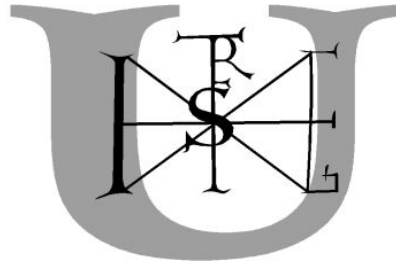


**Doktori (PhD) értekezés**

**Bózváriné Juhász Zsófia Mária**

**Gödöllő**

**2014**



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**Genetikailag módosított burgonyavonalak metabolit analízise és  
szárazságtűrő képességének vizsgálata**

Doktori értekezés

**Bózváriné Juhász Zsófia Mária**

**Gödöllő**

**2014**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola

**vezetője:** Dr. Helyes Lajos  
egyetemi tanár,  
Szent István Egyetem,  
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,  
Kertészeti Technológiai Intézet

**tudományterület:** 4. Agrártudományok

**tudományága:** 4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**Témavezető:** Dr. Bánfalvi Zsófia  
tudományos tanácsadó, az MTA doktora  
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ  
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>4</b>
<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>9</b>
1.1.A burgonya eredete, termesztése Magyarországon, beltartalmi értékei .....	9
1.2.A szárazság hatása a növényekre .....	11
1.3.A szárazság hatása a burgonyára .....	14
1.4.A szárazságtűrés növelésének módszerei .....	17
1.4.1. Ozmoregulációban szerepet játszó gének .....	20
1.4.2. Oxidatív károsodást enyhítő gének .....	21
1.4.3. Transzkripció/hormonális szabályozásban és jelátvitelben szerepet játszó gének .....	21
1.4.4. RNS chaperon .....	23
1.5.A szárazságtűrés növelésének módszerei burgonyában .....	24
1.5.1. Szárazságtűrés javítása szárazság stressz szabályozásban részt vevő génekkel .....	25
1.5.2. Szárazságtűrés javítása ozmolitok szintézisében szerepet játszó génekkel ....	26
1.5.2.1.A prolin és glicin-betain szerepe az abiotikus stresszválaszban .....	26
1.5.2.2.A trehalóz szerepe az abiotikus stresszválaszban .....	26
1.6.A „priming” jelensége növényekben .....	30
1.6.1. A <i>PRLIP</i> géncsalád .....	31
1.6.2. „Priming” kísérletek burgonyában .....	32
<b>ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>36</b>
1.7.Anyagok .....	36
1.7.1. Enzimek és vegyszerek .....	36
1.7.2. Növények és baktériumok.....	36
1.7.3. Plazmidok és primerek.....	37
1.7.4. Táptalajok.....	38
1.8.Módszerek .....	38

1.8.1. Molekuláris biológiai módszerek .....	38
1.8.1.1. Standard molekuláris biológiai technikák .....	38
1.8.1.2. Nukleinsav izolálás burgonyából .....	40
1.8.1.3. Burgonya szövettényésztés .....	41
1.8.1.4. Transzgenikus növények előállítása.....	41
1.8.2. Analitikai módszerek .....	42
1.8.2.1. Kis molekulásúlyú, poláros vegyületek meghatározása.....	42
1.8.2.2. Trehalóz-6-foszfát (T6P) tartalom meghatározása.....	43
1.8.2.3. Keményítő meghatározás .....	44
1.8.2.4. Összfehérje meghatározás .....	44
1.8.2.5. Szárazanyag tartalom meghatározás .....	44
1.8.3. Szárazságtűrő képesség meghatározása .....	45
1.8.3.1. Szárazság stressz üvegházi körülmények között.....	45
1.8.3.2. Sztómakonduktancia mérés.....	45
1.8.3.3. Burgonya levelek relatív víztartalmának (RWC) meghatározása .....	45
1.8.3.4. A növények fenotipizálása .....	46
1.8.4. Számítógépes programok használata .....	46
1.8.4.1. Molekuláris technikákhoz .....	46
1.8.4.2. Analitikai technikákhoz.....	46
<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>47</b>
1.9. A <i>TPSI</i> transzgenikus burgonya vonalak összfehérje, keményítő és metabolit analízise .....	47
1.9.1. Levélanalízis.....	47
1.9.2. Gumóanalízis.....	51
1.10. <i>PRLIP2</i> gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak előállítása és jellemzése.....	58
1.10.1. <i>PRLIP2</i> gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak előállítása .....	58
1.10.2. <i>PRLIP2</i> gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak jellemzése.....	62
<b>KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>70</b>
1.11. A <i>TPSI</i> expresszió hatása a burgonyára .....	70
1.11.1. A szárazság stressz nem teljesen egyformán befolyásolja a vad típusú és a <i>TPSI</i> gént expresszáló T1 és T2 transzgenikus növények leveleinek metabolit tartalmát.....	70

1.11.2. A szárazság stressz nem teljesen egyformán befolyásolja a vad típusú és a <i>TPSI</i> gént expresszáló T1 és T2 transzgenikus növények gumóinak metabolit tartalmát.....	72
1.11.3. A tárolás szinte teljesen egyforma hatással van a vad típusú és a <i>TPSI</i> gént expresszáló T1 és T2 transzgenikus növények gumóinak metabolit tartalmára .....	73
1.11.4. A <i>TPSI</i> gén expressziója befolyásolja a növények nyugalmi állapotát és metabolit tartalmát.....	73
1.12. A <i>PRLIP2</i> expresszió hatása a burgonyára.....	74
<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>77</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>80</b>
<b>IDÉZETT IRODALOM .....</b>	<b>82</b>
<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK .....</b>	<b>99</b>
<b>MELLÉKLETEK.....</b>	<b>102</b>
<b>KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS .....</b>	<b>105</b>

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

ABA: abszcizinsav

AP37: etilén válaszáért felelős faktor 37

AP59: etilén válaszáért felelős faktor 59

APX: aszkorbát-peroxidáz

AtGR1: *Arabidopsis* glutation-reduktáz 1

BABA:  $\beta$ -amino-vajsav

BADH: betain-aldehid-dehidrogenáz

BTH: benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav S-metilészter

CAT: kataláz

CBF1: C ismérlést kötő faktor 1

CDH: kolin-dehidrogenáz

CIM: kalluszindukáló táptalaj

CK: citokinin

codA: kolin-oxidáz

CspA: hidegsokk fehérje A

CspB: hidegsokk fehérje B

DHN4: dehidrin 4

DREB: vízvesztésre indukálódó gének promoter elemeihez kötő fehérje

DSP: kettős specificitású foszfatáz

ET: etilén

ETR1: etilén receptor 1

FFT: fruktán:fruktán-1-fruktozil-transzferáz

GABA:  $\gamma$ -amino-vajsav

GB: glicin-betain

GC-MS: gázkromatográffal összekötött tömegspektrométer

GR: glutation-reduktáz

INA: 2,6-diklór-izonikotinsav

IPT: izopentenil-transzferáz

IPTG: izopropil-tio- $\beta$ -D-galaktozid

ISR: indukált szisztémikus rezisztencia

JA: jázminsav

LEA: késői embriogenezis során felhalmozódó proteinek

LeNCED: *Lycopersicon esculentum* 9-cisz-epoxi-karotenoid

LOS5: alacsony expressziójú ozmotikusan szabályozott gén 5

MDHAR: monodehidroaszorbát-reduktáz

MEOX: metoxiamin-hidroklorid

Mn-SOD: mangán-szuperoxid-dizmutáz

MSTFA: N-metil-N-[trimetil-szilil]-trifluoro-acetamid

MtID: mannitol-1-foszfát-dehidrogenáz

MYB: mieloblasztózis onkogén

MYC: mielocitomatózis onkogén

NAC: növény-specifikus transzkripció faktor család

NO: nitrogén-monoxid

OD: optikai denzitás

OR: ozmotikus stresszválaszért felelős gén

otsA: *Escherchia coli* trehalóz-foszfát-szintáz

otsB: *Escherchia coli* trehalóz-foszfát-foszfátáz

P5CS: pirrolin-5-karboxilát-szintáz

PCD: programozott sejthalál

PCR: polimeráz láncreakció

PEG: polietilén-glikol

POCI: Potato Oligo Chip Initiative

POD: peroxidáz

PR: patogenezishez köthető fehérje



PRLIP: patogenezishez köthető lipáz

RAB: ABA válaszáért felelős fehérje

ROB5: hidegre indukálódó transzkripciós faktor 5

ROS: reaktív oxigéngyökök

RT-PCR: reverz transzkriptáz PCR

Rubisco: ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz

RWC: relatív víztartalom

SA: szalicilsav

SAR: szisztémikusan szerzett rezisztencia

SIM: hajtásindukáló táptalaj

SIM: szelektív iondetektálás

SNAC1: stressz válaszáért felelős NAC1 transzkripciós faktor

SNO: S-nitrozotiol

SNOG: S-nitrozilált glutation

SNOGR: S-nitrozilált glutation-reduktáz

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SOD3:1: mangán szuperoxid-dizmutáz

SST: szacharóz:szacharóz-1-fruktozil-transzferáz

*StDS2*: szárazságra indukálódó burgonya gén

*StMYB1R-1*: *Solanum tuberosum* R1-tpusú MYB-szerű transzkripciós faktor

T6P: trehalóz-6-foszfát

TIC: teljes ionkromatogram

TPP: trehalóz-foszfát-foszfátáz

TPS: trehalóz-foszfát-szintáz

X-Gal: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid

VT: vad típus

## 1. BEVEZETÉS

A szárazság napjaink egyik legégetőbb környezeti problémája. A Föld felszín hőmérséklete az elmúlt 50 évben 0.9°C-kal emelkedett és ennek számos érzékelhető bizonyítéka van: olvadó sarkköri területek, csökkenő vízkészletek, időjárási viszontagságok, évszakok megváltozása/kimaradása, stb. Az emelkedő hőmérséklet következtében nő a szárazság, ami egyre nagyobb területeket foglal el, köztük a mezőgazdaságra alkalmas földeket is. A növekvő élelmiszerigény miatt viszont fontos, hogy ezek az aszályos területek ne essenek ki a mezőgazdasági tevékenység alól és a természetett növények a szélsőségessé vált éghajlati körülmények között is a várt, vagy akár annál jobb terméshozamot adjanak. A növénynemesítők munkájának egyik legfőbb célja ezért az, hogy a környezetükhöz alkalmazkodni tudó, szárazságtűrő növényfajtákat hozzanak létre hagyományos, vagy molekuláris módszerekkel.

A burgonya a negyedik legnagyobb mennyiségben természetett élelmiszernövény a világon, azonban igen érzékeny a szárazságra. Az elmúlt években a molekuláris biológiai eszközök segítségével egy kicsit közelebb kerülhettünk ahhoz a kérdéshez, milyen változásokon megy keresztül a növény az őt ért stresszhatás következtében. A transzformációs technológiák által pedig olyan transzgenikus növények létrehozására is lehetőség nyílt, amivel a különböző fiziológiai, biokémiai és molekuláris válaszokat génexpressziós szinten befolyásolni tudják a kutatók.

A trehalóz egy nem redukáló diszacharid, ami nagy mennyiségben megtalálható a sivatagi növényekben. Megfigyelték, hogy szárazság során ozmoregulátor szerepet játszik (IORDACHESCU és IMAI 2008; JAIN és ROY, 2009). Számos kísérletben bizonyították, hogy a trehalóz szintéziséért felelős gének transzformációjával fokozható a növények szárazság stressz toleranciája (YEO et al., 2000; CORTINA et al., 2005; KARIM et al., 2007; MIRANDA et al., 2007). Munkacsoportunk az élesztő *TPSI* génjét juttatta be sikeresen marker mentes transzformációval Desirée burgonyafajtába (STILLER et al., 2008). A *TPSI* transzgenikus növények szárazságtűrőbbek voltak, mint a kontroll növények, azonban növekedésük optimális körülmények között elmaradt a kontrollétól, alacsonyabb volt a szén-dioxid fixációs rátájuk és a sztómaszámuk is. Génexpressziós szinten KONDRÁK és munkatársai (2011, 2012) azt találták, hogy a megváltozott expressziójú gének többsége a fotoszintézisben vagy a szénhidrát anyagcserében játszik szerepet. A génexpressziós változások metabolikus változásokkal is járnak, ami módosíthatja a növény beltartalmi értékeit. Ezért dolgozatom első részének célja:

1. **A *TPSI* gént expresszáló T1, T2 és a vad típusú vonalak leveleinek és gumóinak beltartalmi és metabolit szintű összehasonlítása öntözött és szárazság stressz körülmények között.**

A növényeknél a „priming” jelensége megnövekedett védelmi kapacitást jelent. Ennek értelmében, ha a növényt valamilyen patogén megtámadja, akkor nő az ellenálló képessége egy következő fertőzéssel, illetve más patogénekkal szemben (DURRANT és DONG, 2004; RYALS et al., 1996). A megerősödött immunvédelem kiváltható nekrotizáló patogénekekkel vagy egyes rizobaktériumokkal, de szerves és szervetlen vegyületekkel is (PRIME-A-PLANT GROUP, 2006). A „priming” során bekövetkező „immunvédelem” szorosan összefügg a „pathogen-related” (PR) fehérjékkel, és az azokat kódoló *PR* génekkkel. A *PR* génekhez hasonló expresszióval rendelkeznek a *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) gének is (JAKAB et al., 2003). Bizonyított, hogy a  $\beta$ -amino-vaajsav (BABA) több növény fajban is képes a „priming” kiváltására (JAKAB et al., 2001). JAKAB és munkatársai (2005) *Arabidopsis*-on szárazság és sótűrés javítására is eredményesen alkalmazták a BABA kezelést. Megfigyelték, hogy többek között a *PRLIP1* expressziója is megemelkedik a BABA, a szalicilsav (SA) és az etilén (ET) kezelés, valamint *Pseudomonas* baktériummal történt fertőzés hatására. A *PRLIP2* szintén indukálódott SA és patogén fertőzés hatására, azonban enyhébb mértékben, mint a *PRLIP1* (JAKAB et al., 2003). Mivel eddig még nem találtak a *PRLIP1*, vagy *PRLIP2* fehérjékhez hasonló szekvenciájú fehérjét burgonyában (JAKAB et al., 2003), arra gondoltunk, hogy a Dr. Jakab Gábor és munkatársai által előállított *PRLIP2* gént tartalmazó pZP111 plazmidot felhasználva, a *PRLIP2* gént bevisszük a burgonyába. Reméltük, hogy a *PRLIP2* expresszáltatásával fokozni tudjuk a burgonya szárazságtűrő képességét. Ezért dolgozatom második részének célja:

- 1. A Desirée burgonyafajta *Agrobacterium tumefaciens*-szel történő transzformációs technikájának elsajátítása és az elkészített konstrukciókkal stabil transzgenikus burgonya vonalak előállítása.**
- 2. Az adott transzgén beépülésének és kifejeződésének bizonyítása molekuláris módszerekkel.**
- 3. *PRLIP2* transzgént expresszáló vonalak szárazságtűrő képességének vizsgálata üvegházi körülmények között.**

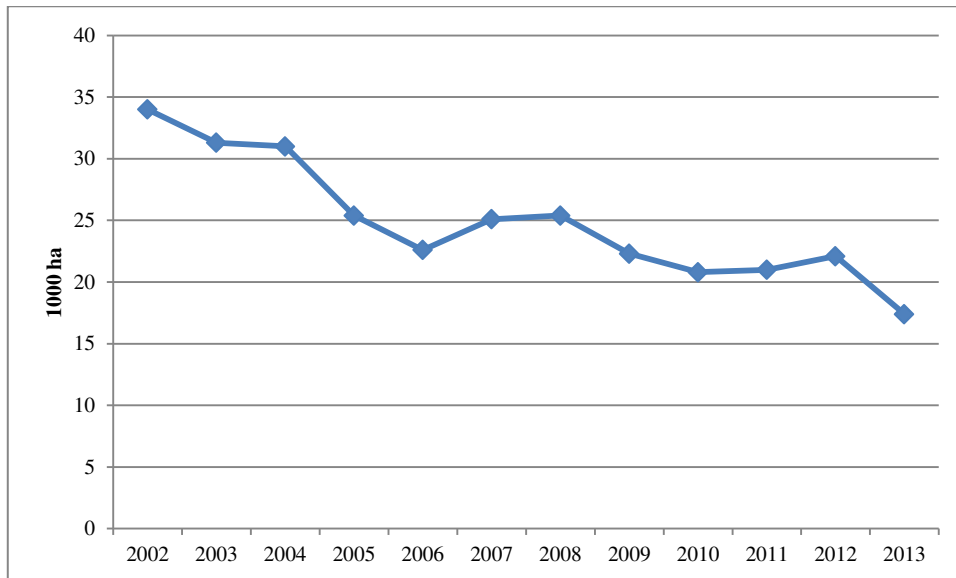
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A burgonya eredete, termesztése Magyarországon, beltartalmi értékei

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) a *Solanaceae* családba tartozó lágyszárú növény. Származási helye Közép- és Dél-Amerika, Chile, Peru és Mexikó magas hegyvidéke, ahol mintegy 8000 évvel ezelőtt kezdték termesztani az ottani farmerek, és ahol a mai napig megtalálhatók a vad burgonyafajták, amelyek az úgynevezett „*andigena*” alfajba tartoznak. A ma köztermesztésben lévő fajták a „*tuberosum*” alfajba tartoznak, mivel ezek a fajták alkalmasak a hosszú nappalos termesztésre, míg az „*andigena*” alfajba tartozó fajták inkább az egyenlítői, trópusi éghajlathoz alkalmazkodtak. Mindkét alfaj feltehetően egy ősi fajtól származik. Európába a spanyol hódítók hozták be és kezdetben csak, mint dísznövényt termesztették a burgonyát. Termesztése eleinte veszélyt is rejtett magában, mert előfordult, hogy a gumó helyett a burgonya levelét és termését fogyasztották az emberek, ami alkaloidokban gazdag, mérgező része a növénynek. Miután kiderült, hogy a gumó igen gazdag tápanyagforrás, Írországból nagyon népszerűvé vált, mivel a hűvös klímához kiválóan alkalmazkodó növény megoldotta az éhínség problémáját. Amikor azonban a XIX. században a burgonyát egy akkor ismeretlen betegség (a ma már ismert, *Phytophthora infestans*) támadta meg, egymillió ember halt éhen, legalább félmillió kivándorolt, és így az elkövetkező években az Ír sziget lakossága a felére csökkent.

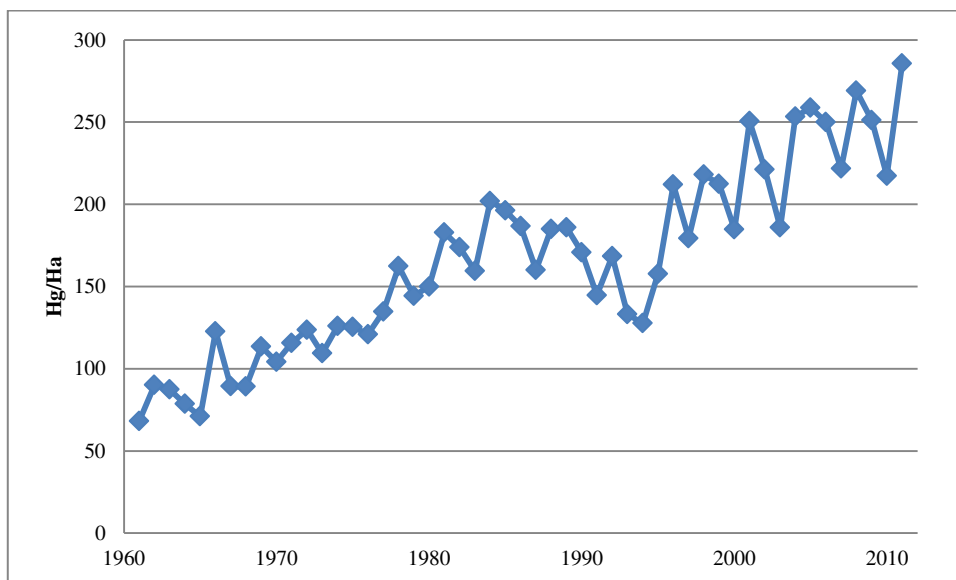
Hazánkban a XVII. század végén vált ismertté a burgonya. Mária Terézia és fia, II. József, a felvidéki éhínség idején már ingyen osztatta, a gazdákat pedig adókedvezménnyel ösztönözte a termesztésre, így vált népszerűvé a termelők körében. A hazai burgonyanemesítés kezdete Teichmann Vilmos nevéhez köthető az 1920-as években. Az 1960-as évektől Keszthelyen Sárvári István, majd Lönhárd Miklós végzett eredményes kutatásokat. Jelenleg Polgár Zsolt irányítása alatt folyik eredményes burgonyanemesítés a keszthelyi Burgonyakutatási Központban.

A legfrissebb adatok szerint az utóbbi évtizedben jelentősen csökkent a burgonya vetésterülete Magyarországon (1. ábra).



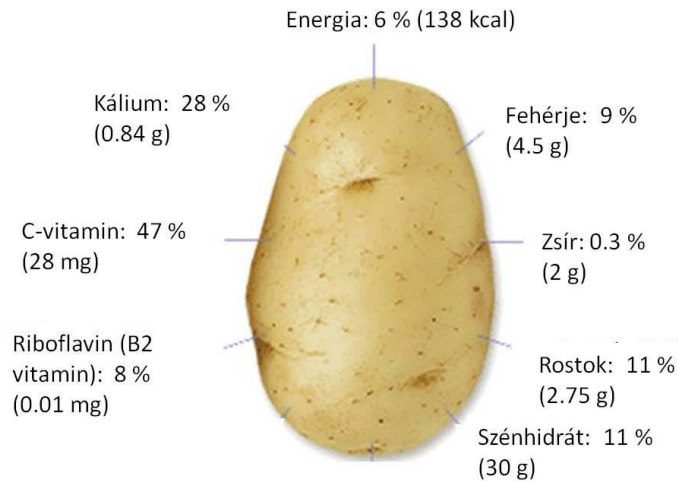
**1. ábra:** A burgonya vetésterületének alakulása Magyarországon  
[http://www.ksh.hu/d°Cs/hun/eurostat\\_tablak/tabl/tag00107.html](http://www.ksh.hu/d%C3%A9Cs/hun/eurostat_tablak/tabl/tag00107.html)

A vetésterület ugyan csökkent, a termésátlag azonban szinte folyamatosan növekedett (2. ábra), ami elsősorban az öntözéses termesztésnek köszönhető. Ez a technológia azonban drága, és az egyre gyakrabban előforduló száraz, aszályos időszakok csak növelik a felhasznált víz mennyiségét, ami többlet költségekkel jár. Ezért egyre nagyobb igény van arra, hogy olyan burgonya fajták kerüljenek köztermesztésbe, amelyek ellenállóbbak a szárazsággal szemben.



**2. ábra:** A burgonya termésátlaga Magyarországon  
<http://faostat.fao.org/>

A burgonya beltartalmi értékeit tekintve, a magas keményítő tartalom mellett, gazdag C-vitaminban, kiváló rost és kálium forrás (3. ábra). Ezen kívül értékes B1, B2, B6-vitaminokat és karotenoidokat (38-500  $\mu\text{g}/100$  g friss súly) is tartalmaz (HAASE, 2007; BRUGIERE, 2005).



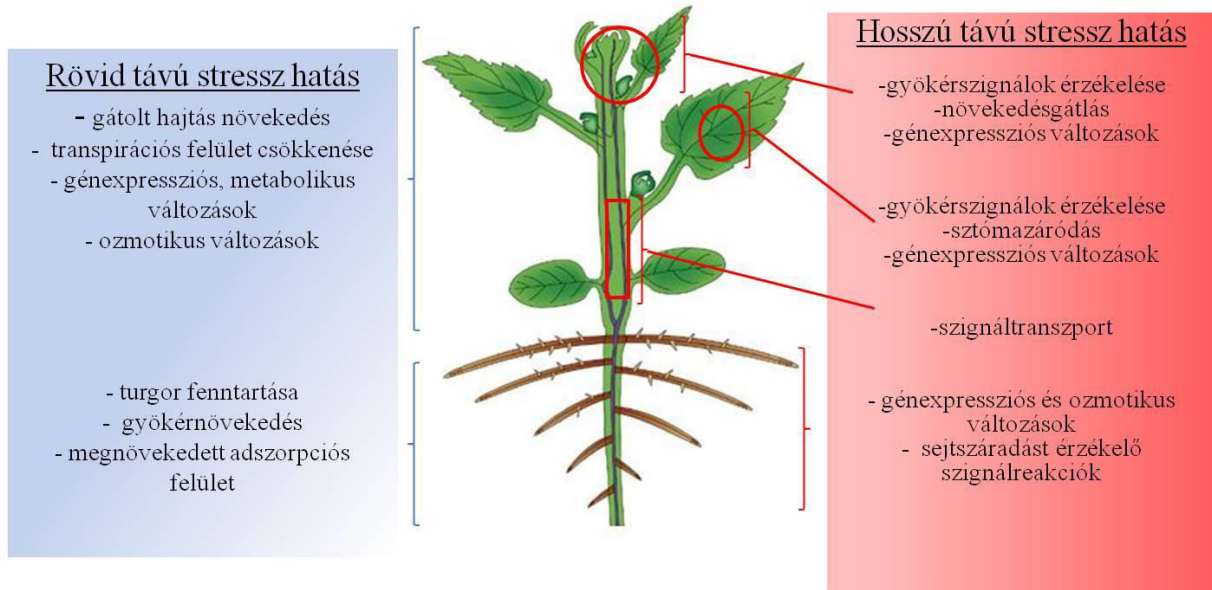
**3. ábra:** Tápanyagtartalom 200 g héjában főtt burgonyában; az irányadó napi beviteli érték, vitaminok esetében az ajánlott napi beviteli érték (HAASE, 2007)

A burgonya nagyon értékes takarmány, és az élelmiszeripari feldolgozás mellett a keményítő- és szesziparban is fontos szerepet játszik. Itthon azonban az utóbbi években az ipari feldolgozása visszaesett, inkább friss fogyasztása az elterjedt.

## 2.2. A szárazság hatása a növényekre

A növények optimális fejlődéséhez különböző ásványi anyagokra, szén-dioxidra, oxigénre, napfényre és vízre van szükség. Igen fontos, hogy a víz megfelelő mennyiségben legyen jelen, mert ez alkotja a növényi szövetek 80-90%-át.

A világon évről évre egyre jobban érzékelhető a globális felmelegedés hatása, aminek következtében az aszályos időszakok egyre jellemzőbbek hazánkra is. A szárazság, attól függően, hogy rövid távú, vagy hosszan tartó időszakon keresztül éri a növényt, különböző változásokat okoz (4. ábra). Ha nincs elegendő csapadék, vízmennyiség, amit a növény felvehetne, csökken a sejtekben a vízpotenciál értéke, a sztómák bezáródnak, csökken a transpiráció, a fotoszintézis gyengül és a növény fejlődése visszamaradt, gátolt lesz (ARAYA, 2007; SANTOS et al., 2009).



**4. ábra:** A növényt érő rövid és hosszú távú stressz hatásokra adott válaszok (SANTOS et al., 2009 nyomán)

A növények különböző módon védekeznek az őket ért stressz hatások ellen, köztük a szárazság ellen is. Egyrészt alkalmazkodhatnak a vízhiányhoz úgy például, hogy rövid életciklusukkal átvészelik a száraz periódust. Másrészt az aszályos, száraz területeken élő növények praktikus morfológiai adottságokkal is rendelkezhetnek: mélyre nyúló gyökeret növesztenek, ezzel a talaj legmélyebb pontjából is kinyerhetik az életet jelentő vízcseppeket, vagy vastag kutikula réteget növesztve minimálisra csökkentik a párologtatást, de még számos példát említhetnénk.

Szárazság stressz hatására a növényekben fiziológiai, biokémiai és molekuláris változások egyaránt végbemennek (KRASENSKY és JONAK, 2011) (5. ábra).

## Szárazság stressz

### Fiziológiai válaszok

- gyökérszignálok felismerése
  - csökkenő turgor
- csökken a levél vízpotenciálja
- csökkenő sztómakonduktancia és belső széndioxid koncentráció
- csökkenő fotoszintézis
  - gátolt növekedés

### Biokémiai válaszok

- Rubisco enzim működésének csökkenése
  - metabolitok felhalmozódása: aszkorbinsav, glutation, GABA, prolin, trehalóz, glicin-betain, poliaminok, tokoferol
- antioxidáns enzimek bekapcsolása: SOD, CAT, APX, POD, GR, MDHAR
- ROS szint változása

### Molekuláris válaszok

- stresszválaszért felelős génexpresszió változások
- ABA bioszintézisben szerepet játszó gének megnövekedett expressziója
  - specifikus fehérjék szintézise: LEA, DSP, RAB, dehidrin fehérjék
- szárazság stressz tolerancia

### 5. **ábra:** A szárazság stressz hatása a növényekre (OLIVEIRA et al., 2013 nyomán)

GABA:  $\gamma$ -amino-vajsav, SOD: szuperoxid-dizmutáz, CAT: kataláz, APX: aszkorbát-peroxidáz, POD: peroxidáz, GR: glutation-reduktáz, MDHAR: monodehidroaszkorbát-reduktáz, ROS: reaktív oxigéngyökök, LEA: késői embriogenezis során felhalmozódó proteinek, DSP: kettős specificitású foszfatázok, RAB: ABA válaszáért felelős fehérjék

Amint a növény érzékeli a vízhiányt, sejtszinten válaszol a stresszre. Megváltozik a sejtfaal összetétele, a sejtciklus és a sejtosztódás mértéke. De megváltozik a szén-dioxid kötés kulcsenzimének, a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláznak (Rubisco) az aktivitása is (PARRY et al., 2013; CARMO-SILVA et al., 2012; FLEXAS et al., 2006; PARRY et al., 2002). Ezzel párhuzamosan megnő bizonyos anyagok, az úgynevezett ozmolitok mennyisége, amelyek megvédik a sejteket a vízvesztéstől. Ilyen ozmolit például a prolin (SZABADOS és SAVOURE, 2010; ANJUM et al., 2011), a  $\gamma$ -amino-vajsav (GABA) (KINNERSLEY és TURANO, 2000), a keményítő, a mono- és diszacharidok, köztük a trehalóz (IORDACHESCU és IMAI, 2008), a glicin-betain (GB) (TAMURA et al., 2002, SAKAMOTO és MURATA, 2002; CHEN et al., 2008a), a poliaminok (ALCAZAR et al., 2011), az aszkorbinsav, a glutation és a tokoferol (SZARKA et al., 2012; MUNNÉ-BOSCH és ALEGRE, 2000). Különböző antioxidáns enzimek, mint például SOD, CAT, APX, POD, GR, MDHAR is működésbe lépnek szárazság stressz hatására (FOYER et al., 2005; NAYA et al., 2007; DEVI et al., 2012). Az egyik legjellemzőbb biokémiai válasz eukarióta sejtekben a ROS (reactive oxygen species) szint emelkedése (SUZUKI et al., 2011). A reaktív oxigén gyökök a szárazság stressz másodlagos jelzőmolekulái. Akkumulálódásuk azonban oxidatív károsodást okoz a sejtekben, ami sejthalálhoz is vezethet (APEL és HIRT, 2004).

