AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A GÉNKIFEJEZŐDÉS, SZÁRAZSÁGTŰRÉS ÉS VÍZVESZTÉS EGYES MECHANIZMUSAI ÉS ÖSSZEFÜGGÉSEI MODELL- ÉS HASZONNÖVÉNYEKBEN

PAPP ISTVÁN

BCE Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék



BUDAPEST, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁSOK ELŐZMÉNYEI	7
3.1 Transzkripciós géncsendesítés	7
3.2 Kis RNS-ek a transzkripciós géncsendesítésben	8
3.3 Mutánsok szűrése pleiotróp bélyegek alapján	10
3.4 A magi cap kötő komplex, mint a poszttranszkripciós génszabályozás egyik	szereplője
3.5 Transzkriptumok alternatív splicing és kis RNS függő szabályozása abioti válaszokban	kus stressz 14
3.6 Vízért való versengés vízhiány esetén	17
3.7 Fotoszintézis limitáció	17
3.8 A kutikula képződése, szerepe a szárazságtűrésben és a vízvesztésben	18
I. A KUTATÁSOK CÉLKITŰZÉSEI	26
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
5.1 Az alkalmazott baktériumtörzsek, vektorok, módosító enzimek	27
5.2 DNS tisztítás, polimeráz láncreakció (PCR), oligonukleotidok	27
5.3 Klónozás, bakteriális transzformáció	
5.4 Biszulfit szekvenálás és félautomata szekvenálás	
5.5 Genomi fág és kozmid génkönyvtárak készítése, rescue klónozás	29
5.6 RNS tisztítás, hibridizációk	29
5.7 Kis RNS-ek klónozása	
5.8 RT-PCR, real-time PCR	
5.9 Bioinformatikai módszerek	31
5.10 A kísérleti növények nevelése és keresztezése	31
5.11 Növénytranszformációk	32
5.12 T-DNS mutagenizált növényvonal gyűjtemény screen-elése	
5.13 Vízmegvonás körülményei, a vízháztartás és kutikula permeábilitás jellemze	ése33
5.14 Fotoszintetikus aktivitás, sztóma konduktancia, fluoreszcencia indukciós p mérése	araméterek 34
5.15 Pásztázó-, transzmissziós elektron- és fénymikroszkópos felvételek	

	5.16 Felületi viasz fedettség vizsgálata	35
6.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	36
	6.1 A transzkripciós géncsendesítés (TGS) célszekvenciáinak örökölhető metilációja	36
	6.2 Egy transzkripciós géncsendesítési rendszer lokuszainak jellemzése	41
	6.3 Transzkripciós géncsendesítésben résztvevő kis RNS-ek vizsgálata	45
	6.4 dcl1 mutáció hatása TGS-re, a DCL1 fehérje sejten belüli lokalizációja	48
	6.5 Megváltozott stressztűrésű <i>Arabidopsis</i> mutánsok azonosítása pleiotróp morfológ bélyegek szűrésével	iai 51
	6.6 A <i>cbp20</i> mutáns részletes genetikai, élettani és stresszélettani jellemzése, valam kapcsolata az RNS szabályozással	int 54
	6.7 A <i>cbp20</i> mutáns bőrszövetének morfológiája, a kutikula fejlődés kapcsolata szárazságtűréssel és az RNS szabályozással	a 63
	6.8 Víztakarékos mutánsok tulajdonságai vízért való kompetíció esetén	66
	6.9 A <i>cbp20</i> mutáns fotoszintetikus aktivitása	69
	6.10 Alma gyümölcs kutikula jellemzése mikroszkópos és molekuláris módszerekkel	71
	6.11 Eltérő szárazságtűrésű búzafajták összehasonlítása élettani és morfológiai bélyeg alapján, különös tekintettel a kutikulára	ek 77
	6.12 A kutikula fejlődését szabályozó búza <i>TaeSHN1</i> transzkripciós faktor funkcioná azonosítása	lis 80
	6.13 Kitekintés és az eredmények hasznosíthatósága	87
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	89
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	91
9.	IRODALOMJEGYZÉK	92
	9.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	92
	9.2 Egyéb idézett közlemények	94
	9.3. Egyéb saját közlemények:	16

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA: Abscisic acid AGO: Argonaute AP2-ERF: APETALA2/Ethylene Responsive Factor as: aminosav **CAF**: Carpel Factory **CBP:** Cap Binding Protein cDNS: komplementer (complementary) DNS **CER:** Eceriferum DAP: days after pollination **DCL:** Dicer Like dsRNS: dupla szálú RNS DW: dry weight ER: endoplazmatikus retikulum ERA: Enhanced Response to Abscisic acid FAE: Fatty Acid Elongase FAS: Fatty Acid Synthase FLC: Flowering Locus C FW: fresh weight GCR: G protein Coupled Receptor **GFP:** Green Fluorescent Protein **GRF:** Growth Regulating Factor **GST:** Glutathione S-transferase **GUS:** β glucuronasidase **GWC:** Gravimetric Water Content HD-ZIP: Homeodomain-Leucine Zipper HEN: Hua enhancer HPT: Hygromycin Phosphotransferase HYG: Hygromycin rezisztencia HYL: Hyponastic leaves KAN: Kanamycin rezisztencia KCS: Ketoacyl CoA synthase LCR: Lacerata miRNS: micro RNS **MYB:** Myeloblastosis nat-siRNS: natural antisense siRNS **nCBC:** nuclear Cap Binding Complex

NiR: antiszensz Nitrit reductase gén NLS: Nuclear Localization Signal **NOS:** Nopaline Synthase nt: nucleotide **OCS:** Octopin Synthase PARN: poly (A) specific exoribonuclease PCR: Polimerase Chain Reaction **PM:** plasma membrane **PPFD:** Photosynthetic Photon Flux Density **PTGS:** Posttranscriptional Gene Silencing **RBP:** RNA binding protein RdDM: RNA dependent DNA methylation **RH:** relative humidity **ROS:** Reactive Oxygen Species **RT-PCR:** Reverse Transcription PCR **RWC:** Relative Water Content **SE:** Serrate **SEM:** scanning electron microscope siRNS: short interfering RNS snRNP: small nuclear ribonucleoprotein particle snRNS: small nuclear RNS **TBSV:** Tomato Bushy Stunt Virus TEM: transmission electron microscope **TF:** transcription factor **TGS:** Transcriptional Gene Silencing TW: turgid weight **Ub:** Ubiquitin UTR: untranslated region VLCFA: Very-Long-Chain Fatty Acid WIN/SHN: Wax Inducer/Shine **YRE:** yore-yore

2. BEVEZETÉS

A doktori műben bemutatott kutatások hosszú időtartamot (kb 20 évet) ölelnek fel. Ennek során a növénybiológiának abban a szegmensében ahol munkásságom zajlott jelentős haladás és áttörések sora valósult meg. Ezek egy részét pályafutásom egyes állomásain közelről figyelhettem, az elért eredményekkel esetenként támogathattam. Az epigenetikai kutatások egyik úttörő laboratóriumában a géncsendesítés vizsgálata révén a kis RNS-ek szerepének felderítéséhez kerültünk közelebb. Az RNS szabályozás elemeinek tanulmányozása később szerencsés módon kapcsolódott egy ettől függetlenül indított kutatási irányhoz. Itt egy lúdfű mutáns izolálása majd analízise az RNS szintű szabályozást a szárazságtűrés folyamataival kapcsolta össze. Az izolált mutánssal kapcsolatos további eredményeink a bőrszövet és a kutikula jelentőségére utaltak a szárazságtűrésben. Ez a kutatási irány a kertészeti és haszonnövények kutikulájának biológiájához vezetett, amely jelenleg is egyik fő kutatási területem. A szárazságtűrés a növénytermesztésben, a vízvesztés a gyümölcsök tárolása során is jelentős tényező, a kutikula tulajdonságai mindkét esetben alapvető fontosságúak.

A dolgozat első részében bemutatott kísérletek a géncsendesítés kutatásának "hőskorából" származnak. Azóta jelentős haladás történt a vizsgált jelenségek alapjait képező folyamatok megismerésében, amiknek mai tudásunk szerinti részletes áttekintése nem célja a dolgozatomnak. Az "Irodalmi áttekintés" fejezetben a kísérletek idején rendelkezésre álló ismereteket foglalom össze, az azokhoz később közvetlenül kapcsolódó további eredményeket pedig az "Eredmények és megvitatásuk" fejezet tartalmazza. Részletesen tárgyalom viszont a kutikula biológiájának egyes területeit, ahová a fent említett kísérletek sora vezetett. A dolgozat kitekintése is ebbe az irányba mutat, hiszen ezen a részterületen gazdag lehetőségek vannak alkalmazott kutatási projektek indítására is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁSOK ELŐZMÉNYEI

3.1 Transzkripciós géncsendesítés

Kutatásaink közvetlen előzménye volt a transzkripciós géncsendesítés (TGS) felfedezése, mely jelenség egyik első leírását munkatársaim adták (Matzke et al 1989). A TGS mechanizmusára nézve kísérleteink (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 PTGS tanulmányozása során (Ingelbrecht et al 1994) és burgonya/burgonyagumó orsósodás viroid (Potato spindle tuber viroid) rendszer esetében is (Wassenegger et al 1994) felismerték, hogy RNS szintű információ specifikusan genomi DNS metilációt okozhat. 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 (Matzke 1994), 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 feltételezések 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 kísérletekben használt TGS géncsendesítő rendszer elemeinek leírását a Matzke et al (1994) és a Vaucheret et al (1992) publikációk tartalmazzák. A dohány genomba épített, a kísérlet során csendesített H2 lokusz 35S promóterhez kapcsolt Hygromycinfoszfotranszferáz gént, valamint NOS promóter – oktopin szintáz génkonstrukciót tartalmazott. Előbbi a 35S promóteren TGS-re fogékony volt, utóbbi viszont más NOS promóteren (pl K81 lokuszban) TGS-t volt képes indukálni. A rendszer másik eleme a 271 lokusz volt, ami 35S promóter – antiszensz Nitrit reduktáz génkonstrukcióval transzformált dohányban jött létre. Endogén nitrit reduktázon PTGS-t, 35S promóteren TGS-t volt képes kiváltani (Vaucheret 1993, Dorlhac de Borne 1994). A 271 lokusz 35S promótere által terveztük a H2 lokusz érzékeny 35S promóterének TGS géncsendesítését, és folyamat jellemzését molekuláris módszerekkel.

3.2 Kis RNS-ek a transzkripciós géncsendesítésben

Ez irányú kísérleteinket (2000-2002) nem sokkal megelőzően ismerték fel a kis RNS-ek szerepét a géncsendesítésben (Hamilton and Baulcombe 1999). Fény derült a transzkripciós és poszttranszkripciós géncsendesítés hasonlóságaira, amennyiben a dupla szálú RNS-ek (double stranded RNA; dsRNS) és short interfering RNA (siRNS) részvételét mindkét folyamatban leírták (pl. Sijen et al 2001, Voinnet 2002). 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 köztitermékeket RNáz III aktivitású DICER enzimek hasítják tovább (Bernstein 2001). Ezekből Arabidopsis-ban négyet azonosítottak (DCL1- DCL4). A DCL1 gén gyenge mutációja a virág fejlődésében drámai változásokat okozott ("carpel factory" mutánsok, Park et al 2002), működése az miRNS-ek képződéséhez bizonyult szükségesnek (Reinhart et al 2002). Feltételezhető volt, hogy a négy Arabidopsis DCL enzim különböző tulajdonságú kis RNS-ek processzálásában vesz részt. Míg a DICER enzimek emlősben citoplazmás lokalizációjúak, növényben a sejten belüli kompartmentizációjuk nem volt ismert, erre nézve csak feltételezéseink voltak (1. ábra).

dc_741_13



1. ábra: Korai modell az RdDM és PTGS folyamatairól a DICER aktivitás helyének jelölésével (Matzke et al 2001). A DCL1/CAF enzim részvétele az RdDM-ben kísérleteink során nem bizonyosodott be (ld Eredmények és megvitatásuk fejezet).

Kísérleteink legfontosabb célja az volt, hogy kiderítsük, részt vesz-e a DCL1 enzim a TGS folyamataiban, illetve adatokat nyerjünk a folyamat sejten belüli lokalizációjáról. Az alkalmazott genetikai rendszer *NOSpro-NptII* és *NOSpro-NOS* célgénekből, valamint egy független lokuszon NOSpro dsRNS-t termelő effektor génből állt. Utóbbi a célgéneket transzkripciósan csendesíteni volt képes promóterük metilációja mellett (Mette et al 1999). A csendesítés során a NOSpro dsRNS-ből 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, 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 gátlóiként valószínűsítették. Kísérleteinkben a P19 fehérjét különböző sejten belüli kompartmentumokba (sejtmag és citoplazma) irányított módon terveztük a géncsendesítés gátlására felhasználni.

3.3 Mutánsok szűrése pleiotróp bélyegek alapján

A haszonnövények kedvező tulajdonságokat kódoló génjeinek izolálásához többféle úton indulhatunk el. Egy gyakran követett stratégia a természetben előforduló kedvező tulajdonságú fajták, esetleg rokon fajok segítségével az ilyen gének térképezése és térkép alapú klónozása. Ezt hátráltatja, hogy a fontos tulajdonságok sokszor poligénesek, a haszonnövények genomja esetenként igen nagy lehet, és róluk legtöbbször még mindig kevés információ áll rendelkezésre. Így a térképezés folyamata időigényes, kimenetele bizonytalan lehet.

Modellnövényekben is követhetünk hasonló stratégiát, így például *Arabidopsis*-ban a különböző ökotípusok eltérő kórokozó-rezisztenciáját felhasználva térképezték, majd klónozták az első R géneket (Debener et al 1991). Ezek alapján a haszonnövények hasonló rezisztencia génjeinek vizsgálata a későbbiekben nagyban leegyszerűsödött.

Modellnövényekben indukált mutációkkal az ismert genomszekvenciáknak és egyéb módszertani előnyöknek köszönhetően ma már gyorsabban eljuthatunk egyes fontos tulajdonságokat befolyásoló génekig. Hátrány ilyenkor hogy a kapott eredményeket haszonnövényekre adaptálni kell, valamint hogy számos tulajdonság a kevés számú modellnövényen nem vizsgálható. Mégis ez utóbbi módon napjainkban nagy mennyiségű információ válik hozzáférhetővé.

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 végezhetők olyan szűrési kísérletek (screen-ek) ahol mutáns populációban látható fenotípusú, feltehetően pleiotropikus mutánsokat keresünk. Az így izolált mutánst ezután természetesen további vizsgálatoknak kell alávetni annak megállapítására, hogy van-e olyan tulajdonsága, ami tudományos vagy gyakorlati szemponból értékessé teszi.

A módszer életképességét úgy bizonyították, hogy már ismert mutánsokat vetettek alá pontos fenotipizálásnak. A **2. ábrán** néhány ilyen mutáns jellemzése látható. A mutánsok észrevehetően különböznek a vad típustól jónéhány olyan jellegben, amik összefüggése a hordozott genetikai hibával mai tudásunk szerint nem nyilvánvaló.



2. ábra: *Arabidopsis* mutációk és pleiotróp hatásaik (Boyes et al 2001). *hls* – hookless: etilén termelésben hibás, több rozetta levél növényenként; *fae* – fatty acid elongase: hosszúláncú zsírsavak termelésében hibás, a levelek felülete kisebb; *adg* – ADP glucose pyrophosphorylase: keményítő bioszintézisben hibás, rövidebb gyökerek, kevesebb oldalgyökér, kevesebb mag becőnként, több becő.

3.4 A magi cap kötő komplex, mint a poszttranszkripciós génszabályozás egyik szereplője

A magi cap kötő komplex (nuclear Cap Binding Complex, nCBC) az RNS Polimeráz II által átírt mRNS-ek 5' végére szintetitált 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 idejében az nCBC komplexnek az mRNS splicingjában, 3' végének érésében, illetve az snRNS-ek magból való exportjában tulajdonítottak szerepet (**3. ábra**) (Izaurralde et al 1994, Cougot et al 2004).



3. ábra: Az nCBC (CBP20 és CBP80) elhelyezése a növényi mRNS metabolizmusban a kis RNS-ek érésében betöltött szerep felismerése előtt (Fedoroff 2002). További jelölések: Ran – fehérjék magi transzportjában szereplő GTP-áz, α és β : importin komplex alegységek, 4E-T: eIF4E magi importját végző fehérje, Dcp1 – capspecifikus endonukleáz, PARN – poly (A) specifikus exoribonukleáz, RBP – RNS kötő fehérje, snRNP – kis magi ribonukleoprotein részecske, Ub – ubiquitin, SAD1, HYL1 – RNS kötő fehérjék, NLS – magi lokalizációs szignál.

Emlősben 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 poszttranszkripciós 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).

Az *abh1* lúdfű mutánst az alapján izolálták, hogy már olyan alacsony koncentrációjú abszcizinsav (ABA) mellett képtelen volt a csírázásra, ami a vad típusú növényt még nem gátolta. Az ABA túlérzékenységgel magyarázták a gázcserenyílások korai záródását, a párologtatás csökkenését, végső soron a növény szárazsággal szemben megfigyelt ellenállóképesség növekedését (Hugouvieux et al. 2002).

Az nCBC által szabályozott gének felderítése érdekében az *abh1/cbp80* mutánson génexpressziós (microarray) vizsgálatokat is végeztek. Az adatok szerint az *abh1/cbp80* mutánsban kifejeződő gének szintje csak néhány gén esetében tért el a vad típusú *Arabidopsis*-tól (Hugouvieux et al. 2001). Mivel a mutáns növény fenotípusa több tekintetben is megváltozott, feltételezhető volt, hogy a microarray adatok nem adtak teljes képet a mutációval létrejött genetikai változásokról. Ez a hipotézis a későbbiekben bebizonyosodott, amennyiben később számos gén alternatív splicing-ját mutatták ki az nCBC mutánsokban.

A vad típusú lúdfűben az *nCBC* gének a növényi szervek mindegyikében kifejeződnek (Kmieciak et al 2002). A nyilvánosan hozzáférhető microarray adatokból (Winter et al 2007) is levonhatók voltak bizonyos következtetések a komplex alegységeinek szabályozására nézve. Mindkét alegység átírása magasabb volt a hajtáscsúcsban és pl. a fiatal virágban, míg a fertőzések és stresszek hatására az expresszió nem változott, vagy csökkent. Ez arra utal, hogy növények esetében a komplex az átírás szintjén is szabályozódik, poszttranszlációs regulációja viszont nem ismert. Egy fontos növényi növekedési hormoncsoport a cytokininek, amik közül a zeatin szerepel a fenti microarray kísérletekben. Ennek a hormonnak nem volt hatása a *CBP20* és *CBP80* gének mRNS szintjeire. A Rashotte et al. (2003) által publikált cytokinin indukciós microarray kísérletekben a *CBP* génekre vonatkozóan szintén nincs adat,

míg Hoth et al (2003) a *CBP80* gént cytokininnel 6 óránál indukáltnak, míg 24 óránál represszáltnak találta. Utóbbi kísérletet egy indukálható génexpressziós rendszerrel végezték, mely során egy bakteriális isopentenil-transzferáz transzgént indukáltak. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a növényi nCBC komplex szabályozásában szerepet játszhat génjeinek trasznkripciós szintű regulációja is, amiben a növekedési hormonoknak (pl citokinineknek) szerepük lehet.

3.5 Transzkriptumok alternatív splicing és kis RNS függő szabályozása abiotikus stressz válaszokban

A poszttranszkripciós szabályozás lehetőségei közé tartoznak az aktuális transzkriptum készlet módosításai PTGS géncsendesítés, alternatív splicing és az RNS érésének, transzportjának illetve lebomlásának befolyásolásával. Fehérje szinten további poszttranszlációs folyamatok (foszforilláció, sumoyláció, ubiquitináció/lebontás, stb) és kompartmentizáció nyújtanak további szabályozási módokat. Ezeket a lehetőségeket a növény a stresszfüggő szabályozásban kiterjedten használja (Mazzucotelli et al 2008). Érdekes módon az mRNS poliszómába épülése is stressz-szabályozott (ozmotikus stressz esetén), ami hozzájárul ahhoz, hogy a kifejeződő traszkriptumok mennyisége nem feltétlenül tükrözi hűen a képződő fehérjék mennyiségi viszonyait (Kawaguchi et al 2004). A továbbiakban a transzkriptumok szintjének alternatív splicinggal és kis RNS-ek segítségével stresszhatásra történő szabályozási lehetőségeit tekintem át, mert az nCBC komplex működése kapcsolhatónak bizonyult ezekhez a jelenségekhez.

