Vízhányos stressz hatására a genotípusok többségénél a viasz fedettség erőteljesen megnőtt, ami azonban itt (egy fajta kivételével) nem járt együtt a kutikuláris transpiráció változásával. Pozitívan korrelált azonban a viaszoltság a betakarítási index-el, és fordítottan volt arányos a levél hőmérséklettel. Ebből az a következtetés volt levonható, hogy borsóban, az adott kísérleti körülmények között, a megnövekedett viaszmenyiség elsődleges feladata a levélre eső besugárzás szétszórása, a levélhőmérséklet káros emelkedésének kivédése volt. A kutin mátrix vastagodást mint akklimációs választ elsőként a dolgozatomban is idézett Kosma és munkatársai (2009) írták le. Búza esetében vizsgálataink szerint a kutin mátrix nem vastagodott meg, az epikutikuláris viasz kristályok lerakódása azonban a fajták többségénél fokozódott (Jäger *et al* 2014). Ismert, hogy a lúdfű kutikula kutin rétege nem tipikus, lipid összetétele jobban hasonlít a szuberinhez, mint egyéb fajok kutinjaihoz (Franke *et al* 2005). Elképzelhető, hogy az összetevők különlegessége a képződés egyedi szabályozásával jár együtt (pl stresszválasz során). Hogy ezt a folyamatot milyen gének szabályozzák nem ismert, a WIN/SHN transzkripciók faktorok részvételét publikált kutatási eredmény vagy nyilvános microarray adatok (<http://bar.utoronto.ca/>) nem támasztják alá.

A búza szárazságstressz válaszát transzkriptom szinten többen vizsgálták (pl Aprile et al 2009; Szűcs et al 2010). A kutikula képződésével összefüggésbe hozható gének kifejeződésére nézve azonban a feldolgozott adatok szórványosak. Krugman és munkatársai (2010) tönke búzában (*Triticum dicoccoides*) egy a kutin és kettő további, a viasz bioszintézisben feltehetőleg szereplő gén indukcióját mutatták ki. A kevés rendelkezésre álló információ tehát mind a viaszoltság, mind a kutin mátrix képzés serkentésére utal vízhiányban, utóbbit azonban kenyérbúzában saját méréseink nem erősítették meg. Lúdfűben a génexpressziós és microarray adatok bőségebbek. Seo és munkatársai (2011) például a lúdfű MYB96 indukált, viasz termelésben szereplő géneket vizsgálva a *KCS1*, *KCS2*, *KCS6*, *CER1*, *LTP3*, *WSD1* és *WBC11* szárazságstressz alatti fokozott kifejeződését figyelték meg. Ezek közül az ABC transzportert kódoló *WBC11* a kutin monomerek szállításában is részt vesz. A kutikuláris funkciókkal kapcsolatos gének specifikus bőrszöveti kifejeződésük miatt a microarray adatok között alulreprezentáltak. Ezért ilyen kifejeződési adatokat főleg gének, géncsoportok célzott vizsgálataiban nyertek és/vagy a bőrszövet mikrodisszekcióval való izolálása után (pl Yeats et al 2010).

Hivatkozások:

Shepherd T, Wynne Griffiths D. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171: 469–499.

Sánchez FJ, Manzanares M, de Andrés EF, Tenorio JL, Ayerbe L. (2001) Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *European Journal of Agronomy* 15(1): 57-70.

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.

Jäger K, Fábíán A, Eitel G, Szabó L, Deák Cs, Barnabás B, Papp I. (2014) A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology* 171:1256–1266.

Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L. (2005) Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues--a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*. 66(22):2643-58.

Aprile A, Mastrangelo AM, De Leonardis AM, Galiba G, Roncaglia E, Ferrari F, De Bellis L, Turchi L, Giuliano G, Cattivelli L. (2009) Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. *BMC Genomics*. 10:279.

Szűcs A, Jäger K, Jurca ME, Fábíán A, Bottka S, Zvara A, Barnabás B, Fehér A. (2010) Histological and microarray analysis of the direct effect of water shortage alone or combined with heat on early grain development in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant*. 140(2):174-88.