A molekuláris válaszok génexpressziós szinten segítik a növényben a stressz tolerancia kialakítását. Terjedelmes irodalom szól az abszcizinsav (ABA) szint változásáról ozmotikus és sóstressz hatására (CUTLER et al., 2010; HUBBARD et al., 2010; RAGHAVENDRA et al.,

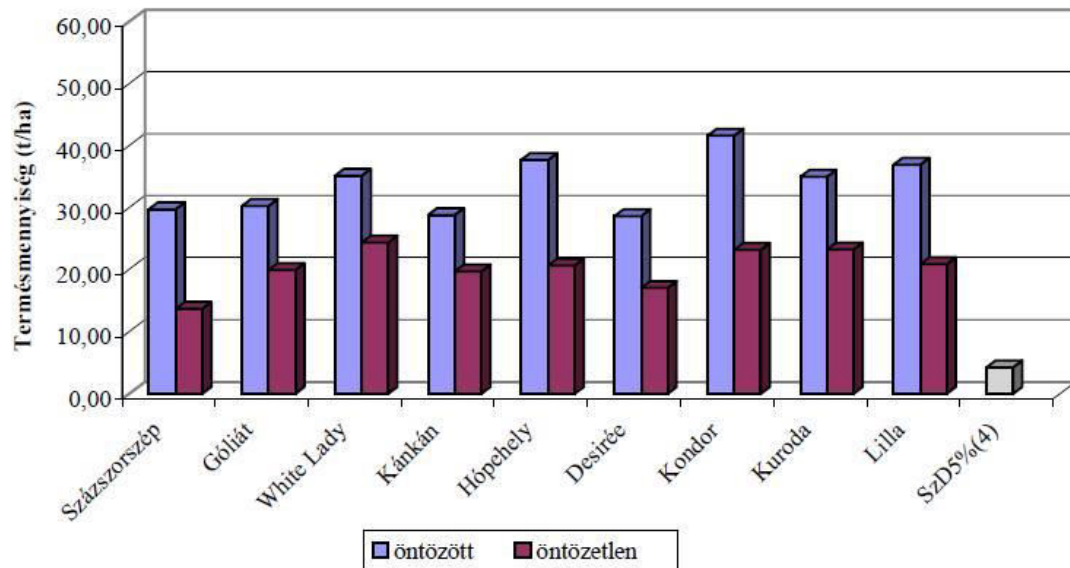


2010; UMEZAWA et al., 2010). A szárazsággal szembeni védelem főleg a vízvesztés mértékének csökkentésén alapul. Ezt a növény a transpiráció mértékének csökkentésével segíti elő. Az ABA segít ebben azáltal, hogy a sztómazáródást befolyásolva megóvja a sejteket a kiszáradástól, ezáltal a növényt a vízvesztéstől és hervadástól (AGARWAL és JHA, 2010). Az ABA akkumulációját gyakran ozmotikus stresszválaszért felelős gének (osmotic stress responsive genes - OR) expressziója is kíséri (ROYCHOUDHURY et al., 2013). A növények vízvesztésre adott génszintű válaszát külső ABA kezeléssel is el lehet érni (YAMAGUCHI-SHINOZAKI és SHINOZAKI, 2006; ZHU et al., 2002). Az ABA által kiváltott génexpressziós válaszokat transzkripciós faktorok szabályozzák. Ezeket a válaszokat receptorok, másodlagos hírvivő molekulák, protein kinázok, stb. is követik (FUJITA et al., 2011). *Arabidopsis*-ban a fehérje kódoló gének közel 10%-át az ABA szabályozza (NEMHAUSER et al., 2006). Az egyik legismertebb fehérje család a LEA (késői embriogenezis során felhalmozódó proteinek családja) (FINKELSTEIN et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI és SHINOZAKI, 2006; XIAO et al., 2007). A LEA proteinek csoportjába tartoznak a dehidrinek. Mivel a LEA fehérjéket kódoló géneknek az átírása sok esetben az ABA által indukálódik, ABA válaszáért felelős fehérjéknek (RAB – responsive to ABA) is nevezik őket (HANIN et al., 2011; WANG et al., 2003). De összefüggés van a szárazságra indukálódó ABA-függő transzkripciós szabályozás és a szénhidrát metabolizmus között is (KEMPA et al., 2008). Ugyanakkor számos olyan *OR* gént is ismerünk, amelyek az ABA-tól függetlenül indukálódnak a szárazság stressz hatására (SHINOZAKI és YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). De azt is többen bizonyították, hogy bizonyos szárazságra indukálódó gének só illetve hideg stresszre is indukálódnak, ami azt mutatja, hogy a növényt ért különböző típusú környezeti faktorokra adott válaszok kapcsolatban állnak egymással (ROYCHOUDHURY et al., 2013).

### **2.3. A szárazság hatása a burgonyára**

A burgonya nagyon érzékeny a vízhiányra és jelentősen csökken a termésmennyisége, ha nem jut elegendő csapadékhoz (ÁBRAHÁM et al., 2005; WEGENER et al., 2013). Még egy jól öntözött állomány is szenvedhet időszakosan szárazság stresszt, ha a tenyészidő alatt egy-egy nap kifejezetten forró és száraz (JEFFERIES et al., 1993). Ilyen esetben akár egy nap alatt több vizet tud elpárologtatni a burgonya, mint amennyit a gumójában egy teljes vegetációs idő alatt felhalmozni képes (KRUPPA et al., 2003). Aszályos időjárás esetén a fajták között jelentős különbség lehet a termésmennyiségben, de általában elmondható, hogy a vízhiány a hozam

jelentős csökkenését eredményezi (6. ábra). ÁBRAHÁM (2009) szerint megfelelő öntözéssel a burgonya termésátlaga 16-20 t/ha-ról akár 35-40 t/ha-ra is növelhető.

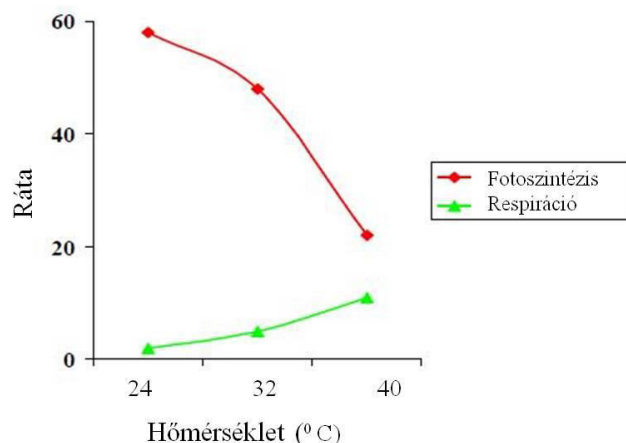


**6. ábra:** Öntözés hatása a termésmennyiség alakulására (ÁBRAHÁM et al., 2005 nyomán)

Attól függően, hogy a vegetációs időn belül mikor szenved vízhiányt a növény, más elváltozásokat okozhat a stressz. Ha nem kap elegendő csapadékot a burgonya, akkor visszamarad a fejlődésben, alacsonyabbak lesznek a növények, csökken a biomassza, a gyökérfejlődés és a lombzat kialakulása is időben elhúzódhat, aminek következtében kisebb lesz a gumóhozam (KING et al., 2003). Optimális körülmények között a gumókötés után a gumó erőteljes fejlődésnek, „duzzadásnak” indul, egészen a lombhullásig. Ha ez alatt az idő alatt szenved szárazság stresszt a növény, akkor növekedési rendellenességek, „babásodás”, azaz másodlagos növekedés lép fel a gumókon (KRUPPA et al., 2004; KING et al., 2003). A vegetációs idő végén szintén gondokat okoz az alacsony talajnedvesség. Csökken a hozam, megrövidülhet a nyugalmi állapot, és fellép az úgy nevezett üvegesedés, vagyis nő a redukáló cukrok mennyisége a gumóban (KRUPPA et al., 2004).

A szárazsággal sokszor együtt jár a magas hőmérséklet is. A hőmérséklet növekedésével a respiráció intenzívebbé válik, viszont csökken a fotoszintézis mértéke (7. ábra). Mindennek az lesz az eredménye, hogy kevesebb keményítő szintetizálódik a növényekben. A hőmérséklet emelkedésével a növény a meglévő keményítőt a szárnövekedésre használja fel ahelyett, hogy a gumófejlődésre fordítaná (THORNTON, 2002). A keményítő mellett csökken a fehérje és C-

vitamin tartalom is (ÁBRAHÁM, 2009). De emellett a magas hőmérséklet és a vízhiány kihat az antioxidáns tartalomra is (WEGENER et al., 2013).



**7. ábra:** Hőmérséklet hatása a fotoszintézis és respiráció alakulására (THORNTON, 2002 nyomán)

GOPAL és IWAMA (2007) *in vitro* körülmények között nevelt burgonyanövényeken modellezték a szárazság stressz hatását. Az ozmotikus stressz kiváltására polietilén-glikolt (PEG) és szorbitolt adtak a táptalajhoz különböző koncentrációkban. Három burgonya genotípust vizsgáltak. Megfigyelték, hogy ezek az anyagok ugyanolyan reakciót váltottak ki a növényekből, mintha szabadföldi körülmények között érte volna őket a szárazság stressz: a növényeknek csökkent a vízpotenciál értéke, visszamaradt a növekedésük, a gyökérfejlődésük, és csökkent a hozamuk is. Ezzel a módszerrel lehetőség nyílt a szárazság stressz tesztelésére *in vitro* körülmények között, ami a burgonya esetében kifejezetten előnyös és időtakarékos lehetőség.

A fiziológiai változások a kutatók számára felvetették azt a kérdést, vajon génexpressziós szinten mit befolyásol a szárazság a burgonyanövényben? EVERS és munkatársai (2010) két különböző szárazságtűréssel rendelkező, andoki burgonyafajtát vizsgáltak szabadföldön, hosszú ideig tartó szárazság stressznek kitéve. A levelek relatív víztartalmát (relative water content – RWC) tekintve nem találtak különbséget a két fajta között. Mindkét fajta gumóhozama mintegy 70%-kal csökkent, de a levelek ozmotikus potenciál értéke eltérő volt. A fiziológias változásokon kívül több, a szénhidrát bioszintézist befolyásoló génexpressziós változást is megfigyeltek a levelekben: indukálódott a szacharóz-szintáz, invertáz és a keményítőbontó enzimek génjeinek átírása. De erős expressziót mutattak a hosszan tartó szárazság hatására a levélben a galaktinol és raffinóz bioszintézisében szerepet játszó gének, az UDP-glükóz-4-

epimeráz, galaktinol-szintáz és raffinóz-szintáz is (EVERS et al., 2010; LEGAY et al., 2011; SCHAFLEITNER et al., 2007).

Számos tanulmány beszámolt arról, hogy a poliolo, cukrok és cukoralkoholok szintje megemelkedik a növényekben szárazság stressz hatására (POPP és SMIRNOFF, 1995; PATONNIER et al., 1999; TAJI et al., 2002). Ezek az ozmotikusan aktív anyagok felhalmozódásukkal képesek megvédeni a sejteket a kiszáradástól. Burgonyalevélben galaktóz, galaktinol, inozitol és prolin felhalmozódást tapasztaltak a hosszan tartó szárazság hatására (EVERS et al., 2010; LEGAY et al., 2011). A glutamin-szintáz és az aszparagin-szintáz a nitrogén metabolizmus kulcsenzime, amelyek közvetve befolyásolni tudják a prolin szintet is (BRUGIERE et al., 1999). Burgonyagumóban szárazság hatására prolin akkumulációt tapasztaltak (TEIXERIA et al., 2006; MAGGIO et al., 2008), de megfigyelték a glutamin, glutamát és az aszparagin szint emelkedését is az Agria és Merit fajták gumóiban (MAGGIO et al., 2008).

#### **2.4. A szárazságtűrés növelésének módszerei**

A mai mezőgazdasági termelés a Föld vízkészletének 70%-át használja élelmiszer termelésre (FAO, 2007). Egy kilogramm kukorica előállításához 900 liter, egy kilogramm búzáéhoz kb. 1300 liter, míg egy kilogramm rizshez 3000 liter vízre van szükség (CHAPAGAIN et al., 2004). Bár a világ termőföld területének csupán 16%-a öntözött, mégis a világ élelmiszer készletének 40%-át állítják elő rajta (GITAY et al., 2001). Már az ötvenes években, az úgynevezett „zöld forradalom” idején is fontos volt, hogy a kórokozók, kártevők elleni védekezéssel, trágyázással és nemesítéssel növeljük az élelmiszernövények hozamát (KHUSH et al., 2001). Napjainkban a modern biotechnológiai, molekuláris nemesítésnek köszönhetően a „második zöld forradalom” idejét éljük, mivel ezek a módszerek lehetőséget nyújtanak a nemesítőknek a mezőgazdasági növények eddiginél gyorsabb hozamnövelésére (ECKARDT et al., 2009).

A növekvő élelmiszer igény, a klimatikus változások és az egyre apadó elérhető vízkészletek szükségessé teszik a szárazságtűrő fajták termesztését. A szárazságtűrés növelésére a nemesítőknek több módszer is rendelkezésére áll. A hagyományos nemesítés során a különböző fajták keresztezésével és az így létrehozott hibridek szelekciójával érik el a kívánt eredményt. Így azonban, növényfajtól függően, de akár évtizedekig is eltarthat a megfelelő toleranciával rendelkező egyed megtalálása. Bár vannak eredmények ezzel a módszerrel is (kukorica - BËNZIGER et al., 2004; búza - BËNZIGER et al., 2008; szója - CHEN et al., 2007;

árpa - NOAMAN et al., 2007), mégis több esetben sikertelennek, költségesnek és túl időigényesnek bizonyult ez az eljárás.

A molekuláris technikák fejlődésének és a kutatási eredményeknek köszönhetően már egyetlen gén bevitelével, módosításával vagy expressziójának megváltoztatásával befolyásolhatjuk bizonyos metabolitok mennyiségét vagy fehérjék működését és ezzel elősegíthetjük a növények abiotikus stresszel szembeni toleranciájának növekedését (UMEZAWA et al., 2006; PARDO et al., 2010; PELEG et al., 2011a; COMINELLI et al., 2013). A genetikai módosítással megváltoztatott élőlények közül transzgenikus növényeknek nevezzük azokat az élőlényeket, amelyek genomjába molekuláris technikákkal egy másik élő szervezetből származó gént juttatunk be és ez a gén beépül, működik, és öröklődik. Az idegen gén működése során a növény szerveiben, szöveteiben új fehérjék termelődnek (HESZKY et al., 2005). Az idegen gén működését promóterekkel szabályozzuk. A legelterjedtebben használt szabályozó régió a *CaMV35S* konstitutív promóter, azonban a konstitutív expresszió következtében a növényeken gyakran negatív pleiotropikus hatás figyelhető meg (KASUGA et al., 1999; HSIEH et al., 2002; NAKASHIMA et al., 2007). Ennek a negatív hatásnak a kivédése szerv-, szövet-, vagy sejtspecifikus promóterekkel, vagy ezek kombinálásával érhető el.

A legjellegzetesebb szárazságtűrés fokozására használt géneket, funkciójukat és az általuk módosított növényfajokat az 1. táblázatban foglaltam össze.

## 1. táblázat

## Szárzságtűrés fokozására használt legismertebb gének listája

Gén	Funkció	Mechanizmus*	Növény	Hivatkozás
<b>Ozmolitok szintézisében szerepet játszó gének</b>				
<i>P5CS</i>	pirrolin-5-karboxilát-szintáz	prolin akkumuláció	rizs, búza	SU és WU 2004; VENDRUSCOLO et al., 2007
<i>otsA, otsB</i>	<i>E. coli</i> trehalóz bioszintézis	trehalóz felhalmozódás	rizs	GARG et al., 2002
<i>TPS1, TPS2</i>	élesztő trehalóz bioszintézis	trehalóz felhalmozódás	lucerna	SUAREZ et al., 2009
<i>MtID</i>	mannitol-1-foszfát-dehidrogenáz	mannitol akkumuláció	<i>Arabidopsis</i> , dohány, búza	THOMAS et al., 1995; KARAKAS et al., 1997; ABEBE et al., 2003
<i>BADH, CDH</i>	betain-aldehyd-dehidrogenáz, kolin-dehidrogenáz	glicin-betain akkumuláció	gyapot, búza	LV et al., 2007; WANG et al., 2010
<b>Oxidatív károsodást enyhítő gén</b>				
<i>Mn-SOD</i>	mangán-szuperoxid-dizmutáz	ROS aktivitás gátlás	lucerna, rizs	McKERSIE et al., 1996; WANG et al., 2005
<b>Transzkripció/hormonális szabályozásban és jelátvitelben szerepet játszó gének</b>				
<i>DREB1, DREB2</i>	stresszre indukálódó transzkripció faktorok	fokozzák a stressz toleranciában szerepet játszó gének expresszióját	<i>Arabidopsis</i> , rizs	ITO et al., 2006; CHEN et al., 2008b
<i>SNAC1</i>	stressz válaszáért felelős NAC1 transzkripció faktor ABA	sztómazárodás és fotoszintetikus aktivitás fenntartása	rizs	HU et al., 2006
<i>LOS5/ABA3</i>	bioszintézisben szerepet játszó gének	ABA akkumuláció	rizs	XIAO et al., 2009
<i>LeNCED</i>	ABA bioszintézisben szerepet játszó gén	ABA akkumuláció	paradicsom	THOMPSON et al., 2007

<i>IPT</i>	izopentenil-transzferáz, citokinin bioszintézis	a magas citokinin tartalom negatív hatásai nélkül is elérhető vele a szárazságtűrés növekedése	dohány, kasszava, rizs	RIVERO et al., 2007, 2009, 2010; ZHANG et al., 2010; PELEG et al., 2011b
<i>AP37, AP59</i>	etilén válaszáért felelős faktorok	magasabb hozam szabadföldön	rizs	OH et al., 2009
<b>RNS chaperon</b>				
<i>CspA, CspB</i>	RNS kötő fehérjék	jobb növekedési erély, magasabb hozam szabadföldön	rizs, kukorica	CASTIGLIONI et al., 2008 (Monsanto)

\* szárazság stressz alatt

#### 2.4.1. Osmoregulációban szerepet játszó gének

Az osmoreguláció során felhalmozott anyagokat összefoglaló néven kompatibilis vegyületeknek nevezzük. Fontos szerepük van a vízhiány során a sejtalkotók integritásának védelmében. Ezek közé az anyagok közé tartoznak egyes cukrok (trehalóz, fruktán), cukoralkoholok (galaktinol, mannitol), aminosavak (prolin) és aminok (glicin-betain).

Az első osmoregulációval kapcsolatos sikeres transzformációt KAVI KISHOR és munkatársai (1995) végezték dohány növényen, illetve ZHU és munkatársai (1998) rizsben, ahol a *P5CS* túltermeltetésével prolin felhalmozódást értek el a növényekben és nagyobb biomassza tömeget kaptak a stressz ellenére. VENDRUSCOLO és munkatársai (2007) búzában értek el így nagyobb ellenállóságot, míg SU és WU (2004) rizsben figyelték meg, hogy a só- és szárazság stressz alatt a növények hajtásai és gyökere gyorsabban növekedett, mint a nem transzformált kontrollé.

A trehalóz egy nem redukáló diszacharid, ami megtalálható baktériumokban, gombákban, gerinctelenekben. A sivatagi növények kivételével alig detektálható mennyiségben fordul elő más növényekben. GARG és munkatársai (2002) *E. coli*-ből vonták ki a trehalóz szintéziséért felelős géneket (*otsA, otsB*), és juttatták be rizsbe szövetspecifikus illetve stresszre indukálódó promoterekkel. A kísérlet eredménye az volt, hogy a nem transzgenikus növényekkel szemben a transzgenikus növények kevésbé károsodtak a szárazság stressz során. SUAREZ és munkatársai (2009) az élesztő trehalóz bioszintézisében szerepet játszó TPS1 (trehalóz-foszfát-szintáz) és TPS2 (trehalóz-foszfát-foszfátáz) génjét használták fel lucernában. A stresszre indukálódó *rd29A*

promóterrel indukált *TPS1-TPS2* expresszió kedvezően hatott a növények növekedésére és a biomasszára nemcsak szárazság-, hanem más abiotikus (fagy, só, hő) stressz során is.

*Arabidopsis*-szal (THOMAS et al., 1995) és dohányjal (KARAKAS et al., 1997) végzett kísérletekben a mannitol-1-foszfát-dehidrogenáz (*Mt1D*) expresszió fokozta a só- és szárazság stresszel szembeni toleranciát. Búzában normál esetben nem szintetizálódik mannitol, de a *Mt1D* folyamatos expressziójával javítani lehetett a növények növekedését szárazság stressz alatt (ABEBE et al., 2003).

A GB a glicin származéka. Különböző növény családok fajaiban fellelhető, mint stressz jelzőmolekula, de egyes fajokban ozmoregulátorként is működik (MUNNS és TESTER, 2008). A külső GB kezelés, illetve a GB szintézisben szerepet játszó gének segítik a növényeket a szárazság stressz tűrésében (KHAN et al., 2009). A kolin-dehidrogenáz (*CDH*) transzgenikus gyapot növényekben 2.3-2.9-szer magasabb GB szintet detektáltak és ezek a növények szignifikánsan nagyobb toleranciát mutattak szárazsággal szemben (LV et al., 2007). Hasonló eredményt értek el WANG és munkatársai (2010) búzában, ahol javult a *BADH* transzgenikus növények fotoszintetikus kapacitása a szárazság- és hőstressz alatt.

#### **2.4.2. Oxidatív károsodást enyhítő gének**

A különböző biotikus és abiotikus stresszorok hatására oxidatív stressz jön létre a növényekben, ami az egyes biokémiai reakcióutak eltolódását eredményezheti. A ROS keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek között felbomlik az egyensúly és megváltozik a sejtek oxido-redukciós állapota. Stressz során csökken a növények CO<sub>2</sub> felvevő képessége és a fotoszintetikus elektron transzport, ezáltal megemelkedik a szuperoxid és hidrogén-peroxid szint, ami további ROS termelődéshez vezethet.

McKERSIE és munkatársai (1996) *MnSOD* transzgenikus lucernát vizsgáltak 3 évig szabadföldön és azt találták, hogy a megemelkedett *SOD* aktivitás következtében javult a növények fotoszintetikus hatékonysága és a hajtások növekedése vízhiányos környezetben. De az oxidatív stresszre indukálódó promóterrel transzformált *MnSOD* transzgenikus rizs növények növényházi tesztje is pozitív eredményt adott - a növények megemelkedett oxidatív stressz toleranciát mutattak (WANG et al., 2005).

#### **2.4.3. Transzkripció/hormonális szabályozásban és jelátvitelben szerepet játszó gének**

Egy gén expressziójának megváltoztatásával egy bizonyos, vagy akár több olyan útvonalat is befolyásolhatunk a növényekben, amelyek hatással vannak stressztűrő képességükre. Mivel a



növény folyamatosan arra törekszik, hogy fenntartsa a metabolikus homeosztázist, egy-egy kulcsfontosságú génnel elősegíthetjük ennek az egyensúlynak a megtartását a stressz során is. A transzkripciós faktorok szinte az összes biológiai folyamatban részt vesznek, ezért nagyon jól felhasználhatók a tolerancia növelésére.

A *DREB1*, *DREB2* transzkripciós faktorok az ABA-tól függetlenül működő szárazság stressz toleranciát biztosító gének expressziójának pozitív regulátorai. Az első ilyen géneket *Arabidopsis*-ban fedezték fel, de azóta már számos növényben találtak hasonlókat és különböző növényeken végeztek velük transzformációs kísérleteket (SHINOZAKI és YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Az *OsDREB1* és *OsDREB2* transzgenikus rizsben a szárazság stressz mellett a só- és hideg stressz tolerancia is megemelkedett, bár normál körülmények között ezek a növények visszamaradtak a növekedésben. A stressz tolerancia növekedése együtt járt a prolin és az oldható cukor tartalom emelkedésével (ITO et al., 2006). CHEN és munkatársai (2008b) rizsben 3 új, *Arabidopsis DREB* génekkel homológ gént (*OsDREB1E*, *OsDREB1G*, *OsDREB2B*) találtak. Rizsbe transzformálva ezeket a géneket azt figyelték meg, hogy megemelkedett a növények vízhiánnyal szembeni toleranciája. A 3 gén közül az egyik azonban csak gyenge javulást eredményezett, amiből arra következtettek, hogy bár hasonló funkciót látnak el ezek a gének, mégis különböző stressz válaszáért felelős útvonalakat szabályoznak (CHEN et al., 2008b).

A NAC szintén egy specifikus, stresszre adott válaszokat szabályozó növényi transzkripciós faktor. HU és munkatársai (2006) a stressz válaszáért felelős NAC gént (*SNAC1*) expresszáló transzgenikus rizs vonalakat vizsgáltak és megállapították, hogy normál körülmények között ezek a növények nem különböznek a nem transzformált növényektől. Szárazság stressz alatt viszont mintegy 22-34%-kal jobb volt a szemkötése a *SNAC1* transzgenikus növényeknek, mint a kontroll növényeknek, amelyek szinte mindegyike steril maradt. A transzgenikus növényekben több volt a zárt sztómák száma mind stresszelt, mind optimális körülmények között (HU et al., 2006).

A növényi hormonok kapcsolata és a szabályozásukkal kapcsolatos bioszintézis utak módosítása a szárazság stressz során fontos szerepet játszik a tolerancia kialakításában (PELEG et al., 2011b). *Arabidopsis*-ban már nagyon sok ABA-val kapcsolatos metabolikus útvonalban szerepet játszó gént leírtak. A *LOS5/ABA3* az ABA bioszintézis utolsó fázisában vesz részt. Rizsbe ezt a gént konstitutív promóterrel juttatták be és tesztelték szabadföldi körülmények között (XIAO et al., 2009). Megállapították, hogy a transzformáció javította a növények szárazság stresszre adott válaszát.

Paradicsomban a szárazságra indukálódó *LeNCED1* gén expressziója magasabb ABA koncentrációt eredményezett a növényekben (THOMPSON et al., 2007), aminek következtében

nőtt a növények biomassza tömege, a transpiráció mértéke, vízkészlete, stb. vízhiányos körülmények között (THOMPSON et al., 2007).

Kedvezőtlen környezeti hatások következtében a növények gyökerében csökken a citokinin (CK) tartalom és ez génexpressziós változásokhoz vezet a hajtásokban. HARE és munkatársai (1997) azt találták, hogy a CK kezelés számos stresszre indukálódó gén transzkripcióját fokozta. Kukoricában a megemelkedett CK szint javította a növények túlélő képességét szárazság stressz során, gátolta a levelek öregedését és prolin akkumulációhoz vezetett (ALVAREZ et al., 2008). A CK szintézisben részt vevő *IPT* gént szárazságra indukálódó promóterrel expresszáltatták dohányban (RIVERO et al., 2007, 2009, 2010) és rizsben (PELEG et al., 2011b). Az *IPT* expresszió fokozta a növények szárazságtűrését és növelte a hozamát. ZHANG és munkatársai (2011) *IPT* transzgenikus kasszava növényeket teszteltek szabadföldön. Ez esetben az *IPT* gén kódoló szakaszát öregedésre indukálódó promóterrel építették össze. A transzformánsok nemcsak jobban viselték a szárazságot, hanem a stresszt követően a felépülésük is gyorsabb volt, mint a kontrollé.

OH és munkatársai (2009) az etilén válaszáért felelős transzkripcióban szerepet játszó *AP37* és *AP59* géneket konstitutívan expresszáltatták rizsben. Mindkét transzgenikus vonalnak javult a szárazságtűrése a vegetatív fázisban. Emellett az *AP37*-es növényeknek szabadföldön magasabb volt a termés hozama száraz körülmények között, mint a kontrollnak, és nem mutattak eltérést a kontrollhoz képest normál körülmények között.

#### **2.4.4. RNS chaperon**

CASTIGLIONI és munkatársai (2008) a Monsanto-nak végzett kísérleteikben baktériumokból származó hidegsokk fehérjék (cold shock protein – Csp) hatását tesztelték rizs és kukorica növényekben különböző abiotikus stressz körülmények között. A Csp fehérjék onnan kapták a nevüket, hogy hideg hatására felhalmozódnak a baktériumokban. Ezek a fehérjék úgynevezett chaperonként működnek, azaz megóvják az RNS molekulák szerkezetét a stressz káros hatásaitól, segítik fenntartani normál állapotukat, hogy azok elláthassák feladatukat. CASTIGLIONI és munkatársai (2008) két különböző típusú *Csp*-t használtak: az *E. coli*-ból származó *CspA*-t és a *Bacillus subtilis*-ből származó *CspB*-t. Mindkét gént rizsben expresszáltatták. Ezek a transzgenikus növények jobb növekedési erélyt mutattak a nem transzformált növényekhez képest hideg, hó és szárazság stressz során is.

Ugyanebben a kísérletben *CspB*-vel transzformált kukoricát is vizsgáltak szabadföldön. A növényeket 2 hetes száraz periódusnak vetették alá közvetlenül a virágzást megelőzően, ami köztudottan az egyik legérzékenyebb időszak a hozamot tekintve. A nem transzformált növények

50%-kal elmaradtak a növekedésben az öntözött kontrollhoz képest. Ehhez képest a *CspB* kukoricánál 24%-os emelkedést figyeltek meg a növekedési rátában a szárazság stressz alatt. Emellett a *CspB* kukoricának magasabb volt a terméshozama, nőtt a klorofill tartalma és a fotoszintetikus rátája, ráadásul öntözött körülmények között nem mutatott semmilyen eltérést a nem transzformált kontrollhoz képest.

## 2.5. A szárazságtűrés növelésének módszerei burgonyában

A burgonya szárazságtűrésével kapcsolatos vizsgálatok a 1960-as években kezdődtek (MONNEVEUX et al., 2013). Akárcsak más haszonnövényeknél, a burgonyánál is számos gén hatását vizsgálták az abiotikus stresszekre adott válaszokkal-, köztük a szárazság stresszel kapcsolatosan, amelyek közül néhányat az 2. táblázatban soroltam föl.