Az mRNS alternatív splicing az egyik legrégebben ismert poszttranszkripciós 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). Lúdfű esetében az alternatív splicing arányát a gének 30%-ára becsülik (Reddy 2007). Abiotikus stressz hatására lezajló alternatív splicingot növényben eddig aránylag kevés esetben írtak le (Floris et al 2009). Kong et al (2003) egy rizs feltételezett alternatív oxidáz génnél figyeltek meg só stressz hatására alternatív splicingot. A CD111 burgonya invertáz gén esetében hideghatás okozta egy mini exon kivágásának elmaradását (Bournay et al 1996). Hideg stressz hatására búzában is intron megtartást írtak le egyes korai hidegindukált géneknél (Mastrangelo et al 2005). A *Bronze2* kukorica GST gén transzkriptuma kadmium stressz

hatására alternatív splicingot mutat az 5' UTR régióban, ami az mRNS mennyiségének 20szoros növekedését okozza ilyen körülmények között (Marrs and Walbot 1997). Egy további példa a szerin/arginin gazdag (SR) fehérjéket kódoló gének mRNS-ei, amelyeken alacsony és magas hőmérséklet alternatív splicing-ot okoz. Az SR gének maguk is a splicing szabályozásában működnek, tehát feltehető hogy további célgének termékeinek processzálása is változik működésük eredményeként (Palusa et al 2007). 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 útján történő géncsendesítés részvétele az abiotikus stressz válaszokban jól dokumentált. Már a legkorábbi in silico analízisek is utaltak a kis RNS-ek ilyen szerepére (Jones-Rhoades and Bartel 2004). Ezzel egy időben már klónoztak is stressz függő kis RNSeket lúdfűből (Sunkar and Zhu 2004). Egy természetes cisz-antiszensz transzkriptum pár esetében a nat-siRNS-ek szerepét fedték fel a lúdfű sótűréshez vezető stresszválaszában a prolin felhalmozódáson keresztül (Borsani et al 2005). Mivel az nCBC működése legjobban az miRNS-ek érésével kapcsolatban dokumentált, ennek a kis RNS fajtának a stresszválaszban betöltött szerepét tekintem át részletesebben. Microarray megközelítéssel Arabidopsis-ban 14 különböző stressz (só, szárazság, hideg) szabályozott miRNS-t azonosítottak (Liu et al 2008). A miR396a és miR396b túltermeltetése lúdfűben a GRF transzkripciós faktorokon át a levélméret és sejt/sztómaszám csökkentésével párhuzamosan befolyásolni tudta a növény szárazságtűrését (Liu et al 2009). Reyes and Chua (2007) Arabidopsis csíranövényekben a miR159 szintjét ABA indukáltnak találták, míg ugyanez a kis RNS a MYB33 és MYB101 transzkripciós faktorok csendesítésén keresztül gátolta az ABA érzékenységet. Ezzel egy önszabályzó mechanizmust írtak le, ahol a magas ABA koncentráció a válaszok intenzitásának lecsengését okozza. Ennek a visszacsatolásnak a növény normál működéséhez való visszatérésében lehet szerepe magas ABA szinttel járó stresszhatások után. A miR398 mennyisége viszont stresszhatásra lecsökkent, így célgénjei, a ROS detoxifikációban résztvevő Cu/Zn szuperoxid dizmutázok kifejeződése fokozódott (Sunkar et al 2006). Szintén stresszfüggő repressziót mutat a miR169 lúdfűben, mely célgénjén, az NFYA5 transzkripciós faktoron keresztül a stresszválaszokat befolyásolja (Li et al 2008). A miR169 rizs homológot ugyanakkor a megfigyelések szerint só és ozmotikus stressz indukálja (Zhao et al 2009). Covarrubias and Reyes (2010) összefoglaló munkájukban több esetet is említenek, ahol hasonló szekvenciájú miRNS-ek fajonként más típusú válaszban (indukció vs. represszió) vesznek részt (4. ábra).

miRNA	Plant species	Salt	Osmotic/Drought	ABA	Target(^b)	Reference
miR156	Arabidopsis thaliana	(+)	(+)		SPL	Liu et al. (2008)
miR156	Zea mays	(-)				Ding et al. (2009)
miR159	A. thaliana		(+)	(+)	MYB	Reyes & Chua (2007)
	A. thaliana	(+)				Liu et al. (2008)
miR167	A. thaliana	(+)	(+)		ARF	Liu et al. (2008)
	Oryza sativa			(-)		Liu et al. (2009b)
	Z. mays	(-)				Ding et al. (2009)
miR168	A. thaliana	(+)	(+)		AGO1	Liu et al. (2008)
	Z. mays	(+)	1.201			Ding et al. (2009)
	Populus tremula	(+)		(+)		Jia et al. (2009)
miR169	A. thaliana		(-)	(-)	NFYA5	Li et al. (2008)
	O. sativa			(-)		Liu et al. (2009b)
	O. sativa		(+)			Zhao et al. (2007)
	O. sativa	(+)				Zhao et al. (2009)
	P. tremula	(-)		(-)		Jia et al. (2009)
miR171	A. thaliana	(+)	(+)		SCL	Liu et al. (2008)
miR319	A. thaliana	(+)			TCP	Liu et al. (2008)
	O. sativa	2.1		(+)		Liu et al. (2009b)
miR393	A. thaliana	(+)	(+)	(+)	TIR1	Sunkar & Zhu (2004)
	A. thaliana	(+)	(+)			Liu et al. (2008)
	O. sativa		(+)			Zhao et al. (2007)
	Phaseolus vulgaris	(+)	(+)	(+)		Arenas-Huertero et al. (2009)
miR395	P. tremula	(+)		(+)	APS	Jia et al. (2009)
	Z. mays	(+)				Ding et al. (2009)
miR396	A. thaliana	(+)	(+)		GRL	Liu et al. (2008)
	A. thaliana		(+)			Liu et al. (2009a)
	Z. mays	(-)				Ding et al. (2009)
miR397	A. thaliana	(+)	(+)	(+)	Laccase	Sunkar & Zhu (2004)
miR398	A. thaliana	(-)	· · /	(-)	CSD	Jia et al. (2009)
	A. thaliana	(-)				Jagadeeswaran et al. (2009)
	P. tremula	(+)		(+)		Jia et al. (2009)
miR399	P. tremula	(+)		(+)	PHO2	Jia et al. (2009)

^aThe (+) and (-) signs indicate induction or repression of miRNA accumulation in each treatment. ^bTargets are proposed based on known transcripts in Arabidopsis.

4. ábra: Só vagy vízhiányos stresszre indukálódó/represszálódó növényi miRNS családok. További részletekért ld Covarrubias and Reyes (2010).

Új nyárfa miRNS-ek azonosításánál azt találták, hogy stresszhatásra (pl só, vízhiány) döntő többségük kifejeződése csökkenést mutatott (Lu et al 2008). Az miRNS-ek egyik fő feladata az egyedfejlődés szabályozása. Mivel a stresszhatások nyilvánvalóan befolyásolják az egyedfejlődést, nem meglepő, hogy egyes esetekben ezt az miRNS-ek közvetítésével teszik (de Lima et al 2012, Khraiwesh et al 2012). Erre példa a miR156, amelynek a vegetatív/reproduktív fázisváltásban (Wu and Poethig 2006), illetve a miR166, amelynek az egyedfejlődés mellett a hormon homeosztázisban van szerepe (Williams et al 2005).

3.6 Vízért való versengés vízhiány esetén

Vízhiány esetén a növények különböző védekezési stratégiákat követhetnek (Taiz and Zeiger 2010). Az egyed szintjén megjelenő különböző akklimációs válaszokat (menekülés, elkerülés, tűrés) fajonként, sőt fajtánként eltérő arányban mutatják a növények. A vízforgalom egy fontos szabályozási pontja a sztómákon át történő párologtatás (Fan et al 2004), amelyet vízmegvonás esetén egyes fajok/fajták gyorsan, mások lassan, vagy alig korlátoznak. A víztakarékos növények a talaj és szöveteik víztartalmát a párologtatás visszafogásával megtartani igyekeznek, míg a vízpazarlók a vízutánpótlás növelésével (pl gyors gyökérnövekedéssel) kerülik el, illetve jobban tolerálják a dehidrációt (Maseda and Feranandez 2006, 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 jelenlétével is számolni kell, amik a hozzáférhető vízért versengenek. Ezt a kompetíciót, különösen, ha az különböző vízgazdálkodási stratégiát követő növények között zajlik, vizsgálataink előtt kevéssé jellemezték.

A víztakarékos lúdfű mutánsok (pl. *era1* Pei et al 1998, *gcr1* Pandey and Assmann 2004, *cbp20* Papp et al 2004) izolálásának feltűnő jellegzetessége volt, hogy azokat nem a vízmegtartásra vonatkozó direkt screenek során izolálták, hanem egyéb módokon, pl ABA túlérzékenység révén, vagy reverz genetikai megközelítés alkalmazásával. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az izolálni kívánt víztakarékos (mutáns) és a vad típusú (hozzájuk képest pazarló) növények között gyökér kontaktus esetén interakció zajlódhat le, ami gátolja a mutáns fenotípus megjelenését egy direkt screen kísérletben.

3.7 Fotoszintézis limitáció

Vízhiány esetén a sztómák zárása nemcsak a párologtatás csökkentését okozza, hanem a CO₂ felvétel gátjaként hozzájárulhat a fotoszintézis limitációjához is. A fotoszintézis hatékonyságának romlását például a ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláció hatékonyságának csökkenése (Wise et al, 1991) vagy oxidatív stressz okozta membránkárosodások (El-Tayeb 2006) is okozhatják. Hogy milyen mértékben felelősek a különböző faktorok a CO₂ 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 CO₂ beépülés jelenti a szűk keresztmetszetet a fotoasszimilációban (Flexas and Medrano 2002; Lawlor 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). Másrészről 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 gázcseréje 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 befolyásolja a fotoszintetikus folyamatokat normál, illetve korlátozott vízellátás esetén.

3.8 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 (Schreiber 2010; Jäger et al 2011; Deák et al 2010; Nawrath, 2006). 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 (Jenks et al 2002). Rétegelt, rendezett struktúrájú, egy kutin poliészter mátrixból és abba, illetve arra rakódó viasz komponensekből áll, kevéssé 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, Kunst and Samuels 2009, Bernard and Joubès 2013), de egyéb fajokról is egyre több adatot közölnek (Buschhaus and Jetter 2011, Martin and Rose 2014).

A kutin, kután és viaszok kémiai összetétele, valamint a rétegek ultrastruktúrája határozza meg a kutikula fizikai tulajdonságait, például vízáteresztő képességét. Ezek összefüggéseiről

még aránylag keveset tudunk. Feltételezik, hogy a kutikula nem egységes felület, hanem domén szerkezetű. A lipofil anyagok a homogén lipid doméneken át diffúzióval, míg a poláris molekulák hidrofil pórusokon juthatnak át rajta (Buchholz 2006, Schönherr 2006). A permeábilitást a kutikula fajfüggő jellemzői mellett az átjutó molekula tulajdonságai (pl. mérete), illetve külső körülmények, pl. hőmérséklet befolyásolják. A kutikula transzport folyamatait aktívan kutatják, az ezen az úton történő anyagfelvételnek komoly gyakorlati jelentősége van, például a növényvédő- és egyéb permetszerek felszívódásában és a lombtrágyázásnál.

A kutikula alkotóinak bioszintézise modell növényekben viszonylag jól feltárt (**5. ábra**). Az epidermisz sejtek plasztiszaiban képződő palmitinsav és sztearinsav az ER zsírsav elongációs komplexében hosszabbítódik nagyon hosszú láncú zsírsavakká, amelyek további módosításokon eshetnek át, kialakítva a kutikuláris lipidek végső profilját (Jetter et al, 2006). A zsírsav-származékok mellett, fajtól függően egyéb lipofil anyagok is felhalmozódhatnak a kutikula rétegeiben. Alma esetében ilyen például az egészségvédő hatású pentaciklikus triterpén urszolsav (He and Liu 2007), vagy a paprika kutikulában az amyrinek (Bauer et al 2005). A kutikula fő tömegét alkotó zsírsav származékok bioszintézisében résztvevő enzimeket kódoló gének közül többet jellemeztek, klónoztak (Kunst and Samuels, 2009). Ezek a C16 és C18 láncok hosszabbítása mellett további dekarbonilációs, oxidációs, redukciós, észtereződési stb lépésekben működnek közre. A bioszintetikus reakciók felderítésében sok segítséget nyújtott a lúdfű kutikula mutánsok (pl *eceriferum;* Jenks et al 1995, Kunst and Samuels 2003, 2009) jellemzése.

dc_741_13



5. ábra: Kutikuláris lipidek bioszintéziséhez vezető anyagcsere utak a növényi epidermisz sejtekben. FAS: zsírsav szintáz komplex; FAE: zsírsav elongáz komplex; VLCFA: nagyon hosszú láncú zsírsav; PM: plazma membrán, ER: endoplazmatikus retikulum (Kunst and Samuels 2009)

A kutikula-specifikus bioszintetikus utak ismert résztvevői közé tartozik az *Arabidopsis LACERATA* gén terméke (CYP86A8 enzim) amely a C16 és C18 zsírsavak ω -hidroxilációját végzi (**6. ábra**). Ezek a monomerek később feltehetően a kutin bioszintézisben használódnak fel (Wellesen et al, 2001).



6. ábra: *lacerata* lúdfű mutáns (balra), az azonos korú vad típusú növénnyel (jobbra) összehasonlítva. A pleiotróp fenotípusban csökkent apikális dominancia, féltörpe növekedés és lassú fejlődés mutatkozik meg (Wellesen et al. 2001).

A kutikula komponensek felszín felé irányuló transzportjával kapcsolatban máig is több nyitott kérdés maradt. Feltételezik, hogy "ATP binding cassette" transzport fehérjék juttatják át a zsírsavszármazékokat a plazma membránon (Panikashvili et al 2007). A viasz komponensek szállításában a glikozil-foszfatidil-inozitol kapcsolt lipid transzport fehérjék részvétele valószínű (Kim et al 2012). A transzportfolyamatok részletei körül azonban még sok a bizonytalanság. A kutikula képződést (bioszintézist és transzportot) szabályozó gének közül többet is azonosítottak (Borisjuk et al 2014). 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) transzkripciós faktorok (**7. ábra**).



7. ábra: A WIN/SHN1 AP2-ERF típusú TF túltermelése lúdfűben a kutikularéteg vastagodását okozta (Broun et al 2004).

A TF-ok mellett a kutikula alkotók képződésének poszttranszkripciós 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.

Kertészeti fajok közül a paradicsom, mint modellnövény kapott a kutikula biológiája szempontjából is a legnagyobb figyelmet (Bargel and Neinhuis 2005, López-Casado et al 2007, Isaacson et al 2009, Matas et al 2011). Egy hosszú ideig tárolható paradicsomfajta termésén a kutikula alkotók fokozott mennyiségét mutatták ki (Saladié et al 2007), míg az epidermális lipid bioszintézis célzott megzavarása fokozott vízvesztéshez vezetett (Leide et al 2007).

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' bőralmákon 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 (Janssen et al 2008, Lee et al 2007), 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 köthető a kutin bioszintézis serkentése (Kannangara et al. 2007, Shi et al. 2011). Egy paradicsom WIN/SHN3 ortológ (SISHN3) túltermelése a levelek kutin monomer mennyiségét specifikusan növelte, ami szintén ezt a szerepet támasztja alá (Buxdorf et al. 2013). Gabonafélékben eddig árpában (Taketa et al. 2008) és rizsben (Wang et al. 2012) írtak le a WIN/SHN családhoz tartozó transzkripciós faktorokat. Búzában Kosma és munkatársai (2010) azonosítottak a kutikulával feltehetően összefüggő géneket hesszeni légy kártételével kapcsolatban. Ezek között volt az eddig búzában egyetlenként leírt, kutikula képződéshez kapcsolható jelölt 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. A gázcserenyílások bezáródásával a perisztómás párologtatás jelenti a fő vízvesztési utat, így a kutikula nyilvánvalóan alapvető szerepű a vízhiányos növény

vízháztartásában. A kutikula viaszainak oldószeres leoldása a vízvesztés drámai növekedését okozza levélen és termésen egyaránt. A kutikula és a haszonnövények szárazságtűrése azonban összetett kapcsolatot mutat. A növényfajok/fajták egy része a vízhiányra nem, vagy lassan reagál a gázcserenyílások zárásával, ezekben tehát nem a kutikula a párologtatás szűk keresztmetszete. A felszíni (epikutikuláris) viaszrétegről pedig több esetben kimutatták, hogy inkább a napfény visszaverésében, szétszórásában és a növény hőháztartásában van szerepe. A kutikulán át történő reziduális vízvesztés borsó fajták között nem függött a hajtás viasz fedettségétől, a fedettebb fajták hőmérséklete alacsonyabb, betakarítási indexük magasabb volt a kevésbé fedetteknél (Sánchez et al 2001). Kim et al (2007), ugyanakkor szója fajták összehasonlításakor a maghozam és a viasz fedettség inverz összefüggését találták. Egyértelmű bizonyítékok utalnak arra, hogy a stresszhatások, pl. a vízhiányos illetve sóstressz egyes fajok esetében serkenti a kutin réteg (Kosma et al 2009, **8. ábra**) valamint a kutikuláris viaszok képződését.

I.



II.



8. ábra: I: Lúdfű levél kutikulájának vastagodása vízhiányos periódus után (B) és sóhatásra (D), a kontrollokkal (A, C) összehasonlítva. II. A vastagodott (B) kutikula reziduális párologtatása csökkent.

Cameron et al (2006) díszdohány levelek viasz fedettségét vizsgálta több szárazság stressz periódus után. A viasz mennyiség egyértelmű növekedését, valamint a reziduális párologtatás csökkenését tapasztalták, ami ebben az esetben a képződött viaszok kedvező hatását mutatta a vízmegtartásra.

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 hozamcsökkenéssel, illetve a reziduális párologtatással kapcsolatban. Gonzalez 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 (Larson and Svenningson 1986; Merah et al. 2000). Az epikutikuláris viaszkristályok okozta hamvasság vízhiányos termesztési viszonyok között szintén nem jelentett előnyt közel izogenikus búza vonalak között (Johnson et al. 1983). A kutikula másik fő alkotója, a kutin mátrix tekintetében nincs tudomásunk összehasonlító vizsgálatokról gabonafélék esetében. Meg kell továbbá jegyezni, hogy az előbbiekben bemutatott vizsgálatokat a búza nagyszámú, eltérő genotípusán végezték, amelyek szárazságstressz alatti viselkedése nem feltétlenül egyforma. Schoppach és 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.

4. A KUTATÁSOK CÉLKITŰZÉSEI

A transzkripciós géncsendesítés mlekuláris 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.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Az alkalmazott baktériumtörzsek, vektorok, módosító enzimek

A bemutatott kísérletekben a különféle génkonstrukciók előállítására és szaporítására az Escherichia coli több különböző törzsét használtuk gazdaként. Általános klónozási feladatokra a DH5a, TG1 (Lucigen), TOP10 (Invitrogen), JS5 (BioRad) és az XL1-Blue (Stratagene), rescue klónozáshoz a SURE (Stratagene) baktérium törzseket használtuk. Utóbbi esetben a nagy, és gyakran repetitív inszertek átrendeződéseinek megakadályozása miatt volt szükség a rekombinációban erősen gátolt gazdára. A növény transzformációkhoz az Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Hoekema et al 1983) és GV3101 (Koncz and Schell 1986) törzseit használtuk. A klónozási feladatokhoz többféle vektortípust alkalmaztunk. A phagemid vektorok közül a pBluescriptIIKS (Stratagene) használata volt az általános, illetve esetenként a pUC18 (Yanisch-Perron et al 1985) plazmidé. Hagyma epidermiszben biolisztikus tranziens expressziót a pDH51 plazmid (Pietrzak et al 1986) származékainak segítségével végeztünk. A növényi transzformációra szánt szekvenciákat pCAMBIA1300 (Cambia BioForge), pCP60 illetve 35S promóter és 35S terminátor elemekkel kiegészített pGreen0179 (Hellens et al 2000) bináris vektorokba klónoztuk. A génkonstrukciók előállításához használt módosító enzimeket többféle forrásból szereztük be. A restrikciós endonukleázokat, T4 DNS-ligázt, Taq-polimerázt, egyéb módosító enzimeket, dNTP nukleotidokat, valamint az enzimreakciókhoz szükséges pufferoldatokat a Biolabs, a Magyarországon végzett kísérleteknél a Fermentas szállította. A búza és alma RT-PCR reakciókat GoTag (Promega). a klónozásra szánt búza szekvenciák amplifikálását Advantage2 (Clontech) Tag polimerázokkal végeztük.

5.2 DNS tisztítás, polimeráz láncreakció (PCR), oligonukleotidok

Bakteriális plazmid DNS kivonásnál Qiaprep Spin Mini Kit-et (Qiagen) vagy Plasmid DNA Extraction Miniprep System-et (Viogene) alkalmaztunk. Agaróz gélből, illetve PCR reakció utáni DNS fragmens tisztításhoz Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit-et (GE Healthcare Life Sciences) használtunk. Növényi DNS kivonásra a DNeasy Plant System Mini Kit-et (Qiagen), vagy a Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System-et (Viogene) alkalmaztuk. PCR reakciókat MJ Research Minicycler PTC-150 Thermal Cycler, Perkin-Elmer/Cetus Model 480 DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer 9600 Gene Amp PCR System,

Eppendorf Mastercycler DNA Engine Thermal Cycler PCR készülékekben futtattunk. Növény genomi DNS szakasz felszaporításánál 32-35 ciklusszámot alkalmaztunk, RT-PCR reakcióban 28-30 ciklust. A denaturáció/csatolás/lánchosszabbítás idejét általában 30/30/60 másodpercre állítottuk, a lánchosszabbítás idejét hosszabb (>1 kilobázis) termék esetén arányosan megemeltük. A csatolási hőmérsékletet általában 55°C-nak választottuk, búza szekvenciák esetén 60°C-on futtattuk a reakciókat. Erre azért volt szükség, mert a búza DNSben a G/C bázispárok aránya általában magas. A láncreakciók indításához szükséges saját tervezésű primereket az MWG (Ebersberg, Németország), Biolegio (Nijmegen, Hollandia) Biomi (Gödöllő, Magyarország), illetve Sigma (St. Louis, MO) cégek szintetizálták és szállították.