Krugman T, Chagué V, Peleg Z, Balergue S, Just J, Korol AB, Nevo E, Saranga Y, Chalhoub B, Fahima T. (2010) Multilevel regulation and signalling processes associated with adaptation to terminal drought in wild emmer wheat. *Funct Integr Genomics*. 10(2):167-86.

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.

Yeats TH, Howe KJ, Matas AJ, Buda GJ, Thannhauser TW, Rose JK. 2010 Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *J Exp Bot.* 61(13):3759-71.

Lehetséges-e, hogy szárazság hatására a toleráns és szárazság érzékeny búzafajták esetén a kutikula szerkezet-összetétel másként változik?

A kutikula intra és epikutikuláris viaszainak összetétele, valamint a jelenlevő egyéb lipidek, pl terpenoidok mennyisége és aránya szárazság stressz hatására változhat. A vizsgált búzafajták epikutikuláris viaszainál valószínű a minőségi eltérés, mert Jäger és munkatársai (2014) a levélfelületen képződött kristályok különböző morfológiai típusait írták le. A viasz komponensek aránya a stressz válasz során úgy is megváltozhat, hogy a hajtás teljes viasz fedettsége nem változik. Ezt Macková és munkatársai (2013) kerti zsázsa viasz analízisével mutatták ki, ahol a vízhiányos stresszt ABA kezeléssel szimulálták. A hosszú láncú >C26 alifás láncú lipidek megnövekedett mennyiségét találták az ABA kezelt növényeken, ami a legvalószínűbb módon a viasz hidrofobicitásának növekedését, így permeabilitásának csökkenését eredményezi.

Hivatkozások:

Jäger K, Fábíán A, Eitel G, Szabó L, Deák Cs, Barnabás B, Papp I. (2014) A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology* 171:1256–1266.

Macková J, Vašková M, Macek P, Hronková M, Schreiber L, Šantrůček J. (2013) Plant response to drought stress simulated by ABA application: Changes in chemical composition of cuticular waxes. *Environmental and Experimental Botany* 86:70-75.

11. Hogyan szabályozhatja az SHN1 a sztóma sűrűséget? Más kutikula szabályozók túltermelése is sztóma szám változásokkal jár?

Yang és munkatársai (2011) a lúdfű *WIN/SHN1* gént kifejező, indukálható transzgénikus rendszert hoztak létre. Vizsgálataikba sztóma fejlődést szabályozó géneket is bevontak. Azt találták, hogy a *WIN/SHN1* transzgén indukciója után a *SPEECHLESS*, *MUTE* és *FAMA* sztóma differenciálódást serkentő gének kifejeződési szintje lecsökkent. Ha az indukciót fejlődő levélben végezték, a kifejlett levelek sztómasűrűsége alatta maradt a nem kezelt, illetve vad típusú növényekének. A *SPEECHLESS*, *MUTE* és *FAMA* gének repressziója a *WIN/SHN1* transzkripció faktor kifejezésének direkt vagy indirekt következménye volt. A jelenséggel magyarázható volt a sztómaszám csökkenése a *WIN/SHN1* túltermelő növényeken.

A viasz mutánsok sztóma fejlődése (pl iniciáció gyakorisága – sztóma index) gyakran rendellenes. Ez a kutikula képzést szabályozó, valamint a bioszintézis utak génjeinek mutációira is igaz lehet. A *wax2* mutáció például a levél színi és fonáki sztóma indexet 16%-al illetve 17,4%-al csökkentette (Chen et al 2003). A jelenség azzal magyarázható, hogy a gázcsereenyílások differenciálódását gátló, szekretált peptidek (EPF1, EPF2; Hara et al 2009) diffúzibilitása a megváltozott fizikai tulajdonságú kutikulában eltérhet a vad típusétól.

Hivatkozások:

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.

Chen X, Goodwin SM, Boroff VL, Liu X, Jenks MA. (2003) Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell.* 15(5):1170-85.

Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, Torii KU, Kakimoto T. (2009) Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol.* 50(6):1019-31.

Budapest, 2015 Szeptember 2

Dr Papp István