## 2. táblázat

### A burgonya szárazságtűrésének fokozására használt legismertebb gének listája

Gén	Génfunkció	Hatás	Hivatkozás
<b>Szárazság stressz szabályozásban részt vevő gének</b>			
<i>StMYB1R-1</i>	szárazság specifikus gének aktiválása	szárazság stressz tolerancia	SHIN et al., 2011
<i>DREB1B</i>	transzkripciós faktor	szárazság- és fagy-tűrés	MOVAHEDI et al., 2012
<i>AtGRI</i>	megemelkedett glutation szint	szárazság stressz tolerancia	ELTAYEB et al., 2010
<i>SOD3:1, DHN4, DREB/CBF1, ROB5</i>	Mangán szuperoxid- dizmutáz, dehidrin 4, hidegre indukálódó transzkripciós faktor, <i>LEA3</i> fehérjét kódoló stresszre indukálódó gén	magasabb hozam szárazság és hideg stressz alatt	WATERER et al., 2010
<b>Ozmolitok szintézisében szerepet játszó gének</b>			
<i>SST/FFT</i>	fruktán akkumuláció	alacsony vízellátás esetén prolin akkumuláció	KNIPP et al., 2006
<i>codA</i>	glicin-betain szintézis	oxidatív-, só- és szárazság stressz tolerancia	AHMAD et al., 2008
<i>BADH</i>	glicin szintézis	só- és szárazság stressz tolerancia	ZHANG et al., 2011
<i>otsA, otsB</i>	trehalóz szintézis	szárazság tolerancia	DEBAST et al., 2011
<i>TPS1, TPS2</i>	trehalóz szintézis	szárazság tolerancia	3. táblázat

### 2.5.1. Szárazságtűrés javítása szárazság stressz szabályozásban részt vevő génekkel

A növényekben az abiotikus stresszválaszban szerepet játszó MYC (myelocytomatosis oncogene)/MYB (myeloblastosis oncogene) regulon az ABA-függő jelátviteli úthoz tartozik (SOLTÉSZ, 2011). SHIN és munkatársai (2011) burgonyában az *IR-MYB* (MYB rokon) transzkripciós faktort azonosították (*StMYBIR-1*) és tesztelték abiotikus körülmények között. Bebizonyították, hogy a *StMYBIR-1* ABA kezelés hatására indukálódik, megemeli a szárazság toleranciát a burgonyában, megvédi a növényeket a vízvesztéstől és fokozza a szárazsággal kapcsolatos gének expresszióját (SHIN et al., 2011).

MOVAHEDI és munkatársai (2011) *DREB1B*-vel transzformált burgonya vonalakat vizsgáltak. Azt találták, hogy a nem transzformált növényekkel ellentétben, több prolin halmozódott fel a transzgenikus növényekben a szárazság-, illetve hideg stressz során és nem változott a növények relatív víztartalma a vízhiányos körülmények ellenére sem. Megfigyelték továbbá, hogy 14 nappal az öntözés megszüntetését követően a vad típusú növények erősen hervadtak, míg a transzformáltak szemmel láthatóan jobban bírták a stresszt.

ELTAYEB és munkatársai (2010) az *Arabidopsis* glutation-reduktáz génnel (*AtGRI*) transzformáltak burgonya növényeket. A transzformánsokban megemelkedett a glutation-reduktáz és glutation-S-transzferáz aktivitás, illetve magasabb volt a glutation tartalom, mint a nem transzformált növényekben. Szárazság stressz után a transzgenikus növények gyorsabban regenerálódtak és szemmel láthatóan is kevésbé károsodtak, mint a vad típus.

WATERER és munkatársai (2010) több génnel is kísérleteztek burgonyában, szabadföldön és növényházban egyaránt. Desirée növényeket transzformáltak búza mitokondriális mangán szuperoxid-dizmutázzal (*SOD3:1*), árpából izolált dehidrin 4-gyel (*DHN4*), repce *DREB/CBF 1* transzkripciós faktorról és rozsnok *ROB5* génnel. A transzformációt tovább kombinálták azzal, hogy kétféle promotert használtak: a konstitutív expressziót biztosító *CaMV35S*-t és egy stresszre indukálódó, *Arabidopsis* promotert, a *COR78*-at. A transzformált növények mindegyike nagyobb ellenállóságot mutatott a szárazság-, hő- és hideg stresszel szemben mind szabadföldi, mind növényházi körülmények között, mint a kontroll növények.

## 2.5.2. Szárazságtűrés javítása ozmolitok szintézisében szerepet játszó génekkel

### 2.5.2.1 A prolin és glicin-betain szerepe az abiotikus stresszválaszban

KNIPP és munkatársai (2006) a prolin felhalmozódással kapcsolatos változásokat vizsgálták szárazság stressz hatására burgonya levelekben. A növényeket SST/FFT-vel (fruktán:fruktán-1-fruktozil-transzferáz, szacharóz:szacharóz-1-fruktozil-transzferáz) transzformálták. A növények leveleiben vízhiányos körülmények között megemelkedett a prolin szint, ami összefüggésben állt a levelek megnövekedett RWC értékével is.

Számos irodalmi adat utal arra, hogy abiotikus stressz során GB halmozódik fel a növényekben (SAKAMOTO és MURATA, 2000). Vannak azonban olyan növények, köztük a burgonya is, amelyek nem képesek GB-t szintetizálni (GIRI, 2011). AHMAD és munkatársai (2008) a Superior burgonyafajtába vitték be a GB szintézisben kulcsszerepet játszó kolin-oxidáz (*codA*) gént. A gén elé az oxidatív stresszre indukálódó *SWPA2* promótert helyezték. A transzformánsokat paraquat jelenlétében szelektálták. A transzgenikus növények a kloroplasztiszbán GB-t szintetizáltak. Oxidatív stresszt követően a transzgenikus növényeken kisebb volt a membránkárosodás és magasabb toleranciát mutattak só- és szárazság stresszel szemben - magasabb volt a víztartalmuk és a biomassza tömegük, mint a nem transzformált, kontroll növényeké.

A másik, GB szintézist elősegítő gén, a *BADH*. ZHANG és munkatársai (2011) spenótból származó *BADH*-t juttattak be a Gannongshu burgonyafajtába. A vizsgált növényeken negatív korrelációt figyeltek meg a *BADH* expresszió és a levélkonduktancia között szárazság- és só stressz során. Megfigyelték továbbá, hogy a NaCl és PEG kezelés után a transzgenikus növények friss súlya 17–29%-kal magasabb volt, mint a kontrollé.

### 2.5.2.2. A trehalóz szerepe az abiotikus stresszválaszban

A trehalóz egy nem redukáló diszacharid, ami két glükóz molekulából áll. A természetben gyakori az előfordulása: baktériumokban, gombákban, élesztőben és növényekben egyaránt előfordul és a szárazságtűrésben fontos ozmoregulátor szerepet játszik (IORDACHESCU et al., 2008; JAIN és ROY, 2009). Előfordul ugyan a növényekben is, de nagyon alacsony mennyiségben (kivéve azokat a sivatagi növényeket, amelyek hosszú száraz időszak után is képesek regenerálódni).

A trehalóz két lépésben szintetizálódik a baktériumokban, élesztőkben és a növényekben is (8. ábra).



**8. ábra:** Trehalóz szintézis. TPS: trehalóz-foszfát-szintáz; TPP: trehalóz-foszfát-foszfátáz

Első lépésben a glükóz-6-foszfátból és UDP-glükózból a TPS trehalóz-6-foszfátot (T6P) szintetizál, amit a TPP trehalózzá alakít. A TPS és TPP enzim komplexet alkot, amit élesztőben a *TPS1* és *TPS2*, míg baktériumokban az *otsA*, és *otsB* gén kódol. DEBAST és munkatársai (2011) kísérleteiben a gumóspecifikus *B33* promóterrel együtt juttaták be burgonyába a TPS-t kódoló *otsA* gént, illetve a TPP-t kódoló *otsB* gént. A több T6P-t szintetizáló *otsA* vonalak gumóiban alacsonyabb keményítő és ATP szintet, valamint intenzívebb respirációs értéket tapasztaltak. Ezzel ellentétben az *otsB* vonalaknál, ahol a T6P mennyisége kevesebb volt, az oldható cukrok, hexóz foszfátok és az ATP mennyisége megemelkedett, miközben a gumók friss súlyra számított keményítő tartalma nem változott. A TPP vonalak gumói hosszúkásak voltak, míg a TPS vonalaké nem különböztek lényegesen a kontrolltól. Viszont mindkét transzgenikus vonalnál csökkent a gumóhozam. A TPP vonalak esetében az alacsony szénfelhasználás következtében az oldható cukor tartalom megemelkedett, ami feltételezhetően azt jelzi, hogy ezek a növények nem fordítanak elég energiát a gumónövekedésre. A megnövekedett ATP szint viszont arra utal, hogy a csökkent szénfelhasználásért nem közvetlenül az ATP mennyisége felelős ezekben a vonalakban. Az élesztő *TPS1* és *TPS2* génjét több növényfajba is bevitték az abiotikus stressztűrő képesség javítására (3. táblázat).

### 3. táblázat

**Élesztő *TPS1* és *TPS2* génnel transzformált növények és abiotikus stresszre adott válaszuk**

Gén	Promóter	Növény	Hatás	Hivatkozás
<i>TPS1</i>	<i>CaMV35S</i>	burgonya	szárazság tolerancia	YEO et al., 2000
<i>TPS1</i>	<i>CaMV35S</i>	paradicsom	Szárazság- és só tolerancia	CORTINA et al., 2005
<i>TPS1-TPS2</i>	<i>AtRbcS1A</i> , <i>AtRAB18</i>	<i>Arabidopsis</i> dohány	szárazság tolerancia	KARIM et al., 2007
<i>TPS1-TPS2</i>	<i>RD29Af</i>	<i>Arabidopsis</i>	Szárazság-, só-, hő- és hideg tolerancia	MIRANDA et al., 2007
<i>TPS1</i>	<i>StDS2</i>	burgonya	szárazság tolerancia	STILLER et al., 2008 KONDRÁK et al., 2011 KONDRÁK et al., 2012

YEO és munkatársai (2000) *CaMV35S-TPS1*-gyel transzformált burgonya növényei azonban amellet, hogy jobban tűrték a szárazságot, morfológiai deformációkat is mutattak „in

*in vitro*” körülmények között (törpenövekedés, sárgás, hosszúkas levelek, deformálódott gyökér). Érdekes módon ezek a morfológiai elváltozások megszűntek, amint kiültették a növényeket a talajba.

CORTINA és munkatársai (2005) paradicsomon próbálták ki a *CaMV35S* promóterről folyamatosan átíródó *TPS1* gén hatását. Ők is tapasztaltak pleiotropikus elváltozásokat (vékony hajtások, merev, sötétzöld levelek, abnormális gyökérfejlődés). Megfigyelték továbbá azt is, hogy a transzgenikus paradicsom levelekben a klorofill és keményítő tartalom magasabb volt, mint a kontroll levelekben, de ugyanakkor ezek a növények fokozott toleranciát mutattak a szárazság-, só- és oxidatív stresszel szemben. Mindebből arra a következtetésre jutottak, hogy a szénhidrát anyagcserében végbemenő változások összefüggnek a trehalóz bioszintézisével, ami hatással van a növények stresszel szembeni viselkedésére.

KARIM és munkatársai (2007) olyan konstrukciót juttattak be *Arabidopsis* és dohány növényekbe, amivel ezeket a nem kívánt pleiotropikus mellékhatásokat kiküszöbölve sikerült szárazság toleranciát elérniük a növényekben. Az egyik konstrukcióban a *TPS1* gént és egyszerre a *TPS1-TPS2* géneket az *Arabidopsis Rubisco* génjének promóterével (*AtRbcS1A*) építették össze. Ez a promóter a zöld növényi részekben erős, folyamatos expressziót eredményez. A másik esetben egy szárazság stresszre indukálódó, szintén *Arabidopsis*-ból származó promótert használtak, és ezt tették a *TPS1* gén, vagy a *TPS1-TPS2* génkombináció elé. A harmadik esetben az *AtRbcS1A* promótert egy tranzit peptidet kódoló génszakaszhoz kapcsolták, aminek segítségével a TPS1 fehérjét a kloroplasztisban expresszáltatták. A *TPS1* gént folyamatosan expresszáló dohány növények növekedése kezdetben elmaradt a kontrollétól, a későbbiekben azonban ezek a növények elérték a normál méretet és nem mutattak különbséget a virágzásban és maghozamban sem. Szemben a csak a *TPS1* gént folyamatosan expresszáló növényekkel, a *TPS1-TPS2* transzgenikus dohány növények nem mutattak növekedésbeli eltérést a kontrollhoz képest. Feltételezhetően a *TPS2* expressziója enyhíti, vagy teljesen megszünteti a cukor-foszfát által okozott negatív hatásokat. A stresszre indukálódó konstrukcióval létrehozott *TPS1* és *TPS1-TPS2* transzgenikus dohány növények nem mutattak növekedésbeli eltéréseket. De mind a stresszre indukálódó, mind pedig a konstitutív *TPS1* expresszió esetében hasonló volt a szárazságtűrése a növényeknek, annak ellenére, hogy a folyamatosan expresszáló konstrukciókban volt a legmagasabb a trehalóz szintje. Mindebből arra következtettek KARIM és munkatársai (2007), hogy nem a trehalóz mennyisége okozza a megnövekedett toleranciát.

*Arabidopsis*-ban a kloroplasztisban a TPS1 folyamatos jelenléte fejlődési rendellenességek nélkül fokozta a növények szárazságtűrő képességét. Sem a konstitutív promótert, sem a stresszre indukálódó promótert tartalmazó *TPS1-TPS2* konstrukcióval létrehozott transzgenikus növényekben nem okozott negatív hatást a TPS1 és a TPS2 jelenléte a

kloroplasztiszban. A citoszolban azonban a konstitutív expresszió gyökérfejlődési rendellenességet és növekedésbeli visszamaradottságot okozott, amiből arra következtettek, hogy a citoszolban felhalmozódó T6P felelős a negatív hatásokért. A szárazság stresszt követő regenerálódást is vizsgálták Petri csészében *Arabidopsis*-on. Azok a növények, amelyekben a kloroplasztiszban expresszált a TPS1, jobban regenerálódtak a szárazság stresszt követően, mint a kontroll, vagy azok a növények, amelyekben a citoszolban termelődött a TPS1 fehérje. A növényházban, talajon végzett kísérletekben is jobb volt a szárazságtűrése a TPS1-t expresszáló növényeknek, mint a kontrollnak (KARIM et al., 2007).

MIRANDA és munkatársai (2007) is hasonló jelenséget tapasztaltak *Arabidopsis*-on. A TPS1-TPS2 géneket *CaMV35S* illetve *rd29A* promóter konstrukciókkal juttatták be a növényekbe. Azok a növények, melyekben a TPS1 és TPS2 gén is expresszált, ellenállóbbak voltak a szárazság-, só-, hő-, és hideg stresszel szemben anélkül, hogy morfológiai eltérést mutattak volna a nem transzformált növényekhez képest. Azok a növények viszont, amelyek csak a TPS1 gént expresszálták eltértek növekedésben, levélszínükben és formájukban is a kontrolltól.

STILLER és munkatársai (2008) két transzgenikus burgonyavonalat (T1, T2) hoztak létre, melyek az élesztő TPS1 génjét expresszálták. A transzgenikus vonalakat marker mentes transzformációval állították elő és egy burgonyából származó, szárazságra indukálódó promótert (*StDS2*) használtak a gén megnyilvánítására (DÓCZI et al., 2002). Az *StDS2* azonban – valószínűleg a beépülés helyének, környezetének hatására – csak kis mértékben indukálódott a szárazság során, sőt mindkét transzgenikus vonalban optimális körülmények között is egy alacsony expressziót biztosított a TPS1 számára. De az alacsony TPS1 expresszió ellenére is a növények szárazságtűrőbbek voltak, mint a kontroll: a levett levelek 8 órával később, a cserepes növények levelei 6 nappal később kezdtek el hervadni, mint a kontrollé és a sztómák is tovább megtartották konduktivitásukat. A TPS1 transzgenikus növények növekedése azonban optimális körülmények között elmaradt a kontrollétól, alacsonyabb volt a szén-dioxid fixációs rátájuk és a sztómaszámuk is.

A STILLER és munkatársai (2008) által létrehozott T1 és T2 transzgenikus vonalakat KONDRÁK és munkatársai (2011) transzkripció szinten vizsgálták. Az optimális körülmények között fejlődött és a szárazság-stresszelt növények leveleinek transzkriptumait POCI (Potato Oligo Chip Initiative, Agilent) microarray-vel (KLOSTERMANN et al., 2008) hasonlították össze. A POCI chipen 44290 gént reprezentáló oligo található, amiből 42034 burgonyából származik, és szekvenciájuk szabadon elérhető egy adatbázison keresztül (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>). KONDRÁK és munkatársai (2011) összesen 99 olyan gént találtak a TPS1 transzgenikus növények leveleiben, aminek eltért az expressziója a vad típushoz képest optimális



körülmények között. Szárazság stressz hatására összesen 379 génnek változott meg az expressziója a különböző vonalakban (KONDRÁK et al., 2012). A megváltozott expressziójú gének többsége a fotoszintézisben vagy a szénhidrát anyagcserében játszik szerepet és mind a vad típusban, mind a *TPSI* transzgenikus vonalakban csökkent az expressziójuk a stressz következtében.

## 2.6. A „priming” jelensége növényekben

Ha egy növényt patogéntámadás ér, akkor ez növelheti ellenálló képességét a következő fertőzéssel, illetve más patogénnel szemben is (DURRANT és DONG, 2004; RYALS et al., 1996). Ezt nevezzük indukált rezisztenciának. Az indukált rezisztencia lehet lokális vagy kiterjedt, szisztemikus, amikor a kiváltott rezisztencia térben elválik az indukálás helyétől. Azt a jelenséget, amikor nekrotizáló patogének vagy egyes rizobaktériumok felerősítik ezt a védekező mechanizmust „priming”-nak nevezzük. Ez az állapot nemcsak mikroorganizmusokkal, hanem különböző szerves és szervetlen vegyületekkel is kiváltható a növényekben. Az ilyen állapotban lévő növények sejtszinten gyorsabban és nagyobb ellenállósággal reagálnak az őket ért biotikus vagy abiotikus stresszekkel szemben (PRIME-A-PLANT GROUP, 2006).

A „priming” egyik típusa a nem-nekrotizáló rizobaktériumok által kiváltott rezisztencia, ami a gyökérből a hajtásba terjed és ezért indukált szisztemikus rezisztenciának (induced systemic resistance – ISR) is nevezik. Az ISR jázminsav/etilén (JA/ET) útvonalakon keresztül hat és nem változtatja meg a „pathogen-related” (*PR*) gének expresszióját (VAN LOON et al., 1998; PIETERSE et al., 1998).

A „priming” másik típusa a szisztemikusan szerzett rezisztenciával, a „systemic acquired resistance”-szel (SAR-ral) kapcsolatos. Ez esetben egy lokális, hajtást ért fertőzés vagy avirulens baktériummal történt kezelés után a növény távolabbi szövetei, szervei is ellenállóbbá válnak a patogénnel szemben (RYALS et al., 1996; STICHER et al., 1997). A SAR során szalicilsav (SA) halmozódik fel a növényekben, ami számos *PR* gént bekapcsol (DURRANT és DONG, 2004). Ezt a fajta védelmet szerves vagy szervetlen anyagokkal is kiválthatjuk a növényekben (KUC, 2001). Ilyen anyagok az INA (2,6-diklór-izonikotinsav) (KESSMANN et al., 1994), a BTH (benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav S-metilészter) (FRIEDRICH et al., 1996; GÖRLACH et al., 1996) és a BABA ( $\beta$ -amino-vajsav) (COHEN, 2002; JAKAB et al., 2001). A BABA-val végzett kutatásokból kiderült, hogy az immunkemikáliákkal indukálható rezisztencia szorosan összefügg a patogén fertőzés során fellépő védekező reakciókkal. ZIMMERLI és munkatársai (2000) például azt találták, hogy a BABA-val kezelt *Arabidopsis*-ban a *PR-1* gén gyorsabban

indukálódik a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* fertőzés után, mint a nem kezelt növényekben. De számos más kísérlet is igazolja, hogy a BABA milyen sok patogén ellen és sok növényfajban ki tudja váltani ezt a fajta „szerzett” rezisztenciát (JAKAB et al., 2001).

JAKAB és munkatársai (2005) *Arabidopsis*-szal végzett kísérletekkel bizonyították a BABA jótékony hatását szárazság és sóstressz során is. Eredményeikből kiderült, hogy a BABA által kiváltott védelem összefügg az SA által indukálható *PR-1* és *PR-5* gének, és az ABA-függő *RAB-18* és *RD-29A* gének megnövekedett expressziójával. A vízmegvonást megelőzően 300 mM BABA-val kezelt *Arabidopsis* növényeknek a vízmegvonás után csak 35%-kal csökkent a víztartalmuk, míg a kontroll növényeknél 70%-os volt a vízveszteség. A BABA kezelés az ABA mutánsoknál nem váltotta ki a védelmet, míg az SA hiányos növények a vad típushoz hasonló reakciót mutattak. A BABA kezelés nem vezetett ABA akkumulációhoz, mégis a kezelt növényekben az ozmotikus stressz során megnőtt az ABA koncentrációja, ami további ABA-függő gének expressziójához és intenzívebb sztómazáródáshoz vezetett (JAKAB et al., 2005).

### 2.6.1. A *PRLIP* géncsalád

A „priming” során bekövetkező „immunvédelem” szorosan összefügg a PR fehérjékkel. Ezeket a fehérjéket kódoló *PR* géneket először VAN LOON és munkatársai (1970) írták le dohány mozaik vírussal fertőzött dohánylevelekben. Ma már 17 géncsaládba sorolható a különböző növényekben beazonosított PR fehérjéket kódoló gének listája (VAN LOON et al., 2006). Vannak olyan PR fehérjék, amelyek gátolják a patogének terjedését, növekedését, és vannak olyanok, amelyek a SAR kiváltásáért felelősek (RYALS et al., 1996).

JAKAB és munkatársai (2003) molekulárisan vizsgálták a *PR* génekhez hasonló expressziót mutató *PRLIP* (patogenezishez köthető lipáz) géneket. Homológiájuk alapján a *PRLIP* fehérjéket 3 alcsoportba sorolták. Az első a legnagyobb. Ide tartoznak a *PRLIP1*, *PRLIP2*, *PRLIP4*, *PRLIP5*, *PRLIP6* és *PRLIP7* fehérjék. A második alcsoportba a *PRLIP3* és *PRLIP9*, a harmadikba pedig a *PRLIP8*-at sorolták. A második és harmadik alcsoportba tartozó fehérjéket kódoló génekhez hasonló géneket találtak egyes egy-, illetve kétszikűekben, köztük a burgonyában is, viszont az első alcsoportba tartozó fehérjékhez hasonló fehérjéket kódoló géneket más növényfajban nem tudtak azonosítani.

*Arabidopsis* növényekben a *PRLIP1* expressziója megemelkedik BABA, SA és ET kezelés, valamint *Pseudomonas* baktériummal történt fertőzés hatására is. Ugyanakkor a *PRLIP1* expressziója független a JA-tól. *Arabidopsis*-ban a *PRLIP2* szintén indukálódik SA és patogén fertőzés hatására, azonban enyhébb mértékben, mint a *PRLIP1* (JAKAB et al., 2003).

Egy másik kísérletben mélyebbre hatóan vizsgálták ezeket a fehérjéket a különböző hormonkezelések után (SA, ET, JA), valamint azt is nézték, hogy a különböző szervekben hogyan indukálódnak ezek az gének (SZALONTAI és JAKAB, 2010). A *PRLIP3*, *PRLIP8* és *PRLIP9* gének a gyökérben, szárban és a becőben indukálódtak a legerőteljesebben. Ezek közül is a *PRLIP3* expressziója tovább emelkedett SA és JA kezelés hatására. A *PRLIP4* és *PRLIP6* gének expressziója ezzel ellentétben csak a gyökérben volt kimutatható. A *PRLIP1* a növény minden vizsgált zöld szervében megnyilvánult, de a becőben volt a legmagasabb az expressziója. A *PRLIP2* mRNS-t viszont csak a becőben találták. A levelekben a *PRLIP1* és *PRLIP2* az SA, a *PRLIP6* a JA, a *PRLIP1* és *PRLIP6* átírása pedig az ET kezelés hatására indukálódott.

### 2.6.2. „Priming” kísérletek burgonyában

SI-AMMOUR és munkatársai (2003) a *Phytophthora infestans* fertőzésre érzékeny Bintje burgonyafajtát vizsgálták. A fertőzést megelőzően 2 nappal BABA-val (1 mM) kezelték a növényeket és a rezisztens Matilda fajtához hasonló ellenálló képességet tapasztaltak.

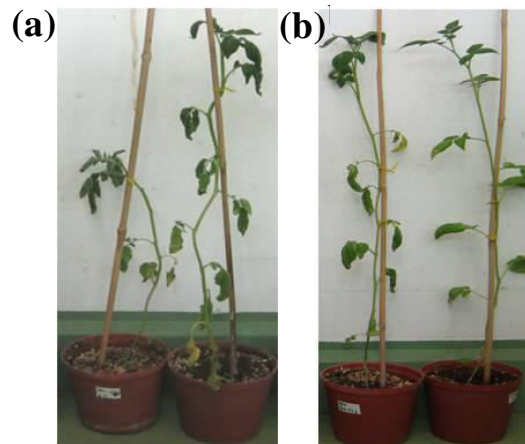
MACHINANDIARENA és munkatársai (2012) a kálium-foszfát hatását vizsgálták burgonyában ugyancsak *P. infestans* fertőzés során. Kísérleteikből kiderült, hogy a kálium-foszfát szintén alkalmas a „priming” kiváltására, és ez a mechanizmus az SA útvonallal áll összefüggésben.

FLORYSZAK-WIECZOREK és munkatársai (2012) kimutatták, hogy a BABA, GABA, INA és laminarin kezelés aktiválja a burgonya nitrogén-monoxiddal (NO-val) összefüggő folyamatait, aminek következtében az gyorsabban és jobban reagál a *P. infestans* fertőzésre. ARASIMOWICZ-JELONEK és munkatársai (2013b) szintén a fent említett négy immunkemikáliát használták burgonyában. Összesen 25 olyan fehérjét találtak, amelyek felhalmozódtak a kezeléseket során. Ebből 13 az S-nitrozilált glutation-reduktáz (mint NO-donor) kezelés során is akkumulálódott. Az S-nitrozotiolok (SNO) az NO reverzibilis S-nitrozilációs reakciója során keletkeznek a fehérjék cisztein aminosavának tiol csoportjával történő kölcsönhatás során. Az NO képes más tiolokkal is reakcióba lépni, mint például a glutationnal, amiből S-nitrozilált glutation (SNOG) keletkezik, és aminek a mennyiségét a SNOG-reduktáz (SNOGR) szabályozza (KOLBERT, 2009).

ARASIMOWICZ-JELONEK és munkatársainak (2013a) egy másik kísérletéből az is kiderült, hogy ha alumíniummal (Al) kezeljük a burgonya gyökerét, akkor mérséklődnek a *P. infestans* fertőzés jelei a levélen. A gyökérben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhalmozódást és az SA valamint az NO útvonalak szisztémikus aktiválódását figyelték meg a levelekben. Az Al kezelés hatására a gyökerekben a *PR-1*, a levelekben a *PR-2* és *PR-3*, valamint mindkét szervben a *PAL* expresszió

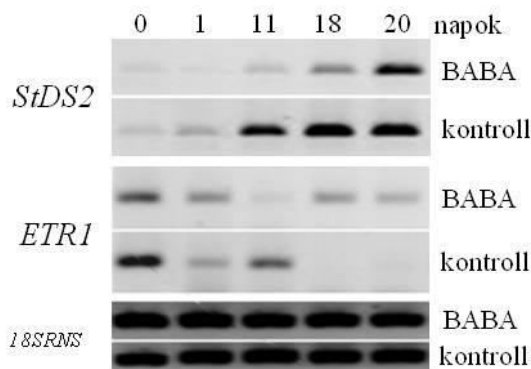
emelkedett meg szignifikánsan. Az A1-lel nem kezelt, a gyökértől távoli burgonya részekben (levél, hajtás) nőtt az NO szintézis, amivel együtt az SNO-k mennyisége és a SNOGR aktivitás is emelkedett. Bár az SNOGR aktivitás nem befolyásolta az SNO-k mennyiségét a levelekben, az SNOGR kétségkívül fontos szerepet játszik a burgonya védekezőrendszerében.

Az eddig említett közleményekben mind a „priming” *P. infestans*-szal szembeni hatását vizsgálták burgonyában. Ezzel szemben SÓS-HEGEDŰS és munkatársai (2014) arra voltak kíváncsiak, hogy hogyan hat a BABA a burgonya szárazságtűrő képességére. Kimutatták, hogy a BABA-val előkezelt szárazság-stresszelt burgonyanövények levelének magasabb a víztartalma és jobb a gumóhozama is, mint a nem kezelt szárazság-stresszelt növényeknek (9. ábra).



**9. ábra:** BABA hatása a burgonya szárazságtűrő képességére. **(a)** Szárazság-stresszelt kontroll növények **(b)** BABA-val kezelt szárazság-stresszelt növények

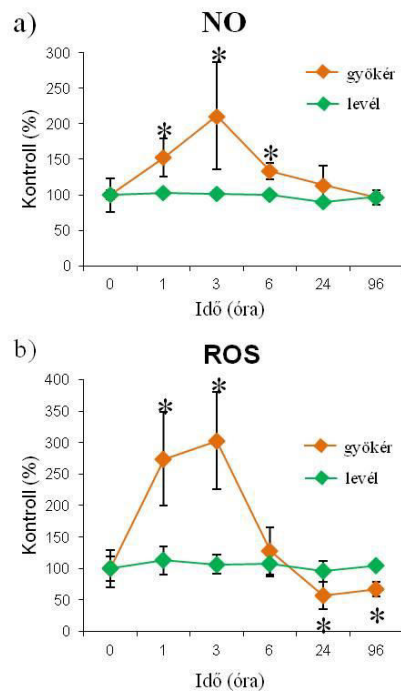
BABA-val öntözött *Arabidopsis* növényeknél 761 gén expressziójának változását írták le ZIMMERLI és munkatársai (2008), köztük 46 stresszválaszért felelős génét is. Ezek egy része az ABA illetve az ET jelátviteli útvonalban szerepet játszó gén volt. Ebből kiindulva SÓS-HEGEDŰS és munkatársai 42 stressz-, illetve hormon-szabályozáshoz köthető gént választottak ki és vizsgálták expressziójukat a BABA-val kezelt illetve nem kezelt növények leveleiben szárazság stressz során. Bár a kezelt és kezeletlen növények leveleinek RWC értéke között nem találtak különbséget 11 nappal a vízmegvonást követően, a talaj víztartalma jelentősen csökkent, ami a kontroll növényekben a szárazság-indukálható *StDS2* expressziójának emelkedését okozta. Ugyanakkor ez a BABA-kezelt növényekben csak később, a vízmegvonás követően 18-20 nappal következett be. Az *ETR1* gén viszont tovább expresszált a BABA-kezelt, mint a nem kezelt növények levelében (10. ábra).