5.3 Klónozás, bakteriális transzformáció

Az alapvető génsebészeti és klónozási technikákat Sambrook et al (1989) kézikönyve alapján végeztük. A baktériumok transzformálására rutinszerűen a hősokk módszert alkalmaztuk. Ennek során *Escherichia coli* gazda baktériumot jégen 50mM CaCl₂ oldattal kezeltük, majd a transzformálni kívánt DNS-el együtt 42 °C-os hősokknak tettük ki. A mintát folyékony táptalajban történt egy órás 37 °C-os inkubáció után szilárd táptalajra szélesztettük, mely a szelekció céljából antibiotikumot tartalmazott. A transzformáció az *Agrobacterium tumefaciens* esetében is hasonlóan zajlott, itt azonban 37°C helyett 30°C-os inkubálást alkalmaztunk. Egy további eljárás ugyanebből a célból az elektroporáció volt. Itt a steril desztillált vízzel többször mosott baktériumokhoz kevertük a transzformálni kívánt DNS-t, majd *Escherichia coli* Pulser Unit (Bio-Rad) készülék cellájában nagyfeszültségű áramütésnek tettük ki a mintát. A sikeresen transzformált baktériumok szelekciója az előbbiek szerint történt.

5.4 Biszulfit szekvenálás és félautomata szekvenálás

A genomi (biszulfit) szekvenálásban Frommer et al (1992) módszerét követtük, a Meyer et al (1994) által javasolt módosításokkal. Egy további változtatást tettünk a protokollon, amennyiben a biszulfit kezelt DNS mennyiségét 100 µg-ra emeltük. Kontrollként pDH51 plazmidot alkalmaztunk, amely 35S promótert tartalmaz. A kontroll (nem metilált) 35Spro Citozinok maradéktalan konverziója a reakció teljes lefutását jelezte. Mindkét DNS szálra egy külső és egy belső primer párt alkalmaztunk 2 nmol/ml koncentrációban. A felső szálon egy

(5'-GAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTG) 23-mer-t és (5'egy 24-mer-t CCTCTCCAAATAAAAAAAACTTCC) használtunk külső primerként, egy 34-mer-t (5'-CCATCGATGAAAAGGAAGGTGGRTRRTACAAATG, R=C vagy T) és egy 31-mer-t (5'-GCTCTAGAAATAAAAAAAACTTCCTTATATA) belső primerként. Az alsó szálon egy 31-mer-t (5'-AAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTACAAATACCATC) és egy 29-mer-t (5'-GAATTTTTTTATATAGAGGAAGGGTTTTG) használtunk külső, valamint egy 38-mer-t (5'-CCATCGATAACTCCTACAAATACCATCATTRCRATAAA; R=G vagy A) és egy 36mer-t (5'-CGGAATTCTATAGAGGAAGGGTTTTGRGAAGGATAG; R=C vagy T) belső primerként. A hagyományos, félautomata szekvencia analízist ThermoSequenase cycle sequencing kit (Amersham) végeztük, IR jelölt oligonukleotidok felhasználásával (MWG Biotech). A reakciótermékeket LI-COR DNA Sequencer Long Read IR 4200 system (LI-COR) készüléken futtattuk.

5.5 Genomi fág és kozmid génkönyvtárak készítése, rescue klónozás

Dohány növényekből kivont DNS-t Sau3A restrikciós enzimmel részlegesen emésztettünk. Kozmid klónozáshoz ezt pWE15 vektorba (Stratagene), fág könyvtár készítéséhez Lambda FIX II/XhoI partial fill-in vector kit-be (Stratagene) ligáltuk, majd GIGA Pack III Gold pakoló elegy (Stratagene) segítségével hoztuk létre a klóntárakat. Rescue (mentéses) klónozás céljából a K_{α} dohány vonalból DNS-t izoláltunk, azt *Bgl*II restrikciós enzimmel emésztettük, ligáltuk, majd elektroporálással juttattuk be Epicurian Coli SURE kompetens sejtekbe (Stratagene). A lúdfű *Cbp20* lokuszának klónozásához *Eco*RI és *Hind*III restrikciós emésztett genomi DNS-t ligáltunk, majd transzformáltunk kompetens TOP10 *Escherichia coli* baktériumba (Invitrogen).

5.6 RNS tisztítás, hibridizációk

Dohány növények leveléből az RNA-Clean System (AGS) kit segítségével tisztítottunk RNSt, a gyártó előírásait követve. Az RNS koncentrációt és tisztaságot GeneQuant RNA/DNA Calculator készülékkel ellenőriztük (Pharmacia). Búza és lúdfű szövetek esetében Tri-Reagent-t (Sigma ill. Molecular Research Center) használtunk, a gyártók előírásai szerint. Alma gyümölcs szövettájaiból Asif et al (2006) polifenol és poliszacharid gazdag mintákra ajánlott módszerével tisztítottunk RNS-t. A kivont RNS-t a szennyező DNS eltávolítása céljából DNáz I enzimmel kezeltük (Fermentas), majd fenolos extrakcióval újra tisztítottuk.

Az RNS minőséget spektrofotométer segítségével ellenőriztük (NanoDrop Technologies). Northern hibridizáció céljából azonos mennyiségű RNS mintákat futtattunk denaturáló formaldehid-agaróz gélen, majd azokat Sambrook et al (1989) által leírt módon Hybond N (Amersham) membránra blottoltuk, majd hibridizáltuk. A próba ³²P jelölésére Multiprime DNA Labelling system kit-et vagy Ready-To-Go kit-et (Amersham) használtunk. A genomi fág és kozmid génkönyvtárak screen-elése ugyanezzel a módszerrel jelölt próbák segítségével történt, a klónozó kit-et gyártó (Stratagene) előírásai szerint. A Lambda ZIPII kit esetén a lemezelt fág könyvtárat nitrocellulóz filteren denaturáltuk, semlegesítettük, majd Stratalinker UV crosslinker segítségével rögzítettük (Stratagene). Prehibridizációt követően a filtert jelölt próbával hibridizáltuk, majd a nem specifikus jeleket mosással eltávolítottuk. Az expozíciót követően pozitív jelet adó plakkokat további szaporítás utáni hibridizációs lépésekkel tisztítottuk. A pWE15 kozmid klónokkal hasonló eljárást követtünk, azzal a különbséggel, hogy a lemezelést követően, a filterre vitel előtt a baktérium telepekről replikát készítettünk, az eredeti lemezt pedig in situ lizáltuk a sejttartalom feltárásához.

5.7 Kis RNS-ek klónozása

A kis RNS-ek klónozásában Mette et al (2001) módszerét használtuk, a Djikeng et al (2001) által javasolt dúsítási lépéssel kiegészítve. A promóter szekvenciáról átírt, biotinált szensz és antiszensz RNS-t a tisztított, és linkerhez kapcsolt kis RNS-ekről átírt, PCR amplifikált cDNS-hez anelláltuk, majd az RNS-DNS hibrid molekulákat streptavidinnal kapcsolt Dynabead részecskékhez (M280; Dynal Biotech) kötöttük. A kötés után mosást, majd a specifikusan kötődött szekvenciák PCR amplifikációját alkalmaztuk. A PCR termékkel a biotinált RNS-hez való anellálásától kezdve újra megismételtük a teljes szelekciót és amplifikációt. A végtermék fenolos tisztítása után a kis RNS-hez kapcsolt linkeren restrikciós emésztés, majd klónozás eredményezte a szekvenálható klónokat.

5.8 RT-PCR, real-time PCR

Az RNS minták cDNS-re való átírásához First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtunk (Fermentas, Vilnius, Lithuania), a gyártó előírásai szerint. Az RT-PCR-t alma esetében GoTaq Flexi DNA Polymerase-al (Promega) végeztük 55°C anellálási hőmérsékleten, a búza mintákat Advantage-GC2 polymerase mix-el (Clontech) 60°C-os anellálással amplifikáltuk, mindkét esetben 30-as ciklusszám mellett. Az alma cDNS-eken végzett valós idejű qPCR

reakciókat ImmoMix (Bioline) reakcióközegben, EvaGreen (Biotium) jelölés mellett Corbett RotorGene 6000 PCR készüléken futtattuk (Corbett Research) az annak gyártója által ajánlott ciklus paraméterekkel. Az amplifikált termékek olvadáspont analíziséhez a Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 mennyiségi összehasonlító funkcióját használtuk. A *LCR* génre vonatkozó kifejeződési értékeket a *UBQ11* referencia génhez viszonyítva a REST © 2009 software felhasználásával számoltuk ki.

5.9 Bioinformatikai módszerek

A szekvencia kereséseket a BLAST (Altschul et al. 1990) program segítségével hajtottuk végre. Szekvenciák összeillesztésére a Needle (EMBOSS) vagy a CLUSTAL W (2.1) (Chenna et al 2003) programokat használtuk. Oligonukleotid primerek tervezéséhez a Primer Premier (Premier Biosoft), vagy a Primer3 szoftvereket (<u>http://primer3.sourceforge.net/</u>) vettük igénybe.

5.10 A kísérleti növények nevelése és keresztezése

Búza (Triticum aestivum) és lúdfű (Arabidopsis thaliana) növényeket fitotronban (Conviron) illetve in vitro körülmények között neveltünk, míg dohányt és paradicsomot üvegházi körülmények között is vetettünk. Lúdfű növények esetében fitotronban az első 4 héten rövid nappalos (14/10 óra sötét/fény) majd hosszú nappalos (10/14 óra sötét/fény) megvilágítást alkalmaztunk 21 °C hőmérséklet mellett, a fényerősség 120 µEinstein m⁻² s⁻¹ volt. A magokat CompoSana type II földbe vetettük (Compo). Dohány (Nicotiana tabacum) és paradicsom (Solanum lycopersicum) növények nevelése hosszú nappalos körülmények között, hasonló megvilágítási erősség mellett 24 °C-on zajlott. Lúdfű növények nagyléptékű fenotípusos screen-elésénél a fitotronban előnevelt növényeket üvegházban ültettük szét, majd neveltük tovább. A búza fitotronban történő nevelésének körülményeit Tischner et al (1997) írja le. 21/14 °C max/min hőmérséklet mellett a megvilágítás 500 umol m⁻²s⁻¹, a talaj föld-homoktőzeg (3:1:1, v/v/v) összetételű volt. Dohány és paradicsom steril vetéshez a magokat 5%-os HYPO oldattal 0,01% Tween 20 detergens jelenlétében 10 percen át kezeltük. Ezután a magokat steril desztillált vízzel háromszor lemostuk, majd cukormentes 1/2 Murashige and Skoog (MS) táptalajra vetettük. Lúdfű magok felületét Ca(OCl)₂ segítségével sterilizáltuk, amit ezután többszörös steril desztillált vizes mosással távolítottunk el. Az így sterilizált magokat 0 – 3 % szacharózt tartalmazó 1/2 MS táptalajra vetettük. A steril magvetéseknél

alkalmazott MS közeg antibiotikumokat illetve a később leírtak szerint hormonokat tartalmazhatott. Szelekcióhoz dohánynál 40 – 800 μ g ml⁻¹ Hygromycint vagy Kanamycint, lúdfűnél 50 μ g ml⁻¹ Hygromycint alkalmaztunk. Lúdfű esetében az ABA érzékenység vizsgálatánál az in vitro tápközeget 0,3 μ M ABA-val egészítettük ki. Búza ABA érzékenység vizsgálathoz a magokat Petri csészébe fektetett nedvesített szűrőpapíron, nem steril körülmények között csíráztattuk, 0, 10 vagy 20 μ M ABA jelenlétében. A lúdfű kompetíciós kísérletekhez 9 növényt ültettünk egy tenyészedénybe egymástól kb 6,5 cm távolságra. A tenyészedények tömege 900 – 1100 g volt szántóföldi vízkapacitásnál. Keresztezésekhez az éretlen portokokat tartalmazó virágot emaszkuláltuk, majd a termőket fölös mennyiségű érett pollennel termékenyítettük meg.

5.11 Növénytranszformációk

Tranziens génkifejezés céljából biolisztikus transzformációt hagyma epidermisz sejteken végeztünk Mette et al (2002) módszerével. Bio-Rad Gene Gun készüléket használtunk 900 p.s.i. hasadó korongokkal (Bio-Rad, Vienna, Austria). A plazmid DNS-t arany (1 µm átmérőjű) microcarrier részecskékre vittük, a gyártó előírásai szerint. Lúdfű transzformációt Clough and Bent (1998) módszerével végeztünk, a vákuum használatának elhagyásával. A binary vektor konstrukciókat Agrobacterium tumefaciens-be transzformáltuk (pl GV3101, LBA4404 törzsek). Stacionáris fázisú baktérium kultúrát LB táptalajból lecentrifugáltunk (4000g, 10 perc), majd a csapadékot 5% (w/v) szacharóz oldatban felszuszpendáltuk. Az oldatot 0.01% Silwet L-77-el kiegészítettük, majd a virágzás korai fázisában levő, bimbózó lúdfű hajtásokat (Col-0 ökotípus) merítettünk bele kb 30 másodpercig. A növényeket egy napig befóliázva inkubáltuk (Folpack), majd fitotronban neveltük magfogásig. A transzformált utód növényeket Hygromycin antibiotikumos szelekcióval nyertük, in vitro körülmények között (ld fentebb). Paradicsom transzformációjához cv Ailsa Craig növények in vitro nőtt szikleveleit Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 kultúrával inkubáltuk acetosyringon jelenlétében. A szikleveleket ezután szelektív táptalajra helyeztük át amely az Agrobacterium elölése céljából Claforan antibiotikumot tartalmazott. Egy hét múlva cytokinint, auxint és Kanamycint is tartalmazó táptalajra passzáltuk a növényi részeket, ami fenntartotta a szelekciót a transzformált növényi sejtek számára a regeneráció indukciója mellett. A kalluszosodott szöveteken megjelenő hajtásokat leválasztottuk, majd csak auxin tartalmú táptalajra tettük át a gyökeresedés serkentése céljából. A gyökereket fejlesztett növényeket akklimatizáció után fitotronban neveltük fel.

5.12 T-DNS mutagenizált növényvonal gyűjtemény screen-elése

A kollekció pPCV6NFHyg konstrukcióval transzformált *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípusú növényeket tartalmazott (Koncz et al 1990). A T-DNS transzformált lúdfű vonalakat egyedileg kezeltük. Vetés után a csíranövényeket fitotronban neveltük rövid nappalos körülmények mellett (10 óra megvilágítás) 4 hétig, majd 15 – 20 növényt genotípusonként üvegházban neveltünk tovább. A látható fenotípusuk alapján kiválasztott egyedekről magot fogtunk, majd a bélyeg megjelenését/szegregációját a következő generációkban is követtük.

5.13 Vízmegvonás körülményei, a vízháztartás és kutikula permeábilitás jellemzése

Lúdfű növényeken teljes vagy részleges vízmegvonást a virágzati tengely fejlődés megindulásának fázisában alkalmaztunk. A növények fenotípusát a vízmegvonás 7-10. napján, illetve a 17. napon történő újraöntözést követően értékeltük. Lúdfű részleges vízmegvonásához előkísérletek során megmértük a cserepek átlagos tömegvesztését szántóföldi vízkapacitásig locsolt növények esetében. A csökkentett vízutánpótlás érdekében az átlagos napi teljes vízveszteség felét (kb 40 ml-t) pótoltuk vissza tenyészedényenként. Ezt a vízmennyiségét a növények között egyenlő arányban osztottuk meg, a gyökerek mellé fecskendővel injektálva. Búza vízmegvonását két ciklusban végeztük. Az első ciklust a virágnyílás előtt 3 nappal kezdtük, majd a föld 10%-os GWC értékének eléréséig folytattuk. Újraöntözés után egy további ugyanilyen kezelést alkalmaztunk. A növények vízháztartását több módon is jellemeztük: A föld gravimetrikus víztartalmát (GWC) a következő képlettel számoltuk: GWC (%) = $[(W-DW) / (FW-DW)] \times 100$, ahol W – a cserép tömege a mérés időpontjában, DW – a cserép tömege teljes kiszárítás után (80C° 24 óra), FW - a cserép tömege szántóföldi vízkapacitásnál. A növényi teljes vízpotenciált Scholander bombával mértük (PMS610, PMS Instrument Co, Albany, Oregon, USA). A levelek relatív víztartalmát (RWC) következő módon számoltuk: а RWC (%) = $[(W-DW) / (TW-DW)] \times 100$, abol W – a friss tömeg, DW – a száraz tömeg, TW - turgid tömeg volt. A száraz tömeget 80C° 24 óra kezelés után állapítottuk meg. A turgid tömeg meghatározásához a leveleket 4 óra hosszan úsztattuk zárt térben desztillált víz felszínén, majd szárazra törlés után mértük. Sötét adaptált lúdfű RWC méréséhez 6 hetes növények teljes rozettáit inkubáltuk 1 órán át desztillált vízben. A turgid tömeg meghatározása után a friss tömeg csökkenését 160 percen át követtük sötétben. Az RWC

értékeket a fenti képlet szerint számoltuk ki. A kutikula permeábilitását Toluidin Blue festéssel is vizsgáltuk Tanaka és munkatársai (2004) módszerével. Ehhez lúdfű teljes rozettáit 0.025 % Toluidin Blue (Sigma, St Louis, MO, USA) vizes oldatban (w/v) 2 óra hosszan inkubáltuk enyhe rázatással. A felesleg festéket vizes öblítéssel eltávolítottuk, majd a leveleket fényképeztük. A kutikula áteresztő képességét jellemeztük a klorofill kioldás módszerével is (Kimbara et al 2012). Ennek során 4 hetes rozettákat inkubáltunk 80%-os etanolban sötétben. 8 percenként vettünk mintát 80 percig, majd 24 óra elteltével utoljára. 664 és 647 nm-en leolvastuk az abszorpciót, a kioldódott klorofill tartalmat a következő képlettel számoltuk: μ mol klorofill = 7.93 (A₆₆₄) + 19.53 (A₆₄₇). Az adatokat ezután a friss tömeg 1 grammjára vonatkoztattuk. A 24 óra alatt kioldódott klorofill mennyiséghez, mint 100%-hoz viszonyítottuk az aktuális értékeket.

5.14 Fotoszintetikus aktivitás, sztóma konduktancia, fluoreszcencia indukciós paraméterek mérése

A fotoszintetikus aktivitást teljesen kifejlett leveleken egy LCi Portable Photosynthesis System (ADC Bioscientific Ltd., Herts, UK) segítségével mértük. Sztóma konduktanciát AP4 Porometer segítségével határoztunk meg (Delte-T Devices, Cambridge, UK). Klorofill-a fluoreszcencia indukciós paramétereket a modulált működésű FMS-2 műszer segítségével mértünk (Hansatech Ltd., King's Lynn, UK) legalább 30 perces sötét adaptációt követően. Quenching paramétereket 5 perces aktinikus megvilágítás után nyertünk (PPFD = $40 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) Schreiber et al. (1986) módszerét követve.

5.15 Pásztázó-, transzmissziós elektron- és fénymikroszkópos felvételek

A pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálatokhoz a levél mintákat 3 órán keresztül 4 °C-on 2.8% glutáraldehidben 0.1 M HEPES pufferben (pH 7.2) fixáltuk, majd 3 órán át 1% (w/v) OsO₄ –ban utófixáltuk. HEPES pufferben történő öblítés után a szöveteket etanol hígítási sorozatban dehidratáltuk, és kritikus ponton szárítottuk (CPD 030, BAL-TEC GmbH, Balzers, Liechtenstein). A levél felszíneket Zeiss EM-910 elektron mikroszkóppal 80 kV felszültségen vizsgáltuk. Transzmissziós elektron mikroszkópos felvételek készítéséhez a mintákat 1mm²- es szegmensekre vágtuk, 4 óra hosszan 2.5% (v/v) glutáraldehid 0.05 M Na-kakodilát pufferben pH 7.2 (CB) fixáltuk, majd 3 órán át 4 °C-on 1% (w/v) ozmium tetroxide-ban 0.05 M CB-ben utófixáltuk. A mintákat etanol hígítási sorozatban dehidratáltuk, Spurr féle

gyantába (Spurr 1969) ágyaztuk a gyártó előírásai szerint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), és 48 óra hosszan 60 °C-on polimerizáltuk. Ultravékony metszeteket Ultracut E mikrotommal készítettünk, majd ezeket Formvarral bevont (SPI-Chem, West Chester, PA) nikkel rostélyon 3% (w/v) uranil acetáttal és 0.08% (w/v) ólom citráttal kezeltük. A metszeteket Zeiss EM-910 elektron mikroszkóppal (Wetzlar, Germany) 80 kV feszültség mellett vizsgáltuk. Hagyma epidermisz sejtek vizsgálatához Leica MZ FLIII fluoreszcensz sztereo mikroszkópot használtunk (Leica, Vienna, Austria), fénykép felvételeket Color-Cool-View CD kamerával készítettünk (Photonic Science, UK). Az elkészült képeket Image-Pro-plus Version 3.0 (Media Cybernetics, MD) programmal dolgoztuk fel.

5.16 Felületi viasz fedettség vizsgálata

A felületi viaszok leoldásához az alma gyümölcsöket egy percen keresztül 300 ml kloroformba merítettük. A leoldott mintákat 5 g vízmentes Na₂SO₄ segítségével vízmentesítettük, Albet 400 szűrőpapíron átszűrtük, majd gömblombikokban vákuum körülmények között 40 °C-on bepároltuk, a visszamaradt viasztömegeket megmértük. Az almákat gömbnek tekintettük, felületüket (A) a mért sugaruk (r) alapján az $A=4\pi$ r² képlettel számoltuk.