**10. ábra:** A BABA-kezelt és kontroll növények levelében RT-PCR-rel kimutatott *StDS2* és *ETR1* expresszió szárazság stressz alatt. A *18SRNS* expressziója a mennyiségi kontroll.

Az *ETR1* az etilén receptor 1 kódoló génje. Az ET - többek között - a levél öregedéséért is felelős hormon. A szárazság hatására a levelek gyorsabban öregednek (ZHANG és ZHOU, 2012), ami összefügghet az ET receptorok mennyiségének csökkenésével. Az ET receptorok ugyanis negatív regulátorok (WANG et al., 2013), azaz hiányuk felgyorsítja az öregedést, míg a BABA-kezelt növényekben fennmaradó expressziójuk késleltetheti ezt a folyamatot. Feltételezhetően a „priming” hatására az ET indukálható gének szuppresszálódnak, ezáltal a levelek öregedése később következik be, míg a BABA-val nem kezelt növényekben a csökkenő ETR szint a levelek gyorsabb öregedéséhez vezet.

A kísérlet egy másik részében SÓS-HEGEDŰS és munkatársai a Szegedi Tudományegyetem Növénybiológia Tanszékének munkatársaival együttműködve a növények gyökereinek és leveleinek ROS és NO tartalmát vizsgálták. A BABA-val kezelt növények gyökereiben mindkét anyag koncentrációja átmenetileg megemelkedett, míg a levelekben nem változott a szintjük (11. ábra).



**11. ábra:** A gyökérben és levélben mért NO és ROS koncentráció %-os változása BABA kezelés után

A túlzott ROS felhalmozódás sejthalálhoz vezet, ami azonban megfelelő antioxidánsokkal megelőzhető. Kukoricában a gyökér NO-os kezelése után megemelkedett az aszkorbát-peroxidáz, glutation-peroxidáz és glutation-reduktáz aktivitás, és ezzel együtt az aszkorbát és glutation mennyisége is, ami csökkentette a  $H_2O_2$  felhalmozódást sóstressz alatt (KEYSTER et al., 2012). Az ET-nek szintén fontos szerepe van a programozott sejthalálban (programmed cell death - PCD). Kimutatták, hogy a kamptotecin (DE JONG et al., 2002), a kadmium (YAKIMOVA et al., 2006) és a sóstressz által indukált PCD (POÓR et al., 2013) során ET, és ennek hatására  $H_2O_2$  halmozódik fel a paradicsom sejtekben. A gyökérben a BABA hatására keletkezett  $H_2O_2$  és NO azonban valószínűleg csak jelmolekula. Hatásuk egy ma még ismeretlen jelátviteli útvonalon keresztül érvényesül a levélben.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. Anyagok

##### 3.1.1. Enzimek és vegyszerek

Az enzimeket a Fermentas International Inc. cégtől rendeltük. A vegyszereket a Bio-Rad, Duchefa, Fluka, Sigma-Aldrich és Reanal cégektől vásároltuk.

##### 3.1.2. Növények és baktériumok

#### 4. táblázat

<b>Növények</b>		
Név	Jellemző	Eredet
<i>Solanum tuberosum</i> cv. White Lady	magyar burgonya fajta	Burgonyakutatói Központ, Keszthely
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Desirée	holland burgonya fajta	Burgonyakutatói Központ, Keszthely
T1, T2	trehalóz-6-foszfát-szintáz 1 ( <i>TPS1</i> ) génnel transzformált White Lady vonalak	STILLER et al., 2008
LG vonalak	patogenesis-related lipase 2 ( <i>PRLIP2</i> ) génnel transzformált Desirée vonalak <i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260) törzssel transzformálva	jelen dolgozat
LA vonalak	patogenesis-related lipase 2 ( <i>PRLIP2</i> ) génnel transzformált Desirée vonalak <i>A. tumefaciens</i> ALG0 törzssel transzformálva	jelen dolgozat
PG vonalak	pPZP111 vektorral transzformált Desirée vonalak <i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260) törzssel transzformálva	jelen dolgozat
PA vonalak	pPZP111 vektorral transzformált Desirée vonalak <i>A. tumefaciens</i> ALG0 törzssel transzformálva	jelen dolgozat

## 5. táblázat

## Baktériumok

Név	Jellemző	Eredet
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG <math>\Phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), <math>\lambda</math>-</i>	HANAHAN, 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ALG0	szupervirulens törzs	HOOD et al., 1984
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1(pGV2260)	virulens törzs	DEBLAERE et al., 1985

## 3.1.3. Plazmidok és primerek

## 6. táblázat

## Plazmidok

Név	Jellemző	Eredet
pBluescript II KS (+)	<i>E. coli</i> klónozó vektor	Stratagene, La Jolla, USA
pPZP111	bináris növény- transzformációs vektor	HAJDUKIEWICZ et al., 1994
pPZP111::LIP2	<i>PRLIP2</i> gént tartalmazó pPZP111	Dr. Jakab Gábor, Pécsi Tudományegyetem
pRK2013	helper plazmid	FIGURSKI és HELINSKI, 1979
pBlueLIP2	<i>PRLIP2</i> gént tartalmazó pBluescript II KS (+)	jelen dolgozat

## 7. táblázat

## Primerek

Név	Szekvencia
LIP2_RNS_Rev	5'-ATG-GCC-GAC-GGA-AGA-AAA-TGA-AG-3'
LIP2_RNS_FW	5'-CGC-CTT-CGA-GAA-CCC-CTA-CC-3'
nptII_Rev	5'-ATA-GCG-GTC-CGC-CAC-ACC-CA-3'
nptII_Fw	5'-GAG-GCA-GCG-CGG-CTA-TCG-TG-3'



### 3.1.4. Táptalajok

SAMBROOK et al. (1989) útmutatásai alapján készítettük el az LB és YEB táptalajokat az *E. coli* illetve az *Agrobacterium* törzsekkel végzett munkákhoz a megfelelő antibiotikumokkal (*Agrobacterium*: rifampicin 100 mg/l, *E. coli*: kanamicin 10 mg/l, ampicillin 100 mg/l) kiegészítve.

A burgonya szövettenyésztést 2% szacharózt tartalmazó MS (MS2) és RM2 (MS2 táptalaj vitamin nélkül) táptalajokon (MURASHIGE és SKOOG, 1962) végeztük. A kalluszindukcióhoz CIM (MS táptalaj 1.6% glükózzal + 5 mg/l naftil-ecetsav, 0.1 mg/l benzil-amino-purin, 250 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamicin) a hajtásindukcióhoz SIM (MS táptalaj 1.6% glükózzal + 2 mg/l zeatin-ribozid, 0.02 mg/l naftil-ecetsav, 0.02 mg/l gibberellin, 250 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamicin) táptalajt használtunk (DIETZE et al., 1995).

## 3.2. Módszerek

### 3.2.1. Molekuláris biológiai módszerek

#### 3.2.1.1. Standard molekuláris biológiai technikák

##### a. Plazmid DNS tisztítás *E. coli*-ból és *Agrobacterium*-ból

A bakteriális plazmidok tisztítását SAMBROOK (1989) alkalikus lízis módszere alapján végeztük. A 4 ml tápfolyadékban felnevesztett plazmidokat tartalmazó *E. coli* sejteket 7000 rpm-mel 3 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk. A baktériumokat kétszer átmostuk 1 ml 1 M NaCl-dal, majd centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a szuszpenzióhoz 100 µl SOL I oldatot (50 mM glükóz) adtunk. Jégen összerázva hozzá adtunk 200 µl SOL II (0.2 N NaOH, 1% SDS) oldatot, melyet minden alkalommal frissen készítettünk. Hozzáadtunk 150 µl SOL III oldatot (5 M K-acetát), és 5 perc centrifugálás (4°C, 13000 rpm) után a felülúszót tiszta 2 ml-es Eppendorf csöbe tettük, hozzáadtunk még 400 µl fenol-kloroformot (1:1), vortexeltük és újra centrifugáltuk (4°C, 5 perc, 13000 rpm). A felülúszóból a DNS kicsapását 1 ml 100%-os etanol hozzáadásával végeztük. A centrifugálás után megmaradt csapadékot kétszer átmostuk 1-1 ml 75%-os etanollal, majd beszárítottuk és visszaoldottuk 30 µl desztillált vízben.

Az *Agrobacterium* sejtekből a plazmid DNS-t ugyanúgy tisztítottuk, mint *E. coli*-ból, azzal a kivétellel, hogy a SOL I oldat hozzáadása előtt kétszer átmostuk 1M NaCl-dal és a SOL I oldatot kiegészítettük 40 µl (200 mg/ml) lizozim oldattal.

b. Emésztés restrikciós endonukleázokkal

A plazmidok emésztését 30 µl reakció térfogatban, a gyártó (Fermentas) által leírt pufferrel és hőmérsékleten végeztük *Bam*HI restrikciós enzimmal.

c. DNS fragmentumok elválasztása és izolálása

A restrikciós emésztésből illetve PCR reakcióból származó fragmentumokat 1-1.2%-os agaróz gélen választottuk szét 1xTBE pufferben (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA), 1 mg/l etidium-bromid jelenlétében. Az elektroforézis után a fragmentumokat UV fényben detektáltuk. A megfelelő fragmentumokat a gélből szikével kivágtuk, és QIAEX II Gel Extraction Kittel vagy MinElute Gel Extraction Kittel (QIAGEN) tisztítottuk.

d. DNS fragmentumok klónozása

Az izolált fragmentumokat a *Bam*HI restrikciós hasító helyen emésztett pBluescript II KS klónozó vektorba építettük. A ligálási reakciót 20 µl végtérfogatban készítettük el, kb. 100 ng vektorral és ötszörös moláris többletben a fragmentummal. A reakcióhoz 2 µl 10xT4 ligáz puffert és 0.5 µl T4 ligázt (1000 CEU/µl) használtunk, majd 22°C-on inkubáltuk 15 percig.

e. Baktérium transzformáció

Az *E. coli* sejtek transzformálását INOUE et al. (1990) módszere alapján végeztük. A -70°C-on tárolt 200 µl kompetens sejtuszuspenzióhoz 10 µl ligátumot tettünk, majd 30 percig jégen hagytuk. Ezután fél percig 42°C-on tartottuk, majd visszahelyeztük a jégre 1-2 percig és 800 µl antibiotikum-mentes tápfolyadékot adtunk hozzá. A sejteket 37°C-on 1 órán át rázattuk, majd szelektív táptalajra (100 mg/l ampicillin) szélesztettük. A *lacZ* gén jelenlétén alapuló kék-fehér szelekcióhoz a szilárd táptalajra 10 µl 1 M izopropil-tio-β-D-galaktozidot (IPTG) és 40 µl 20 mg/ml-es 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozidot (X-Gal) szélesztettünk.

f. Polimeráz lánreakció (PCR)

A PCR reakció elegyet 50 µl végtérfogattal készítettük, kb. 100 ng DNS templáttal, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>-dal, 0.3-0.5 µM primerrel, 0.2 mM dNTP keverékkel (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1xPCR Taq pufferrel és 1 U Taq polimeráz enzimmal. A denaturálás 95°C-on történt (5 perc), majd a reakció elegyet 40 cikluson át 95°C-on 30 s-ig, 60°C-on 30 s-ig és 72°C-on 45 s-ig inkubáltuk. A keletkezett terméket 10 percig elongáltuk 72°C-on.

g. Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az *in vitro* növények leveleiből RNS-t izoláltunk STIEKEMA et al. (1988) módszere szerint. Az izolátumokból kb. 45 µg-nyi mennyiséget DNáz kezelésnek vetettünk alá (RNase Free DNase Set, Qiagen), majd az így kapott mintákat tisztítottuk (RNeasy Minelute Cleanup Kit, Qiagen). A cDNS szintézishez a tisztított mintákból 400 ng-ot használtunk (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). A cDNS szintézisből keletkezett mintákból 40 ng-nyit használtunk fel az RT-PCR-hez, amelyet 50 µl végtérfogatban raktunk össze (34.7 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 µl 10xTaq puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP, 1 µl *nptII* reverse primer, 1 µl *nptII* forward primer, 1 µl LIP2\_RNS\_Rev primer, 1 µl LIP2\_RNS\_FW primer, 0.3 µl Taq polimeráz). A primerekből 20 pMol-t használtunk reakciónként. A hőmérséklet program megegyezett a PCR-nél leírtakkal.

3.2.1.2. Nukleinsav izolálás burgonyából

a. DNS izolálás

A növények leveleiből a genomi DNS izolálását SHURE et al. (1983) módszere alapján végeztük. Körülbelül 0.2 g-nak megfelelő levelet dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben elporítottunk, majd hozzáadtuk a kivonó puffer (0.6 M NaCl, 0.1 M Tris pH 7.5, 40 mM EDTA, 4% Sarcosyl, 1% SDS) : 10 M urea : 2M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 1:1:0.02 arányú keverékét. A lízis után az oldatot kétszer extraháltuk 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel. A fázisokat centrifugálással (5 perc, 5000 rpm, 4°C) választottuk szét, majd 0.7 térfogat izo-propanollal (végkoncentráció 41.2%) a DNS-t kicsaptuk. A csapadékot visszaoldottuk 300 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), majd 20 µg RNáz A-val kezeltük (37°C, 1 óra). Az oldatból a DNS-t 1/20-ad térfogat 4 M Na-acetáttal és 3 térfogat abszolút etanollal (-70°C, 1 óra) kicsaptuk. A centrifugálást követően (25 perc, 10000 rpm, 4°C) a csapadékot 75%-os etanollal kétszer átmostuk, beszárítottuk és 50-100 µl steril desztillált vízben oldottuk. A DNS-t -20°C-on tároltuk.

b. RNS izolálás

A növények leveleiből az összRNS-t STIEKEMA et al. (1988) nyomán izoláltuk. Körülbelül 0.2 g levelet dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben elporítottunk, majd hozzáadtunk 750 µl kivonó puffert (0.2 M Na-acetát pH 5.2, 10 mM EDTA, 1% SDS) és 750 µl telített fenolt. Rövid ideig vortexeltük, majd centrifugáltuk (10 perc, 13000 rpm, 4°C).

Eltávolítottuk a felülúszót és hozzáadtunk 750 µl fenol-kloroformot (1:1). Újra vortexeltük és centrifugáltuk (10 perc, 13000 rpm, 4°C). A felülúszóból 600 µl-t átpipettáztunk 1.5 ml-es Eppendorf csőbe és 200 µl 10 M LiCl-ot adtunk hozzá. A csövet óvatosan forgattuk, míg meg nem jelent a kicsapódott RNS. Ezután 1 órán át jégen tartottuk, majd 10 percig, 4°C-on 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A csapadékot 1 ml 2.5 M LiCl-dal, majd 75%-os etanollal kétszer mostuk, beszárítottuk és 25 µl steril desztillált vízben oldottuk. Az RNS-t -20°C-on tároltuk.

### 3.2.1.3. Burgonya szövettényésztés

A burgonya növényeket *in vitro* 9-10 hetes állapotban, három leveles hajtáscsúcsairól és egy nóduszos szárszegmenseiről vegetatív módon szaporítottuk RM2 táptalajon papírdugóval lezárt kémcsövekben vagy MS2 táptalajon 0.5 literes befőttes üvegekben 16/8 h fény/sötét (fényerő 5000 lux) mellett, 24°C-on.

### 3.2.1.4. Transzgenikus növények előállítása

#### a. Plazmid átvitele *E. coli*-ből *Agrobacterium*-ba háromszülős keresztezéssel

A plazmidokat az *E. coli* sejtekből a két *Agrobacterium* törzs (1. táblázat) sejtjeibe a pRK2013 „helper” plazmid segítségével háromszülős keresztezéssel juttattuk át DITTA et al. (1980) módszere szerint. A donor, recipiens és „helper” törzseket szilárd táptalajról antibiotikum-mentes LB táptalajra oltottuk úgy, hogy a három törzs sejtjeiből egy-egy oltókacsnyit 100 µl steril desztillált vízben szuszpendáltunk, és ebből 25-25 µl-t egymásra cseppentettünk. A konjugáció 28°C-on 1 napig tartott. Ezután a baktériumokat felkapartuk a lemezről, 100 µl steril desztillált vízben szuszpendáltuk és antibiotikummal kiegészített (100 mg/l rifampicin, 25mg/l kanamicin) szilárd táptalajra szélesztettük.

#### b. Burgonya transzformáció

A transzgenikus burgonya növényeket DIETZE et al. (1995) módszere szerint, *Agrobacterium*-közvetítette levél transzformációval állítottuk elő. A háromszülős keresztezésből származó transzkonjugánsokat folyékony YEB táptalajon (kanamicin 25 mg/l, rifampicin 100 mg/l) 28°C-on növesztettük, majd 2 ml-es Eppendorf csőbe téve, 2 percig, 8000 rpm-mel centrifugáltuk. A leülepedett baktériumokhoz hozzáadtunk 1-1 ml MS2 tápfolyadékot. A transzformációhoz 6 hetes MS2 táptalajon befőttes üvegekben nőtt *in vitro* növények 4-7. levélszintjének leveleit használtuk. Az MS2 tápoldatot és a baktérium szuszpenzióból 50-50 µl-t

tartalmazó Petri csészébe 15-20 levelet helyeztünk, melyeket a fonákukon steril zsilett pengével 3-4 helyen megsebezünk, a levél alapi részét levágtuk. A megsebezett leveleket a fonákkal felfelé helyeztük el az MS2 tápoldatba, és két napig sötétben 24°C-on tartottuk. A következő lépésben a leveleket kalluszindukáló (CIM) táptalajra helyeztük. Egy hét múlva áthelyeztük őket hajtásindukáló (SIM) táptalajra. A keletkező hajtásokat hetente áttettük antibiotikumot is tartalmazó RM2 táptalajra, a leveleket pedig visszahelyeztük friss SIM táptalajra. Hajtásokat összesen 8 héten át gyűjtöttünk. A táptalajok az *Agrobacterium* elölésére 250 mg/l cefotaximot, a pozitív szelekcióra pedig 50 mg/l kanamicint tartalmaztak.

### 3.2.2. Analitikai módszerek

#### 3.2.2.1. Kis molekulású, poláros vegyületek meghatározása

##### a. Kivonat készítése és származékolása burgonya levélből és gumóból

A vizsgált növényi anyagokat SCHAUER et al. (2004) módszere szerint készítettük elő a vizsgálatokra. A növények alól frissen felszedett gumókat egyenlően elosztottuk, az egyik csoportot azonnal feldolgoztuk, a másikat tárolás céljából félreraktuk. Felhasználás előtt a gumókat megmostuk és meghámoztuk. A meghámozott gumókat univerzális konyhai aprítóval (Bosch) pépesre daráltuk. Három adagra osztva, alufóliába csomagolva, -70°C-on tároltuk felhasználásig. Az így előkészített mintákat dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben eldörzsöltük, amiből azután 125 mg-ot kimértünk 2 ml-es Eppendorf csöbe. Gondosan ügyeltünk arra, hogy a mintánk ne olvadjon fel, amíg a kivonó puffert, 700 µl kromatográfiai mérésekre alkalmas nagy tisztaságú metanolt, hozzá nem adjuk. Belső sztenderdnek 30 µl ribitol (0.2 mg/ml vízben oldva) használtunk. A mintát vortexeltük, majd 70°C-on, 15 percig, 1000 rpm-mel rázattuk. Ezután hozzáadtunk egy térfogat (730 µl) MQ tisztaságú vizet és 375 µl nagy tisztaságú kloroformot. Alapos vortexelés után 15 percig, 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszóból 150 µl-t beszáritottunk vákuum szárítóban. A származékolást első lépésben 40 µl metoxiamin-hidroklorid (MEOX) - piridin (20 mg MEOX 1 ml piridinben oldva) eleggyel végeztük (37°C, 90 perc, 300 rpm rázatás), majd 60 µl N-metil-N-[trimetil-szilil]-trifluoro-acetammiddal (MSTFA-val) (37°C, 30 perc, 300 rpm rázatás) folytattuk.

b. Elválasztási körülmények és a vegyületek azonosítása

A származékolt mintákat gázkromatográffal összekötött tömegspektrométerrel (GC-MS; Finnigan Trace/DSQ, Thermo Electron Corp., Austin, TX, USA) vizsgáltuk. A mintákból 1 µl-t injektáltunk a 30 m hosszú kapilláris kolonnára (Rxi-5ms, 0.25 mm ID, 0.25µm df, Restek, Bellefonte, PA, USA) split módban. Az injektálási hőmérséklet 230°C, az ionforrás hőmérséklete 250°C volt. A hélium vivőgáz 1 ml/perc áramlási sebességre volt állítva. A hőmérséklet program a következő volt: 2 percig 90°C-on tartottuk a gázkromatográfot, majd percenként 25°C-kal felfűtöttük 165°C-ra és ezen a hőmérsékleten tartottuk 15 percig. A második szakaszban percenként 6°C-kal emeltük a hőmérsékletet 330°C-ig, és az oszlop tisztulása érdekében ezen a hőmérsékleten tartottuk a gázkromatográfot 1.5 percig. A detektálás TIC (total ion chromatogram) pozitív módban történt.

A metabolitok azonosítása a NIST 11 tömegspektrometriás szoftverrel illetve az interneten szabadon elérhető Golm Metabolome Database segítségével történt a vegyületek tömegspektruma és jellemző retenciós ideje alapján.

3.2.2.2. Trehalóz-6-foszfát (T6P) tartalom meghatározása

a. Kivonat készítése burgonyagumóból

A T6P meghatározása LUNN et al. (2006) módszere szerint történt, némi mennyiségi változtatással. Folyékony nitrogénban elporított 250 mg gumó mintát hűtött 2 ml-es Eppendorf csőbe kimértünk, hozzáadtunk 500 µl -20°C-os kloroform/methanol elegyet (3:7, v/v), vortexeltük és -20°C-on tartottuk 2 órán keresztül, időnként vortexeltük. Ezután hozzáadtunk 400 µl MQ vizet. Centrifugáltuk (13000 rpm, 4 perc, 4°C), és a vizes-metanolos fázist 5 cm átmérőjű Petri csészébe helyeztük és 4°C-on tartottuk. Az extrakciót megismételtük újabb 400 µl hideg MQ vízzel, majd egyesítettük a két kivonatot. Az oldatban maradt metanolt steril elszívó boxban elpárologtattuk. A megmaradt vizes fázist MQ-val kiegészítettük 1ml-re. A nagy molekulású részecskéket Amicon Ultra-4 (Millipore) oszlopra helyezve, centrifugálással (4000 g, 20 perc, 4°C) eltávolítottuk. 100 µl kivonathoz hozzáadtunk 20 µl ribitolt (20 mg/ml) és beszárítottuk. A származékolást a 3.2.2.1.a pontban leírtak szerint végeztük.

b. Elválasztási körülmények és a T6P azonosítása

Az elválasztási körülmények megegyeznek a 3.2.2.1.b pontban leírtakkal. A detektálás SIM (selected ion monitoring) pozitív módban történt, az  $m/z$  271, 315, és 387 tömegspektrumokkal. A T6P sztenderdet a Sigma-tól vásároltuk (Cat. No. T4272).

### 3.2.2.3. Keményítő meghatározás

A növények keményítő tartalmát YU et al. (2001) nyomán mértük. A begyűjtött levél mintából 150 mg-ot (gumóból 100 mg-ot) ledörzsöltünk folyékony nitrogénben, áthelyeztük 1.5 ml-es Eppendorf csőbe, és hozzáadtunk 1 ml Killing Solution-t (16 ml 80%-os etanol, 10 ml 5%-os hangyasav, 30 ml desztillált víz) és 10 percig 80°C-on inkubáltuk. Centrifugálás után (5 perc, 13000 rpm) eltávolítottuk a felülúszót, és 5 percig 1 ml 80%-os etanollal 80°C-on inkubáltuk. A felülúszó eltávolítása után újra adtunk hozzá 1 ml 80%-os etanolt, és 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. Az etanol eltávolítása után a csapadékot beszárítottuk. A teljesen beszáradt csapadékhoz hozzáadtunk 400 µl 0.2 N KOH-ot és 1 órán át 95°C-on tartottuk, majd 70 µl 1 N ecetsavval semlegesítettük. Centrifugálás után 300 µl felülúszóból 10-szeres hígítási sort készítettünk, amiből 100-100 µl-t tettünk Elisa lemezbe. Ehhez 10 µl Lugol oldatot (43.4 mM kálium-jodid) adtunk és spektrofotometriásan 595 nm-en megmértük az optikai denzitást (OD).

### 3.2.2.4. Összfehérje meghatározás

A burgonyagumókból az összfehérjét BRADFORD (1976) módszere alapján határoztuk meg. A Bradford oldat 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250-t, 4.7% (w/v) etanolt és 8.5% (w/v) foszforsavat tartalmazott. A kalibrációs görbe elkészítéséhez 1 µg/µl-es BSA (bovine serum albumin) oldatot használtunk. A gumókból 100 mg-ot elporítottunk folyékony nitrogénben. Hozzáadtunk 400 µl 0.1 M-os Na-foszfát puffert (pH 7.8), majd centrifugáltuk 4°C-on 13000 rpm-mel, 30 percen át. A kalibrációhoz előkészítettük a vak (500 µl desztillált víz és 500 µl Bradford oldat elegye) és a BSA kalibráló sort (500 µl Bradford oldat és 1µl/2.5µl/5µl/10µl/15µl BSA desztillált vízzel 500 µl-re kiegészítve). A minták felülúszójából 3 µl-t tettünk 497 µl desztillált vízhez és 500 µl Bradford oldathoz és spektrofotométerrel 595 nm-en mértük az optikai denzitást (OD).

### 3.2.2.5. Szárazanyag tartalom meghatározás

A megmosott és meghámozott gumókat univerzális aprítóval (Bosch) ledaráltuk, 3-5 g-ot Petri csészére helyeztünk, és 80°C-on szárítottuk 24 órán keresztül. A szárítás utáni tömeg és a friss tömeg hányadosának %-os arányával fejeztük ki a szárazanyagtartalmat.

### 3.2.3. Szárazságtűrő képesség meghatározása

#### 3.2.3.1. Szárazság stressz üvegházi körülmények között

Az üvegházi kísérletekhez a 6 hetes *in vitro* növényeket 14 cm átmérőjű cserepekbe, A260 típusú (Stender, Németország) steril földbe ültettük. Négy hét elteltével megkezdjük a periodikus szárazság stressz kezelést a növényeken. A cserepes növények súlyát minden nap mértük. A kiindulási súly 600 g volt. A locsolt kontroll növényeket folyamatosan ezen a szinten tartottuk. A többi növényt egészen addig nem locsoltuk, amíg a vad típusú kontrollon a hervadás tünetei nem jelentkeztek. Ekkor visszalocsoltuk a stresszelt cserepes növényeket 600 g-ra, és ezen a szinten tartottuk 1 héten keresztül. Ezután egy újabb vízmegvonásos periódus kezdődött. Egy tenyésztő alatt 4-7 száraz periódust tudunk beiktatni.

#### 3.2.3.2. Sztómakonduktancia mérés

A szárazság-stresszelt és kezeletlen növényekről 6-6 asszimiláló levelet szedtünk és 1 cm átmérőjű levélkorongokat vágunk ki belőlük. A korongokat 10-10 ml desztillált vízbe tettük majd 24 órán keresztül rázattuk. A konduktométert 0.01 M KCl-dal kalibráltuk és megmértük a levélkorongokat tartalmazó oldat vezetőképességét. Ezután a mintákat 3 órán keresztül 95°C-on inkubáltuk, és újra megmértük az oldatba kiáramló ionok mennyiségét.

#### 3.2.3.3. Burgonya levelek relatív víztartalmának (RWC) meghatározása

A cserepes növényekről gyűjtött asszimiláló levelek friss súlyát mérlegemmel lemértük, majd a leveleket csapvízbe raktuk. Megvártuk, míg teljesen megduzzadnak (egy éjszakán át), majd újra lemértük. A szárazsúly meghatározáshoz a leveleket 24 órán keresztül 80°C-on szárítottuk és újra lemértük. A relatív víztartalmat az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{RWC (\%)} = [(W-DW) / (TW-DW)] \times 100$$

W – friss levelek súlya

TW – megduzzadt levelek súlya

DW – kiszáritott levelek súlya.



### 3.2.3.4. A növények fenotipizálása

A növényeket az alábbi módon fenotipizáltuk: figyeltük a biomassza változását, a növények- és a levelek alakját, méretét, a vízmegvonás alatt a levelek hervadását, cserepenként mértük a gumóhozamot (a felszedett gumók súlyának [g] átlaga/cserép), szemrevételeztük a gumók színét és alakját, a tárolás során a csírázási képességet és a csírázás kezdetének időpontját.

### 3.2.4. *Számítógépes programok használata*

#### 3.2.4.1. Molekuláris technikákhoz

##### a. Primer tervezés

A PCR-hez használt primer párokat az NCBI honlapján (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) található programmal terveztük.

##### b. Szekvencia összehasonlítás

A szekvenciákat az NCBI BLAST programjával hasonlítottuk össze.

#### 3.2.4.2. Analitikai technikákhoz

Az adatok főkomponens analízisét (PCA) a Multibase Add-Ins program segítségével végeztük ([www.numericaldynamics.com](http://www.numericaldynamics.com)). A MANOVA (Multivariate ANOVA) statisztikai értékeléshez az IBM SPSS Statistics 19 programját használtuk.