6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

6.1 A transzkripciós géncsendesítés (TGS) célszekvenciáinak örökölhető metilációja

Dohányban transzkripciós (35S promóteren) és poszttranszkripciós (NiR génen) géncsendesítés kiváltására egyaránt alkalmas a T-DNS integrációból származó '271' lokusz (Vaucheret et al 1992, 1993). Szintén T-DNS beépülésével jött létre dohány genomban a 35S promóteren TGS-re érzékeny 'H2' lokusz, amely e mellett ugyanakkor kiváltani is képes transzkripciós géncsendesítést arra szenzitív NOS promóteren (**9. ábra**). A TGS jelenségét '271' x H2 keresztezés esetében tanulmányoztuk, ahol egy rendszerben tudtuk vizsgálni és összehasonlítani a TGS és PTGS folyamatait (Park et al 1996).



9. ábra: A promóter homológia függő géncsendesítési rendszerünkben szereplő konstrukciók szerkezete és kölcsönhatásaik.

A 'H2' és '271' lokuszokra homozigóta vonalakat keresztezve F1 növényeket nyertünk. Az F1 növényekben a 'H2' lokusz 35Spro-Hygromycin rezisztencia génjének (HPT) átírása a sejtmagi run-on kísérlet tanúsága szerint nem volt kimutatható (Park et al 1996), ami a csendesítés transzpripciós szintjét bizonyította. A '271' lokusz további hatásaként ugyanakkor a '271' transzgénikus vonalakban átíródó antiszensz nitrit reduktáz gén (NiR) poszttranszkripciós géncsendesítő hatása (PTGS) is megjelent. Ezt a nitrogén hiány jeleként a
növények sárgulása kísérte. A NiR génről képződő elsődleges, magi mRNS azonban a HPT génnel ellentétben megjelent, annak degradációja csak később következett be.

A 'H2'/'271' F1 dohánynövényeket vad típusú dohánnyal visszakeresztezve kapott BC1 generációt vizsgálva részben meglepő eredményt kaptunk. A várakozásnak megfelelően a '271' lokuszt nem öröklő egyedek nem mutatták a nitrogénhiány tüneteit, a PTGS a csendesítő konsrukció eltávolításával azonnal megszűnt. Az utódok negyedénél ugyanakkor a szegregáció eredményeként a TGS hatás alól felszabaduló H2 lokuszok miatt Hygromycin rezisztenciát kellett volna tapasztalnunk.

H₂/271 x wt

BC1 seedlings:



10. ábra: A H2/271 x wt első visszakeresztezett nemzedékben a Hygromycin rezisztencia a várakozással ellentétben nem jelent meg.

Ez a tulajdonság azonban a BC1 növényeknél egyáltalán nem jelent meg (**10. ábra**), a H2 lokuszt öröklő BC1 növények HptII mRNS szintje csak a töredéke volt a H2 szülőének (**11. ábra**). Ezzel ellentétben, és a növények fenotípusával összhangban a NiR próbával végzett Northern hibridizáció eredménye szerint a nitrit reduktáz gén kifejeződése a csendesítő hatás megszűnésével azonnal az eredeti szintre állt vissza.









11. ábra: Northern blot NiR (felső panel) és HYG (alsó panel) próbákkal a szülői, F1 és BC1 nemzedékek dohánynövényein. A #3 vonal a '271' lokuszt, míg a csillaggal jelöltek a H2 lokuszt örökölték. Az 'S' RNS minta nem szelektált BC1 csíranövényekből összekevert növényanyagból származott.

A HptII gén metilációjának fokát 4 (csillaggal jelölt, H2-t öröklő) BC1 vonal esetén HpaII és MspI emésztett genomi Southern blottal követve azt korellációban találtuk a Hyg próbával kapott Northern jel erősségével (Park et al 1996).

További vizsgálatainkhoz a H2*BC1#5 vonalat választottuk, amelyben a HptII gén átírásának gátlása a legnagyobb mértékben maradt meg. A jelenség hátterének felderítésére a H2*BC1#5 és az eredeti H2 növények 35S promóterein biszulfit szekvenálást végeztünk. Az eredmények azt mutatták, hogy a '271' lokusz hatásának előzetesen kitett H2 lokusz 35S promóter szekvenciája a növények következő generációjában, a csendesítő lokusz jelenléte nélkül is magasabb szintű citozin metilációt mutatott (**12. ábra**).



12. ábra: H2 és H2*BC1#5 lokuszok 35S promótereinek metilációs mintázata a (-32) és (-232) pozíciók között, az átírás kezdetéhez viszonyítva. A szimmetrikus CpG és CpNpG nukleotid kombinációkat aláhúzás jelzi. Előbbiek háromszög, utóbbiak négyszög alakú jelzései metiláció esetében kitöltöttek. A nem szimmetrikus citozinok metilációját hasonlóképpen, kitöltött illetve üreskörök jelzik. A promóterek metilációjának mértéke közötti legnagyobb különbségeket mutató régiók keretezettek.

A H2 35S promóterek CpG bázisainak 13,5%-a, a CpNpG-k 19,8 %-a volt metilált, míg ugyanez az érték a H2*BC1#5 növényekben 76% illetve 77,5% volt. A sűrűbben metilált

H2*BC1#5 lokusz azonban nem mutatott további csendesítésre való képességet. "Naiv" H2, H1 lokuszokkal, vagy egyéb 35S promótert tartalmazó konstrukcióval keresztezve azok csendesítését nem fokozta, a másodlagos paramutáció jelenségéhez hasonló hatást nem tapasztaltunk. A BC1 növények további visszakeresztezésével kapott BC2 generációban az utódok még mindig nem mutattak teljes Hygromycin rezisztenciát, azt csak a későbbi generációkban, vonalanként eltérő gyorsasággal nyerték vissza.

Kísérleteinkben a transzkripciós géncsendesítésnél a transzgén hatására bekövetkező génkifejeződés-csökkenés együtt járt a cél promóter DNS metilációjával. A csendesítő és csendesített konstrukciókat együtt tartalmazó növényekben a 271 lokusz csendesítést kiváltó 35S promóterei miatt a cél promóter szekvencia metilációja direkt módon nem volt vizsgálható. A szegregáció után fennmaradó legerősebb csendesítést mutató vonalon volt elvégezhető a metiláció molekuláris szintű analízise. Az itt megfigyelt 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. Kísérleteink eredményeinek magyarázatára az akkori ismeretek szerint több lehetséges mechanizmust javasoltunk. Magyarázatképpen felmerült a promóterek közötti DNS/DNS párosodás, illetve egy lehetséges RNS/DNS interakció is feltételezhető volt. A kísérletek idején a dsRNS-ek és kis RNS-ek szerepe a TGS géncsendesítésben még nem volt ismert, ez csak néhány évvel később vált nyilvánvalóvá (Paszkowski and Whitham 2001, Mette et al 2000, Matzke et al 2001, Matzke et al 2004). Ezek felfedezése után, az általunk használt '271' géncsendesítő lokusz esetében is kimutatták ezeknek az RNS fajtáknak a részvételét a csendesítés folyamatában (Mourrain et al 2007). Kísérleteinket követően genetikailag jobban meghatározott modellrendszerekben az általunk is leírt jelenség mechanizmusát kísérletek sorával részletesen felderítették. A metiláció és a TGS funkcionális kapcsolatát a metl mutáns segítségével bizonyították (Morel et al 2000). Mivel a jelenség elterjedtnek bizonyult, kódoló és nem kódoló génszakaszokon is megnyilvánult, máig használt elnevezése RdDM (RNS függő DNS metiláció) lett. A promóter szekvenciák RdDM jelenségére a továbbiakban is a TGS elnevezést használom. Promóterek metilációja ismert az Arabidopsis genomban (a gének kb 5%-ánál), az SDC gén esetében ennek funkcionális jelentősége is kimutatható volt (Henderson and Jacobsen 2008). Érdekes módon az almában feltárt kevés számú ismert génregulációs mechanizmus egyikeként a gyümölcshéj piros színét

adó anthocyanin-ok képződését befolyásoló MYB10 transzkripciós faktor szintén a promóter metiláció szintjén szabályozódik (Telias et al 2011).

A munkánkat követő években számos, az RdDM folyamataiban résztvevő fehérjét azonosítottak, egyesek sejten belüli elhelyezkedését is meghatározták (pl. Kanno et al 2004; Pikaard 2006, Huettel et al 2007). Kísérleteinkben a csendesítő konstrukció eltávolítása után a célszekvencia metilációja a szimmetrikus pozíciókban maradt fent. Diéguez és munkatársai (1998) eredményei szerint viszont az RdDM jelensége szimmetrikus pozíciójú citozin nukleotidok jelenléte nélkül is előidézhető. A nem szimmetrikus pozíciójú metiláció azonban a csendesítő konstrukció eltávolítása után nem volt örökíthető. A megfigyeléseket összevetve az a kép alakul ki, hogy az RdDM kialakulása lehetséges nem szimmetrikus citozin metiláció révén is, a csendesítő hatástól független öröklődése viszont csak szimmetrikus pozíciójú metiláció kontextusú citozinok metilációjáért felelős metilázok, a lokuszokról képződő kis és scaffold RNS-ek és ezek összefüggései is az RdDM folyamatával (Herr et al 2005, Zhang and Zhu 2011). Ma már jól ismert a hiszton módosítások ("hiszton kód") jelentősége is a géncsendesítésben (Bender 2004, Matzke et al 2009).

6.2 Egy transzkripciós géncsendesítési rendszer lokuszainak jellemzése

A H2 lokusz a 35S promóterének TGS érzékenysége mellett NOS promóterével arra szenzitív lokuszban transzkripciós géncsendesítést volt képes kiváltani (Matzke et al 1989). Ilyen, TGS-re érzékeny NOS promótert hordoz a K₈₁ lokusz, amit H2 a promóter metilációja mellett teljesen csendesíteni volt képes. A részben rezisztens K_{α} 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 transzgéneken és az azokat határoló genomi DNS-en szekvencia szintű vizsgálatokat végeztünk (Jakowitsch et al 1999). A transzgénikus dohányvonalak létrehozásánál használt génkonstrukciókat a **13. ábra** mutatja be.



13. ábra: A NOSpro TGS csendesítő H2 lokusz, valamint az érzékeny és a részlegesen rezisztens 'K' lokuszok transzformációjánál használt T-DNS-ek térképei. HYG: HptII gén, OCS: octopin synthase gén, N: NOS promóter, 23H: NOS promóter és rövidített nopaline synthase gén, csíkozott régió: NOS promóterhez kapcsolt kanamycin rezisztencia gén és NOS gén, KAN: kanamycin rezisztencia gén, GUS: β glükuronidáz gén, α ': a szója β -conglycinin α ' alegységének promótere; T: NOS terminátor szekvencia, S: SacII, P: PstI restrikciós hasítóhelyek, fekete vízszintes vonal: NOS promóter metilációs analízisénél használt próba elhelyezkedése

A dohány vonalakból pWE15 és lambda FIXII vektorokban genomi génkönyvtárakat készítettünk. A H2 lokusz esetében plakk illetve kolónia hibridizáció segítségével 'H' T-DNS próbát használva egy cosmid klónt és négy lambda klónt izoláltunk, melyek T-DNS szekvenciákat tartalmaztak. A cosmid, és a lambda klónok közül kettő tartalmazott NOS promóter szekvenciát, ezeket részletesen analizáltuk. Az inszertek DNS szekvenciáját meghatároztuk, így a cosmid és a két lambda klónt átfedőnek találtuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a lokusz egy teljes T-DNS ('H' konstrukció) mellett annak egy részét fordított ismétlődés formában tartalmazta (**13. ábra**). 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 NOS promótert nem tartalmazó két lambda klónon csak részleges analízist végeztünk, itt bináris szekvenciák mellett egy *gypsy* szerű retrotranszpozon maradványait tudtuk azonosítani.





14. ábra: Felső panel; A szekvencia mérete (kilobázisban) és GC tartalma (%-ban). A függőleges nyilak a szekvencia GC tartalmának hirtelen változásait mutatják. N44 és NS5; A szekvenciák újratranszformálásához használt fragmensek. Alsó panel; A H2 lokusz szerkezete az eredeti H konstrukcióval összevetve. RB: jobboldali LB: baloldali határoló szekvencia, egyéb jelölések magyarázatát ld 13. ábra aláírásában. A szekvenciák színjelölése eredetük szerint: T-DNS – fekete, bináris vektor – szürke, növényi – fehér. A fekete és szürke vonalak a lokusz térkép felett a K₈₁-hez hasonló (NOS promótertől különböző) szekvenciákat jelölik.

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 későbbi kutatásokban is igazolódott.

A transzkripciós csendesítő tulajdonságú '271' lokuszról ismertté vált, hogy telomerikus pozícióban épült be a dohány egy szubtelocentrikus kromoszómájába (Park et al 1996). Ez alapján feltehető volt, hogy a kromoszomális pozíciónak jelentősége lehet a csendesítő képesség kialakításában. 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 H₂ lokusz NOS promóteren erős TGS-t kiváltó tulajdonságáért. A H₂ lokusz két visszaizolált szakasza (N44 és NS5 a **14. ábrán**) azonban a TGS érzékeny K₈₁ vonalba újratranszformálva nem volt képes a H konstrukciónál nagyobb gyakorisággal géncsendesítést kiváltani (Jakowitsch et al 1999). Az irodalomban azonban a későbbiekben több olyan példa is ismertté vált, amikor fordított ismétlődésű (inverted repeat) szekvencia képes volt független lokuszokon metilációt és TGS-t kiváltani (pl. Luff et al 1999; Mette et al 2000). A transzkripciós géncsendesítésre érzékeny K₈₁ és nem érzékeny K_α lokuszok szerkezetét a fentiekhez hasonló módszerrel vizsgáltuk, kiegészítve a 'rescue' klónozási eljárással. A K₈₁ lokuszt két lambda klón, míg a K_α lokusz egy részét egy 'rescue' klón és egy lambda klón fedte le.



15. ábra: A TGS-re érzékeny K_{81} és részben rezisztens K_{α} lokuszok szerkezete és GC tartalma (%). A bakteriális eredetű DNS szakaszok magasabb G/C tartalma jól megfigyelhető. A jelölések magyarázatát ld a **13. és 14. ábrák** aláírásaiban. A K_{81} lokusz szekvenciája a NOS promóteren kívül homológiát mutat a H2 lokusszal a vízszintes fekete (T-DNS eredetű szekvencia) és szürke (bináris vektor eredetű szekvencia) vonalakkal jelölt régióban. E: EcoRI, S: SacII, P: PstI restrikciós hasítóhelyek

A K₈₁ lokuszt teljes terjedelmében nem tudtuk klónozni, a klónozott szekvencia azonban viszonylag egyszerű szerkezetű volt (**15. ábra**). A teljes K₈₁ konstrukció mellett bináris vektor szekvenciákat, és két rövid T-DNS szakaszt tartalmazott. A K_{α} lokusz egy duplikációk

és átrendeződések nélküli, egyszerű K_{α} konstrukciót tartalmazott, amelyhez vektor szekvenciák sem kapcsoltak (**15. ábra**). A T-DNS bal oldali határoló szekvenciája viszont teljes mértékben elveszett az integrációnál. A klónozások révén ismertté vált TGS-re érzékeny illetve részben rezisztens célszekvenciák nem tartalmaztak a H2 lokuszra jellemző komplex strukturális bélyegeket. A K_{81} és a K_{α} 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_{81} 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.

Kísérleteink óta a szakterület rendkívül dinamikusan fejlődött, mára a felhalmozott ismeretanyag bőséges, irodalma szerteágazó. A kialakult elképzelések szerint az RNS függő DNS metiláció természetes célszekvenciái elsősorban repetitív DNS szakaszok (pl rDNS, ismétlődések) és transzpozonok (Steimer et al 2000, Cokus et al 2008). Az RdDM ezek heterokromatizációjához járul hozzá a hiszton kóddal együtt. Az Arabidopsis genom centromérás és pericentromérás szakaszairól például számos rövid életidejű nemkódoló transzkriptum íródik át, amelyek nagy része heterokromatikus ismétlődésekről származik (Chekanova et al 2007). A feltételezések szerint ezek hozzájárulnak a régiók metilációjához és a represszív kromatin struktúra kialakulásához. Metiláció okozta csendesítés ugyanakkor eukromatin kontextusban is megtörténhet (Soppe et al 2002). Az általunk feltárt komplex szerkezetű H2 lokuszról feltehetően aberráns transzkriptumok (is) származnak, amelyek a későbbi eredmények szerint nagy hatékonysággal képesek RdDM-et kiváltani, inverted repeat struktúra nélkül is (Béclin et al 2002). A TGS folyamatának a természetes folyamatok mellett a növénygenetikai kísérletek tervezésében is nagy jelentősége van. A növényi molekuláris biológiai kutatásokban gyakran használt SALK, GABI, FLAG Arabidopsis vonalak egy jelentős részénél a hordozott transzgén konstrukció 35S promótere további ilyen promótereket TGS mechanizmussal csendesíteni képes (Daxinger et al 2008).

6.3 Transzkripciós géncsendesítésben résztvevő kis RNS-ek vizsgálata

A TBSV P19 virális eredetű, géncsendesítést szupresszáló fehérje kifejeződésének sejtmagba irányítása céljából a P19 génhez magi lokalizációs szignált (NLS) kapcsoltunk. Az eredeti

citoplazmás (P19C) és a módosított, NLS-t tartalmazó (P19N) géneket is kifejeztük GFP fúziós fehérjeként (35Spro-P19C-GFP, 35Spro-P19N-GFP) hagyma epidermisz sejtekben tranziens módon, biolisztikus transzformáció segítségével. Eredményeink szerint a P19C-GFP (döntően citoplazmás) lokalizációja nem különbözött a szabad GFP-étől, a P19N-GFP fehérje viszont a sejtmagban dúsult fel (**16. ábra**).



16. ábra: 35Spro-P19C-GFP és 35Spro-P19N-GFP fúziós fehérje konstrukciók tranziens kifejezése biolisztikus módon hagyma epidermisz sejtekben. A szabad GFP kontroll a **20. ábrán** látható.

A P19N és P19C konstrukciókkal NOSpro TGS csendesített *Arabidopsis* vonalakat transzformáltunk. A P19 transzgénikus növények növekedése és maghozatala a vad típusnál gyengébb volt, virágzásuk késett, leveleik szeldeltek voltak. Ezeknek a bélyegeknek a megjelenése feltehetően a P19 fehérje miRNS-ekre gyakorolt hatásának volt köszönhető. A P19 transzgénikus növényekben azonban a TGS célgének kifejeződése nem nőtt meg észrevehető mértékben és a NOS promóterek metilációja sem csökkent. A sejtmagban kifejezett P19N fehérje hatására a 21 és 22 nukleotid hosszú siRNS-ek 30-40%-os, a 24 nt siRNS-ek <10%-os, a szintén vizsgált MIR159 mennyiségének kb 60 %-os csökkenése volt kimutatható Northern hibridizációval. P19C transzgén hatására az siRNS-ek és a MIR159 RNS szintje nem csökkent, hanem további, 1 és 2 nukleotiddal rövidebb származékaik jelentek meg (Papp et al 2003b, **17. ábra**).

dc_741_13



MIR159 antisense probe

17. ábra: NOSpro kisRNS-ek és MIR159 kimutatása Northern blot segítségével P19N, P19C transzformált és kontroll NOSpro TGS csendesített, valamint *dcl1* és kontroll lúdfű növényekben (Papp et al 2003b).

A géncsendesítési folyamatok gátlása céljából azért esett választásunk a TBSV P19 géncsendesítést szupresszáló fehérjére, mert feltételezésünk az volt, hogy az a 21-től 25 nukleotidig terjedő hosszúságú kis RNS-ek képződését egyöntetűen gátolja (Silhavy et al 2002, Hamilton et al 2002). Későbbi eredmények azonban azt mutatták, hogy ez a feltevésünk nem bizonyult igaznak, a P19 fehérje a 24 nt hosszú RNS-ekhez jóval kevésbé kötődik, mint a 21-22 nt hosszúakhoz (Vargason et al 2003). Ez lehet a legvalószínűbb magyarázat arra, hogy kísérleti rendszerünkben a P19 fehérje magba irányítva (P19N) alig, illetve citoplazmás változata (P19C) sem csökkentette szembetűnően a 24 nt hosszú kis RNS-ek mennyiségét. Ennek fényében már nem meglepő, hogy kísérleteinkben a P19 fehérje a NOS promóter transzkripciós géncsendesítését nem tudta megszüntetni. Munkánkat követően azonban nyilvánvalóvá vált a 24 nt hosszú siRNS-ek mennyiségét viszont a P19N fehérje hatékonyan csökkenteni volt képes, míg ez a P19C esetében nem volt megfigyelhető.

Az miRNS-ek közül a MIR159 szintjét követtük a kísérlet során, mert ez elegendő mennyiségben volt jelen az *Arabidopsis* levelekben ahhoz, hogy Northern blottal vizsgálva összevethető jelet mutasson az siRNS-ekkel. A P19N kifejezése a NOSpro siRNS-eknél nagyobb mértékben (kb 60%-al) lecsökkentette a MIR159 mennyiségét. Ebből az eredményből arra következtethettünk, hogy a MIR159 processzálásának legalább egyes lépései a sejtmagban történnek. A P19C fehérje kifejezésének hatására az siRNS-ek és miRNS szintje nem csökkent. Ez összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy mindkét kis RNS típus elsődleges prekurzorának processzálása a sejtmagban zajlik. A kísérlet így hasonló eredményre vezetett, mint a HC-Pro csendesítést szupresszáló fehérje kifejezése, amely szintén citoplazmás lokalizációjú (Mette et al 2001). P19C hatására azonban a kis RNS-ek mindegyik vizsgált típusában azoknak egy 1 és 2 nt-al rövidebb formája is megjelent. Ennek magyarázata az a később felismert jelenség lehet, hogy a P19 fehérje kötődése gátolta a kis RNS-ek 3' végi, védő funkciójú metilációját a citoplazmában (Lózsa et al 2008). Így a dsRNS-ről túlnyúló nukleotidok RNáz aktivitással szemben feltehetőleg kevésbé maradnak védettek, részbeni lehasításuk 1 vagy 2 nt-al rövidebb RNS fajták megjelenését eredményezte.