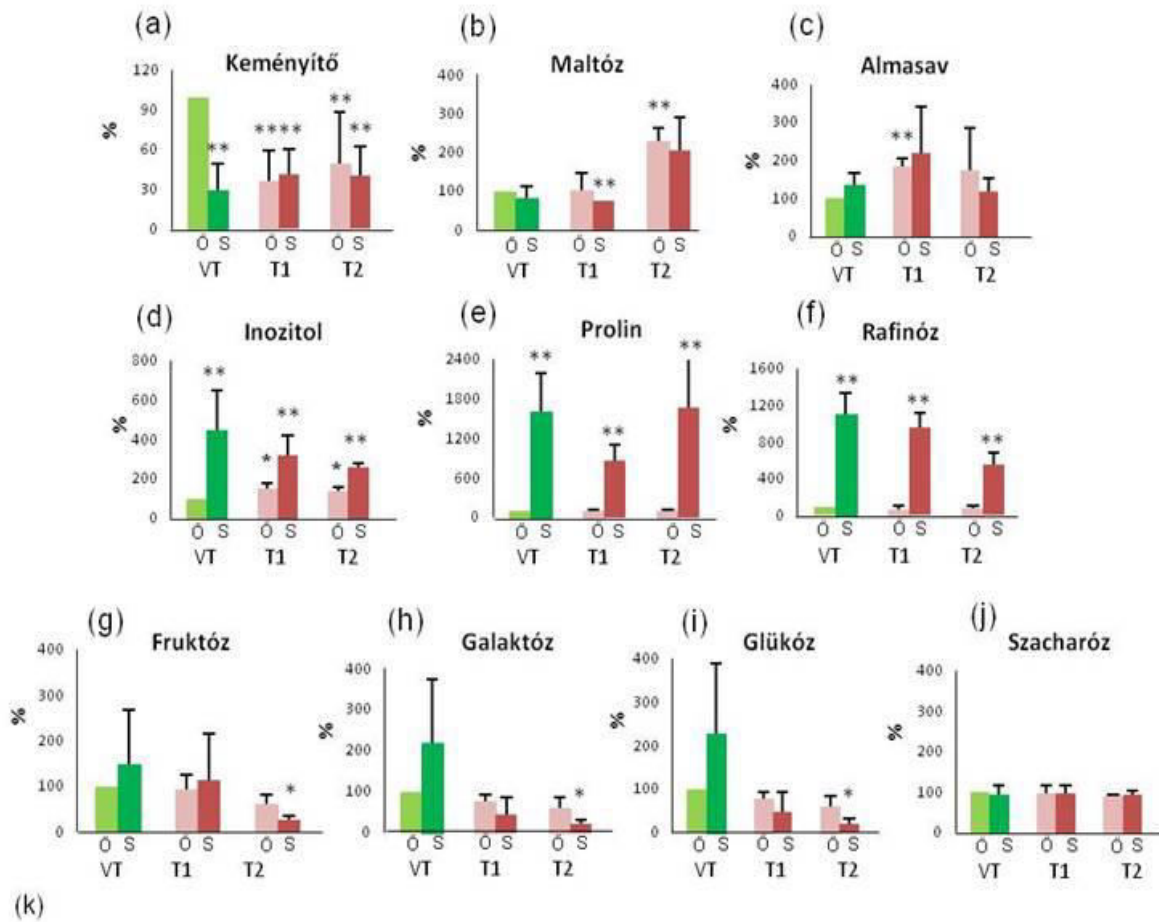
## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A *TPS1* transzgenikus burgonya vonalak összeférje, keményítő és metabolit analízise

#### 4.1.1. Levélanalízis

A vegetatíván szaporított, hat hetes *S. tuberosum* cv. White Lady és a *TPS1* génnel transzformált T1 és T2 vonalakat (STILLER et al., 2008) *in vitro* tenyészetből cserepekbe ültettük és hosszú nappalos, természetes fényviszonyok mellett, optimális körülmények között üvegházban neveltük. Négy héttel a kiültetést követően a növényeket két csoportba osztottuk. Vonalanként három növényt optimális talajnedvesség (70%) mellett neveltünk tovább, míg három növényt szárazság stressznek tettünk ki - abbahagytuk a növények öntözését, naponta mértük a cserepek súlyát, és amikor a talaj elérte a 30%-os nedvesség tartalmat, ezen a szinten tartottuk. Két héttel a vízmegvonást követően, négy órával napfelkelte után a növényekről levettük az összes asszimiláló levelet. Növényenként egy összetett levélből KONDRÁK és munkatársai (2012) meghatározták a relatív víztartalmat (RWC). A többi levelet folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban elporítottuk és -70°C-on tároltuk a további vizsgálatokhoz. A növényeket egymás után háromszor ültettük ki az üvegházba, azaz a teljes kísérletet háromszor megismételtük, és így három független kísérletből származó három biológiai mintasorozatot kaptunk.

Először a levelek keményítő tartalmát határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a vad típusú (VT) növények leveleinek keményítő tartalma jóval magasabb, mint a T1 és T2 vonalaké (12. ábra/a). A három biológiai ismétlésből származó mintasorozatban a keményítő mennyisége nagyon eltérő volt (12. ábra/k), azonban mindegyik esetben magasabb volt a VT-ben, mint a transzgenikus vonalak levelében. Ismert, hogy a környezeti tényezők jelentősen befolyásolják a növények fotoszintézisét, keményítő és metabolit szintézisét (ZEEMAN et al., 2007). Levélmintáink három egymást követő növényi tesztből származtak, melyekhez azonban nem tudtuk pontosan ugyanazokat a feltételeket biztosítani az üvegházban. Valószínű, hogy ez az oka a tapasztalt nagy szórásnak. Ezért a továbbiakban is nem az egyes vegyületek abszolút mennyiségét, hanem azoknak az öntözött VT-hez, mint 100%-hoz viszonyított arányát vettük figyelembe (12. ábra).



Kísélet	Keményítő h. ekv. g <sup>-1</sup>	Maltóz μmol g <sup>-1</sup>	Almasav μmol g <sup>-1</sup>	Inozitol μmol g <sup>-1</sup>	Prolin μmol g <sup>-1</sup>	Rafinóz nmol g <sup>-1</sup>	Fruktóz μmol g <sup>-1</sup>	Galaktóz μmol g <sup>-1</sup>	Glükóz μmol g <sup>-1</sup>	Szacharóz μmol g <sup>-1</sup>
1	49	0.04	90.18	7.34	3.1	3.2	240	84	14.4	106
2	18.5	0.02	108.44	9.95	3	3	156	95	17	101
3	5.4	0.02	62.91	9.45	2.6	4.7	139	104	18.3	82

**12. ábra:** A vad típus (VT) és a *TPS1* transzgenikus vonalak (T1, T2) leveleiben mért keményítő és metabolit változások. A szórás értékek három független biológiai ismétlésből származnak. A három független kísérletben az öntözött VT-ben mért koncentrációkat az ábra (k) részében tüntettük fel. Ezeket az értékeket tekintettük 100%-nak. A két csillag a  $P \leq 0.01$ , az egy csillag a  $P \leq 0.05$  (*t*-próba) szintű szignifikáns eltérést jelöli az öntözött VT kontrollhoz képest. Ö, öntözött; S, stresszelt; h. ekv., hexóz ekvivalens

A növények leveleiben a metabolitokat GC-MS-sel analizáltuk. Összesen 22 vegyületet tudtunk azonosítani (8. táblázat).

## 8. táblázat

### A levelekben GC-MS-sel detektált metabolitok listája

Vegyület csoport	Metabolitok
<b>Aminosavak</b>	aszparaginsav, fenilalanin, glutamin, glicerinsav, prolin, szerin, treonin, triptofán
<b>Szerves savak</b>	almasav, fumársav, izo-citromsav, linolénsav
<b>Cukrok</b>	fruktóz, galaktóz, glükóz, maltóz, raffinóz, szacharóz
<b>Cukor alkoholok</b>	szorbitol, inozitol
<b>Zsírsavak</b>	palmitinsav, sztearinsav

Öntözött körülmények között a 22 metabolitból csak háromnak a mennyisége változott meg szignifikánsan a *TPSI* növények levelében a VT-hez képest. A maltóz szint a T2 növények leveleiben (12. ábra/b), míg az almasav szint a T1-ben volt szignifikánsan magasabb, mint a VT-ben (12. ábra/c). Mindkét *TPSI* génnel transzformált vonal levelében magasabb volt viszont az inozitol koncentrációja, mint a VT-ben (12. ábra/d).

Számos kísérlet bizonyítja, hogy a vízmegvonás anyagcsere és metabolit változással jár (OBATA és FERNIE, 2012). Szárazság stressz hatására a VT keményítőtartalma 65%-kal csökkent (12. ábra/a) az optimális körülményekhez képest. Az öntözött kontrollhoz viszonyítva a transzgenikus vonalakban is szignifikánsan kevesebb keményítő volt, de az optimális körülményekhez képest nem csökkent a keményítő mennyisége a szárazság hatására (12. ábra/a). A maltóz és almasav tartalom szintén nem változott lényegesen a stressz hatására egyik vonalban sem (12. ábra/b,c).

A VT növények levelében az inozitol szint mintegy 4.4-szeres emelkedést mutatott (12. ábra/d), míg a T1 és T2 vonalakban ez az emelkedés kisebb volt (T1: 3.2-szeres, T2: 2.6-szoros). EVERS és munkatársai (2010) két andoki burgonya klónt hasonlítottak össze, melyeknek eltérő volt a szárazságtűrő képessége, és azt találták, hogy a toleráns vonalakban magasabb volt a galaktóz, inozitol és galaktinol szint, mint a szenzitív fajtában. A levelekben a galaktinol a detektálhatósági határ alatt volt, és a galaktóz koncentrációban sem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget öntözött körülmények között a VT és *TPSI* vonalak között, viszont az inozitol mennyisége az öntözött *TPSI* növények levelében - akárcsak az andoki szárazság

toleráns vonalakban - nagyobb volt, mint a VT levelekben. Az inozitol stressz hatására jelmolekulaként viselkedik a növényekben (VALLURU et al., 2011). A magas inozitol szint az alacsony keményítő szinttel összhangban változott (12. ábra/a,d). Ezért arra gondolunk, hogy stressz hatására az inozitol a keményítő szintézist talán közvetetten gátolja.

Stressz hatására minden vonal levelében ugrásszerűen megemelkedett a prolin szint (12. ábra/e). Ezzel csak megerősíteni tudtuk azoknak a különböző növény fajokkal végzett kísérleteknek az eredményét, melyek azt mutatták, hogy a különböző stresszek hatására a prolin koncentrációja extrém módon megemelkedik a növények levelében (OBATA és FERNIE, 2012). Mivel a VT-ben és a *TPSI* növények levelében egyaránt megnő a prolin mennyisége, viszont a VT növények kevésbé tűrik a szárazságot, mint a *TPSI* növények, arra a következtetésre jutottunk, hogy a prolin nem játszik közvetlen szerepet a növények szárazságtűrő képességében.

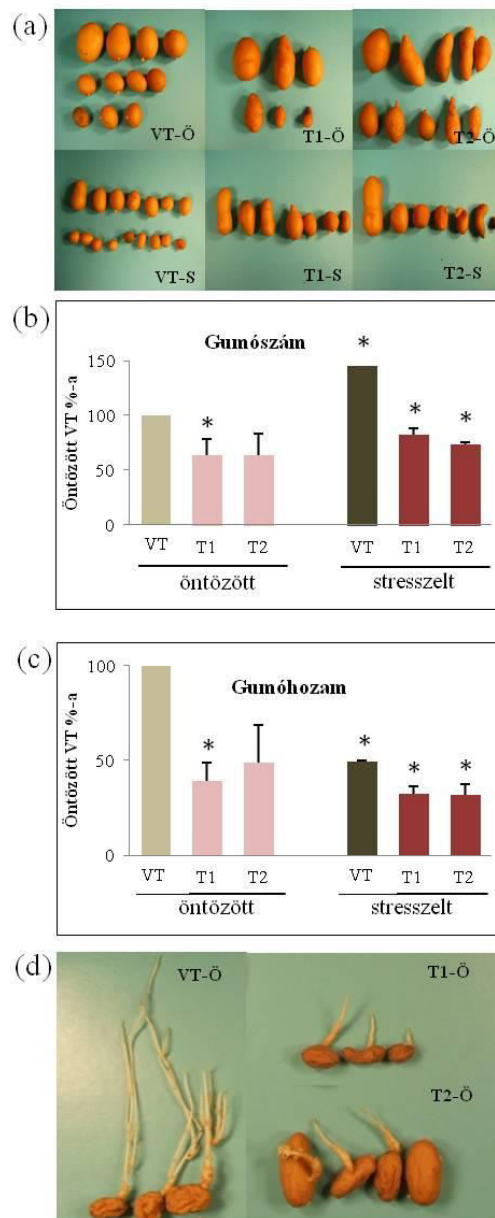
A raffinózt csak nagyon kis mennyiségben tudtuk detektálni a levelekben öntözött körülmények között (maximum koncentráció 50 nmol/g száraz súly), viszont nagyon erős mennyiségi emelkedést tapasztaltunk szárazság stressz hatására (5.5-11-szeres különbség), és ez a VT növények levelében még kifejezettebb volt, mint a *TPSI* növények levelében (12. ábra/f). Habár mind az inozitol, mind a raffinóz mennyisége megemelkedett szárazság hatására, valószínűleg más szerepet tölt be ez a két vegyület a növényben a stressz során. Míg az inozitol tartalmat a szárazság illetve a *TPSI* gén által okozott esetleges transzkripció/biokémiai változások is befolyásolhatják (KONDRAK et al., 2011, 2012), addig a raffinóz felhalmozódását inkább a vízhiány okozhatja a növényekben. LEGAY és munkatársai (2011) szintén azt tapasztalták, hogy szárazság stressz hatására megemelkedik a raffinóz koncentrációja a szárazsággal szemben toleráns burgonyaklónok leveleiben.

A cukrok mennyiségét a raffinózon kívül a szárazság csak kevésbé befolyásolta. Szignifikáns különbséget, csökkenést, csak a T2 vonal fruktóz, galaktóz és glükóz szintjében detektáltunk (12. ábra/g-i). A szacharóz szint egyik vonalban sem, még a kezeléseken ellenére sem változott (12. ábra/j). Azt feltételezzük, hogy az állandó szacharóz koncentráció fenntartása érdekében a növény a keményítő szintézist visszafogja és inkább a szacharóz szintézishez juttatja a megkötött szént és az energiát.

#### 4.1.2. Gumóanalízis

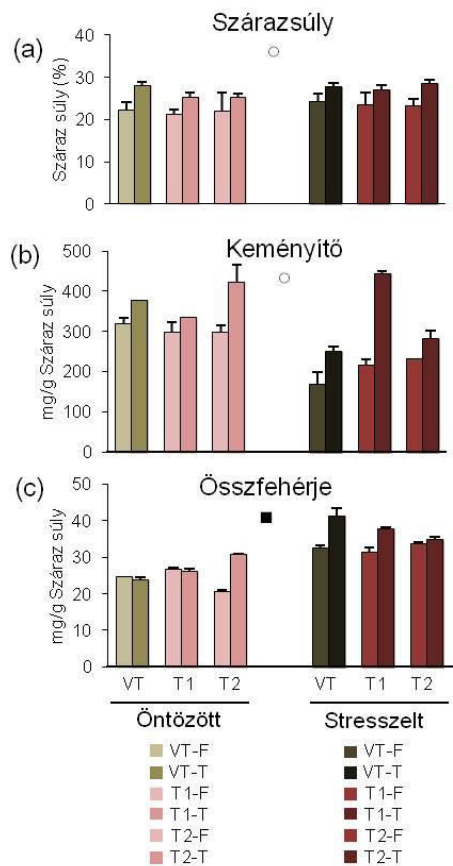
A gumók vizsgálatához új növényi tesztet indítottunk. Az *in vitro* szaporított növényeket cserepekbe ültettük és egy hónapon keresztül optimális körülmények között, 70-80% nedvesség tartalmú földben neveltük. Ezután a növényeket két csoportra osztottuk. A VT, T1 és T2 vonalaktól hét növényt továbbra is optimális körülmények között tartottunk, míg nyolc növényt periodikus szárazság stressznek vetettünk alá, vagyis 7-10 napig megvontuk tőlük a vizet, amíg a talaj nedvességtartalma 30%-ra nem csökkent, majd az ezt követő héten locsoltuk őket, de a hét elteltével újra kezdtük a vízmegvonást. Egy tenészedő alatt (kb. 4 hónap) hét száraz periódust éltek át a növények. A tenészedő végén a gumókat felszedtük a növények alól és a 2 cm átmérőjűnél nagyobbakat két egyenlő csoportra osztottuk. Az első csoportot megmostuk, meghámoztuk, majd ledaráltuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és  $-70^{\circ}\text{C}$ -ra tettük felhasználásig. A másik csoport gumóit szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk 12 hétig és csak azután dolgoztuk fel őket. Az egész növényi tesztet kétszer, egymástól függetlenül megismételtük.

A gumók felszedése után első megfigyelésünk az volt, hogy a *TPSI* vonalak gumói hosszúkásak, ellentétben a VT gumók ovális/gömbölyű alakjával (13. ábra/a). Optimális körülmények között a transzgenikus vonalak gumószáma (13. ábra/b) és tömege is kb. 50-60%-kal kisebb volt, mint a VT kontrollé (13. ábra/c). A stressz következtében a VT növényeken sok, kisméretű gumó képződött (13. ábra/a,b) és a gumóhozam a felére csökkent (13. ábra/c). A transzgenikus vonalagnál a stressz az optimális körülményhez képest nem emelte meg a gumószámot és a gumóhozamban sem okozott akkora csökkenést (20-40%), mint a VT-ben (13. ábra/b,c).



**13. ábra:** A vad típusú (VT) és *TPS1* (T1, T2) vonalak gumószáma, gumóhozama öntözött (Ö) és szárazság stressz (S) körülmények között. **(a)** 12 hétig tárolt gumók **(b)** a növények gumószáma az öntözött VT %-ához viszonyítva **(c)** a növények gumóhozama az öntözött VT %-ához viszonyítva **(d)** 6 hónapig, sötétben tárolt gumók. A szórásokat két független növényi tesztből származó adatok átlagából számoltuk. Mindkét kísérletben hét öntözött és nyolc stresszelt növény volt. Az öntözött VT növények átlagos gumószáma az első kísérletben 3.9 a másodikban 4.0, míg a gumóhozam 11.8 és 17.6 g volt. A csillag a  $P \leq 0.01$  ( $t$ -próba) szintű szignifikáns eltérést jelöli az öntözött VT kontrollhoz képest.

A tárolt gumókat minden héten ellenőriztük és azt tapasztaltuk, hogy a VT vonalak gumói 12 hét után elkezdtek csírázni, a transzgenikus vonalak gumóin viszont még nem volt csírajezdemény (13. ábra/a). Hat hónapos tárolás után ez a csírázási időbeli különbség még szembetűnőbb volt (13. ábra/d).



**14. ábra:** A vad típusú (VT) és a *TPS1* (T1, T2) transzgenikus növények gumóinak szárazsúly, összfehérje- és keményítő tartalma. A szórásokat két független növényi tesztből származó adatok átlagából számoltuk. A méréseket 2 cm átmérőjűnél nagyobb gumókból végeztük. A gumók kísérletenként hét öntözött és nyolc stresszelt növényről származtak. Statisztikailag (egy-utas MANOVA,  $P \leq 0.05$ ) szignifikáns különbség az öntözött és a szárazság-stresszelt növények gumói között ■; a friss (F) és tárolt (T) gumók között ○

Először a gumók szárazanyag-, keményítő- és összfehérje tartalmát vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a stressz nem változtatta meg a gumók szárazanyag tartalmát egyik vonalban sem az öntözött körülmények között nőtt gumókéhoz képest. A tárolás viszont körülbelül 20%-kal megemelte azt a vízvesztés következtében (14. ábra/a). Sem a keményítő, sem az összfehérje mennyiségében nem találtunk különbséget az optimális körülmények között nevelt növényekről származó VT és *TPS1* gumók között (14. ábra/b,c). A stressz viszont csökkentette a gumók



keményítő szintjét, illetve növelte összfehérje tartalmukat. A tárolás viszont mindkét anyagnak emelte a szintjét, ami arra utal, hogy a gumók még a tárolás alatt is metabolikusan aktívak voltak (14. ábra/b,c). MÜLLER-RÖBER és munkatársai (1992) azt találták, hogy azoknak a mutánsoknak gumója, amelyek képtelenek voltak a szacharózt keményítővé átalakítani kevés keményítőt és sok szacharózt tartalmaztak. A stressz hatására az általunk vizsgált gumókban is csökkent a keményítő szint, viszont nem tapasztaltunk emelkedést a szacharóz koncentrációban (lásd később, 15. ábra/e), ezért úgy gondoljuk, hogy nem csak a keményítő szintézis játszik szerepet a gumó energiafelhasználásában.

A tárolás során a nyugalmi periódus hosszát a genotípus és a környezeti tényezők jelentősen befolyásolják. Kíváncsiak voltunk arra, hogyan változik az egyes metabolitok koncentrációja a tárolás alatt. Ezért a frissen felszedett és tárolt gumókat megvizsgáltuk GC-MS-sel is. A gumókban 33 metabolitot tudtunk detektálni (9. táblázat).

## 9. táblázat

### A gumókban GC-MS-sel detektált metabolitok listája

Vegyület csoport	Metabolitok
Aminosavak	$\beta$ -alanin, $\gamma$ -aminovajsav (GABA), aszparagin, aszparaginsav, glutaminsav, glutamin, glicin, izoleucin, fenilalanin, prolin, szerin, treonin, triptofán, 5-oxo-prolin
Szerves savak	cisz-akonitsav, izocitromsav, fumársav, galaktársav, glicerinsav
Cukrok	fruktóz, galaktóz, glükóz, maltóz, mannóz, raffinóz, szacharóz
Cukoralkoholok	galaktinol, inozitol, mannitol, szorbitol
Zsírsavak	palmitinsav, sztearinsav
Egyéb	glükóz-6-foszfát, trehalóz-6-foszfát

A 33 metabolitból a MANOVA statisztikai vizsgálat eredménye alapján 28 vegyület mennyisége változott valamilyen hatásra. Ezek a hatások a következők voltak: stressz és tárolás együttes hatása, a *TPSI* transzgén jelenléte, a tárolás hatása és a vízmegvonás hatása (10. táblázat).

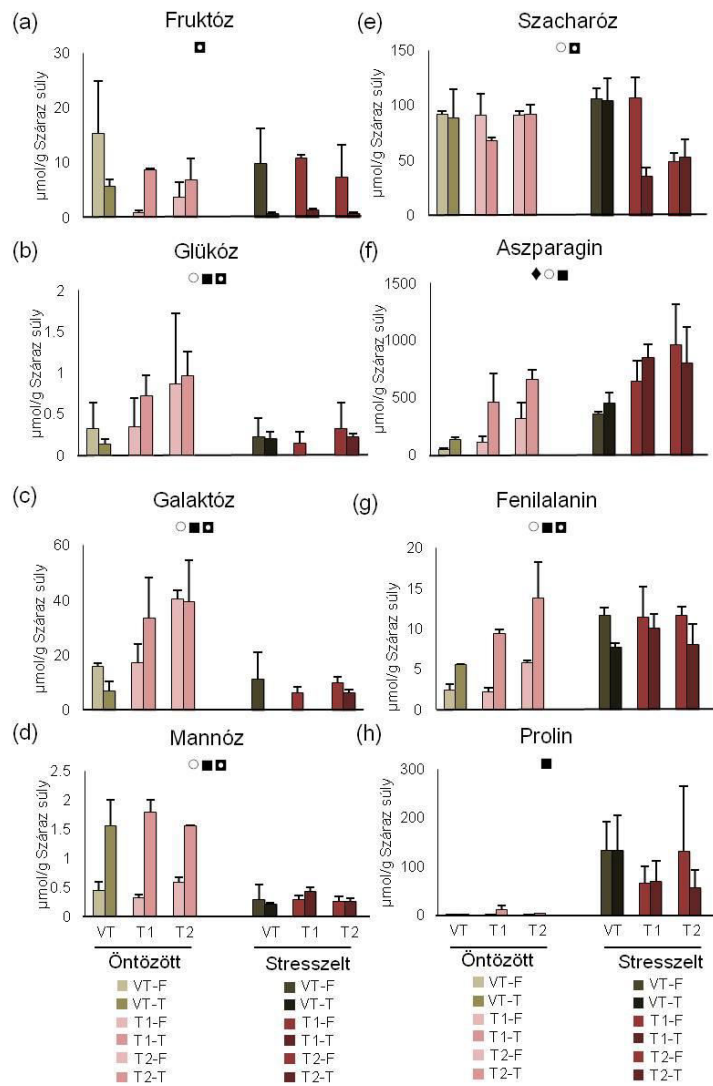
## 10. táblázat

**A stressz+tárolás, a *TPS1* transzgén, a tárolás és a stressz okozta szignifikáns változások az egyes metabolitok mennyiségében**

Hatás	Szignifikánsan megváltozott metabolitok
<b>Stressz+Tárolás</b>	fenilalanin, fruktóz, galaktóz, glükóz, izoleucin, mannóz, szacharóz
<b>Genotípus</b>	aszparagin, aszparaginsav, $\beta$ -alanin, GABA, galaktársav, glutamin, glicin, izocitromsav, mannitol, 5-oxo-prolin, szerin, sztearinsav, treonin
<b>Tárolás</b>	aszparagin, $\beta$ -alanin, fenilalanin, GABA, galaktársav, galaktóz, glicerinsav, glicin, glutaminsav, glükóz, izocitromsav, mannitol, mannóz, 5-oxo-prolin, szacharóz, szerin, treonin, triptofán
<b>Stressz</b>	aszparagin, fenilalanin, fumársav, galaktinol, galaktóz, glutaminsav, glükóz, glükóz-6-foszfát, izoleucin, mannitol, mannóz, prolin, szerin, szorbitol

A legjellegzetesebb változásokat a 15. ábrán foglaltam össze, a többit az 1. sz. mellékletben mutatom be.

A stressz és a tárolás együttesen hét metabolit mennyiségét változtatta meg a gumókban (10. táblázat). Érdekes volt látni, hogy a fruktóz koncentrációja az optimális körülmények között nevelt transzgenikus növények frissen felszedett gumóiban kisebb volt, mint a VT gumókban, és míg a tárolás csökkentette a fruktóz mennyiségét a VT gumókban, a *TPS1* gumókban megemelte. Ugyanakkor a stresszelt növényekről származó gumókban a fruktóz szint a genotípustól függetlenül egyaránt csökkent (15. ábra/a).



**15. ábra:** Tárolás és szárazság-stressz hatására bekövetkező metabolit változások a vad típusú (VT) és *TPS1* (T1, T2) transzgenikus növények gumóiban. Statisztikailag (egy-utas MANOVA,  $P \leq 0.05$ ) szignifikáns különbségek az öntözött és szárazság-stresszelt növények gumói között ■; a friss (F) és tárolt (T) gumók között ○; a VT és *TPS1* gumók között ◆; a stressz és a tárolás együttes hatása ◼

A glükóz, galaktóz és mannóz mennyisége is változott a stressz illetve a tárolás következtében (15. ábra b-d). A mannóz mennyisége pl., az öntözött növények gumóiban genotípustól függetlenül nőtt a tárolás során. Ezzel szemben nem változott a mannóz szintje a stresszelt növények tárolt gumóiban (15. ábra b-d). Öntözött körülmények között nem volt különbség a VT és *TPS1* vonalak szacharóz tartalmában, viszont a T1 vonalban csökkent a mennyisége a tárolás során (15. ábra/e). Az öntözött VT gumókhöz képest a stressz csökkentette a T2 gumókban a szacharóz szintet, míg a másik két vonalban nem változtatta meg lényegesen.

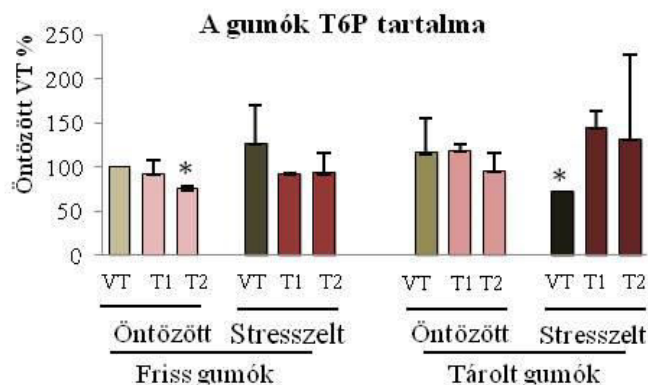
A stresszelt T1 gumókban a tárolás csökkentette a szacharóz koncentrációt, míg a VT és T2 vonalakban nem (15. ábra/e).

A *TPS1* gén expressziója miatt a transzgenikus vonalak hosszabb nyugalmi állapotot tartottak fent. Tizenhárom olyan anyagot találtunk, amelyek mennyiségi különbséget mutattak a *TPS1* gumókban a VT gumókhoz képest (10. táblázat). Ezek közül az aszparagin mennyisége mind öntözött, mind stresszelt körülmények között magasabb volt a *TPS1*-, mint a VT gumókban, de a tárolás során csak az optimális körülmények között fejlődött gumókban emelkedett meg a szintje (15. ábra/f).

A tárolás 18 metabolit mennyiségében okozott változást (10. táblázat). Ilyen anyag volt a fenilalanin is, aminek szintje az öntözött növények gumóiban tárolás hatására emelkedett, viszont a stresszelt gumókban nem változott, vagy talán még csökkent is (15. ábra/g).

A stressz következtében 14 metabolit mennyiségében találtunk különbséget a gumókban (10. táblázat). A vízhiányban fejlődött gumók prolin tartalma erősen megnőtt az optimális körülmények között fejlődött gumók prolin tartalmához képest (15. ábra/h). Ezt a jelenséget már mások is kimutatták burgonya gumóban, és nemcsak szárazság, hanem só- és szelén stressz esetén is (TEIXEIRA és PEREIRA, 2007; MAGGIO et al., 2008; JEZEK et al., 2011). A prolin mellett a gumók glutamin és glutaminsav tartalma is a kétszeresére emelkedett a stressz hatására (1. sz. melléklet). A glutamin-szintetáznak fontos szerepe van a nitrogén metabolizmusban, de a prolin szintézissel kapcsolatban is találtak összefüggéseket a glutamin-szintetáz aktivitás és a prolin mennyisége között növényben (BRUGIERE et al., 1999). MAGGIO és munkatársai (2008) szántóföldi kísérletekben mutattak ki jelentős növekedést a glutamin és glutaminsav mennyiségében a különböző kezelések hatására.

A stressz nem emelte meg a gumók raffinóz tartalmát (1. sz. melléklet), ellentétben a levelekével, ahol a stressz hatására igen jelentős raffinóz koncentrációnövekedés következett be (12. ábra/f). Ebből arra következtethetünk, hogy az asszimiláló és raktározó szervek bizonyos vegyületek tekintetében különböző módon reagálnak ugyanarra a stresszre. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a transzgén befolyásolja-e a gumók T6P tartalmát. A VT vonalakban a T6P mennyisége 120-250 nmol/g szárazsúly volt. Összehasonlítva az öntözött VT növények friss gumóival, csak a stresszelt VT növények tárolt gumóiban és az öntözött T2 növények frissen felszedett gumóiban találtunk szignifikáns különbséget (16. ábra). De ez a különbség is, a várttal ellentétben, csökkenés és nem növekedés volt. Ezért úgy gondoljuk, hogy ez a különbség inkább a gumók heterogenitásából adódik, és nem a *TPS1* expresszió hatása.



**16. ábra:** A gumók T6P tartalma az öntözött VT, mint 100%-hoz viszonyítva

#### 4.2. *PRLIP2* gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak előállítása és jellemzése

##### 4.2.1. *PRLIP2* gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak előállítása

A *Patogenesis Related Lipase (PRLIP)* géncsaládba tartozó *PRLIP2* génnel transzformált *Solanum tuberosum* cv. Desirée burgonyavonalak létrehozásához a pPZP111 növényi transzformációra alkalmas bináris vektor *Bam*HI helyére klónozott *PRLIP2* gént tartalmazó *E. coli* törzset a Pécsi Tudományegyetemről kaptuk Dr. Jakab Gábortól. A plazmid inszertjét ellenőrzés céljából *Bam*HI-gyel kivágtuk és áttettük pBluescript vektorba. A Biomi Kft-vel meghatároztattuk az inszert szekvenciáját, amit a várttal azonosnak találtunk.

A pPZP111::pRLIP2 plazmidot *E. coli*-ból *Agrobacterium*-ba a pRK2013 „helper” plazmid segítségével háromszülős keresztezéssel juttattuk át. A keresztezést két *Agrobacterium* törzssel is elvégeztük. Az egyik a szupervirulens ALG0, a másik a növényi sejteket gyengébben fertőző, pGV2260 plazmidot hordozó C58C1 törzs volt. Az *Agrobacterium*-okból plazmidot izoláltunk, amit aztán *Bam*HI restrikciós enzimmal emésztettünk. A keletkezett fragmentumokat agaróz gélen szétválasztottuk. Miután meggyőződünk arról, hogy az inszert jelen van mindkét *Agrobacterium* törzsbe átvitt plazmidban, Desirée leveleket transzformáltunk velük. Az *Agrobacterium*-okat két napig tartottuk a leveleken. Ezután a leveleket CIM táptalajra tettük (17. ábra/a). Egy hét múlva áthelyeztük a leveleket SIM táptalajra. A keletkező hajtásokat hetente levágtuk és RM táptalajt tartalmazó kémcsövekbe ültettük, a leveleket pedig visszahelyeztük friss SIM táptalajra (17. ábra/b). A hajtásokat összesen nyolc héten át gyűjtöttük. Az RM táptalajon a hajtások legyökeresedtek (17. ábra/c). Mindhárom táptalaj (CIM, SIM, RM) a

transzformánsok szelekciójára kanamicin-, az *Agrobacterium*-ok elölésére pedig cefotaxim antibiotikumokat is tartalmazott.



**17. ábra:** Levéltranszformáció (a) *Agrobacterium*-mal transzformált levelek kalluszindukáló (CIM) és (b) hajtásindukáló (SIM) táptalajon. (c) szelekciós táptalajon gyökeresedő feltételezhetően transzgenikus növények

A leggyökeresedett, feltételezhetően transzgenikus növényeket még kétszer áttettük szelekciós táptalajra, hogy biztosan előljük az *Agrobacterium*-okat. A *PRLIP2* gén bevitele mellett kontroll transzformációt is végeztünk az „üres” pZP111 vektorral. Minden transzformációhoz 15-20 levelet használtunk. Összesen 255 hajtást izoláltunk, amiből 107 tudott leggyökeresedni az RM táptalajban. Ez az arány rosszabb volt a vártnál, aminek magyarázata lehet egy egyszerű technikai hiba is, pl. túl forró volt még a CIM vagy a SIM táptalaj, amikor beletettük az antibiotikumokat.

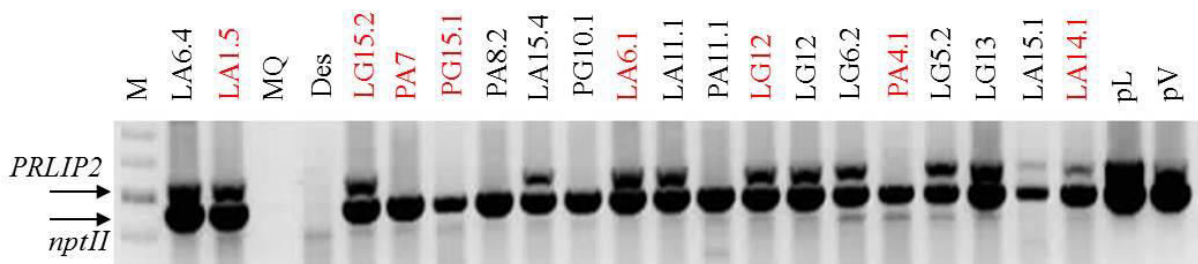
### 11. táblázat

<i>Agrobacterium</i>	A transzformáció eredménye					
	Fertőzött levelek száma	Leszedett hajtások száma	Leggyökeresedett hajtások száma	Izolált DNS-ek száma	<i>npII</i> PCR	<i>PRLIP2</i> PCR
GV2260(pZP111)	15-20	69	36	14	10	0
ALG0(pZP111)	15-20	66	27	13	11	0
GV2260(LIP2)	15-20	55	20	14	9	12
ALG0(LIP2)	15-20	65	22	19	18	19

A transzformáció igazolására DNS-t izoláltunk az *in vitro* növényekből és *PRLIP2* illetve *npII* génre tervezett primer párokkal ellenőriztük, hogy sikeresen beépült-e a célgén. Összesen 60 növényből izoláltunk DNS-t. A 11. táblázatban látható, hogy nem minden kanamicin

jelenlétében legyökeresedett növényben tudtuk kimutatni PCR-rel az *nptII*, illetve a *nptII* és a *PRLIP2* gének beépülését. Erre több magyarázat is lehetséges: 1. nem sikerült a DNS izolálás, 2. valamilyen mutáció következtében a növény rezisztens lett az antibiotikumra, 3. a *PRLIP2* esetében a hibás beépülés is magyarázat lehet.

A transzgén(ek) expressziós szintjének meghatározására azokból az *in vitro* növényekből, amelyekből PCR-rel ki tudtuk mutatni az *nptII* illetve a *PRLIP2* gének jelenlétét, RNS-t izoláltunk. Az RNS izolálást követően DNáz-zal kezeltük a mintákat, majd RNeasy Minielute Cleanup Kittel (QIAGEN) megtisztítottuk és cDNS-t szintetizáltunk belőlük. A cDNS-eket használva szubsztrátként összeállítottunk egy PCR-t és az így kapott fragmentumokat agaróz gélen megfuttatunk (18. ábra).



**18. ábra:** *PRLIP2* és *nptII* gén expressziós szintjének kimutatása *in vitro* növényekből RT-PCR-rel. M: 100 bp DNS méret marker, LA, LG: *nptII* és *PRLIP2* transzgén tartalmazó vonalak, PA, PG: *nptII* transzgén tartalmazó vonalak, pL: pPZP111::LIP2, pV: pPZP111, Des: nem transzformált Desirée kontroll, MQ: distilled water. Pirossal jelöltük a további kísérletekhez kiválasztott vonalakat.

A gélen látott DNS mennyiség alapján a növényeket alacsony (x), közepes (xx) és magas expressziós szintű (xxx) csoportba soroltuk (12. táblázat). Az 12. táblázatban pirossal kiemelt vonalakat (öt transzgén tartalmazó, és három „üres” vektorral transzformált kontroll vonalat) választottuk ki alacsony, közepes, és erős expressziós szinttel a további kísérletekre.

## 12. táblázat

Az *nptII* és *PRLIP2* transzgének expressziós szintje

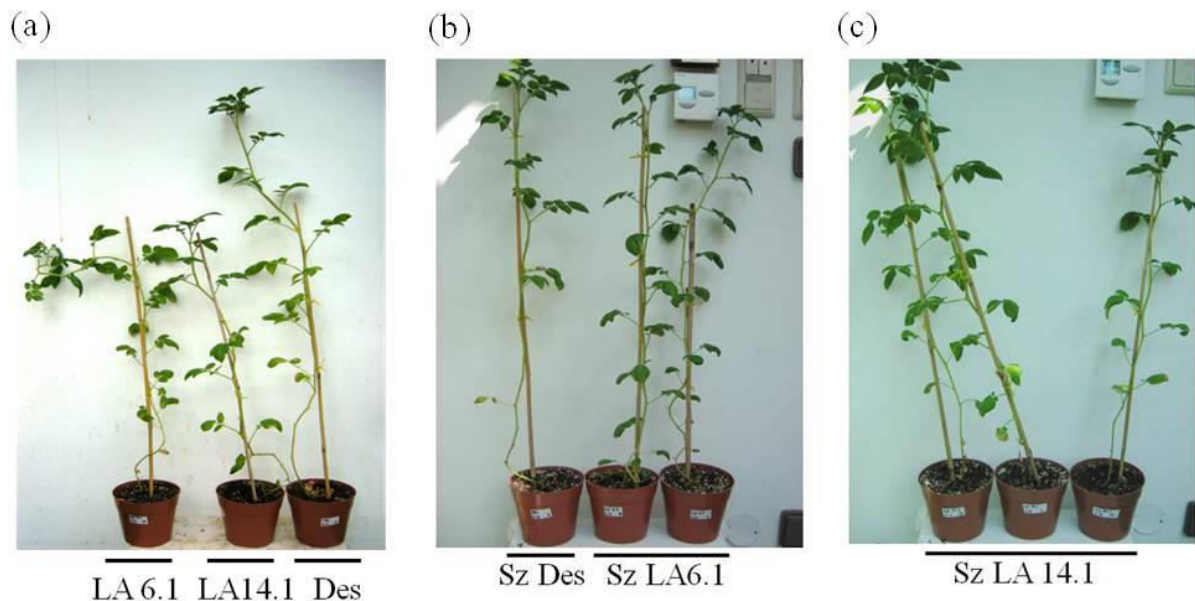
NÉV*	<i>nptII</i>	<i>PRLIP2</i>
LA6.4	xxx	xxx
LA1.5	xxx	xxx
LG15.2	xxx	xx
PA7	xxx	-
PG15.1	xx	-
PA8.2	xxx	-
LA 15.4	xx	xx
PG10.1	xxx	-
LA6.1	xxx	xxx
LA11.1	xxx	xxx
PA11.1	xxx	-
LG12	xx	xxx
LG6.2	xxx	xx
PA4.1	xx	-
LG5.2	xx	xx
LG13	xxx	xxx
LA15.1	xx	x
LA14.1	xxx	x

\*LA, AGL0 törzssel létrehozott *PRLIP2-nptII* transzgenikus vonalak; LG, GV2260 törzssel létrehozott *PRLIP2-nptII* transzgenikus vonalak; PA, AGL0 törzssel létrehozott *nptII* transzgenikus vonalak; PG, GV2260 törzssel létrehozott *nptII* transzgenikus vonalak



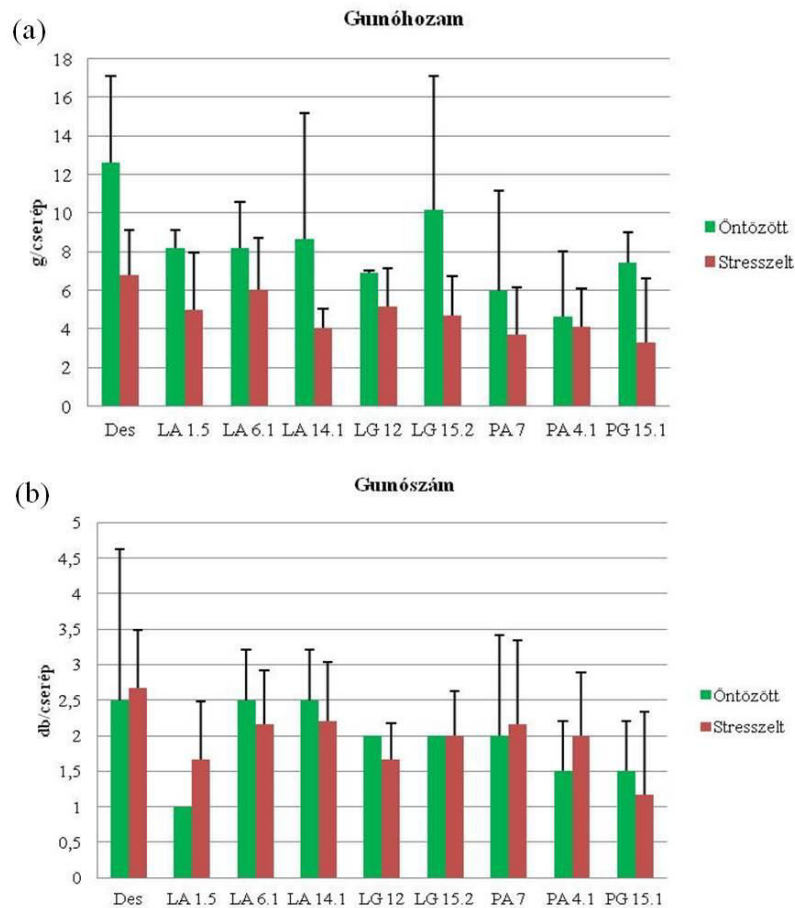
#### 4.2.2. *PRLIP2* gént expresszáló transzgenikus burgonyavonalak jellemzése

A *PRLIP2* transzgént expresszáló vonalak fenotípusos vizsgálatát és szárazsággal szembeni ellenálló képességét üvegházi körülmények között teszteltük. A kiválasztott *in vitro* vonalaktól 8-8 növényt kiültettünk a növényházba. A Desirée kontroll vonalból minden esetben dupla annyi növény számmal dolgoztunk. Egy hónapon keresztül optimális körülmények között, 70-80% nedvességtartalmú földben neveltük a növényeket. Ezután két csoportra osztottuk őket. A PA, PG, LA, LG vonalaktól két-két, a kontrollból 4 növényt továbbra is optimális körülmények között tartottunk és minden nap öntöztük. Vonalanként hat-hat, a Desirée esetében 12 növénytől megvontuk a vizet, azaz nem öntöztük őket, de minden nap mértük a súlyukat, amíg el nem érték a 30%-os talajnedvesség tartalmát. Egy-egy vízmegvonásos periódus körülbelül 12-15 napig tartott, attól függően milyenek voltak a környezeti viszonyok. A teljes tenyészidő alatt négy száraz periódust éltek át a növények. A kísérlet során fenotipizáltuk a növényeket, és azt találtuk, hogy az LA6.1 és LA14.1 vonalak optimális körülmények között kisebbre nőttek, mint a kontroll (19. ábra/a) viszont kevésbé viselte meg őket a vízmegvonás, nem kopaszodtak úgy fel, mint a nem transzformált Desirée (19. ábra/b,c).



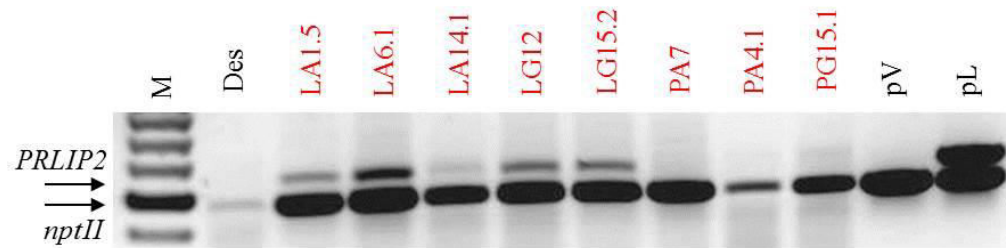
**19. ábra:** Növényházban nevelt növények optimális (a) és szárazság stressz körülmények között (b,c).

A tenyészidő végén felszedtük a gumókat (20. ábra). A növények alatt sok, apró méretű gumót találtunk. A stresszelt növények gumóhozama átlagban minden vonal esetében alacsonyabb volt, mint az öntözött növényeké.



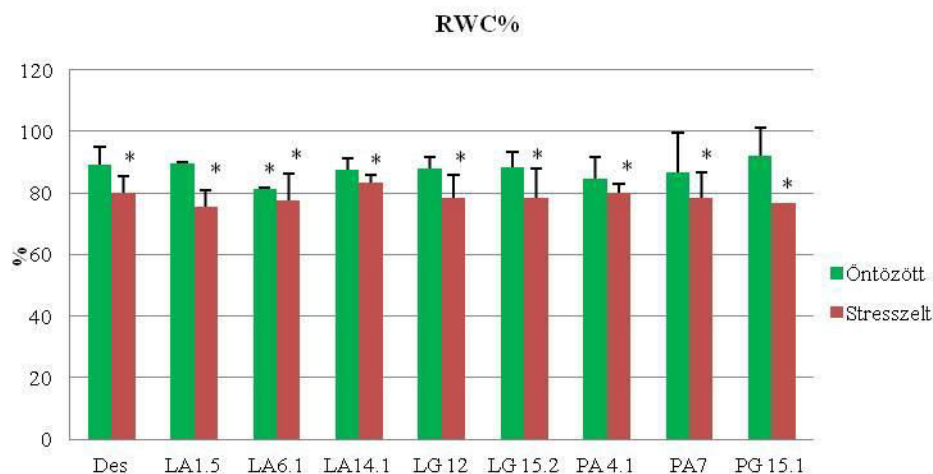
**20. ábra:** Öntözött és stresszelt növények gumóhozama (a) és gumószáma (b). Des: nem transzformált Desirée kontroll, LA, LG: *nptII*-*PRLIP2* transzgenikus vonalak; PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak.

A transzgén jelenlétét az üvegházban nevelt növényekben is ellenőriztük. Az öntözött növények 3. levélszintjének legfelső levéllemezét levettük és RNS-t izoláltunk belőlük. Elvégezve az RT-PCR-t a kapott DNS fragmentumokat agaróz gélen megfuttattuk, akárcsak korábban az *in vitro* növények expressziós szintjének vizsgálata esetében (18. ábra). Az *in vitro* eredményekkel megegyező eredményt kaptunk (21. ábra).



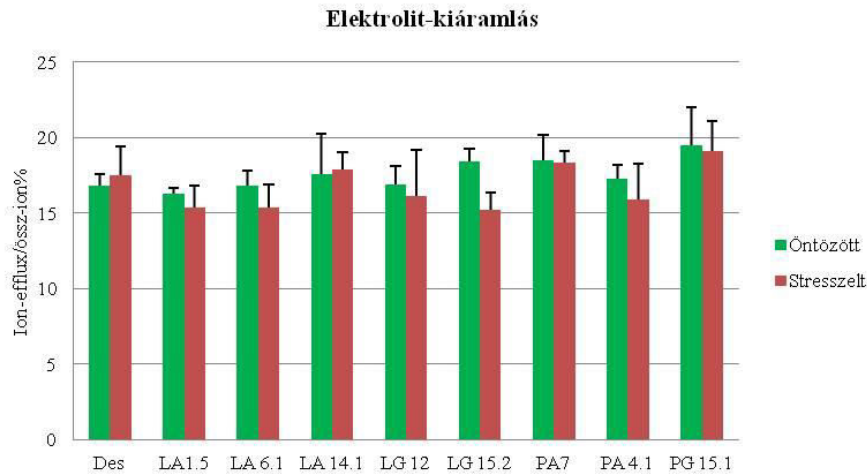
**21. ábra:** *PRLIP2* és *nptII* gén expressziós szintjének kimutatása üvegházi növényekből RT-PCR-rel. M: 100 bp DNS méret marker, Des: nem transzformált Desirée kontroll, LA, LG: *nptII*-*PRLIP2* transzgenikus vonalak, PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak, pV: pZP111, pL: pZP111::LIP2

Az első kísérlet során megfigyelt fenotípusos változások után újabb növényi tesztet indítottunk, hogy fiziológiás vizsgálatokat is végezhessünk. Vonalanként 20-20 növényt ültettünk ki, amiből 16-ot stresszeltünk. Tizenhét napi vízmegvonás után a növények 3. levélszintjének összetett levelét levettük és RWC vizsgálatot végeztünk (22. ábra). Szárazság stressz hatására minden vonalnak szignifikánsan csökkent az RWC értéke az öntözött Desiréehez képest, ami arra utal, hogy a *PRLIP2* gén expressziója nem tudja megvédeni a növények levelét a vízmegvonás okozta vízvesztéstől. Az LA6.1 vonalnak nemcsak stresszelt körülmények között, hanem öntözött állapotban is alacsonyabb volt a relatív víztartalma, aminek magyarázatát egyelőre nem ismerjük.



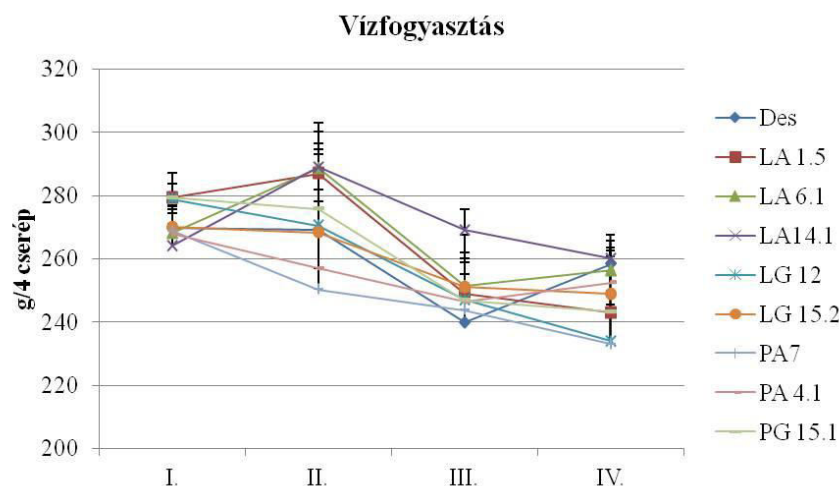
**22. ábra:** Transzgenikus növények %-os RWC értékei optimális és szárazság stressz körülmények között a nem transzformált, öntözött Desirée-hez, mint 100%-hoz, viszonyítva. Des: nem transzformált Desirée kontroll; LA, LG: *nptII*-*PRLIP2* transzgenikus vonalak, PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak. A csillag a  $P \leq 0.01$  (*t*-próba) szintű szignifikáns eltérést jelöli az öntözött Des kontrollhoz képest.

Ahhoz, hogy megtudjuk, ekkora vízvesztés okoz-e már membránkárosodást a növényekben, megmértük az elektrolit-kiáramlást is (23. ábra). Az öntözött növények leveleiből 2x4, a stresszelt növények leveleiből 8x4 levélkorongot vizsgáltunk vonalanként. Az öntözött Desirée-hez képest nem kaptunk  $P \leq 0.01$  szinten (*t*-próba) szignifikáns különbséget, ami a membránok épségére utal.



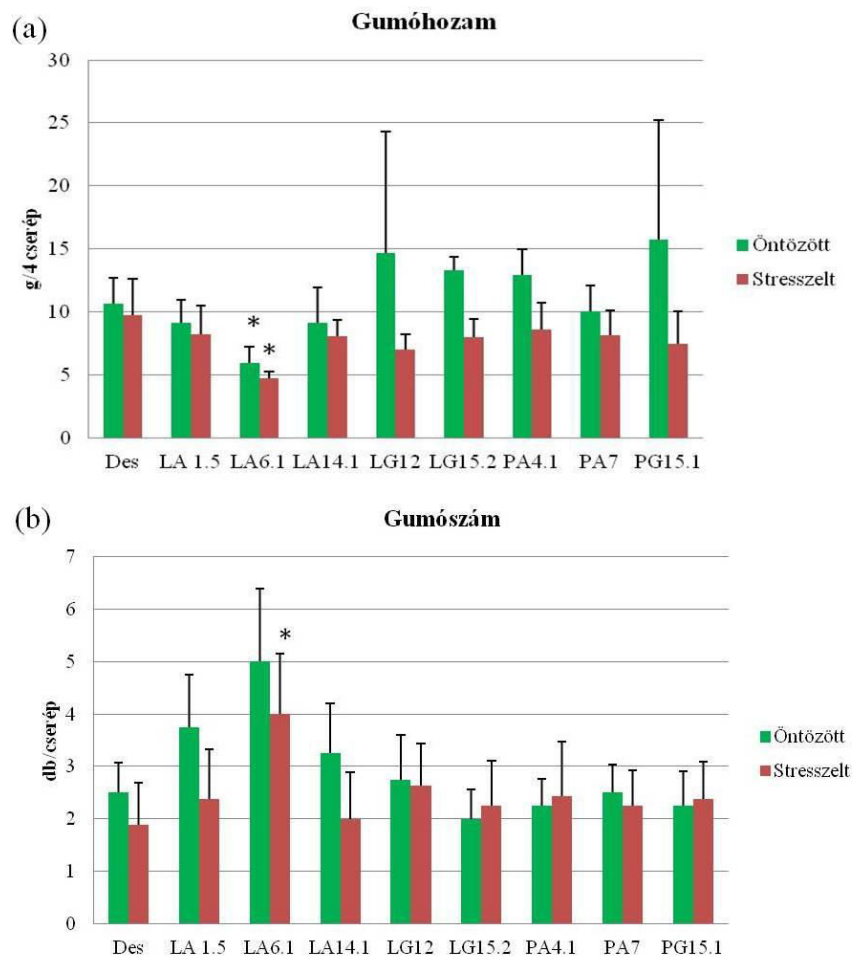
**23. ábra:** Transzgenikus növények leveléből mért elektrolit-kiáramlás optimális és szárazság stressz körülmények között. Des: nem transzformált Desirée kontroll, LA, LG: *nptII*-*PRLIP2* transzgenikus vonalak; PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak.

Vizsgáltuk a növények vízfogyasztását is az első száraz periódustól az utolsóig, de lényegi különbséget a kontroll és transzgenikus vonalak között kimutatni nem tudtunk (24. ábra).



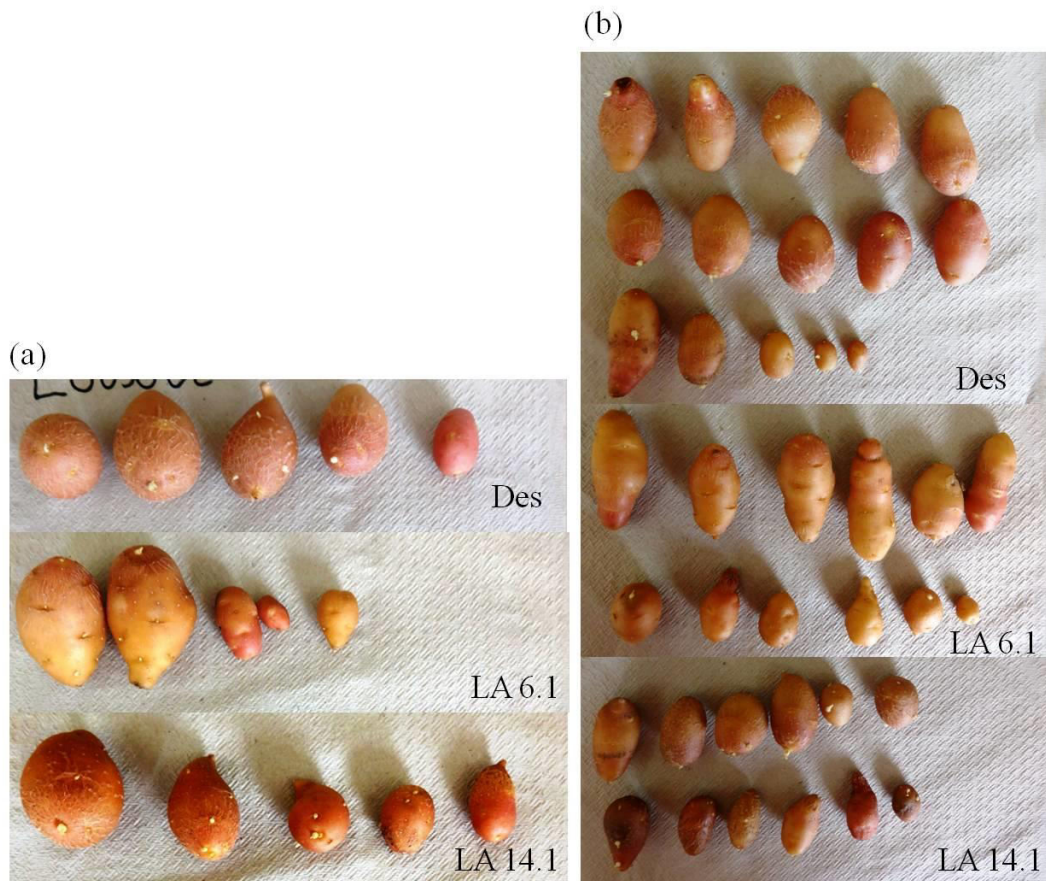
**24. ábra:** A növények vízfelvétele I-IV száraz periódus után. Des: nem transzformált Desirée kontroll, LA, LG: *nptII*-*PRLIP2* transzgenikus vonalak; PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak

A tenyésztő végén felszedtük a gumókat. A második kísérletben az LA6.1 transzgenikus vonal gumóhozama szignifikánsan ( $t$ -próba,  $P \leq 0.01$ ) alacsonyabb volt, mint az öntözött Desirée kontrollé (25. ábra/a). Akárcsak az első kísérletben, most is apróbb gumók voltak a stresszelt, mint az öntözött növények alatt (25. ábra/b).