6.4 dcl1 mutáció hatása TGS-re, a DCL1 fehérje sejten belüli lokalizációja

A *dcl1-7*, *dcl1-8* és *dcl1-9* mutációknak nem volt hatásuk TGS csendesített NPTII illetve NOS gének kifejeződésére és metilációjára. Ugyan Northern hibridizáció segítségével a *dcl1* mutáns háttérben a NOSpro siRNS-ek szintjének kismértékű csökkenését mutattuk ki, ez azonban magyarázható volt a csendesítő lokusz hemizigóta jelenlétével (Papp et al 2003b).

Mindezt figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a *DCL1* gén nincs jelentős hatással a NOSpro siRNS-ek képződésére. Ebből arra következtethettünk, hogy a TGS folyamatában valószínűleg egy másik, addig nem azonosított DICER aktivitású enzim működhet közre. Későbbi eredmények szerint az a DCL3 lehet, amit újabb ismeretek szerint a DCL2 vagy DCL4 enzimek is helyettesíthetnek (Greenberg et al 2011, Daxinger et al 2009, Mlotshwa et al 2010). Ezzel kapcsolatban megemlíthető, hogy a PTGS folyamatához szintén nem szükséges a DCL1 aktivitás (Finnegan et al 2003).

Mivel a NOSpro siRNS-ek a TGS-ben nem az ismert DCL1 aktivitás által keletkeztek, érdekesnek tűnt szekvenciájuk megismerése. Ebből a célból NOSpro TGS csendesített növényekből 74 db egyedi siRNS-t klónoztunk, és szekvenáltunk meg (**18. ábra**). A klónok többsége 21 vagy 24 nukleotid hosszú volt. A NOS promóter mindkét száláról képződött kis

RNS-eket találtunk közöttük, a 16 és 17 nt hosszú RNS-ek csak antiszensz irányultságúak voltak. Ezek azonban a Northern blot tanúsága szerint a nem csendesített növényben is képződtek, jelenlétük tehát nem függött össze a TGS folyamatával.



18. ábra: Klónozott NOSpro siRNS-ek. A/ A NOS promóter szekvenciája a szensz (kék) és antiszensz (piros és fekete) siRNS-ek helyzetével. A promóter aktivitás szempontjából fontos régiók "a", "b" és "z" betűkkel jelölve és keretezve vannak. B/ A feketével színezett 16 és 17 nt kis RNS-ek a nem csendesített kontroll növényben is megjelennek, így azok nem köthetők a NOSpro dsRNS processzáláshoz. C/ A klónozott NOSpro kisRNS-ek méreteloszlása. D/ és E/ A nukleotidok megoszlása a klónozott siRNS-ek 5' (D) és 3' végein (E).

A 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 is arra utal, hogy a kísérleteinkben meghatározott szekvenciájú 21 illetve 24 nt hosszú siRNS-eket eltérő DCL enzim processzálhatta (**19. ábra**). A MIR159 RNS mennyiségét vizsgálva a várakozásoknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a *dcl1* mutánsban nem jelent meg ez a kis RNS fajta. Ez a megfigyelés azt erősíti meg, hogy a DCL1 fehérje feltétlenül szükséges a MIR159 képződéséhez (Reinhart et al, 2002).



19. ábra: Modell az RdDM kialakulásáról (Simon and Meyers 2011). A dsRNS köztitermék hasítását a DCL3 enzim végzi.

A DCL1 fehérje sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása céljából a gén kódoló szakaszának cDNS-éhez GFP jelzőgént kapcsoltunk. A gén nagy mérete (1909 as; 5730 bp) miatt a cDNS-ét csak részben tudtuk klónozni. Az N terminális 1097 as-hoz kapcsolt GFP konstrukció *Escherichia coli* baktériumban, GFP antitesttel végzett Western blot kísérlet

alapján termelte a várt méretű fehérjét. A fúziós konstrukciót konstitutív növényi promóter után kapcsolva azt biolisztikus módszerrel hagyma epidermisz sejtekbe transzformáltuk. A GFP fluoreszcens jel megjelenése alapján a tranziensen kifejezett fúziós fehérje sejtmagi lokalizációjú volt (Papp et al 2003b) (**20. ábra**).



20. ábra: Szabad GFP (balra) és DCL1 cDNS-hez fúzionált GFP (jobbra) konstrukció tranziens kifejezése biolisztikus módon hagyma epidermisz sejtekben.

Ez alapján arra következtethettünk, hogy a DCL1 fehérje maga is sejtmagi lokalizációjú. Ez egybevág azzal az eredményünkkel, hogy a sejtmagi lokalizációjú P19N fehérje kifejezése lecsökkentette a DCL1 által processzált MIR159 mennyiségét. Az eredményt a későbbiekben többen is megerősítették, pl Song et al (2007).

6.5 Megváltozott stressztűrésű *Arabidopsis* mutánsok azonosítása pleiotróp morfológiai bélyegek szűrésével

Új, megváltozott stressztűrésű *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 stressztűrés folyamataival. Izoláltunk például egy új, az *early-flowering-3-*al (Zagotta et al 1996) allélikus mutánst, valamint megváltozott habitusú, pl törpe, féltörpe és egy fotoperiódustól függően törpe fenotípusú vonalakat (**21. ábra**). Ez utóbbi mutáns növény rövid nappalos megvilágításnál normális ütemben növekedett, hosszú nappalon azonban növekedése megállt, törpévé fejlődött. Ezzel egyidejűleg a kötött szalicilsav tartalom a növény szöveteiben jelentősen megemelkedett (Szalai Gabriella, személyes közlés).



21. ábra: Kettő, részben karakterizált mutáns a T-DNS mutagenizált populációból.A/ Fényperiódustól függő törpe mutáns B/ Halványzöld "pale" mutáns

Az enyhe morfológiai változásokat hordozó mutánsokat biotikus és abiotikus stresszeknek tettünk ki. Egy, a vad típusnál halványabb zöld színű ("pale" #686) monogénes mutáns kompatibilis bakteriális fertőzéssel szembeni ellenálló képessége alacsonyabbnak bizonyult a vad típusnál. A DC3000 *Pseudomonas syringae* baktériummal fertőzött levelekből visszaizolált baktérium titere a vad típusnál szignifikánsan magasabbra emelkedett, bár az *enhanced disease susceptibility-1* mutáns (Parker et al 1996) titerét nem érte el (nem bemutatott adatok). A #686 mutáns levelének szövetszerkezete továbbá jelentős eltérést mutatott a vad típushoz képest, a sejtek lazábban kapcsolódtak egymáshoz, a levéllemez vastagsága megnőtt (nem bemutatott eredmények). Mutánsunkat kereszteztük a hasonló

fenotípusú *low cell density-1* mutánssal (Barth and Conklin 2003), amivel azonban nem bizonyult allélikusnak. Mivel érdeklődésem ekkor alapvetően az abiotikus stressztűrés felé fordult, ezeknek a mutánsoknak a részletesebb tanulmányozására nem került sor, hanem az alább bemutatott mutáns vonal vizsgálatával folytattam munkámat.

A részletes vizsgálat alá vont mutáns (*cbp20*) szintén látható, pleiotróp fenotípusa alapján volt megkülönböztethető. A vad típusnál szeldeltebb levélszélt és valamelyest kompaktabb habitust mutatott (**22. ábra**). A komplex fenotípushoz tartozott még a lassúbb növekedés és későbbi virágzás is.



vad típus *cbp20* vad típus *cbp20*

22. ábra: A cbp20 mutáns látható morfológiai bélyegekben különbözik a vad típustól (Col-0).

A mutáns a vad típussal való keresztezést követően monogénes recesszív öröklésmenetet mutatott (nem bemutatott adatok). *cbp20* növényünket kereszteztük a hasonló levél fenotípust mutató *serrate* (Clarke et al 1999) mutánssal. Az F1 generáció vad fenotípusa alapján azonban bizonyossá vált, hogy a *cbp20* és *serrate* mutációkat két különböző lokusz határozza meg, azok nem allélikusak (**23. ábra**).



cbp20 cbp20 x se se F1

23. ábra: *cbp20* és *serrate* (*se*) mutánsok keresztezése. Az F1 generáció vad fenotípusa alapján a mutációk különböző géneket érintenek.

6.6 A *cbp20* mutáns részletes genetikai, élettani és stresszélettani jellemzése, valamint kapcsolata az RNS szabályozással

Stressztűrési vizsgálatok során a *cbp20* növények hőtoleranciája és bakteriális fertőzéssel (*Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000) szembeni ellenállóképessége a vad típushoz hasonlónak mutatkozott (nem bemutatott adatok). Szárazságtűrését tekintve viszont a mutáns a vad típusnál kedvezőbb tulajdonságúnak bizonyult (Papp et al 2004) (**24. ábra**).



24. ábra: Vad típusú és *cbp20* lúdfű növények 7 napos vízhiányos periódust követően.

A szárazságtűrési fenotípus mezőgazdasági jelentősége miatt az izolált mutánsok közül a *cbp20* részletes vizsgálatát folytattuk a továbbiakban. A csírázásnál mutatott ABA érzékenység változása gyakran összefüggésbe hozható a kifejlett növény szárazságtűrésével. A *cbp20* növények csírázását vizsgálataink szerint olyan alacsony ABA koncentráció is gátolta, amely a vad típusú Columbia növényekét még nem (**25. ábra**). Eredményeink hasonlóak voltak a szintén pleiotróp bélyegeket mutató, fokozottan szárazságtűrő *abh1* mutánssal végzett kísérletekéhez (Hugouvieux et al 2001).



25. ábra: A *cbp20* mutáns csírázását alacsony koncentrációjú ABA gátolni képes, ami a vad típusra még nincs ilyen hatással.

A *cbp20* mutáns egy T-DNS mutagenizált populációból származott, ami megkönnyítette a mutációt okozó genetikai lézió helyének azonosítását. Hogy az adatokat összefüggésbe hozhassuk a megfigyelt fenotípussal, először a T-DNS és a megfigyelt fenotípusok együttes öröklődéséről kellett megbizonyosodnunk. Vad típussal való keresztezés után az F2 generációban mind a morfológiai, mind a szárazságtűrési fenotípus a T-DNS-el kapcsoltan öröklődött. A T-DNS kimutatását az utódokban a markergénre specifikus PCR reakciókkal végeztük (nem bemutatott adatok). A T-DNS-t határoló növényi genomi szekvenciákat mentéses, "rescue" klónozással nyertük ki, majd a visszanyert genomikus DNS szakaszokat megszekvenáltuk. A szekvencia analízis szerint a T-DNS a *Cap Binding Protein 20 (CBP20)* gén első exonjába ékelődött be (Papp et al 2004) (**26. ábra**).



26. ábra: A *cbp20* mutációt okozó T-DNS az At5g44200 gén második exonjába épült be, és ott egy 36 bázipáros deléciót okozott (az MLN1 P1 klónban 62,147 és 62,183-ként számozott bázispárok között).

A *CBP20* génre specifikus próbát használva Northern hibridizációval bizonyítani tudtuk a gén kifejeződésének hiányát a *cbp20* mutánsban (**27. ábra**).



27. ábra: A *cbp20* mutánsban a gén mRNS-e nem mutatható ki.

További lépést jelentett a mutáció jellemzésében a mutáns teljes hosszúságú cDNS-el való komplementációja. Ehhez vad típusú *Arabidopsis*-ból RNS-t tisztítottunk, oligo dT primerről cDNS-t írtunk át, specifikus primerekkel a CBP20 fehérjét kódoló szekvenciát RT-PCR reakcióban felszaporítottuk. A terméket klónoztuk, szekvenciáját ellenőriztük, majd bináris vektorba (pPCV702) klónoztuk át. A növényi konstitutív promóterről (35Spro) átíródó konstrukciót *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növénybe transzformáltuk, ami több vonalnál teljes, egyeseknél részleges komplementációt eredményezett. A morfológiai bélyegek komplementációja (**28. ábra**) együtt járt a mutáns fokozott szárazságtűrésének elvesztésével.



28. ábra: Felső panel: A *cbp20* mutáció komplementációjához használt T-DNS konstrukció pPCV702 vektorban a konstitutívan kifejeződő teljes hosszúságú CBP20 cDNS-el (a rövidítések megegyeznek a **27. ábrán** használtakkal). Alsó panel: A *CBP20* cDNS transzgén konstrukció a *cbp20* mutáns levél fenotípusának reverzióját okozta.

A rendelkezésre álló microarray adatok kiegészítése és a *CBP20* gént szabályozó hatások további felderítése céljából stressz és hormonkezelési kísérleteket végeztünk. Többféle hormon között cytokinint (N[6]-Benzylaminopurin) is alkalmaztunk, ami a publikus microarray adatokkal ellentétben indukálta a *CBP20* gén átírását vad típusú *Arabidopsis* növényben (Bacsó and Papp 2008). A vizsgált egyéb hormonoknak nem volt ilyen hatása. Stressztűrési kísérleteinkben azt találtuk, hogy a *CBP20* gén átírása sebzés, fizikai behatás (pl. sterilen nevelt fiatal növények áthelyezése), vagy desztillált víz infiltráció hatására átmenetileg lecsökkent, majd visszaállt (nem bemutatott adatok). A *CBP20* gén átírása tehát bizonyos stresszek hatására is megváltozott, jellemzően csökkent.

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 (**29. ábra**).

dc_741_13



29. ábra: A *cbp20* mutáns sztóma konduktanciája AP4 műszerrel mérve szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a vad típusnál. A konduktancia a komplementált vonalban visszaállt a vad típus szintjére (Papp et al 2004).

A szárazságtűréshez vezető élettani folyamatok további jellemzése céljából mértük a vízhiányos stressznek kitett *cbp20* mutáns és kontroll növények földsúlyainak változását, ami döntően az álaluk 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 gázcserenyílások 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.

Érdekes módon az ABA jelútban az nCBC alegységek mellett két másik RNS kötő fehérje részvételét is igazolták. A *hyl1* és *sad1* ABA túlérzékeny mutánsok, ahol HYL1 egy dsRNS kötő fehérje (Lu and Fedoroff, 2000) SAD1 pedig egy Sm szerű RNP fehérje (Xiong et al 2001). Mindez alapján már korán valószínűsíthető volt, hogy az ABA jelútban poszttranszkripciós, RNS szintű szabályozás is szerepet játszik (Fedoroff 2002). Az nCBC komplex és az ABA válaszok kapcsolatát később több tanulmányban is megerősítették. Kim et al (2008) szerint az abszcizinsav a CBP20 és CBP80 fehérjékkel direkt módon kölcsönhat, és azokat stabilizálja. Daszkowska-Golec et al (2013) további bizonyítékként az *abh1* mutáció szupresszoraként az *abi4* abszcizinsav érzéketlen mutánst azonosították. 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. A splicing zavaraként főleg intron visszatartást írtak le, ami leggyakrabban az első intronnál jelentkezett. Az miRNS-ek képződésének érintettségét az *abh1/cbp80* mutánsban Gregory et al (2008) is megerősítették, azokat a célgének szintjén is igazolták. Raczynska et al (2010) a *cbp20, cbp80* egyszeres és a *cbp20/cbp80* kettős mutánsokban főleg transzkripciós faktorokat és szabályozó géneket vizsgáltak, bennük jelentős arányban találtak alternatív splicing útján történő kifejeződést. A mutánsokban átfedő, de nem azonos génkészletet érintett a változás, amit itt is leggyakrabban az első intronnál lokalizáltak. A két nCBC mutánsban (*cbp20, cbp20/abh1*) részben eltérően kifejeződő génkészlet lehetséges magyarázata az lehet, hogy az alegységek a komplex működésében különböző szerepet töltenek be, bár a mutánsok megfigyelhető fenotípusa igen hasonló. Kierzkowski et al (2009) az nCBC komplexet alkotó CBP20 és CBP80 *Arabidopsis* fehérjék funkcionális kapcsolatát vizsgálták. Arra a következtetésre jutottak, hogy az nCBC szerepeinek ellátásához a CBP20 a komplex egyes alegységeinek sejtmagba juttatásával járul hozzá, míg a CBP80 stabilizáló funkciót is betölt.

Már korán feltűnő volt az nCBC mutánsok hasonlósága a *serrate* mutánshoz (ld saját fenti kísérletünket is). A *serrate* pleiotróp fenotípusának egyes elemei emlékeztettek továbbá a *dicer-like1 (dcl1), hua enhancer 1 (hen1), hyponastic leaves 1 (hyl1), argonaute 1 (ago1)* és egyéb, az miRNS képződésben zavart szenvedett mutánsok fenotípusára (Yang et al 2006, Lobbes et al 2006). A vizsgálatok megerősítették, 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 megjelent tanulmányukban 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 (**30. ábra**).



30. ábra: Növényi nCBC és egyéb faktorok szerepei a pre-mRNS és pri-miRNS processzálásában. Az EIF4F komplex az eIF4E, eIF4A és eIF4G alegységekből áll. RNAPII: RNS polimeráz II, SE: SERRATE; HYL: HYPONASTIC LEAVES; DCL: DICER-LIKE; HEN: HUA ENHANCER, AGO: ARGONAUTE (Montgomery and Carrington, 2008)

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) képződését a *Cbp20*, *Cbp80* és *Serrate* gének szabályozzák (lincRNS-ek, Liu et al 2012). Erről az RNS típusról, és esetleges funkcióiról a stresszválasszal kapcsolatban azonban még keveset tudunk (Au et al 2011).

A *cbp20* mutánst jellemző késői virágzással összefüggésben Geraldo et al (2009) végeztek kísérleteket. Élesztőben és növényben a CBP20 és FRIGIDA fehérjék direkt kapcsolatát mutatták ki, amivel a *cbp20* mutációnak a virágzást szabályozó *FLC* mRNS átírására és spilcing-jára való hatását magyarázták.

Az nCBC komplex működéséről tehát a *cbp20* mutáns izolálása óta sok új ismeret gyűlt össze, az RNS szintű génszabályozásban betöltött szerepéről egyre többet tudunk. Az nCBC

mutánsok szárazságtűrő fenotípusa felveti azt a lehetőséget, hogy az nCBC komplex az ozmotikus stressz hatására csökkenő szintű miRNS-eken keresztül szabályozhat toleranciához vezető válaszokat. Az miRNS-ek (és siRNS-ek) részvétele a stressz válaszokban mára már jól megalapozott, és egyre inkább általános jelenségnek tűnik (Khraiwesh et al 2012). Az nCBC mutánsok szárazságtűrő fenotípusának kialakításáért felelős mechanizmusok és effektor gének megismerése felé azonban még csak kezdeti lépéseket sikerült tenni. A mutánsokban megfigyelt miRNS szint változások némelyike összefüggésbe hozható az ABA válasz potenciációjával. A cbp20 és abh1/cbp80 mutánsokban alacsony miR159 szintet és annak gyenge ABA indukálhatóságát találták (Kim et al 2008), aminek hatására történő magas MYB33 és MYB101 kifejeződés magyarázhatja a fokozott ABA válaszokat. A miR160 ARF célgénjének miRNS érzéketlen mutációja megemelkedett ABA érzékenységet okoz csírázáskor (Liu et al 2007). A miR160 szintje a *cbp20*, *abh1/cbp80* mutánsokban lecsökkent (Laubinger et al 2008 Fig1B), processzálásának gátlása tehát egy további lehetséges magyarázatot adhat az nCBC mutánsok ABA túlérzékenységére csírázásnál. A miR159 és miR160 szintje ugyanakkor a *serrate* mutánsban is lecsökken, mely ugyan csírázásnál ABA túlérzékeny, de fokozott szárazságtűrést nem mutat. A miR164 szintjének csökkenése mindkét Arabidopsis nCBC mutánsban markánsan megjelenik. Ennek az miRNS-nek a célszekvenciái a NAC típusú transzkripciós faktorok közé tartoznak. Saad et al (2013) eredményei szerint a rizs NAC1 transzkripciós faktor túltermelésével a búza szárazságtűrését javítani lehetett, többek között az ABA válaszok potenciációja révén. Laubinger et al (2008) beszámol továbbá számos miRNS esetében az elsődleges transzkriptum mennyiségének növekedéséről (pl miR398, miR169, miR156, miR166, ld. Table S1). Az ezeknek megfelelő processzált miRNS mennyiségek csökkenését azonban nem minden esetben dokumentálták. Ennek ellenére feltehető, hogy az miRNS-ek által szabályozott folyamatok koordinált változásai hozzájárulnak az nCBC mutánsok fenotípusának kialakulásához. Hogy ezen belül (illetve ezen túl) a mutánsok jobb szárazságtűrését milyen faktorok okozzák nem tisztázott. A fenotípus kialakulásával kapcsolatban felmerülő hipotetikus összefüggéseket még kísérleti bizonyítékokkal kell alátámasztani, valamint lehetséges, hogy egyes faktorok önmagukban nem adnak teljes körű magyarázatot. Ebbe az irányba tett további lépésnek, részeredményként értékelhető, hogy Kuhn et al (2006) egy fehérje foszfatáz (AtPP2CA) túltermeltetésével az abh1/cbp80 mutáns ABA túlérzékenységét csökkenteni volt képes.