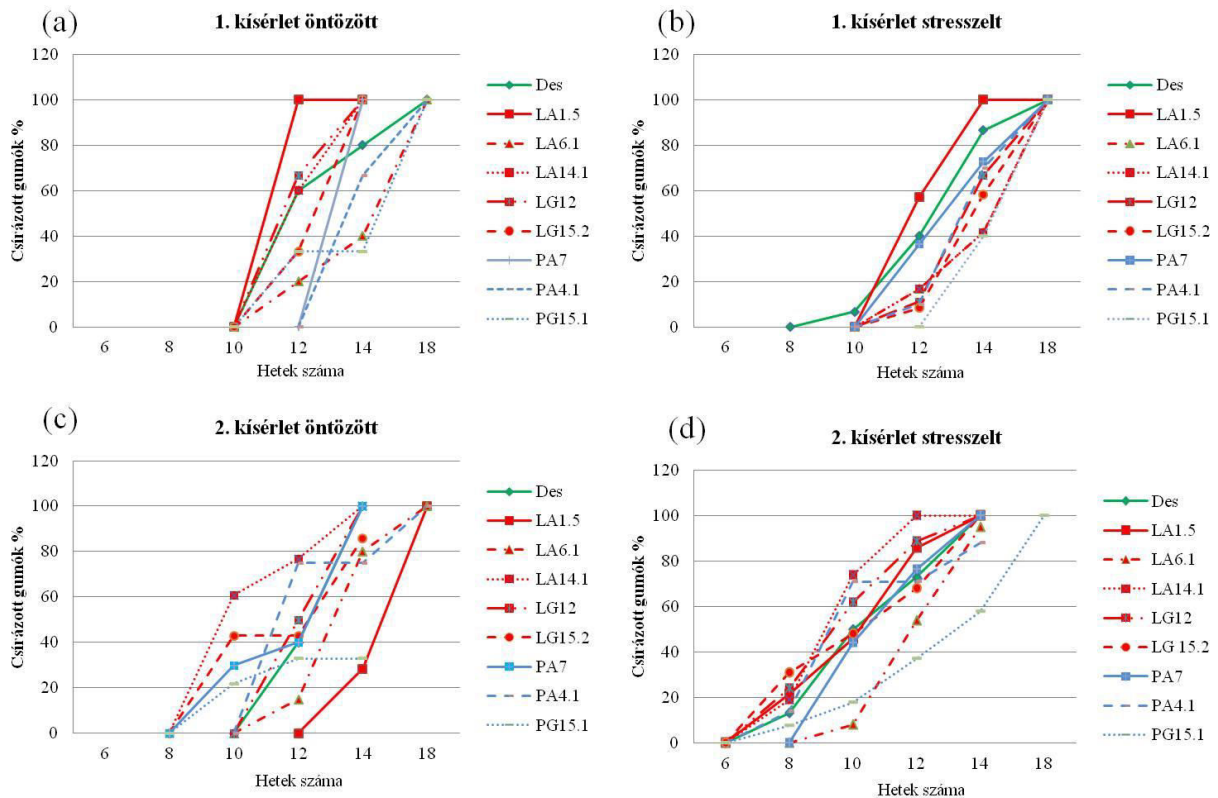
**25. ábra:** Öntözött és stresszelt növények gumóhozama (a) és gumószáma (b). Des: nem transzformált Desirée kontroll, LA, LG: *nptII-PRLIP2* transzgenikus vonalak; PA, PG: *nptII* transzgenikus vonalak. A csillag a  $P \leq 0.01$  ( $t$ -próba) szintű szignifikáns eltérést jelöli az öntözött Des kontrollhoz képest.

Szinte mindegyik szárazság-stresszelt növény gumói hosszúkas alakúak voltak, szemben az öntözött növényekével, amelyek gömbölyűbbek voltak (26. ábra).



**26. ábra:** Öntözött (a) és stresszelt (b) növények gumói 14 hét szobahőmérsékleten történt tárolás után.

A két kísérletben felszedett gumókat 18 hétig szobahőmérsékleten tároltuk és hetente megnéztük, hogy csíráznak-e. Az öntözött Desirée gumók mindkét kísérletben szinte azonos módon a 12. héten kezdtek el csírázni. Ehhez képest a stresszelt növények gumóinak csírázása jobban eltért a két kísérletben. Különösen igaz volt ez a transzgenikus növények gumóira. Az LA1.5 vonal pl., az 1. kísérlet alapján úgy tűnt, hogy hamarabb csírázik, mint a kontroll. Ezzel szemben a 2. kísérletben az öntözött LA1.5 növények gumói voltak a leglassabbak a csírázást illetően. Így tehát végső soron nem találtunk összefüggést a *PRLIP2* expresszió (21. ábra), vagy a megfigyelt fenotipikus változások (19. ábra) és a csírázás koraisága, vagy a nyugalmi állapot hossza között (27. ábra).



**27. ábra:** Az öntözött (a,c) és stresszelt (b,d) növények gumóinak csírázási %-a 18 hét szobahőmérsékleten való tárolás során

Az LA6.1 és LA14.1 vonalak csírázó gumóit a Desirée kontrollal együtt cserepekbe ültettük. Az LA14.1, de főleg az LA6.1 növények fejlődése optimális körülmények között elmaradt a kontroll Desirée-től (28. ábra). Mivel az LA6.1 vonalban erős *PRLIP2* expressziót mutattunk ki (21. ábra), feltételezhetnénk, hogy emiatt növekszik lassabban a növény. Ugyanakkor azonban meg kell jegyeznünk azt is, hogy vannak olyan vonalak, mint pl., az LA1.5, LG12, LG15.2, amelyekben az RT-PCR alapján erősebben expresszálódik a *PRLIP2*, mint a LA14.1 vonalban (21. ábra) mégsem mutatnak növekedésbeli különbséget. Ennek lehetséges magyarázatát a „Következtetések és javaslatok” című fejezetben írtam le.



**28. ábra:** Az öntözött LA6.1 (a) LA14.1 (b) és Desirée (c) növények





vonalaké. Ugyanakkor a szárazság hatására a VT növények leveleiben mintegy 65%-kal csökkent a keményítő mennyisége, míg a T1 és T2 vonalakban nem tapasztaltunk ilyen erős változást. Mindhárom vonalban megemelkedett viszont az inozitol, prolin és raffinóz szint (12. ábra/d-f), de a fruktóz, galaktóz és glükóz mennyisége csak a VT növények leveleiben nőtt szárazság hatására (12. ábra/g-i). A szacharóz szintet nem befolyásolta a szárazság egyik vonalban sem (12. ábra/j). Ebből arra következtetünk, hogy a burgonya növények számára igen fontos a szacharóz szint fenntartása a stressz alatt is. Feltételezzük, hogy a stressz során a szacharóz szint fenntartására a növény a keményítő szintézistől/szénhidrát anyagcserétől vonja meg az energiát.

Az inozitol stressz hatására jelmolekulaként viselkedik a növényekben (VALLURU et al., 2011). A transzgenikus növények levelében optimális körülmények között 1.4-1.6-szoros inozitol szintkülönbséget tapasztaltunk a VT-hez képest. Szárazság hatására megemelkedett az inozitol mennyisége mindhárom vonalban, azonban a T1 és T2 leveleiben ez az emelkedés nem volt olyan erőteljes, mint a VT-ben (12. ábra/d). Mivel az inozitol szint változása összhangban volt a keményítő tartalom csökkenésével, feltételezzük, hogy az inozitol közvetett módon befolyásolja a keményítő szintézist.

Az inozitolból származó galaktinol és a raffinóz családjába tartozó oligoszacharidok szintén jelmolekulaként viselkednek a növényekben (VALLURU et al., 2011). LEGAY és munkatársai (2011) egy szárazságtűrő burgonyafajta levelében magasabb galaktinol és raffinóz szintet találtak, mint egy szenzitív vonalban. Mi is drasztikus emelkedést tapasztaltunk a stressz hatására a raffinóz koncentrációban mindhárom vonal levelében (12. ábra/f). A T1 és T2 vonalak raffinóz szintje azonban, az inozitollal ellentétben, nem volt magasabb optimális körülmények között, mint a VT-é. Ezért tehát úgy gondoljuk, hogy az inozitol mennyiségét olyan transzkripció és/vagy biokémiai folyamatok határozzák meg, amelyeket a szárazság stressz és a *TPSI* gén expressziója egyaránt befolyásolhat, míg a raffinóz szint megváltozása inkább a talaj nedvességtartalmának csökkenésével állhat összefüggésben.

Stressz hatására minden vonal levelében ugrásszerűen megemelkedett a prolin szint (12. ábra/e). Több kísérletben is kimutatták, hogy különböző stresszek hatására a prolin koncentrációja extrém módon megemelkedik a növények levelében (OBATA et al., 2012). Mivel a VT-ben és a *TPSI* növények levelében egyaránt megnőtt a prolin mennyisége, viszont a VT növények kevésbé tűrték a szárazságot, mint a *TPSI* növények, arra a következtetésre jutottunk, hogy a prolin nem befolyásolja közvetlenül a növények szárazságtűrő képességét. Akárcsak a raffinóz koncentrációjának, valószínűleg a prolin mennyiségének a növekedése is a talajnedvesség csökkenésével hozható összefüggésbe. A raffinóz és a prolin szint emelkedése azonban nem óvja meg a növények levelét a hervadástól, hiszen a szárazságtűrő *TPSI*

vonalakban és a szenzitív, már szemmel láthatóan hervadó VT-ben is egyaránt magas volt mindkét vegyület koncentrációja.

### **5.1.2. A szárazság stressz nem teljesen egyformán befolyásolja a vad típusú és a TPS1 gént expresszáló T1 és T2 transzgenikus növények gumóinak metabolit tartalmát**

A T1, T2 és VT növények gumóinak vizsgálatához két új, egymástól független növényi tesztet indítottunk. A gumókban 33 metabolitot tudtunk detektálni (29. ábra).

A TPS1 vonalak gumói morfológiailag eltértek a VT növények gumóitól (13. ábra/a). Optimális körülmények között a transzgenikus vonalak gumószáma és tömege is kb. 50-60%-kal kisebb volt, mint a VT kontrollé. A periodikus szárazság stressz következtében a VT növények gumószáma megemelkedett, míg gumóhozama a felére csökkent (13. ábra/b,c). Korábban ilyen sok, apró méretű gumót figyeltek meg olyan mutánsoknál, amelyek nem voltak képesek felhasználni a szacharózt a keményítő szintézisre (MÜLLER-RÖBER et al., 1992). Mivel mi nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a szacharóz koncentrációban (15. ábra/e), ezért feltételezzük, hogy a szacharózon kívül más tényezők is szerepet játszanak a gumóképződésben, melyet érdemes lenne tovább vizsgálni.

A stressz következtében 14 metabolit mennyisége változott meg a gumókban (10. táblázat). A gumókban öntözött körülmények között alig volt detektálható mennyiségben jelen a prolin. Szárazság hatására viszont ugrásszerűen megemelkedett a szintje mindegyik vonalban (15. ábra/h). Ez a megfigyelés nem újszerű, hiszen már mások is kimutatták, hogy stressz hatására nő a prolin koncentrációja a burgonya gumóban, sőt nemcsak szárazság, hanem só- és szelén stressz esetén is (TEIXEIRA és PEREIRA, 2007; MAGGIO et al., 2008; JEZEK et al., 2011). A glutamin-szintáz, ami szárazság hatására aktiválódik a burgonyagumóban (TEIXEIRA és PEREIRA, 2007), részt vesz a nitrogén anyagcserében és a prolin koncentrációt is befolyásolja a növényekben (BRUGIERE et al., 1999). MAGGIO és munkatársai (2008) különböző szántóföldi kísérletekben aszályos körülmények között glutamin és glutamát szintemelkedést tapasztaltak. A szárazság-stresszelt növények gumóiban mi is emelkedést tapasztaltunk ezeknek a vegyületeknek a mennyiségében. Az aszparaginsav és fenilalanin szint is megemelkedett a növények gumóiban a stressz következtében (1. sz. melléklet). *Arabidopsis*-ban az *ASN1* gén kódolja az aszparagin-szintázt, aminek aktivitása következtében aszparagin és glutaminsav keletkezik. A prolin képződésében a  $\Delta 1$ -pirrolin-5-karboxilát-szintázt kódoló *P5CS* gén játszik szerepet. Mindkét gén expresszióját a bZIP11 transzkripciós faktor szabályozza, amit viszont a szacharóz szint negatív módon befolyásol. *Arabidopsis*-ban a bZIP11 expressziója fenilalanin akkumulációhoz is vezet (HANSON et al., 2008). Mi a stressz hatására nem

tapasztaltunk változást a szacharóz koncentrációban (15. ábra/e), ezért azt feltételezzük, hogy a prolint, aszparagint és fenilalanint szabályozó transzkripciós faktorok működését a szacharóz szint a burgonyában nem befolyásolja.

A prolin és raffinóz szint a szárazság stressz hatására a levelekben erőteljesen megemelkedett, míg a gumókban nem. Ez arra enged következtetni, hogy ugyanaz a stressz eltérő válaszokat is kiválthat a növény asszimiláló és raktározó szerveiben.

### **5.1.3. A tárolás szinte teljesen egyforma hatással van a vad típusú és a TPS1 gént expresszáló T1 és T2 transzgenikus növények gumóinak metabolit tartalmára**

A gumókat felszedés után két csoportra osztottuk. Az első csoportot frissen analizáltuk, a másik csoportot szobahőmérsékleten, sötétben 12 hét tárolás után. A tárolás 18 vegyület koncentrációját változtatta meg a gumóban (29. ábra).

Megállapítottuk, hogy nemcsak a stressz, de a tárolás hatására is megemelkedett az aszparagin szint a gumókban (15. ábra/f). A legjellegzetesebb különbségeket a tárolt VT, T1 és T2 vonalak gumóinak mannóz és fenilalanin tartalmában találtuk (15. ábra/d,g). Az optimális körülmények között fejlődött gumók mannóz és fenilalanin tartalma a tárolás hatására megemelkedett, míg a stresszelt növények gumóiban nem változott, vagy ellenkezőleg, inkább csökkent. A jelenség okát egyelőre nem ismerjük.

### **5.1.4. A TPS1 gén expressziója befolyásolja a növények nyugalmi állapotát és metabolit tartalmát**

A TPS1 gént expresszáló gumók később kezdtek el csírázni, mint a vad típus (13. ábra/d). A metabolit elemzés során 13 olyan vegyületet találtunk, amelyek mennyiségi különbséget mutattak a TPS1 gumókban a VT gumókhoz képest (29. ábra). Ezek közül az aszparagin mennyisége mind az öntözött, mind pedig a stresszelt körülmények között nőtt növények esetében magasabb volt a TPS1-, mint a VT gumókban, de a tárolás során csak az optimális körülmények között fejlődött gumókban emelkedett meg a szintje (15. ábra/f). A változások nagy része azonban, tendenciáját tekintve, hasonló volt a tárolt TPS1 és VT gumókban. Mivel a TPS1 gumók jóval később kezdtek el csírázni, mint a VT gumók, úgy gondoljuk, hogy ezek a változások inkább a gumók „öregedésével”, és nem a csírázással hozhatók összefüggésbe.

A gumó specifikus B33 promóter régiót tartalmazó, és az *E. coli* OtsA-val transzformált B33-OtsA burgonyagumók is később csíráztak, mint a vad típus, és az OtsA expresszió szintje

korrelált a gumók T6P tartalmával (DEBAST et al., 2011). Ebből arra következtek, hogy a T6P szint közvetlenül vagy közvetve befolyásolja a nyugalmi időszak hosszát. A kísérletünkben vizsgált *TPS1* vonalak a szárazság specifikus *StDS2* promóter régiót tartalmazzák (DÓCZI et al., 2002). Ennek ellenére, mint ahogy azt már korábban STILLER és munkatársai (2008) megállapították, a *TPS1*, ha gyengén is, de expresszál a levelekben optimális körülmények között is. A *TPS1* transzgenikus növények gumóiban is találtunk *TPS1* expressziót, ami a szárazság stressz körülmények között fejlődött gumókban kissé erősebb volt, mint az optimális körülmények között fejlődöttekben (JUHÁSZ et al., 2014). A tárolás viszont csökkentette a *TPS1* transzkriptum szintjét mind a T1 mind pedig a T2 gumókban. A gumók T6P tartalmát vizsgálva, csak a stresszelt VT növények tárolt gumóiban és az öntözött T2 növények frissen felszedett gumóiban találtunk szignifikáns különbséget az öntözött VT növények friss gumóinak T6P szintjéhez képest (16. ábra). Tehát a *TPS1* expresszió a mi esetünkben nincs hatással a T6P koncentrációra a gumókban, mégis - akárcsak a *B33-OtsA* gumóknak - a T1 és T2 gumóknak is hosszabb a nyugalma időszaka, mint a VT-nek. Ebből pedig az következik, hogy a T6P-nak nincs szerepe a nyugalmi periódus hosszának meghatározásában.

## 5.2. A *PRLIP2* expresszió hatása a burgonyára

A *PRLIP2* gén hatását a Desirée burgonya fajtára üvegházban, optimális és szárazság stressz körülmények között vizsgáltuk. Öt kiültetett transzgenikus vonal közül kettő, az LA6.1 és LA14.1 vonalak egyedei, optimális körülmények között kisebbre nőttek, mint a kontroll (19. ábra/a), de kevésbé viselte meg őket a vízmegvonás, kevésbé kopaszodtak fel, mint a kontroll (19. ábra/b,c). A másik fenotipikus változás, amit megfigyeltünk, az a gumók méretében és mennyiségében volt. Az LA6.1 növények alatt sok, apró méretű gumót találtunk. A stresszelt növények gumóhozama viszont minden vonal esetében alacsonyabb volt, mint az öntözött növényeké, azaz a *PRLIP2* expresszió nem tudta megakadályozni a gumóhozam csökkenését stressz körülmények között.

A vízmegvonást követően minden vonal levelének szignifikánsan csökkent az RWC értéke az öntözött Desirée-hez képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a *PRLIP2* gén expressziója nem tudja megvédeni a növényeket a vízmegvonás okozta vízvesztéstől. Az LA6.1 vonal leveleinek nemcsak stressz körülmények között, hanem öntözött állapotban is alacsonyabb volt a relatív víztartalma, mint a többi növényének, aminek magyarázatát egyelőre nem ismerjük.

A csírázással kapcsolatosan azt figyeltük meg, hogy az öntözött Desirée gumók mindkét kísérletben szinte azonos módon, a 12. héten kezdtek el csírázni. Ehhez képest a stresszelt

növények gumóinak csírázása eltérő volt a két kísérletben, főleg a transzgenikus gumók esetében. Régóta ismert, hogy a vegetációs periódus és a tárolás ideje alatti hőmérséklet, vízellátottság és fotoperiódus befolyásolja a csírázást. A nyugalmi állapotban lévő gumók, bár nem nőnek, de merisztémáik metabolikusan és hormonálisan aktívak (SONNEWALD és SONNEWALD, 2013). A mi vizsgálataink is azt mutatták, hogy a stressz és a tárolás megváltoztatja a gumók metabolit és hormon összetételét (10. táblázat és JUHÁSZ et al., 2014). Valószínű, hogy a stresszelt növények gumóinak fejlődését az egyéb környezeti faktorok, mint pl. a hőmérséklet és fotoperiódus, még erőteljesebben befolyásolják, mint az optimális vízellátottságú növényekét. Az is valószínű, hogy a stresszelt növények gumóinak fejlődése egyenetlenebb, mint az optimális körülmények között fejlődő gumóké. Mindez együttesen magyarázatot adhat arra, hogy miért volt kevésbé ismételtető és kevésbé szinkronizált a stresszelt gumók csírázása, mint a jól öntözöttekké. A *PRLIP2* expresszió a nyugalmi állapot hosszát nem befolyásolja (27. ábra).

A kicsírázott gumókat cserepekbe ültettük. Ebben a kísérletben is az LA6.1 és LA14.1 növények fejlődése optimális körülmények között elmaradt a kontroll Desirée növényekétől (28. ábra). Az LA6.1 növények fejlődése volt a leglassúbb és ezekben volt a legerősebb a *PRLIP2* expresszió (21. ábra). Ugyanakkor azonban az LA14.1 vonalban gyengébb volt a *PRLIP2* expresszió, mint pl. az LA1.5-ben, ami viszont nem mutatott fenotipikus elváltozásokat (21. ábra). Bár nem találtunk egyértelmű összefüggést a transzgen expresszió és fenotípus között, mégis nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy az észlelt elváltozásokat a *PRLIP2* expresszió okozza, mivel annak valószínűsége, hogy öt megvizsgált, független transzgenikus vonalból kettő azonos, vagy legalább is nagyon hasonló fenotípust mutasson, rendkívül kicsi.

A növényi lipáz gének expresszióját sok esetben kapcsolatba lehetett hozni a morfogenezissel (MATSUI et al., 2004; HONG et al., 2005), de megfigyelték aktivitásukat biotikus és abiotikus stressz-, valamint patogén fertőzés, ET és SA kezelés során is (JAKAB et al., 2003; NARUSAKA et al., 2003; LO et al., 2004).

A lipáz enzimek egyik csoportja a GDSL lipázok, amelyek nevüket az aminosav szekvenciájukban megfigyelhető jellegzetes Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] motívumról kapták (JIANG et al., 2012). Ide tartozik a GLIP1 (GDSL lipase-like 1) enzim is, amiről OH és munkatársai (2005) megállapították, hogy erősen indukálódik etefon kezelés hatására és fontos szerepet játszik az *Arabidopsis* növények *Alternaria brassicicola* elleni védekezésében.

A SA által indukált *AtLTL1* expresszió növelte a só és más abiotikus stresszel szembeni toleranciát *Arabidopsis*-ban és élesztőben egyaránt (HONG et al., 2008; NARANJO et al., 2006; RIEMANN et al., 2007). HONG és munkatársai (2008) paprikából izolálták a *CaGLIP1*-t, ami szintén egy GDSL lipáz. A *CaGLIP1*-gyel transzformált *Arabidopsis* növények mannitol kezelés

után is mintegy 75-100%-ban csíráztak, míg a vad típusnál csak a magok 15%-a élte túl a kezelést. Kifejlett, 3 hetes növényeket is teszteltek szárazság stresszel. Tizenkét napos vízmegvonást követően a vad típusú növények levelei teljesen elhervadtak, míg a *CaGLIP1* növényeket nem viselte meg a szárazság. Továbbá megállapították azt is, hogy a *CaGLIP1* növények csírázását sem az ABA kezelés, sem a glükóz stressz nem befolyásolja. A csírázás során az ABA és szénhidrát útvonalak genetikailag összefüggnek egymással (GAZZARRINI és MCCOURT, 2001), épp ezért HONG és munkatársai (2008) úgy vélik, hogy a *CaGLIP1*-gyel transzformált növények szárazság, ABA és glükóz kezelés során mutatott toleranciája kapcsolatban áll ezekkel az útvonalakkal.

*Arabidopsis*-ban az *RGE1* (retarded growth of embryo 1), és az *EXL4* (extracellular lipase 4) génekkel kapcsolatos kutatásokból kiderült, hogy ezek összefüggésben állnak a GDSL lipázok expressziójával, és más fejlődésért felelős folyamatokkal (KONDOU et al., 2008; RIEMANN et al., 2007; UPDEGRAFF et al., 2009). A *RGE1* gén funkcióvesztéses mutációja apró, fonnyadt magvak fejlődéséhez vezetett. Ezek a mutánsok – akárcsak az általunk izolált LA6.1 és LA14.1 burgonya vonalak - visszamaradtak a növekedésben. Egy valószínűsíthetően GDSL lipázokhoz tartozó gén expressziójának csökkenését mutatták ki ezekben a mutánsokban, így feltételezhetően ez befolyásolta a magok morfológiáját is (KONDOU et al., 2008).

A fent említett példákból kiderül, hogy a legtöbb kísérletet *Arabidopsis* növényeken végezték ebben a témában. Ezen kívül vizsgáltak kukoricát (BRICK et al., 1995), paprikát (HONG et al., 2005; HONG et al., 2008) és paradicsomot is (MATSUI et al., 2004), de burgonyáról szóló kísérletek leírását nem találtuk az irodalomban. A mi munkánk újszerűsége abban áll, hogy a lipáz génekhez tartozó *PRLIP2* gént bevittük és megnyilvánítottuk burgonyában, és az így kapott transzgenikus növényeket üvegházi körülmények között teszteltük öntözött és szárazság stressznek kitett állapotban. Megállapítottuk, hogy két vonal, a levelek megtartását tekintve, ellenállóbbá vált a szárazsággal szemben, ami hasonló eredmény ahhoz, mint amit HONG és munkatársai (2008) kaptak a *CaGLIP1* megnyilvánításával *Arabidopsis*-ban. A levelek megtartása a szárazság okozta korai szenescencia megakadályozására utal. Mivel ennek a két vonalnak a vegetatív fejlődése is lelassult, további vizsgálatuk érdekes összefüggések felismeréséhez vezethet a növekedés/fejlődés és a szenescencia tekintetében.

## 6. Összefoglalás

A burgonya a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett élelmisznővény a világon, azonban igen érzékeny a szárazságra. Ezért munkacsoportunk kísérletet tett a burgonya szárazságtűrő képességének javítására.

Ismert volt, hogy a trehalóz, egy nem redukáló diszacharid, ozmoregulátorként fontos szerepet játszik a szárazságtűrésben. A burgonya trehalóz szintjének emelésére STILLER és munkatársai (2008) két transzgenikus burgonyavonalat (T1, T2) hoztak létre, melyekben az *StDS2* promóter (DÓCZI et al., 2002) segítségével az élesztő *TPS1* génjét expresszáltatták. Az alacsony *TPS1* expresszió ellenére is a növények szárazságtűrőbbek voltak, mint a kontroll, azonban a *TPS1* transzgenikus növények növekedése optimális körülmények között elmaradt a kontrollétól, miközben 99 gén expressziója is megváltozott a levelekben (KONDRÁK et al., 2012). A génexpressziós változások metabolikus változásokkal is járnak, amik módosíthatják a gumók beltartalmi értékeit is. Ezért kísérleteim egyik célja a T1 és T2 transzgenikus vonalak és a vad típusú (VT) burgonya leveleinek és gumóinak beltartalmi és metabolit szintű összehasonlítása volt öntözött és szárazság stressz körülmények között. Az elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy:

1. Öntözött körülmények között 22 vegyületből háromnak, a maltóznak, az almasavnak és inozitolnak, más a mennyisége a *TPS1* növények levelében, mint a VT-ben.
2. A VT növények leveleinek keményítő tartalma jóval magasabb optimális körülmények között, mint a T1 és T2 vonalaké.
3. Szárazság hatására a VT növények leveleiben nagyon lecsökkent a keményítő mennyisége, míg a T1 és T2 vonalakban nem tapasztaltunk ilyen erős változást. Az inozitol szint emelkedése összhangban volt a keményítő tartalom csökkenésével, ezért feltételezzük, hogy az inozitol jelmolekulaként közvetett módon befolyásolja a keményítő szintézist.
4. A fruktóz, galaktóz és glükóz mennyisége csak a VT növények leveleiben nőtt szárazság hatására.
5. A szacharóz szintet nem befolyásolta a szárazság egyik vonalban sem.
6. Szárazság hatására a VT-ben és a *TPS1* növények levelében egyaránt megnőtt a prolin és a raffinóz mennyisége. Mivel a VT növények kevésbé tűrték a szárazságot, mint a *TPS1* növények, ebből arra következtettünk, hogy a prolin és a raffinóz koncentráció emelkedése nem védi meg a növényeket a vízvesztéstől.
7. A *TPS1* vonalak gumóhozama kisebb volt, de a szárazság hatására kevésbé csökkent, mint VT-é.



8. A *TPSI* vonalak gumói morfológiailag eltértek a VT növények gumóitól és később kezdtek el csírázni, mint a VT gumók.
9. A gumókban 33 metabolitot tudunk detektálni. MANOVA statisztikai vizsgálat eredménye alapján 28 vegyület mennyisége változott valamilyen hatásra, azaz a stressz és tárolás együttes hatására (7 vegyület), a *TPSI* transzgén jelenléte következtében (13 vegyület), a tárolás folyamán (18 vegyület), vagy a vízmegvonás miatt (14 vegyület).

A metabolit analízis tehát, az alkalmazott statisztikai módszerek segítségével, egyértelműen rámutatott arra, hogy az anyagcsere folyamatokat a legkisebb genetikai változások, a környezet és az élettani folyamatok előrehaladása egyaránt nagymértékben befolyásolja.

A burgonya szárazságtűrő képességének javítására tett másik kísérletünk a „priming” jelenségével hozható összefüggésbe. JAKAB és munkatársai (2003) megállapították, hogy a „priming” során bekövetkező „immunvédelem” *Arabidopsis*-ban szorosan összefügg a patogenezishez köthető lipáz gének, a *PRLIP*-ek expressziójával. Ezért elhatároztuk, hogy bevisszük az *Arabidopsis PRLIP2* génjét a burgonyába és megvizsgáljuk annak hatását a burgonya szárazságtűrő képességére.

1. A *PRLIP2* gént bináris vektorba klónoztuk és keresztezéssel *E. coli*-ből *A. tumefaciens* ALG0 és C58C1(pGV2260) törzsekbe juttattuk.
2. Az így előállított *Agrobacterium* törzsekkel burgonya leveleket transzformáltunk, hajtásokat regeneráltunk és gyökerezettünk szelektív körülmények között, *in vitro*.
3. A transzformáció sikerességét a *PRLIP2* illetve *nptII* génre tervezett primer párokkal végzett PCR-rel bizonyítottuk.
4. A transzgén(ek) expressziós szintjét RT-PCR-rel határoztuk meg, aminek alapján alacsony, közepes és erős expressziós szintű csoportokba soroltuk a növényeket.
5. A további vizsgálatokra öt *PRLIP2* transzgént tartalmazó, és három „üres” vektorral transzformált kontroll vonalat választottunk ki alacsony, közepes, és magas expressziós szinttel.
6. A *PRLIP2* transzgént expresszáló vonalak fenotípusos vizsgálatát és szárazsággal szembeni ellenálló képességét üvegházi körülmények között teszteltük. A teljes tenyésztési idő alatt négy száraz periódust éltek át a növények. A *PRLIP2*-vel transzformált vonalak közül kettőt kevésbé viselt meg a szárazság, mint a többi növényt, de ez nem volt elegendő ahhoz, hogy a *PRLIP2* expresszió megakadályozza a gumóhozam csökkenését stressz körülmények között.
7. A gumókat szobahőmérsékleten tároltuk és megállapítottuk, hogy a *PRLIP2* expresszió a nyugalmi állapot hosszát nem befolyásolja.

8. A kicsírázott gumókat cserepekbe ültettük és az abból kihajtott növényeket újra üvegházi körülmények között neveltük és teszteltük szárazság stressz során. Két *PRLIP2*-t expresszáló vonal fejlődése optimális körülmények között elmaradt a kontroll növényekétől, de nem találtunk egyértelmű összefüggést a *PRLIP2* expresszió erőssége, és a növények fejlődése között.

## 5. Summary

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the world's fourth-largest food crop. Nevertheless, it is very sensitive to drought. Therefore, our research group aims to improve the drought tolerance of the elite potato varieties.