Az Arabidopsis CBP20 génhez nagyfokú hasonlóságot mutató szekvencia sok fajban kimutatható. Ezek funkciója transzgénikus technológiával, RNAi módszerrel történő

csendesítéssel vizsgálható, ha a faj genetikai transzformációja megoldott. Az ilyen kísérletek gyakorlati perspektíváját nCBC mutánsok esetében az adja, hogy a várható kedvező fenotípus funkcióvesztéses mutáció eredménye. Így egy további molekuláris biológiai módszer segítségével (TILLING) lehetőség van nem transzgénikus mutáns kiválasztására is, ami az esetleges GMO mentes mezőgazdasági hasznosítás lehetőségét is nyitva hagyja. Hogy egy vízigényes haszonnövényben megvizsgáljuk a kedvező fenotípus kialakításának lehetőségeit, paradicsomban azonosítottunk egy, az Arabidopsis CBP20 génhez nagy szekvencia hasonlóságot mutató gént (LeCBP20). A LeCBP20 cDNS fragmenseiből fordított ismétlődésű csendesítő konstrukciót készítettünk, majd azt 'Ailsa Craig' fajtájú paradicsomba transzformáltuk. A transzformáns paradicsomok azonban csak vízháztartásuk marginális megváltozását mutatták. Hasonló megközelítéssel, de a CBP80 gén burgonya homológját célozva Artur Jarmolowski és csoportja sikeresen növelték meg a burgonya szárazságtűrését (Pieczynski et al 2013). A CBP20 homológ gén csendesítésével azonban nekik sem sikerült ilyen hatást elérni burgonyában (Jarmolowski, személyes közlés). A vizsgálatokba vont két Solanaceae faj tehát ebből a szempontból másképpen viselkedett, mint a lúdfű modellnövény. További haszonnövények ilyen irányú kísérleti eredményeiről nincs tudomásunk, feltételezhető hogy a CBP20 és CBP80 ortológ génfunkciók kiesése fajfüggő módon hat a növények vízháztartására. A két alegység közötti különbség magyarázatát további kutatások adhatják meg. A CBP80 gátolt burgonya vonalak tanulmányozása során ugyanakkor Pieczynski et al (2013) a fent vázolt szabályozási lehetőségek közül а miR159/MYB33/MYB101 jelút megváltozott működésére utaló eredményeket kaptak. Ez tovább valószínűsíti a szárazságtűrési fenotípus mechanizmusára vonatkozó fentebbi feltételezések legalább egy részének helyességét.

6.7 A *cbp20* mutáns bőrszövetének morfológiája, a kutikula fejlődés kapcsolata a szárazságtűréssel és az RNS szabályozással

A *cbp20* mutáns vízháztartásával kapcsolatos esetleges epidermális bélyegek után kutatva a levél bőrszövetét részletes anatómiai vizsgálatnak vetettük alá. Fénymikroszkópos megfigyeléseink szerint a mutáns bőrszövete szignifikánsan több epidermisz sejtet, levélszőrt és gázcserenyílást tartalmazott mint a vad típus, a sztóma index azonban változatlan maradt. A sztómák és zárósejt anyasejtek fejlődésében is rendellenességeket találtunk (Jäger et al 2011).

Kifejlett *cbp20* levelek abaxiális bőrszövetét transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgálva a vad típussal összehasonlításban jelentős (78,2%) kutikula vastagodást figyeltünk meg (**31. ábra**).



31. ábra: Vad típusú (A) és *cbp20* mutáns (B) levelek abaxiális felszíni kutikuláinak transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata. A fekete nyílhegyek a kutikula kiterjedését jelzik. CW: sejtfal. A fekete vonal 300 nm-t jelöl (Jäger et al 2011).

Az nCBC komplex működése és a kutikula fejlődés kapcsolata közötti kapcsolatot megerősítik a Jarmolowski csoport eredményei is. A már említett, a *CBP80* gén kifejeződésében csendesített, fokozott szárazságtűrésű burgonya levelén a kutikula szerkezet változását találták, transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) annak kompaktabb ultrastruktúráját figyelték meg (Pieczynski et al 2013).

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 (**32. ábra**), ami arra enged következtetni, hogy a mutáció hatására a párologtatás kutikuláris komponense csökkent.

dc_741_13



32. ábra: 4 hetes, sötét adaptált vad típusú (Col) és *cbp20* mutáns lúdfű rozetták relatív víztartalmának változásai.

A kutikula szerepe a vízháztartásban és a szárazságtűrésben a kurrens kutatási területek közé tartozik. Eredményeink megerősítik, hogy a kutikula szerkezetének változása együtt járhat a reziduális vízvesztés csökkenésével és a növény szárazságtűrésének javulásával. Kísérleteinkkel szinte egy időben mutatták ki, hogy a lúdfű szárazságstressz hatására megvastagodó kutikulája a vízvesztést fokozott gátolja (Kosma 2009).

A kutikula fejlődés és az RNS szabályozás kapcsolatára eredményeink mellett más adatok is utalnak. Voisin et al (2009) a lúdfű *lacerata, fiddlehead* és *bodyguard* kutikula mutánsokat részletes morfológiai, biokémiai, élettani és genetikai vizsgálatoknak vetették alá. Adataikból arra a következtetésre jutottak, hogy a három mutánsban megfigyelt (a kutikuláris anyagot egymáshoz hasonló módon rendezetlenül felhalmozó) fenotípus nem a más-más léziót hordozó mutációk elsődleges következménye. Hasonló fenotípusukat feltételezésük szerint a kutikula intakt struktúrájának primer megbomlását követő másodlagos, sebzési válaszreakció folyamatai alakítják ki. Érdekes módon, egy microarray adatokkal végzett *in silico* enhanszer/szupresszor meta analízissel a *Serrate* gént azonosították ennek a védekezési reakciónak a résztvevőjeként. Ebből az következik, hogy a SERRATE részvételével RNS-eket processzáló komplexnek is szerepe lehet a kutikula szerkezetet formáló folyamatokban. Ezt az *in silico* elemzés mellett azzal támasztották alá, hogy a *lacerata/serrate* dupla mutánsban a *lacerata* fenotípusának egyes elemei (szerv fűziók, fokozott kutikula permeábilitás) nem jelennek meg. Az RNS szabályozás részvételét a kutikula felépítéséhez

vezető folyamatokban tehát a *cbp20* mutációra vonatkozó korábban bemutatott adataink mellett más forrásból származó eredmények is alátámasztják. Lam et al (2012) közelmúltban közölt eredményei még közvetlenebb bizonyítékot szolgáltattak az RNS szabályozás és a kutikula fejlődés kapcsolatára. A *cer7* mutáns szupresszoraként az RNS szabályozás két ismert résztvevőjét (*RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE1 és SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3*) azonosították, bizonyítva ezzel a kis RNS szabályozás szerepét a *CER3/WAX2/YRE* gén kifejeződésében, és a kutikuláris viaszok képződésében.

A *cbp20* mutáns kutikulájának vizsgálata során nyert eredményeink tehát alátámasztják azt az érdekes lehetőséget, hogy a kutikula fejlődésében legalábbis bizonyos körülmények között (feltehetőleg a stresszválasz részeként) szerepe van az RNS szabályozásnak. Az nCBC komplex ismert célpontjai között nem könnyű feladat a kutikula fejlődését befolyásoló komponenst azonosítani. Az alternatívan splicing-ot mutató gének csoportjában számos ismeretlen funkciójú transzripciós faktort és egyéb gént találhatunk, amelyek részt vehetnek a kutikula fejlődés módosításában. Az nCBC mutánsokban változó processzálású miRNS-ek cél génjei sem adnak ebbe az irányba mutató egyértelmű fogódzót. Lehetséges továbbá, hogy a hatás nem direkt, hanem pl. az ABA jelút potenciációján át valósul meg. Az újonnan felismert lincRNS-ek által szabályozott géncsoport szintén tartalmazhat effektor géneket, amik befolyásolhatják a kutikula képződését. Jelen tudásunk szerint tehát nem tudjuk pontosan meghatározni azt a mechanizmust és cél géneket, amik segítségével az nCBC részvételével működő jelút a kutikula fejlődését módosítja. Az nCBC eddig feltárt tulajdonságai alapján azonban valószínűsíthetjük, hogy ez a mechanizmus mindenképpen tartalmaz az RNS szabályozás szintjén zajló lépéseket (Deák et al 2010).

6.8 Víztakarékos mutánsok tulajdonságai vízért való kompetíció esetén

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 *era1* vízzel takarékos 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 (**33. és 34. ábrák**).

A kísérleteket a *cbp20* mutáns mellett egy további csökkentett párologtatású ABA túlérzékeny mutánssal (*era1*) is elvégeztük. Ezzel arról kívántunk megbizonyosodni, hogy az eredményt a genotípustól függő, de a vizsgálatok körén kívül eső esetleges egyéb faktorok nem befolyásolják.



33. ábra: 7 napig tartó vízhiányos stressz eltérő hatása víztakarékos mutáns és vad típusú növényekre különböző (A: csak vad típus, B: csak mutáns, C: vegyes) ültetési mintázatok esetén. V: vad típus, M: mutáns, csillag: a mutáns növények pozíciója.

dc_741_13



34. ábra: Tenyészedények gravimetrikus víztartalma (GWC) vad típus (wt) / *cbp20* mutáns (mut) összehasonlításában A, B, és C típusú ültetési mintázatok esetében (szántóföldi vízkapacitás = 100%).

További méréseket végeztünk a *cbp20* és vad típusú növények gyökérzetén is, amely szerint a gyökérzet mennyisége nem különbözött lényegesen az ültetési helyzet függvényében. 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.

Különböző fajok egyedeinek egymásra hatása gyökérkontaktus esetén, optimális növekedési feltételek mellett gátló, de akár serkentő is lehet Armas and Pugnaire (2011) évelő növényekkel végzett kísérletei alapján. Vegyes növénypopulációk esetén a vízért való versengés növekedést visszafogó hatása jól dokumentált (pl Bennett and Cahill 2012). Vysotskaya et al (2011) paradicsom és saláta csíranövényekben kompetíció által indukált élettani változásokat írtak le. Eredményeik szerint saláta és paradicsom növények kompetíciója a vízhiányos állapottól függetlenül is a párologtatásuk csökkenéséhez vezetett, mely hatást ABA közvetítette, és melyben feltehetőleg a xylém nedv lúgosodása is szerepet játszott.

Kísérleteink annyiban jelentettek újdonságot az ismert összefüggésekhez képest, hogy ugyanazon faj (lúdfű) mutáns és vad típusú egyedeit hasonlítottuk össze vízhiányos körülmények között, így a versengésben résztvevő növények vízgazdálkodásának (párologtatásuk intenzitásának) hatása a kompetícióban egyértelműbb volt. Eredményeink

felhívták a figyelmet arra, hogy a kísérleti körülmények között jól teljesítő növényvonalak a szántóföldön megjelenő esetleges versenyhelyzet során elveszthetik vízforgalmi sajátosságukból fakadó előnyüket (Pardo 2010).

6.9 A cbp20 mutáns fotoszintetikus aktivitása

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 (P_N) 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 szignifikáns különbséget hozott létre. A vízhiány hatására a vad típusú növényeken a 4-5. napon váltak nyilvánvalóvá a hervadás külső jelei.



35. ábra: *cbp20* és vad típusú (col-0) növények tenyészedényeiben a föld gravimetrikus víztartalma (szántóföldi vízkapacitás = 100%, felső panel), és a fotoszintetikus aktivitások (P_N , alsó panel) 7 napos vízhiányos periódus alatt.

A cbp20 mutáns a kísérlet során a várt módon visszafogott párologtatást mutatott, amit a tenyészedények földsúlyainak lassúbb csökkenése bizonyít (35. ábra). 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. Vízmegvonás hatására a mutáns növény jelentősen kevesebb vizet párologtatva életfolyamatait jóval tovább normális szinten tudta tartani, ami a fotoszintetikus paraméterek (fotoszintetikus ráta, fotokémiai kioltás és kvantum hatásfok) magasabb értékeiben is megmutatkozott (36. ábra). Az 5. és 7. napi méréseken a mutáns fotoszintetikus rátája, fotokémiai kioltás és kvantum hatásfok értékei szignifikánsan meghaladták a vad típusét. Érdekes módon a cbp20 növények nem fotokémiai kioltása jó vízellátás mellett, valamint a 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 (daSilva and Arrabaça 2004).



36. ábra: Fotoszintetikus paraméterek változása *cbp20* és vad típusű (Col-0) növényekben vízhiányos periódus alatt. A: F_v/F_m : maximális kvantum hasznosítás, B: Φ PSII: effektív kvantum hatásfok, C: qP: fotokémiai kioltás, D: qNP: nem fotokémiai kioltás

A maximális kvantum hasznosítás (F_v/F_m), mint a vízhiányos stressz esetén gyakran vizsgált mutató a kísérlet utolsó napjára sem mutatott szignifikáns különbséget a mért növények között. Az effektív kvantum hatásfok viszont a vízmegvonás 6-7. napján mutatott különbségeket, ami a 7. napon már statisztikailag szignifikáns volt. Megfelelő vízellátás mellett nevelt növényeknél a mért paraméterek közül egyedül a fotokémiai kioltás mutatott eltérést a két genotípus között. A *cbp20* mutánsban a kísérlet kezdetén mért magasabb értékek a mutáns jobb képességét jelezheti a nem fotokémiai kioltásra, ami kedvezőtlen körülmények esetén előnyt jelenthet (Molnár et al 2004). A fokozódó stressz hatására mindkét vizsgált genotípusban nőtt a fotokémiai kioltás, az 5. naptól pedig szignifikáns különbség már nem volt mérhető.

Összességében kísérletünkből azt a legfontosabb következtetést vonhattuk le, hogy a gátolt gázcserét mutató *cbp20* mutáns fotoszintetikus aktivitása normál 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 bíztató arra az nézve, ha a lúdfű mutánshoz hasonló tulajdonságú haszonnövények lehetséges gyakorlati alkalmazhatóságát próbáljuk előzetesen felbecsülni.

6.10 Alma gyümölcs kutikula jellemzése mikroszkópos és molekuláris módszerekkel

Pályám, munkásságom későbbi fázisaiban vizsgálataim középpontjába a haszonnövények (kertészeti növények és gabona) vízvesztési és stressztűrési folyamatai kerültek. Ezen belül az *Arabidopsis* modellnövényen elért eredmények alapján kiemelt jelentőséget kaptak a kutikula fejlődésére és szerepének meghatározására irányuló vizsgálatok.

Az alma a magyar kertészeti termelésben meghatározó jelentőségű faj. Gyümölcsének viaszosodása fontos bélyeg a fogyasztó számára vonzó külső megjelenés, a tárolhatóságot befolyásoló apadás, illetve egyes kórokozókkal szembeni védekezés miatt is.

Ahhoz, hogy a kutikula képződés mechanizmusai vizsgálhatóak legyenek, első lépésként a folyamatokban szereplő gének, transzkripciós faktorok azonosítására van szükség. Az ilyen irányú vizsgálatokat az alma esetében a közelmúltban közzétett teljes genom szekvencia nagyban megkönnyítette. Ezeknek az adatoknak és a lúdfű kutikula képződés folyamatainak

(részleges) ismeretében tűztük ki célul 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 (**37. ábra**). A felületegységre jutó viaszmennyiség a két fajtánál összemérhető volt, bár a termelődés dinamikája a téli fajtánál intenzívebbnek bizonyult (**37/B ábra**).

Kísérleteinket a gyümölcsök 100%-os szedési érettségi állapotáig végeztük, de elképzelhető, hogy tárolás során a két fajta viaszoltságában további különbségek is kialakulnak. Ennek eldöntése további vizsgálatok tárgya lehet.



37. ábra: A/ Prima és Florina alma gyümölcsök mintavételi ideje a megporzástól számított napokban (DAP) kifejezve. B/ A gyümölcsök viasz fedettsége a fejlődésük során (Prima – kék, Florina – piros oszlopok).
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 (nem bemutatott adatok). 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 metszeteken jellemző különbségeket találtunk. 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. Igaz ugyanakkor, hogy megfigyeléseink nem terjedtek ki az alma gyümölcs kutikula egyéb strukturális jellemzőire (pl mikrorepedések), amelyeknek szintén nagy hatása lehet az apadást okozó vízvesztési folyamatokra.

Az alma kutikula képzésért felelős gének azonosítása céljából először *in silico* analízist végeztünk lúdfű szekvenciák segítségével az alma genomi adatbázisban. Az alma genomban több putatív gén szekvenciája kiterjedt régiókban jelentős hasonlóságot mutatott a lúdfűben funkcionálisan jellemzett, kutikulával kapcsolatos szerepű génekhez (**38. ábra**). A kiválasztott gén párok erősen homológ átfedő régiói mellett ugyanakkor további jelentős, nem hasonló génszakaszokat is találtunk. Ez jelezheti az alma genom annotálás még fennálló esetleges pontatlanságait, illetve utalhat a gének domén szerkezetének különbségeire is.

dc_741_13



38. ábra: Alma genom feltételezett géntermékei és ismert, a kutikula fejlődéshez köthető *Arabidopsis* fehérje szekvenciák összehasonlítása. A %-ban megadott érték az átfedő régiók homológiáját adja meg.

A lúdfű génekhez hasonló alma homológok kifejeződését a gyümölcs két szövettáján (héj és hús) valamint a levélben követtük RT-PCR módszerrel. Az RNS kivonáshoz feldolgozott héj minta az epidermisz mellett néhány (átlagosan 4-5) sejtsor parenchima sejtréteget is tartalmazott. Ez egy epidermisz-specifikusan kifejeződő gén esetében a kísérleteinkben szereplő héj/hús minták vonatkozásban a tapasztalt génkifejődési különbség arányát többszörösen csökkentette. Eredményeink több esetben mutatták a kiválasztott alma gének héjspecifikus kifejeződését a gyümölcsben, aminek aránya a többi mintához képest így valószínűleg alábecsült. Kísérleteinkben először főleg a hosszúláncú viaszok bioszintéziséért felelős FAE komplexben résztvevő ketoacyl CoA szintázt (KCS) kódoló génekre koncentráltunk (Albert et al 2011a; Albert et al 2011b). Több, feltételezett KCS gén kifejeződését mutattuk ki Gegesi-Zöld fajta gyümölcsének héjában. Jellemeztük e mellett az alma egy CER1 homológjának kifejeződéi mintázatát, amelynek valószínűsíthető szerepe a

zsírsav dekarbonilációs bioszintézis útvonalban lehet (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.

F leaf F pee F pulp P leaf	- dind
	LACS2 - 2010 LACS2 - 2011
	KCS7/2 - 2010 KCS7/2 - 2011
	FDH - 2010 FDH - 2011
	PAS2 - 2010 PAS2 - 2011
	CER10 - 2010 CER10 - 2011
	CER1 - 2010 CER1 - 2011
	CER4 *
	LCR - 2010
	WBC11 -2010 WBC11 -2011
==	LTPG1 - 2010 LTPG1 - 2011
an 14	WIN1 *
	🗕 🕳 Ubiquitin

39. ábra: Lúdfű gének feltételezett ortológjainak kifejeződése alma gyümölcsök különböző szövettájaiban és levélben. F: Florina, P: Prima fajták

A vizsgált gének jelentős részében kizárólagos, vagy döntő mértékű expressziót figyelhettünk meg a héjban (Albert et al 2013b) (**39. ábra**). A kifejeződés specifitása egyes gének esetében

az évjárattól is függött (*LACS2, LCR*). A vizsgálatok mindkét évében döntően héj specifikusan fejeződött ki például a *CER1* gén alma homológja, amely egy feltételezett aldehid dekarbonilázt kódol (Aarts et al. 1995; Bernard et al. 2012). 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 reduktázt kódol (Rowland et al. 2006). A 2011 évi kísérletben az alma CER4 homológja héj specifikusan fejeződött ki (2010-ben nem tudtuk a terméket detektálni). 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 a két kísérletben. Ez azért figyelemre méltó, mert mindhárom génnek ugyanabban a biokémiai folyamatban, a kutin bioszintézisben tulajdonítanak (katalítikus vagy szabályozó) szerepet.

A tapasztalt kifejeződési különbségek validálása céljából a szemikvantitatív RT-PCR eredményeket egy kiválasztott gén esetében real-time PCR módszerrel igazoltuk (**40. ábra**). Ehhez a *Lacerata* gén alma homológját választottuk, amely egyrészt jellegzetes kifejezési mintázatot mutatott, másrészt ezzel a génnel további vizsgálatokat is terveztünk.



40. ábra: Az alma *MdLACERATA1* gén kifejeződés expressziós szintjeinek ellenőrzése real-time PCR segítségével, a vizsgált 2 fajta különböző mintáiban (Albert et al 2013b).

Az *MdLACERATA1* kódoló régiójának teljes hosszúságú cDNS-ét a további vizsgálatok érdekében klónoztuk, szekvenciáját ellenőriztük, és *Arabidopsis* növénybe transzformáltuk. 17 független transzformáns vonalat nyertünk, amelyek jellemzése folyamatban van.

6.11 Eltérő szárazságtűrésű búzafajták összehasonlítása élettani és morfológiai bélyegek alapján, különös tekintettel a kutikulára

Kísérleteinkben szárazság-tűrő (Plainsman V, Mv Emese) és érzékeny (GK Élet, Cappelle Desprez) búzafajtákat hasonlítottunk össze annak érdekében, hogy meghatározzuk a kutikula, mint a toleranciával kapcsolatba hozható levélfelszíni struktúra különbségeit. Fitotronban nevelt búza növényeket a virágzás fázisában két egymást követő periódusban vízhiánynak tettünk ki. A kísérletek során mért hozam jellemzők alátámasztották a választott fajták feltételezett szárazság tolerancia szintjeit (Jäger et al 2014a). A kezelések előtt és után a kutikula vastagságot, mint a párologtatás szempontjából potenciálisan releváns morfológiai paramétert mértük transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével. A stresszkezelés kezdetekor mért kutikula mátrix vastagság értékek az ismételt szárítási ciklusok hatására sem 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 toleráns és érzékeny búzafajták zászlós leveleinek kutikula vastagságát összehasonlítva a mért értékek nem várt változatosságát találtuk (41. ábra). A kutikula mért átmérője nem tartalmazza az epikutikuláris viaszokat, mert azok a minták előkészítése során leoldódnak. Megállapításaink tehát a kutin mátrix kiterjedésére vonatkoznak, amik azonban intrakutikuláris viaszokat még valószínűleg tartalmaznak. A szárazságra érzékeny 'Cappelle Desprez' fajta kutikulája szignifikánsan vékonyabbnak bizonyult a többi fajtáénál.

dc_741_13



41. ábra: Transzmissziós elektron mikroszkópos felvételek a Plainsman (A), Mv Emese (B), GK Élet (C) és Cappelle Desprez (D) zászlós levelek kutikuláiról. cl: cuticle layer; cp: cuticle proper; cw: cell wall; nyíl: epikutikuláris viaszok. A fekete vonal hossza 150 nm.

Eredményeink alapján a vékony kutikula egy olyan bélyeg, amely a vizsgálatainkba vont fajták közül csak az egyik szárazság érzékeny genotípusban mutatkozott. A vastag kutikula tehát nem feltétlenül járt együtt fokozott szárazság toleranciával. A szárazságtűrés nyilvánvalóan komplex tulajdonság, ami több faktor együttes hatására alakul ki. A 'GK Élet' fajta kiterjedt kutikulája ellenére például érzékeny a vízhiányra. Így olyan élettani tényezőket is kerestünk kísérleteinkben, amelyek további hozzájárulást jelenthetnek a fajták eltérő stressz válaszához. Ilyen faktor lehet az ABA érzékenység, amelynek meghatározása céljából a vizsgált búza fajták csíranövényeinek gyökér növekedését ABA jelenlétében mértük.

100 90 80 70 ■0 µM 60 ■ 10 µM % 50 □ 20 µM 40 □ 50 µM 30 20 10 0 Plainsman V Mv Emese Gk Élet Cappelle Desprez fajták

ABA növekedésgátló hatása búza fajták gyökerein

42. ábra: Petri csészében csírázó búzaszemek gyökérnövekedését a jelölt koncentrációban jelenlevő ABA különböző mértékben gátolta.

A **42. ábrán** bemutatott (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. Kísérleteinkben ugyanakkor a 'Plainsman' fajta ABA-ra a legérzékenyebbnek bizonyult. Kurahashi Y et al (2009) nagyszámú búza genotípuson elért eredményei szerint a vonalak szárazságtűrése és az ABA gyökérnövekedés gátlás mértéke lineáris korrelációban voltak. A 'GK Élet' fajta gyenge szárazságtűrése tehát legalábbis részben magyarázható – vastag kutikulája ellenére – az alacsony ABA érzékenységgel. Kísérleteink kezdetekor fajtaválasztásunkat az motiválta, hogy ugyanezen fajtákon Prof Erdei László és munkatársai már végeztek stresszélettani vizsgálatokat, így a genotípusokra nézve bizonyos releváns adatok már hozzáférhetőek voltak (Gallé et al., 2009; Guóth et al., 2009). A publikált adatok különbségeket mutattak a toleráns és érzékeny fajták szemterméseiben az ABA termelődés dinamikáját tekintve. A fajták ABA érzékenységére nézve azonban eddig nem voltak ismereteink. Az általunk feltárt, itt mutatkozó különbségek hozzájárulhatnak a feltehetően részben ABA közvetítette stresszválaszok fajták közötti eltéréseinek magyarázatához.

Eredményeink szerint tehát a'Cappelle Desprez' fajta gyenge aszálytűréséhez vékony kutikulája, míg a 'GK Élet' szenzitivitásához az ABA érzéketlenség járulhat hozzá. Természetesen következtetéseinket kis számú fajta vizsgálatából vontuk le, az

összefüggéseket a továbbiakban nagyobb fajtaszámon kell igazolni. Összességében vizsgálataink megerősítik, 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 bélyeget tártunk fel, amelyeknek nagy valószínűséggel jelentőségük van a stressztűrés folyamataiban, és hozzájárulnak a tolerancia tapasztalt különbségeihez.

6.12 A kutikula fejlődését szabályozó búza *TaeSHN1* transzkripciós faktor funkcionális azonosítása

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 fehérje szekvenciával a tBLASTn program segítségével az NCBI adatbázis búza EST-i között keresve a Ta31753 és Ta44806 búza Unigene-ek tagjait találtuk leginkább hasonlónak. A Ta31753 EST csoport tagjai a virágzatban, a szárban és a magban a Ta44806 Unigene a virágzatban és a magban voltak megtalálhatóak. A Ta44806 Unigene szekvenciákkal a Triticeae Full-Length CDS DataBase adatbázisban (Mochida et al., 2009) a tplb0011g14 gént azonosítottuk, amely egy 227 aminosav hosszú feltételezett fehérjét kódol. Ez 58.1%-ban azonos az *Arabidopsis* WIN/SHN1 (Aharoni et al., 2004, Broun et al., 2004), illetve 72.8% ban az ezzel a lúdfű fehérjével ortológ OsWR1 rizs transzkripciós faktorokkal (Wang et al., 2012) (**43. ábra**). A rizs polipeptidhez való nagyobb hasonlóság különösen a "C terminális motívum"-ban nyilvánvaló.

AP2 domain		
AthSHN1 TaeSHN1 OsSHN1	<pre> MVQT-KKFRGVRQRHWGSWVAEIRHPLLKRRIWLGTFETAEEAARAYDEAAVLMSGRNAKTNFPLNNNNTGET-SEGKTD MVQSKKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLLKRRVWLGTFETAEEAARAYDEAAILMSGRNAKTNFPVPRSANGEIIVAPAVA MVQFKKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLLKRRVWLGTFETAEEAARAYDEAAVLMSGRNAKTNFPVQRNSTGDLATAAD </pre>	
"middle motif"		
AthSHN1 TaeSHN1 OsSHN1	ISASSTMSSSTSSSSLSSILSAKLRKCCKSPSPSLTCLRLDTASSHIGVWQKRAGSKSDSSWVMTVELGPASSSQE RDGRGGVGSSSSGAAGASSLSQILSAKLRKCCKTPSPSLTCLRLDTEKSHIGVWQKRAGARADSSWVMTVELNKEPATAA QDARSNGGSRNSSAGNLSQILSAKLRKCCKAPSPSLTCLRLDPEKSHIGVWQKRAGARADSNWVMTVELNKEVEPTE	
"C terminal motif"		
AthSHN1 TaeSHN1 OsSHN1	TTSKASQDAILAPTTEVEIGGSREEVLDEEEKVALQMIEELLNTN AAPTPSDSTVSATPCSSTSTSTGSPPEAMEDEERIALQMIEELLSRSSPASPSHGLLHGEEGSLVI PAAQPTSTATASQVTMDDEEKIALQMIEELLSRSSPASPSHGEGE-GSFVI	

43. ábra: Lúdfű, búza és rizs WIN/SHN homológ fehérjék szekvencia összehasonlítása (Jäger et al *in press* 2014b). Az azonos aminosavakat kövér betűtípus jelzi, az AP2 domén és a feltételezett további motívumok kiterjedését nyilak mutatják. AthSHN1: *Arabidopsis*, TaeSHN1: búza, OsSHN1: rizs fehérje szekvenciák

Alkalmas primereket terveztünk a tplb0011g14 ORF szekvencia felszaporítására, amelyet a továbbiakban *TaeSHN1*-nek nevezünk. Kifejlett búza növény szerveiből (gyökér, szár, levél lemez, virágzat) RNS-t tisztítottunk, cDNS-t szintetizáltunk, és *TaeSHN1* specifikus RT-PCR reakciót végeztünk. A gén kifejeződését a vizsgált minták közül csak a virágzatban találtuk meg (nem bemutatott eredmények), ami megerősítette, hogy az *Arabidopsis* WIN/SHN1 ortológját azonosíthattuk, amely szintén erős kifejeződést mutat a virágzatban. Feltételeztük, hogy a gén a kutikula képződésében játszik szerepet, ezért megvizsgáltuk kifejeződését 4 búza genotípus 3. levél hüvely által takart régióiban, ahol a kutikula bioszintézise zajlik. Itt mind a négy vizsgált búzafajta esetében a gén kifejeződését tapasztaltuk, míg a levél lemez középi régiókban a *TaeSHN1* mRNS jelenlétét jelző RT-PCR termék nem jelent meg (Jäger et al *in press* 2014b) (**44. ábra**).



44. ábra: A *TaeSHN1* gén kifejeződésének kimutatása szekvencia specifikus RT-PCR-el búzafajták 3. levelének tövi régiójában. *Ta2776*: cDNS templát mennyiség kontroll

A 'Cappelle Desprez' fajta levélalapjából nyert RT-PCR terméket klónoztuk, és 8 független klón szekvenciáját meghatároztuk. Egy klón tökéletesen megegyezett a tplb0011g14 szekvenciával, a többiben néhány nukleotidot érintő egyedi szekvencia variációkat találtunk. A variánsok száma nagyobb volt mint 6, azaz biztosan nem egy génből származó búza ESTket klónoztunk. A nagymértékű hasonlóság alapján az EST-ket három csoportba sorolhattuk, amelyek feltehetően három gén alléljeit tartalmazták (nem bemutatott eredmények). A búza esetében így valószínűsíthető, hogy a TaeSHN1 génhez nagyban hasonlító kis géncsalád működik, a lúdfű WIN/SHN génekhez hasonlóan. A TaeSHN1 gén(család) levélalapi kifejeződése arra utal, hogy szerepe lehet a kutikula képződés folyamataiban. A WIN/SHN1 transzkripciós faktor lúdfűben a kutin bioszintézist irányítja (Kannangara et al, 2007), ami eredményeink szerint a búza TaeSHN1 génre is igaz lehet. A gén kifejeződését ugyanis szárazságstressz során sem tudtuk a vizsgált 4 búza genotípus zászlósleveleinek középi régióiban kimutatni (nem bemutatott eredmények). A vízhiány hatására bekövetkező viasz bioszintézisben tehát nem tulajdoníthatunk a *TaeSHN1* génnek szerepet. Ezek az eredmények azonban nem mondanak ellent a gén javasolt funkciójának, hiszen a fentebb leírtak szerint a kutinmátrix vastagodása nem része a kifejlett búzanövény szárazságstresszre adott válaszának.

Hogy a *TaeSHN1* gén funkciójára nézve közvetlenebb bizonyítékot kapjunk, teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját növényi expressziós vektorba klónoztuk át, és *Arabidopsis* növénybe transzformáltuk. Nyolc transzgénikus növényvonalból hét a WIN/SHN transzkripciós faktor túltermelésére jellemző csillogó levélfelszínt mutatta (Jäger et al in press 2014b) (**45. ábra**).



45. ábra: A búza *TaeSHN1* gént kifejező *Arabidopsis* növények szabad szemmel látható fenotípusa. Col – *TaeSHN1*: búza 35S-*TaeSHN1* gént hordozó transzgénikus lúdfű vonal, Col-0: *Arabidopsis thaliana* vad típus

A *TaeSHN1*-t túltermelő növényvonalak egy része egyéb morfológiai változásokat is mutatott, pl a levelek görbült növekedése, törpülés volt megfigyelhető. Egy enyhe fenotípusú vonalat, amely csak a csillogó levélfelszínben különbözött a vad típustól (Col-*TaSHN1*-4/2) a levél kutikula mikromorfológia szintjén is jellemeztük (**46. ábra**).



46. ábra: Vad típusú (A) és *TaeSHN1* túltermelő Col-*TaSHN1*-4/2 (B) *Arabidopsis* levél kutikula transzmissziós elektron mikroszkópos felvételei. C: kutikula, CW: sejtfal, A fekete vonal 200 nm-t jelöl

A *TaeSHN1* transzgénre homozigóta 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 matrix ultrastruktúrájának rendezetlensége ellentétben áll a lúdfű saját WIN/SHN1 génjének túltermelésekor leírtakkal, ahol a kutikula alkotók proliferációja szintén megvastagodott de rendezett struktúrát eredményezett (Broun et al 2004). A levelek felszínét SEM módszerrel is megvizsgáltuk mind a színi mind a fonáki oldalakon. A vad típus aránylag sima, hullámos felszíne helyett a transzgénikus növényeknél a felületen mikrokristályok jelentek meg, amit a viaszok túltermelésére utaló jelként értelmeztünk (**47. ábra**).

dc_741_13



47. ábra: SEM felvételek a vad típusú (A,C) és Col-*TaSHN1*-4/2 (B,D) növények abaxiális (A,B) és adaxiális (C,D) levélfelszínéről. A vad típusú leveleken nincsenek, míg a Col-*TaSHN1*-4/2 leveleken megfigyelhetők viaszkristályok. A fekete vonal 5 μm-t jelöl.

A Col-*TaSHN1*-4/2 lúdfű vonal levél kutikulájának permeábilitását 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 in press 2014b) (**48. ábra**).



48. ábra: Vízvesztés sötét adaptált vad típusú és Col-*TaSHN1*-4/2 növények rozettáiból. A transzgénikus növények gyorsabban veszítik el nedvesség tartalmukat.

A kutikula permeábilitását két további módszerrel is vizsgáltuk. A klorofill kioldás (**49. ábra**) és a Toluidin Kék festődés vizsgálatok (**50. ábra**) eredményei megerősítették a kutikula jobb árjárhatóságát.



49. ábra: Klorofill kioldás vad típusú és Col-*TaSHN1*-4/2 növények rozettáiból. A transzgénikus növények gyorsabban veszítik el klorofill tartalmukat a vad típusú növényeknél.



50. ábra: Toluidin Kék festés Col-*TaSHN1*-4/2 (A) és vad típusú (B) növények levelein. A transzgénikus levelek intenzívebben festődnek a vad típusú leveleknél.

A *TaSHN1* túltermelő növények vízgazdálkodásának jellemzése céljából azok szárazságtűrését is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint a Col-*TaSHN1*-4/2 növények nem

lettek ellenállóbbak a vízhiánnyal szemben (**51. ábra**), a transzgén nem okozta a szárazságtűrés javulását. Egy hosszabb (17 napos) szárítási periódus utáni újraöntözést követően sem mutattak jobb eredményt a Col-*TaSHN1*-4/2 növények. Mindezeket a kísérleteket egy további (erősebb fenotípusú) *TaSHN1* túltermelő vonallal is megismételtük, hasonló eredménnyel (nem bemutatott kísérletek).



51. ábra: Col-TaSHN1-4/2 és vad típusú lúdfű növények 9 napos vízmegvonás után. A növények szárazságtűrésében nem mutatkozott észrevehető különbség.

Eredményeinket összevetve a lúdfű saját *WIN/SHN1* génjét expresszáló növények fenotípusával (Broun et al 2004) azt találjuk, hogy a kutikula ultrastuktúrák különbsége ellenére a réteg permeábilitása mindkét esetben megnőtt. Ez a lúdfű saját gén esetében a szárazságtűrés növekedéséhez vezetett, amit azonban a búza gén esetében nem tapasztaltunk. Ebből az következik, hogy a szárazságtolerancia javulása a lúdfű gén esetében egy, a kutikula vízre vonatkozó permeábilitásától eltérő tényező változásának a következménye. Yang et al (2011) feltételezik, hogy ez a tényező a sztómasűrűség lehet, ami a lúdfű *WIN/SHN1* gén túltermelése esetén jelentősen lecsökkent. Mi a sztómaszám kismértékű csökkenését tapasztaltuk (Jäger et al in press 2014b), ami nem mond ellent a fenti hipotézisnek.

Összességében olyan búza szekvenciákat azonosítottunk, amelyek feltételezhetően egy kis géncsalád tagjaiként fejeződnek ki a búza levélalapi régiójában, a kutikula képződésének helyén. Egy szekvencia esetében (*TaeSHN1* gén) bizonyítottuk, hogy 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.

6.13 Kitekintés és az eredmények hasznosíthatósága

A dolgozatban összefoglalt eredmények továbbvitelének az alapkutatások szempontjából fontos iránya lehet a kutikula fejlődés és az RNS szabályozás közötti kapcsolat további feltárása. Ez több módon is megvalósulhat, amire elsősorban lúdfű modellnövény rendszerben látok lehetőséget. Ígéretesnek tűnik például a *cbp20* mutáns CER7/CER3 szabályozási mechanizmusának esetleges változásait megvizsgálni. A további lehetőségek között van a *cbp20* és egyes kutikula mutánsok episztatikus viszonyainak felmérése is.

A kutatások folytatásának a kertészeti biotechnológia és agrártudományok szempontjából lényeges vonatkozásai hasonlóképpen gyümölcsözőek lehetnek. A *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 hasznosítható mértékű szárazságtűrés kialakulásához, más haszonnövényekben erre lehet még esély (Papp et al 2003a).

Haszonnövényekben szeretnénk továbbá folytatni megkezdett munkánkat a kutikula bioszintézist befolyásoló gének funkcionális azonosítása érdekében. E cél felé eddig alma esetében közelítettünk a legjobban, ahol a bemutatott vizsgálatokban azonosított gének egyikét (*MdLACERATA1*) sikeresen klónoztuk, és kifejeztük *Arabidopsis thaliana*-ban.

Az alma és búza növényekre vonatkozó kutatási eredmények közül több a gyakorlatban is hasznosítható. 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 képezik. 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 mutatott 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 nemesítésében nyújt segítséget a kutikula vastagság, mint levélfelszíni morfológiai bélyegek feltárt összefüggése a szárazságtűréssel. A kedvező tulajdonságokhoz kapcsolódó bélyegek a jó stressztűrést valószínűsítő indikátorok lehetnek. Búza nemesítési vonalak jellemzésére alkalmas módszerként értékeljük az ABA érzékenységet becslő gyökér növekedés gátlási tesztet, amely csíranövényeken végezhető, gyors, valamint kevéssé eszköz és anyagigényes. Az itt bemutatott bélyegek és kísérleti módszerek segítségével a szárazságtűrés komplex fenotípusának természetesen csak egy-egy meghatározója becsülhető, abban jónéhány további faktor szerepe biztosan megjósolható.

A kutikula vizsgálatai a növénytermesztés számára más okokból is fontosak. A hajtásra kihordott növényvédő szerek, lombtrágyák, növény kondícionáló készítmények döntően a kutikulán keresztül szívódnak fel. Ilyen irányú, permeábilitással kapcsolatos kísérletek Tanszékünkön már szintén megkezdődtek.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A dohány 271/H2 transzkripciós 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 transzkripciós 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 stressztűrésű 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 bőrszövete 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 (*era1*) esetében is kimutattuk, hogy a csökkentett párologtatással járó szárazságtűrő fenotípus fokozottabban párologató növények szomszédságában, azokkal vízért való versengés esetén nem jelenik meg.

7. A *cbp20* mutáns csökkentett gázcseréje 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 modellnövénnyel 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 *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 permeábilitás növekedésével járt együtt. Összességében kifejeződési mintázata és a transzgénikus lúdfű fenotípusa alapján funkcionálisan azonosítottuk a *TaeSHN1* gént, mint a kutikula képződését befolyásoló búza transzkripciós faktort. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a *WIN/SHN* génekhez köthető funkciókat búzában egy a *TaeSHN1*-hez nagy hasonlóságot mutató géncsalád látja el.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm Dr. Pongor Sándornak, hogy a kutatói pályám elindításában segítséget nyújtott. Köszönettel tartozom Dr. Orosz Lászlónak, akinek tudományos műhelyében kezdő kutatóként rendkívül sok hasznos tapasztalatot szereztem. Sok segítséget kaptam ebben az időben Dr. Dorgai Lászlótól és Dr. Dallman Gézától, akiknek ezt ezúton is köszönöm. Köszönöm továbbá Dr. Marjori és Antonius Matzke-nek hogy laboratóriumukban dolgozhattam, oda pályám során többször is visszatérhettem. Köszönöm Dr. Koncz Csabának, hogy lehetőséget adott rá, hogy a Max Planck Intézetben széles körű ismereteket szerezzek a modern növénybiológiai kutatásokról, továbbá azt is, hogy rendelkezésemre bocsátotta értékes mutáns gyűjteményét. Köszönet illeti Dr. Luis Mur-t, aki nélkül a mutáns gyűjtemény screen-elése nem történhetett volna meg. Köszönöm Dr. Balázs Ervinnek, Dr. Nagy Ferencnek, Dr. Hornok Lászlónak, Dr. Dallman Gézának és Dr. Nagy Istvánnak hogy pályám külföldi szakaszai után befogadtak a Gödöllői Intézetbe illetve csoportjukba, így lehetőséget adtak hogy idehaza is folytathassam tudományos munkámat. Köszönettel tartozom Dr. Lukács Noéminek, hogy Tanszéke oktatójaként lehetőségem nyílt a Budapesti Corvinus Egyetemen a munka továbbvitelére. Szeretném megköszönni számos volt és jelenlegi munkatársamnak folyamatos támogatásukat és segítségüket, ami nélkül a doktori dolgozat alapjául szolgáló eredmények nem jöhettek volna létre. Külön is köszönöm mindezt Dr. Barnabás Beátának, Dr. Dudits Dénesnek, Dr. Galiba Gábornak, Dr. Janda Tibornak, Dr. Jäger Katalinnak, Dr. Tóth Magdolnának és Dr. Sárdi Évának. Végül köszönöm családom kitartó és áldozatkész támogatását.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1 Az értekezés alapjául szolgáló 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 Cs, 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, <u>Papp I</u> 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, <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u> 2008 Investigation of the regulation of the *CBP20* gene in *Arabidopsis*. Acta Biologica Szegediensis 52(1):153-154.
- Deák C, Jäger K, Fábián 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, Fábián A, <u>Papp I</u> 2010 Low and high ψ ways from post-transcriptional RNA regulation to drought tolerance. Plant Signal Behav. 5(12):1549-52.

- Jäger K, Fábián A, Eitel G, Szabó L, Deák Cs, Barnabás B, Papp I 2014a A morphophysiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. Journal of Plant Physiology 171:1256–1266.
- Jäger K, Fábián 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, Fábián 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 tudománymetriai 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.

9.2 Egyéb idézett közlemények

- Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A 1995 Molecular characterization of the *CER1* 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.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990 "Basic local alignment search tool." J Mol Biol 215:403-410.
- Armas C, Pugnaire FI 2011 Plant neighbour identity matters to belowground interactions under controlled conditions. PLoS One 6(11):e27791.
- Asif M, Trivedi P, Solomos T, Tucker M 2006 Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. J Agric. Food Chem. 54:5227-5229.
- Au PC, Zhu QH, Dennis ES, Wang MB 2011 Long non-coding RNA-mediated mechanisms independent of the RNAi pathway in animals and plants. RNA Biol. 8(3):404-14.
- 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.
- Bargel H, Neinhuis C 2005 Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. J Exp Bot. 56(413):1049-60.
- Barth C, Conklin PL 2003 The lower cell density of leaf parenchyma in the *Arabidopsis thaliana* mutant *lcd1-1* is associated with increased sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae*. Plant J. 35(2):206-18.
- Bauer S, Schulte E, Thier H-P 2005 Composition of the surface waxes from bell pepper and eggplant. European Food Research and Technology 220(1):5-10.
- Béclin C, Boutet S, Waterhouse P, Vaucheret H 2002 A branched pathway for transgeneinduced RNA silencing in plants. Curr Biol. 12(8):684-8.
- Bender J 2004 Chromatin-based silencing mechanisms. Curr Opin Plant Biol. 7(5):521-6.

- Bennett JA, Cahill JF Jr. 2012 Evaluating the relationship between competition and productivity within a native grassland. PLoS One 7(8):e43703.
- 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.
- Bernard A, Joubès J 2013 *Arabidopsis* cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. Prog Lipid Res. 52(1):110-29.
- 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.
- Borisjuk N, Hrmova M, Lopato S 2014 Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. Biotechn Advances 32:526-540.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK 2005 Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. Cell 123(7):1279-91.
- Bournay AS, Hedley PE, Maddison A, Waugh R, Machray GC 1996 Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. Nucleic Acids Res. 24(12):2347-51.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J 2001 Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a modell 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.
- Buchholz A 2006 Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. J Exp Bot 57(11):2501-13.
- 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.
- Buxdorf K, Rubinsky G, Barda O, Burdman S, Aharoni A, Levy M 2014 The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. Plant Mol Biol. 84:37-47.
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB 2006 Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. Plant Physiol. 140(1):176-83.
- Chaves MM 1991 Effects of water deficits on carbon assimilation. Journal of Experimental Botany 42: 1–16.
- Chekanova JA, Gregory BD, Reverdatto SV, Chen H, Kumar R, Hooker T, Yazaki J, Li P, Skiba N, Peng Q, Alonso J, Brukhin V, Grossniklaus U, Ecker JR, Belostotsky DA 2007 Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the *Arabidopsis* transcriptome. Cell. 131(7):1340-53.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD 2003 Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res 31:3497-3500.
- 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.
- Clough SJ, Bent AF 1998 Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16(6):735-43.
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE 2008 Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. Nature 452(7184):215-9.
- 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.
- Daszkowska-Golec A, Wojnar W, Rosikiewicz M, Szarejko I, Maluszynski M, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A 2013 Arabidopsis suppressor mutant of abh1 shows a new face of the already known players: ABH1 (CBP80) and ABI4-in response to ABA and abiotic stresses during seed germination. Plant Mol Biol. 81(1-2):189-209.
- Daxinger L, Hunter B, Sheikh M, Jauvion V, Gasciolli V, Vaucheret H, Matzke M, Furner I 2008 Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci. 13(1):4-6.
- Daxinger L, Kanno T, Bucher E, van der Winden J, Naumann U, Matzke AJ, Matzke M 2009 A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. EMBO J. 28(1):48-57.
- 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.
- Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL 1991 Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. The Plant Journal 1:289-302.
- Diéguez MJ, Vaucheret H, Paszkowski J, Mittelsten Scheid O 1998 Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene

silencing in plants, but it is required for its maintenance. Mol Gen Genet. 259(2):207-15.

- Djikeng A, Shi H, Tschudi C, Ullu E 2001 RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. RNA 7(11):1522-30.
- Doheny-Adams T, Hunt L, Franks PJ, Beerling DJ, Gray JE 2012 Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 367: 547-55.
- Dorlhac de Borne F, Vincentz M, Chupeau Y, Vaucheret H 1994 Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. Mol Gen Genet. 243(6):613-21.
- 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.
- Fan LM, Zhao Z, Assmann SM 2004 Guard cells: a dynamic signaling model. Curr Opin Plant Biol. 7(5):537-46.
- Fedoroff NV 2002 RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? Curr Opin Plant Biol. 5(5):452-9.
- Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM 2003 Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila. Curr Biol. 13(3):236-40.
- 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.

- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL 1992 A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci USA. 89(5):1827-31.
- 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.
- Geraldo N, Bäurle I, Kidou S, Hu X, Dean C 2009 FRIGIDA delays flowering in *Arabidopsis* via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear capbinding complex. Plant Physiol. 150(3):1611-8.
- 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.
- Greenberg MV, Ausin I, Chan SW, Cokus SJ, Cuperus JT, Feng S, Law JA, Chu C, Pellegrini M, Carrington JC, Jacobsen SE 2011 Identification of genes required for de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. Epigenetics 6(3):344-54.
- Gregory BD, O'Malley RC, Lister R, Urich MA, Tonti-Filippini J, Chen H, Millar AH, Ecker JR 2008 A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* development. Dev Cell 14(6):854-66.
- 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.

- He X, Liu RH 2007 Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. J Agric Food Chem. 55(11):4366-70.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM 2000 pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Mol Biol. 42(6):819-32.
- Henderson IR, Jacobsen SE 2008 Tandem repeats upstream of the Arabidopsis endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. Genes Dev. 22(12):1597-606.
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC 2005 RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. Science. 308(5718):118-20.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA 1983 A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature 303:179-180.
- 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.
- Hoth S, Ikeda Y, Morgante M, Wang X, Zuo J, Hanafey MK, Gaasterland T, Tingey SV, Chua NH 2003 Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 554:373-380.
- Hu X, Zhang Z, Li W, Fu Z, Zhang S, Xu P 2009 cDNA cloning and expression analysis of a putative decarbonylase TaCer1 from wheat (*Triticum aestivum* L.) Acta Physiologiae Plantarum 31:1111–1118.
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M 2007 RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. Biochim Biophys Acta 1769(5-6):358-74.
- 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.
- Ingelbrecht I, Van Houdt H, Van Montagu M, Depicker A 1994 Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. Proc Natl Acad Sci USA. 91(22):10502-6.
- Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JK 2009 Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. Plant J. 60(2):363-77.
- Izaurralde 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.
- Janssen BJ, Thodey K, Schaffer RJ, Alba R, Balakrishnan L, Bishop R, Bowen JH, Crowhurst RN, Gleave AP, Ledger S, McArtney S, Pichler FB, Snowden KC, Ward S 2008 Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. BMC Plant Biol. 8:16. doi: 10.1186/1471-2229-8-16.
- 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.
- Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA 1995 Leaf Epicuticular Waxes of the Eceriferum Mutants in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 108(1):369-377.
- Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, AL 2006 Composition of plant cuticular waxes. In Biology of the plant cuticle (eds. M. Riederer and C. Müller) Blackwell Publ. pp. 145-181.

- Johnson DA, Richards RA, Turner NC 1983 Yield, water relations, gas exchange, and surface reflectances of near-isogenic wheat lines differing in glaucousness. Crop Science 23(2):318-325.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP 2004 Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol Cell. 14(6):787-99.
- 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.
- Kanno T, Mette MF, Kreil DP, Aufsatz W, Matzke M, Matzke AJ 2004 Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. Curr Biol. 14(9):801-5.
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J 2004 Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 38(5):823-39.
- 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.
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J 2012 Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochim Biophys Acta 1819(2):137-48.
- Kierzkowski D, Kmieciak M, Piontek P, Wojtaszek P, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A 2009 The *Arabidopsis* CBP20 targets the cap-binding complex to the nucleus, and is stabilized by CBP80. Plant J. 59(5):814-25.
- Kim H, Lee SB, Kim HJ, Min MK, Hwang I, Suh MC 2012 Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 2012 53(8):1391-403.
- Kim KS, Park SH, Kim DK, Jenks MA 2007 Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). International Journal of Plant Sciences 168(3):307-316.

- 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.
- Kimbara, J., Yoshida, M., Ito, H., Hosoi, K., Kusano, M., Kobayashi, M., Ariizumi, T.,
 Asamizu, E., Ezura, H 2012 A novel class of sticky peel and light green mutations causes cuticle deficiency in leaves and fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*). Planta 236: 1559–1570.
- Kmieciak M, Simpson CG, Lewandowska D, Brown JWS, Jarmolowski A 2002 Cloning and characterization of two subunits of *Arabidopsis thaliana* nuclear cap-binding complex. Gene 283:171-183.
- Koncz C, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Reiss B, Redei GP, Schell J 1990 Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 9(5):1337-46.
- Koncz C, Schell J 1986 The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Molecular & General Genetics 204: 383–396.
- Kong J, Gong JM, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY 2003 A new AOX homologous gene OsIM1 from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress. Theor Appl Genet. 107(2):326-31.
- 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, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI 2006 The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. Plant Physiol. 140(1):127-39.
- 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.

- Kunst L, Samuels AL 2003 Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Progress in lipid research 42(1):51-80.
- Kunst L, Samuels AL 2009 Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. Curr Opin Plant Biol. 12(6):721-7.
- Kurahashi Y, Terashima A, Takumi S 2009 Variation in dehydration tolerance, ABA sensitivity and related gene expression patterns in D-genome progenitor and synthetic hexaploid wheat lines. Int J Mol Sci. 10(6):2733-51.
- 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.
- 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, Rätsch 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.
- Lawlor DW 2002 Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. Ann Bot. 89 Spec No:871-85.
- Lee YP, Yu GH, Seo YS, Han SE, Choi YO, Kim D, Mok IG, Kim WT, Sung SK 2007 Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. Plant Cell Rep. 26(7):917-26.
- Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, Riederer M, Vogg G 2007 The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a beta-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). Plant Physiol. 144(3):1667-79.
- 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.
- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK 2008 The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. Plant Cell 20(8):2238-51.

- 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 stressregulated 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.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC 2007 Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. Plant J. 52(1):133-46.
- 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.
- López-Casado G, Matas AJ, Domínguez E, Cuartero J, Heredia A 2007 Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. J Exp Bot 58(14):3875-83.
- Lózsa 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.
- Lu C and Fedoroff N 2000 A mutation in the Arabidopsis *HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to adscisic acid, auxin, and cytokinin. The Plant Cell 12:2351-2365.
- Lu S, Sun YH, Chiang VL 2008 Stress-responsive microRNAs in *Populus*. Plant J. 55(1):131-51.
- Luff B, Pawlowski L, Bender J 1999 An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. Mol Cell. 3(4):505-11.
- Machida S, Chen HY, Adam Yuan Y 2011 Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. Nucleic Acids Res. 39(17):7828-36.
- Mahfouz MM 2010 RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions. Plant Signal Behav. 5(7):806-16.

- Marrs KA, Walbot V 1997 Expression and RNA splicing of the maize glutathione Stransferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. Plant Physiol. 113(1):93-102.
- Martin LB, Rose JK 2014 There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. J Exp Bot. 65(16):4639-4651.
- Maseda PH, Fernández RJ 2006 Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. J Exp Bot. 57(15):3963-77.
- Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, Ruperti B, Di Fonzo N, Stanca AM, Cattivelli L 2005 Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. Planta 221(5):705-15.
- Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adato A, Aharoni A, Stark R, Fernie AR, Fei Z, Giovannoni JJ, Rose JK 2011 Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. Plant Cell. 23(11):3893-910.
- 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 M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ 2009 RNA-mediated chromatinbased silencing in plants. Curr Opin Cell Biol. 21(3):367-76.
- Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM 2001 RNA: guiding gene silencing. Science 293(5532):1080-3.
- Matzke MA, Matzke AJ 1995 How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? Plant Physiol. 107(3):679-685.
- Matzke MA, Matzke AJ, Pruss GJ, Vance VB 2001 RNA-based silencing strategies in plants. Curr Opin Genet Dev. 11(2):221-7.

- 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.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ 2000 Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J. 19(19):5194-201.
- Mette MF, Kanno T, Aufsatz W, Jakowitsch J, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ 2002 Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. EMBO J. 21(3):461-9.
- Mette MF, Matzke AJ, Matzke MA 2001 Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. Curr Biol. 11(14):1119-23.
- Mette MF, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ 1999 Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters *in trans*. EMBO J. 4;18(1):241-8.
- Meyer P, Niedenhof I, ten Lohuis M 1994 Evidence for cytosine methylation of nonsymmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. EMBO J. 13(9):2084-8.
- Mlotshwa S, Pruss GJ, Gao Z, Mgutshini NL, Li J, Chen X, Bowman LH, Vance V 2010 Transcriptional silencing induced by *Arabidopsis* T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. Plant J. 64(4):699-704.

- 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.
- Molnár I, Gáspár L, Sárvári É, Dulai S, Hoffmann B, Molnár-Láng M, Galiba G 2004 Physiological and morpho¬logical responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. Funct Plant Biol. 31:1149-1159.
- Montgomery TA, Carrington JC 2008 Splicing and dicing with a SERRATEd edge. Proc Natl Acad Sci USA. 105(25):8489-90.
- Morel JB, Mourrain P, Béclin C, Vaucheret H 2000 DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. Curr Biol. 10(24):1591-1594.
- Mourrain P, van Blokland R, Kooter JM, Vaucheret H 2007 A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. Planta 225(2):365-79.
- 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.
- Palusa SG, Ali GS, Reddy AS 2007 Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. Plant J. 49(6):1091-107.
- Pandey S, Assmann SM 2004 The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. Plant Cell 16(6):1616-32.
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Höfer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A 2007 The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. Plant Physiol. 145(4):1345-60.
- Pardo JM 2010 Biotechnology of water and salinity stress tolerance. Curr Opin Biotechnol. 21(2):185-96.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X 2002 CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Curr Biol. 12(17):1484-95.
- Parker JE, Holub EB, Frost LN, Falk A, Gunn ND, Daniels MJ 1996 Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to Peronospora parasitica specified by several different RPP genes. Plant Cell 8(11):2033-46.
- Paszkowski J, Whitham SA 2001 Gene silencing and DNA methylation processes. Curr Opin Plant Biol. 4(2):123-9.
- Pei ZM, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI 1998 Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. Science 282(5387):287-90.
- Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzesłowska M, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z 2013 Down-regulation of *CBP80* gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. Plant Biotechnol J. 11(4):459-69.
- Pietrzak M, Shillito RD, Hohn T, Potrykus I 1986 Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acids Res. 14(14):5857-68.
- Pikaard CS 2006 Cell biology of the Arabidopsis nuclear siRNA pathway for RNA-directed chromatin modification. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71:473-80.
- 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.
- Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ 2003 Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. Plant Physiology 132:1998-2011.
- Rawson HM, Clarke JM 1988 Nocturnal transpiration in wheat. Functional Plant Biology 15(3):397-406.

- Reddy AS 2007 Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. Annu Rev Plant Biol. 58:267-94.
- 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.
- Reyes JL, Chua NH 2007 ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. Plant J. 49(4):592-606.
- 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.
- Saad AS, Li X, Li HP, Huang T, Gao CS, Guo MW, Cheng W, Zhao GY, Liao YC 2013 A rice stress-responsive *NAC* gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. Plant Sci. 203-204:33-40.
- Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M 2012 Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. Plant Signal Behav. 7(7):767-70.
- Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, Jenks MA, Goodwin SM, Niklas KJ, Xiaolin R, Labavitch JM, Shackel KA, Fernie AR, Lytovchenko A, O'Neill MA, Watkins CB, Rose JK 2007 A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. Plant Physiol. 144(2):1012-28.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T Eds Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Samuels L, Kunst L, Jetter R 2008 Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. Annu Rev Plant Biol. 59:683-707.

- 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.
- 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.
- Schönherr J 2006 Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. J Exp Bot. 57(11):2471-91.
- Schreiber L 2010 Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. Trends Plant Sci. 15(10):546-53.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W 1986 Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth Res. 10: 51-62.
- 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.
- Shi JX, Malitsky S, De Oliveira S, Branigan C, Franke RB, Schreiber L, Aharoni A 2011 SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. PLoS Genet. 7(5):e1001388.
- 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, Szittya 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.

- Simon SA, Meyers BC 2011 Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. Curr Opin Plant Biol. 14(2):148-55.
- Song L, Han MH, Lesicka J, Fedoroff N 2007 *Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. PNAS 104(13):5437-5442.
- Soppe WJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, Jacobsen SE, Schubert I, Fransz PF 2002 DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. EMBO J. 21(23):6549-59.
- Spurr, AR: 1969 A low viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. J Ultrastr Res. 26: 31–43.
- Steimer A, Amedeo P, Afsar K, Fransz P, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J 2000 Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. Plant Cell 12(7):1165-78.
- 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.
- Sunkar R, Zhu JK 2004 Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell 16(8):2001-19.
- Taiz L and Zeiger E (Eds) Plant Physiology (5th Edition) 2010 Publisher: Sinauer Associates
- 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.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., Machida, Y 2004 A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. Plant J. 37: 139-46.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD 2003 A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes Dev. 17(1):49-63.

- Telias A, Lin-Wang K, Stevenson DE, Cooney JM, Hellens RP, Allan AC, Hoover EE, Bradeen JM 2011 Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10. BMC Plant Biol. 11:93. doi: 10.1186/1471-2229-11-93.
- Tischner T, Kőszegi B, Veisz O 1997 Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. Acta Agronomica Hung 45:85–104.
- Vargason JM, Szittya G, Burgyán J, Hall TM 2003 Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. Cell 115(7):799-811.
- 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.
- Vaucheret, H 1993 Identification of a general silencer for 19S and 35S promoters in a transgenic tobacco plant: 90 pb of homology in the promoter sequences are sufficient for trans-inactivation. C. R. Acad. Sci. Paris, 316:1471 1483.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, et al. 2010 The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nat Genet. 42(10):833-9.
- 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.
- Voinnet O 2002 RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. Curr Opin Plant Biol. 5(5):444-51.
- 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.
- 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.

- 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.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sänger HL 1994 RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants.Cell 76(3):567-76.
- Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A 2001 Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. Proc Natl Acad Sci USA 98(17):9694-9.
- Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC 2005 Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. Development 132(16):3657-68.
- Wilson KF, Fortes P, Singh US, Ohno M, Mattaj IW, Cerione RA 1999 The nuclear capbinding complex is a novel target of growth factor receptor-coupled signal transduction. J Biol Chem. 274(7):4166-4173.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ 2007 An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS One. Aug 8;2(8):e718.
- Wise RR, Sparrow DH, Ortiz-Lopez A, Ort DR 1991 Biochemical regulation during the midday decline of photosynthesis in field-grown sunflower. Plant Science 74(1) 45–52.
- Wu G, Poethig RS 2006 Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development 133(18):3539-47.
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Galbraith D, Zhu JK 2001 Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. Dev Cell 1:771-781.

- 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.
- 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.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J 1985 Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 331:103– 119.
- 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.
- Zagotta MT, Hicks KA, Jacobs CI, Young JC, Hangarter RP, Meeks-Wagner DR 1996 The *Arabidopsis* ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. Plant J. 10(4):691-702.
- Zhang H, Zhu JK 2011 RNA-directed DNA methylation. Curr Opin Plant Biol. 14(2):142-7.
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y 2009 Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. BMC Mol Biol. 8;10:29.

dc_741_13

9.3. Egyéb saját szakcikkek:

- 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, <u>Papp I</u> 2012 Epidermal and exodermal tissue structures are characteristic for the long shelf-life 'Kárpia' pepper cultivar. Acta Alimentaria Vol 41 (Suppl.):1–11.
- Compel P, <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u>, Fekete C, Hornok L 1997 Characterization of dsRNA elements in *Fusarium poae*.
 Cereal Res. Communications 25 (3):265-266.
- Dorgai L, <u>Papp I</u>, 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 occurence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*.
 FEMS Microbiology Letters 131:295-299.
- Iglesias VA, Moscone EA, <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u>, Matzke AJM 2001 Ion transporters in the nucleus? Plant Physiology 127: 10-13.
- Matzke M, Weiger TM, <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u>, 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.
- <u>Papp I</u>, 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.
- <u>Papp I</u>, 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, <u>Papp I</u>, 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.