Trehalose is a non-reducing disaccharide. In bacteria, yeast and desiccation-tolerant plants, it accumulates under osmotic/dehydration stress and helps cells to survive by protecting membranes and proteins. STILLER et al. (2008) isolated two transgenic potato lines, T1 and T2, expressing the trehalose-6-phosphate synthase (*TPSI*) gene of yeast. The drought-inducible promoter *StDS2* was fused to *TPSI* and a marker-free transformation method applied. In contrast to the expected drought-induced expression, only very low constitutive *TPSI* expression was detected in the transgenic lines. This expression pattern, however, was sufficient to alter the plants' drought responses. Under optimal growth conditions, the *TPSI* lines grew more slowly and the expression of 99 genes altered in the leaves (KONDRÁK et al., 2012). Changes in gene expression can cause alterations in plants' metabolic profile and modify the metabolite content of tubers. Thus the aim of my experiments was the comparison of the metabolic profile of the leaves and tubers of the wild- type (WT) and transgenic (T1, T2) plants grown under optimal and drought stress conditions.

Results:

1. Under optimal growth conditions, the amount of maltose, malic acid and inositol was changed in the leaves of *TPSI* lines compared to WT.
2. The starch content of WT leaves was much higher under optimal growth conditions than that of the T1 and T2 leaves.
3. The drought stress extremely decreased the starch level of WT leaves, while in the transgenic lines only a moderate decline in starch content was observed. The increase in inositol level correlated with the low starch content. We assume that the inositol serves as a signal for the reduction of starch synthesis.
4. The drought stress elevated the fructose, galactose and glucose levels only in WT leaves.
5. The sucrose level was changed neither in WT nor in *TPSI* leaves.
6. The drought stress induced the accumulation of proline and raffinose in both WT and *TPSI* leaves. Since the WT plants had lower water content than the *TPSI* plants we concluded that the elevated levels of proline and raffinose cannot prevent the plants from wilting.
7. Under optimal growth conditions, the tuber yield of *TPSI* lines was lower than that of the WT, however, periodic drought resulted in smaller yield loss in *TPSI* lines than in WT.

8. The *TPS1* expression altered the shape of the tubers and increased the duration of the dormancy period compared with WT.
9. A total of 33 compounds were detected in the tubers out of which the concentration of 28 compounds was significantly affected by the expression of *TPS1* (13 compounds), storage (18 compounds), drought stress (14 compounds) and the combination of stress and storage (7 compounds).

As an alternative approach we have tried to improve the drought tolerance of potato by „priming”. Previously, it was found that the protection caused by „priming” in *Arabidopsis* is connected to the *PRLIP* (pathogenesis related lipase) gene expression (JAKAB et al., 2003). Therefore, we decided to transfer the *PRLIP2* gene of *Arabidopsis* into potato and to examine its effect on the drought tolerance of the potato.

1. The *PRLIP2* gene was cloned into a binary vector and transferred from *E. coli* into the *A. tumefaciens* strains ALG0 and C58C1(pGV2260).
2. *Solanum tuberosum* cv. 'Desirée' leaves were transformed with the generated *Agrobacterium* strains. On selective media, the shoots and roots were regenerated, *in vitro*.
3. Efficiency of transformation was tested by PCR using *PRLIP2* and *nptII* primer pairs.
4. According to the expression level of the transgenes detected by RT-PCR, the transgenic plantlets were sorted into high-, medium- and low expression level categories.
5. For further investigation, five lines containing the *PRLIP2* gene and three control lines transformed with “empty” vector were chosen. The selected lines had different expression levels of the transgenes.
6. The pleiotropic effect of the transgene and the drought tolerance of the selected lines were tested in greenhouse. Four drought periods were generated during the whole growing season. Two out of the five tested *PRLIP2* lines showed improved drought tolerance. However, the expression of *PRLIP2* did not prevent the plants from the yield loss under stress conditions.
7. The tubers were collected and stored at room temperature. The expression of the *PRLIP2* gene did not influence the dormancy of the tubers.
8. The rooted tubers were planted into pots in the greenhouse and the developed plants were tested again under periodic drought conditions. Two *PRLIP2* lines grew slower than WT, however, no correlation between the expression level of the transgene and the growth habit of the plants could be established.

## 8. IDÉZETT IRODALOM

ABEBE, T., GUENZI, A.C., MARTIN, B., CUSHMAN, J.C. (2003): Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 131, 1748–1755. p.

ÁBRAHÁM, É. B. (2009): Fajta és öntözés hatása a burgonya termésmennyiségének és minőségének alakulására mezőszéki talajon. Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei, Debreceni Egyetem, Hankóczy Jenő Növénytermesztési, Kertészeti és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

AGARWAL, P.K., JHA, B. (2010): Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biol Plant*, 54:201–212. p.

AHMAD, R., KIM, M.D., BACK, K.H., KIM, H.S., LEE, H.S., KWON, S.Y., MURATA, N., CHUNG, W.I., KWAK, S.S. (2008): Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses. *Plant Cell Rep.*, 27 (4) 687–698. p.

ALCÁZAR, R., BITRIÁN, M., BARTELS, D., KONCZ, C., ALTABELLA, T., TIBURCIO, A. F. (2011): Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in *Arabidopsis* and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signal Behav.*, 6 (2): 243–250. p.

ALVAREZ, S., MARSH, E.L., SCHROEDER, S.G., SCHACHTMAN, D. P. (2008): Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell & Environment*, 31, 325–340. p.

ANJUM, S. A., WANG, L. C., FAROOQ, M., KHAN, I., XUE, L. L. (2011): Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defense system and yield in soybean under drought. *J. Agron. Crop Sci.*, Vol. 197, 4, 296–301. p.

APEL, K., HIRT, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373-399. p.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J., WIECZOREK, J., DRZEWIECKA, K., CHMIELOWSKA-BAK, J., ABRAMOWSKI, D., IZBIANSKA, K. (2013a): Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 239 (3): 679–694. p.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M., KOSMALA, A., JANUS, L., ABRAMOWSKI, D., FLORYSZAK-WIECZOREK, J. (2013b): The proteome response of potato leaves to priming agents and S-nitrosoglutathione. *Plant Science*, 198, 83-90. p.

ARAYA, Y.N. (2007): Ecology of Water Relations in Plants. In: Not Set ed. Encyclopaedia, [http://oro.open.ac.uk/6222/1/Ecology\\_of\\_plant\\_water\\_Araya\\_ELS.pdf](http://oro.open.ac.uk/6222/1/Ecology_of_plant_water_Araya_ELS.pdf)

BÄNZIGER, M., SETIMELA, P. S., HODSON, D., VIVEK, B. (2004): Breeding for improved drought tolerance in maize adapted to southern Africa, in *New Directions for a Diverse Planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress (Brisbane, QLD) 26 September–1 October 2004.* [http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/symposia/1/1/152\\_banzigerm.htm#TopOfPage](http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/symposia/1/1/152_banzigerm.htm#TopOfPage)

- BARTELS, D., SUNKAR, R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 24:23–58. p.
- BËNZIGER, P.S., BEECHER, B., GRAYBOSCH, R.A., IBRAHIM, A.M.H., BALTENSBERGER, D.D., NELSON, L.A. (2008): Registration of ‘NEO1643’ wheat. *J Plant Registr*, 2(1):36–42. p.
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254. p.
- BRICK, D.J., BRUMLIK, M.J., BUCKLEY, J.T., CAO, J.X., DAVIES, P.C., MISRA, S., TRANBARGER, T.J., UPTON, C. (1995): A new family of lipolytic enzymes with members in rice, Arabidopsis and maize. *FEBS Lett.*, 377:475–480. p.
- BRUGIERE, N., DUBOIS, F., LIMAMI, A.M., LELANDAIS, M., ROUX, Y., SANGWAN, R.S., BUCKENHÜSKES, H.J. (2005): Nutritionally relevant aspects of potatoes and potato constituents. In: Haverkort, A. J. és Struik, P. C. (szerk.): Potato in Progress: Science Meets Practice. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 17-26. p.
- BRUGIERE, N., DUBOIS, F., LIMAMI, A. M., LELANDAIS, M., ROUX, Y., SANGWAN, R. S., HIREL, B. (1999): Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *The Plant Cell*, 11, 1995–2012. p.
- CARMO-SILVA, E.A., GORE, M.A., ANDRADE-SANCHEZ, P., FRENCH, N.A., HUNSAKER, J.D., SALVUCCI, E. M. (2012): Decreased CO<sub>2</sub> availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 83, 1–11. p.
- CASTIGLIONI, P., WARNER, D., BENSEN, R.J., ANSTROM, D.C., HARRISON, J., STOECKER, M., ABAD, M., KUMAR, G., SALVADOR, S., D'ORDINE, R., NAVARRO, S., BACK, S., FERNANDES, M., TARGOLLI, J., DASGUPTA, S., BONIN, C., LUETHY, M.H., HEARD, J.E. (2008): Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions. *Plant Physiology*, Vol. 147,2, 446-455. p.
- CHAPAGAIN, A.K., HOEKSTRA, A.Y. (2004): Water footprints of nations. Value of water research report series no. 16, UNESCO-IHE. The Netherlands: Delft; <http://www.waterfootprint.org>
- CHAWLA, R., SHAKYA, R., ROMMENS, C. M. (2012): Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 913–924. p.
- CHEN, M., WANG, Q.Y., CHENG, X.G., XU, Z.S., LI, L.C., YE, X.G. (2007): GmDREB2, a soybean DREbinding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun.*, 353:299–305. p.
- CHEN, T.H.H., MURATA, N. (2008a): Glycinebetaine: An effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci*, 139, 499–505. p.

- CHEN, J. Q., MENG, X. P., ZHANG, Y., XIA M., WANG, X. P. (2008b): Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol. Lett.* 30, 2191–2198. p.
- COHEN, Y. (2002):  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.*, 86:448-457. p.
- COMINELLI, E., CONTI, L., TONELLI, C., GALBIATI, M. (2013): Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*, Vol. 30, Number 4.
- CONRATH, U. (2009): Priming of Induced Plant Defense Responses. *Advances in Botanical Research*, Vol. 51 0065-2296/09
- CONRATH, U. (2011): Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, Vol. 16, No. 10.
- CORTINA, C., CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A. (2005): Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.*, 169, 75-82. p.
- CUTLER, S. R., RODRIGUEZ, P. L., FINKELSTEIN, R. R., ABRAMS, S. R. (2010): Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651–679. p.
- DE JONG, A., YAKIMOVA, E.T., KAPCHINA, V.M., WOLTERING, E.J. (2002): A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta*, 21, 537–545. p.
- DEBAST, S., NUNES-NESE, A., HAJIREZAEI, M.R., HOFMANN, J., SONNEWALD, U., FERNIE, A.R., BÖRNKE, F. (2011): Altering Trehalose-6-Phosphate Content in Transgenic Potato Tubers Affects Tuber Growth and Alters Responsiveness to Hormones during Sprouting. *Plant Physiology*, Vol. 156, 1754–1771. p.
- DEBLAERE, R., BYTEBIER, B., DE GREVE, H., DEBROEK, F., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid derived vectors of Agrobacterium mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.*, 13, 4777-4788. p.
- DEVI, R., KAUR, N., GUPTA, A.K. (2012): Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J Biochem Biophys.*, 49(4):257-65. p.
- DIETZE, J., BLAU, A. AND WILLMITZER, L. (1995) Agrobacterium-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In *Gene Transfer to Plants* (Potrykus, I. és Spangenberg, G. szerk.). Berlin: Springer-Verlag, 24–29. p.
- DITTA, G.S., STANFIELD, D., CORBIN, D., HELINSKI, D.R. (1980): Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 7347-7351. p.
- DÓCZI, R., CSANAKI, C., BÁNFALVI, Z. (2002): Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, StDS2. *Plant Cell Environ* 25:1197–1203. p.
- DURRANT, W. E., DONG, X. (2004): Systemic acquired resistance. *AnnuRev Phytopathol.*, 42:185-209. p.

- ECKARDT, N.A., COMINELLI, E., GALBIATI, M., TONELLI, C. (2009): The future of science: food and water for life. *Plant Cell* 21:368–72. p.
- ELBEIN, A. D., PAN, Y. T., PASTUSZAK, I., CARROLL, D. (2003): New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 17R-27R.
- ELTAYEB, A.E., YAMAMOTO, S., HABORA, M.E., MATSUKUBO, Y., AONO, M., TSUJIMOTO, H., TANAKA, K. (2010): Greater protection against oxidative damages imposed by various environmental stresses in transgenic potato with higher level of reduced glutathione. *Breed. Sci.*, 60, 101–109. p.
- EVERS, D., LEFÈVRE, I., LEGAY, S., LAMOUREUX, D., HAUSMAN, J-F., ROSALES, R.O.G., TINCOPA MARCA, L.R., HOFFMANN, L., BONIERBALE, M., SCHAFLEITNER, R. (2010): Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, Issue 9, 2327-2343. p.
- FAO. Water at a glance; 2007. <http://www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance>.
- FERNIE, A.R., WILLMITZER, L. (2001): Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol*, 127:1459–1465. p.
- David H. Figurski, D.H., Helinski, D.R. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *PNAS*, vol. 76 no. 4, 1648–1652. p.
- FINKELSTEIN, R.R., GAMPALA, S.S., ROCK, C.D. (2002): Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: 15-45 p.
- FLEXAS, J., RIBAS-CARBÓ, M., BOTA, J., GALMÉS, J., HENKLE, M., MARTÍNEZ-CAÑELLAS, S., MEDRANO, H. (2006): Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytol.*, 172:73-82. p.
- FLORYSZAK-WIECZOREK, J., ARASIMOWICZ-JELONEK, M., MILCZAREK, G., JANUS, L., PAWLAK-SPRADA, S., ABRAMOWSKI, D., DECKERT, J., BILLERT, H. (2012): Nitric oxide-mediated stress imprint in potato as an effect of exposure to a priming agent. *Mol Plant Microbe Interact.*, 25(11):1469-77. p.
- FOYER, C.H., NOCTOR, G. (2005): Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Env.*, 28:1056-71. p.
- FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUT-RELLA, M., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., MÉTRAUX, J.P., KESSMANN, H., RYALS, J. (1996): A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, 10, 61–70. p.
- FUJITA, Y., FUJITA, M., SHINOZAKI, K.J. (2011): ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Plant Res.*, 124(4):509-25. p.
- GARG, A., KIM, J., OWENS, T., RANWALA, A., CHOI, Y., KOCHIAN, L., WU, R. (2002): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 15898–15903. p.



GAZZARRINI, S., MCCOURT, P. (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 4:387–391. p.

GIRI, J. (2011): Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav.*, 6(11): 1746–1751. p.

GITAY, H., BROWN, S., EASTERLING, W., JALLOW, B. (2001): Ecosystems and their goods and services. In: McCarthy JJ, Canziani OF, Leary NA, Dokken DJ, White KS, Climate change 2001: impacts, adaptation, and vulnerability; Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of IPCC. Cambridge: Cambridge University Press, 237–342. p.

GOPAL, J., IWAMA, K. (2007): In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep.*, 26(5):693-700. p.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8, 629–643. p.

GUSTA, L., BENNING, N., WU, G., LUO, X., LIU, X., GUSTA, M., MCHUGHEN, A. (2009): Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology. *Mol. Breed.*, 24 103–115. p.

HAASE, N.U. (2007): The canon of potato science: 50. The nutritional value of potatoes. *Potato Research*, 50: 415-417. p.

HAJDUKIEWICZ, P., SVAB, Z., MALIGA P. (1994): The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, Vol. 25, Issue 6, 989-994. p.

HANAHAN D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557–580. p.

HANIN, M., BRINI, F., EBEL, C., TODA, Y., TAKEDA, S., KHALED, K. (2011): Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signal Behav.*, 6(10): 1503–1509. p.

HANSON, J., HANSEN, M., WIESE, A., HENDRIKS, M. M. W. B., SMEEKENS, S. (2008): The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *The Plant Journal*, 53, 935-949. p.

HARE, P.D., CRESS, W.A., VAN STADEN, J. (1997): The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regul.*, 23: 79-103. p.

HESZKY L, FÉSÜS L, HORNOK L (2005): Mezőgazdasági biotechnológia, Agroinform, A növényi géntechnológia alapjai, 156-162. p.

HIREL, B. (1999): Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*, 11. 1995–2012. p.

- HOLMSTRÖM, K.O., WELIN, B., MANDAL, A., KRISTIANSDOTTIR, I., TEERI, T.H., LAMARK, T., STROM, A.R., PALVA, E.T (1996): Production of the Escherichia coli betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. *Plant J.*, 5, 749-758. p.
- HONG, J.K., CHOI, H.W., HWANG, I.S., KIM, D.S., KIM, N.H., CHOI, D.U. S., KIM, Y.J., HWANG, B.K. (2008): Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta*, 227(3):539-558. p.
- HONG, J.K., HWANG, B.K. (2005): Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic PR-1 gene in Arabidopsis. *Physiol Plant.*, 124:267–277. p.
- HOOD, E.E., CHILTON, W.S., CHILTON, M.D., FRALEY, R.T. (1984): T-DNA and opine synthetic loci in tumors incited by Agrobacterium tumefaciens A281 on soybean and alfalfa plants. *J Bacteriol.*, 168(3):1283–1290. p.
- HSIEH, T.H., LEE, J.T., CHARNG, Y.Y., CHAN, M.T. (2002): Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*, 130:618–26. p.
- HU, H., DAI, M., YAO, J., XIAO, B., LI, X., ZHANG, Q., XIONG, L. (2006): Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 12987–12992. p.
- HUBBARD, K. E., NISHIMURA, N., HITOMI, K., GETZOFF, E. D., SCHROEDER, J. I. (2010): Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development*, 24, 1695–1708. p.
- IGARASHI, Y., YOSHIBA, Y., SANADA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., WADA, K., SHINOZAKI, K. (1997): Characterization of the gene for Delta(1)- pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in Oryza sativa L. *Plant Mol Biol.*, 33:857–865. p.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-28. p.
- IORDACHESCU, M., IMAI, R. (2008): Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Integr Plant Biol.*, 50: 1223–1229. p.
- ITO, Y., KATSURA, K., MARUYAMA, K., TAJI, T., KOBAYASHI, M., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2006): Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.*, 47, 1–13. p.
- ITURRIAGA, G., SUAREZ, R., NOVA-FRANCO, B. (2009): Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int J Mol Sci.*, 10: 3793–3810. p.
- JACKSON, S.D. (1999): Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol.*, 119:1–8. p.
- JAIN, N.K., ROY, I. (2009): Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.*, 18: 24–36. p.

JAKAB, G., COTTIER, V., TOQUIN, V., RIGOLI, G., ZIMMERLI, L., MÉTRAUX, J.P., MAUCH-MANI, B. (2001): Beta-aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107:29-37. p.

JAKAB, G., MANRIQUE, A., ZIMMERLI, L., MÉTRAUX, J.P., MAUCHI-MANI, B. (2003): Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132:2230–2239. p.

JAKAB, G., TON, J., FLORS, V., ZIMMERLI, L., MÉTRAUX, J.P., MAUCH-MANI, B. (2005): Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*, 139, 267–274. p.

JEFFERIES, R. A., MACKERRON, D. K. L. (1993): Responses of potato genotypes to drought. II. Leaf area index, growth and yield. *Annals of Applied Biology*, 105–112. p.

JEZEK, P., HLUSEK, J., LOSAK, T., JUZL, M., ELZNER, P., KRACMAR, S., MARTENSSON, A. (2011): Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant, Soil & Environment*, 57, 315-320. p.

JUHÁSZ, Z., DANCS, G., MARINCS, F., VOSSEN, M., ALLEFS, S., BÁNFALVI, Z. (2014) Vitamin C, B5, and B6 contents of segregating potato populations detected by GC-MS: a method facilitating breeding potatoes with improved vitamin content. *Plant Breeding* doi: 10.1111/pbr.12169 (published online: 27 FEB 2014)

KARAKAS, B., OZIAS-AKINS, P., STUSHNOFF, C., SUEFFERHELD, M., RIEGER, M. (1997): Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 20, 609–616. p.

KARIM, S., ARONSSON, H., ERICSON, H., PIRHONEN, M., LEYMAN, B., WELIN, B., MÄNTYLÄ, E., PALVA, E.T., VAN DIJCK, P., HOLMSTRÖM, K.O. (2007): Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol Biol*;64(4):371-86. p.

KASUGA, M., LIU, Q., MIURA, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (1999): Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17: 287–91. p.

KAVI KISHOR, P.B., HONG, Z., MIAO, G.H., HU, C.A.A., VERMA, D.P.S. (1995): Over-expression of d-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 25, 1387–1394. p.

KEMPA, S., KRASENSKY, J., DAL SANTO, S., KOPKA, J., JONAK, C. (2008): A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS One*, 3:e3935

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, S., RYALS, J. (1994): Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 439–459. p.

KEYSTER, M., KLEIN, A., LUDIDI, N. (2012): Caspase-like enzymatic activity and the ascorbate-glutathione cycle participate in salt stress tolerance of maize conferred by exogenously applied nitric oxide. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 349-360. p.

- KHAN, M.S., YU, X., KIKUCHI, A., ASAHINA, M., WATANABE, K.N. (2009): Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*, 26, 125–134. p.
- KHUSH, G.S. (2001): Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, 2:815–22. p.
- KING, B., STARK, J., LOVE, S. (2003): Potato production with limited water supplies, Idaho Potato Conference, <http://www.cals.uidaho.edu/potatoes/Research%26Extension/Author/Love,Steve/Love-PotatoProductionWithLimitedWaterSupplies-03.pdf>
- KINNERSLEY, A. M., TURANO, F. J. (2000): Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 479–509. p.
- KLOSTERMAN, B., DE KOEYER, D., GRIFFITHS, R., FLINN, B., STEUERNAGEL, B., SCHOLZ, U., SONNEWALD, S., SONNEWALD, U., BRYAN, G.J., PRAT, S., BÁNFALVI, Z., HAMMOND, J.P., GEIGENBERGER, P., NIELSEN, K.L., VISSER, R.G., BACHEM, C.W. (2008): Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Funct Integr Genomics*, 8:329–340. p.
- KNIPP, G., HONERMEIER, B. (2006): Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *J. Plant Physiol.*, 163 392–397. p.
- KOLBERT, Z. (2009): A nitrogén-monoxid (NO) szerepe, keletkezése és forrása auxin kezelés, valamint ozmotikus stressz alatt gyökerekben. Doktori (PhD) értekezés, Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Növénybiológiai Tanszék, Biológia Doktori Iskola
- KONDOU, Y., NAKAZAWA, M., KAWASHIMA, M., ICHIKAWA, T., YOSHIKAWA, T., SUZUKI, K., ISHIKAWA, A., KOSHI, T., MATSUI, R., MUTO, S. (2008): RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* 147:1924-1935. p.
- KONDRÁK, M., MARINCS, F., ANTAL, F., JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2012): Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.*, 30;12:74. p.
- KONDRÁK, M., MARINCS, F., KALAPOSI, B., JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2011): Transcriptome analysis of potato leaves expressing the trehalose-6-phosphate synthase 1 gene of yeast. *PLoS One*. 6(8):e23466
- KRASENSKY, J., JONAK, C. (2012): Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot.*, 63(4):1593-608.
- KRUPPA, J., GYŐRI, Z., SÁRVÁRI, M. (2003): A burgonya minőségét, piacosságát befolyásoló ökológiai és agrotechnikai tényezők. *Burgonyatermesztés*, 8. 7-14. p.
- KRUPPA, J., GYŐRI, Z., SÁRVÁRI, M., ZSOM, E. (2003): A vízellátás hatása a burgonya minőségére. MTA Növénynevelési Konfer., 85.

- KUC, J. (2001): Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 7–12. p.
- LEA, P.J., SODEK, L., PARRY, M.A.J., SHEWRY, R., HALFORD, N.G. (2007): Asparagine in plants. *Ann Appl Biol.*, 150:1–26. p.
- LEGAY, S., LEFÈVRE, I., LAMOUREUX, D., BARREDA, C., LUZ, R.T., GUTIERREZ, R., QUIROZ, R., HOFFMANN, L., HAUSMAN, J.F., BONIERBALE, M., EVERS, D., SCHAFLEITNER, R. (2011): Carbohydrate metabolism and cell protection mechanisms differentiate drought tolerance and sensitivity in advanced potato clones (*Solanum tuberosum* L.). *Funct Integr Genomics*, 11:275–291. p.
- LO, M., TAYLOR, C., WANG, L., NOWACK, L., WANG, T.W., THOMPSON, J. (2004): Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 135:947–958.p.
- LUAN, S. (2002): Signalling drought in guard cells. *Plant Cell Environ.*, 25, 229–237. p.
- LUNN, J.E., FEIL, R., HENDRIKS, J.H., GIBON, Y., MORCUENDE, R., OSUNA, D., SCHEIBLE, W.R., CARILLO, P., HAJIREZAEI, M.R., STITT, M. (2006): Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 397, 139-148. p.
- LV, S., YOUNG, A., ZHANG, K., WANG, L., ZHANG, J. (2007): Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Mol Breed*, 20: 233–248. p.
- MACHINANDIARENA, M.F., LOBATO, M.C., FELDMAN, M.L., DALEO, G.R., ANDREU, A.B. (2012): Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol.*, 15;169(14):1417-24. p.
- MAGGIO, A., CARILLO, P., BULMETTI, G.S., FUGGI, A., BARBIERI, G., DE PASCALE, S. (2008): Potato yield and metabolic profiling under conventional and organic farming. *Europ. J. Agronomy*, 28, 343–350. p.
- MATSUI, K., FUKUTOMI, S., ISHII, M., KAJIWARA, T. (2004): A tomato lipase homologous to *DAD1* (*LeLIDI*) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase. *FEBS Lett.*, 569:195–200. p.
- MCKERSIE, B.D., BOWLEY, S.R., HARJANTO, E., LEPRINCE, O. (1996): Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 111 1177–1181. p.
- MIRANDA, J.A., AVONCE, N., SUÁREZ, R., THEVELEIN, J.M., VAN DIJCK, P., ITURRIAGA, G. (2007): A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 1411-1421. p.
- MONNEVEUX, P., RAMÍREZ, D.A., PINO, M.T. (2013): Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant Science*, 205– 206, 76– 86. p.

MOVAHEDI, S., SAYED TABATABAEI, B. E., ALIZADE, H., GHOBADI, C., YAMCHI, A., KHAKSAR, G. (2012): Constitutive expression of Arabidopsis DREB1B in transgenic potato enhances drought and freezing tolerance, *Biol. Plant.*, 56 (1) 37–42. p.

MUNIZ GARCÍA, M.N., PAÍS, S.M., TÉLLEZ-INON, M.T., CAPIATI, D.A. (2011): Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is upregulated during tuber development and by abiotic stress, *Planta*, 233, 661–674. p.

MUNNÉ-BOSCH, S., ALEGRE, L. (2000): Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210:925-31. p.

MUNNS, R., TESTER, M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. p.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-479. p.

MÜLLER-RÖBER, B., SONNEWALD, U., STITT, M. (1992). Antisense inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potato leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal*, 11, 1229-1238. p.

NAKASHIMA, K., TRAN, L.S., VAN NGUYEN, D., FUJITA, M., MARUYAMA, K., TODAKA, D. (2007): Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.*, 51(4):617-30. p.

NARANJO, M.A., FORMENT, J., ROLDÁN, M., SERRANO, R., VICENTE, O. (2006): Overexpression of Arabidopsis thaliana *LTL1*, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant, Cell Environ.*, 29:1890-1900. p.

NARUSAKA, Y., NARUSAKA, M., SEKI, M., FUJITA, M., ISHIDA, J., NAKASHIMA, M., ENJU, A., SAKURAI, T., SATOU, M., KAMIYA, A., PARK, P., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K. (2003): Expression Profiles of Arabidopsis Phospholipase A IIA Gene in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Cell Physiol.* (11):1246-52. p.

NAYA, L., LADRERA, R., RAMOS, J., GONZÁLEZ, E. M., ARRESE-IGOR, C., MINCHIN, F. R., BECANA, M. (2007): The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Plant Physiol.*, 144:1104-14. p.

NEMHAUSER, J.L., HONG, F., CHORY, J. (2006): Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, 126:467–475. p.

NOAMAN, M.M., AHMED, I.A., EL-SAYED, A.A., ABO-EL-ENIN, R.A., EL-GAMAL, A.S., EL-SHERBINY, A.M. (2007): Registration of ‘Giza 2000’ drought-tolerant six-rowed barley for rainfed and new reclaimed areas in Egypt. *Crop Sci.*, 47:440. p.

OBATA, T., FERNIE, A.R. (2012): The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci.*, 69(19): 3225–3243. p.

- ODELL, J.T., NAGY, F., CHUA, N.H. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810–2. p.  
of life sciences [26 vol. set]. Wiley.  
[http://oro.open.ac.uk/6222/1/Ecology\\_of\\_plant\\_water\\_Araya\\_ELS.pdf](http://oro.open.ac.uk/6222/1/Ecology_of_plant_water_Araya_ELS.pdf)
- OH, I.S., PARK, A.R., BAE, M.S., KWON, S.J., KIM, Y.S., LEE, J.E., KANG, N.Y., LEE, S., CHEONG, H., PARK, O.K. (2005): Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell*, 17:2832-2847. p.
- OH, S.J., KIM, Y.S., KWON, C.W., PARK, H.K., JEONG, J.S., KIM, J.K. (2009): Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiology*, 150, 1368–1379. p.
- OH, S.J., SONG, S.I., KIM, Y.S., JANG, H.J., KIM, S.Y., KIM, M., KIM, Y.K., NAHM, B.H., KIM, J.K. (2005): Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.*, 138, 341–351. p.
- OLIVEIRA, A. B., MENDES, A. N. L., GOMEZ-FILHO, E. (2009): Comparison Between the Water and Salt Stress Effects on Plant Growth and Development, Agricultural and Biological Sciences, "Responses of Organisms to Water Stress", Sener Akıncı (szerk.), ISBN 978-953-51-0933-4, Published: January 16, 2013 under CC BY 3.0 license
- PARDO, J.M. (2010): Biotechnology of water and salinity stress tolerance, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 21 185–196. p.
- PARRY, J. M., ANDRALOJC, J. P., KHAN, S., LEA, P., KEYS, J. A. (2002): Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. *Ann Bot.*, 89 (7): 833-839. p.
- PARRY, J. M., ANDRALOJC, J. P., SCALES, C. J., SALVUCCI, E. M., CARMO-SILVA, E. A., ALONSO, H., WHITNEY, M. S. (2012): Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. *J. Exp. Bot.*, 64 (3): 717-730. p.
- PATONNIER, M.P., PELTIER, J.P., MARIGO, G. (1999): Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1223–1229. p.
- PELEG, Z., APSE, M.P., BLUMWALD, E. (2011a): Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field, *Adv. Bot. Res.*, 57 405–443. p.
- PELEG, Z., REGUERA, M., TUMIMBANG, E., WALIA, H., BLUMWALD, E. (2011b): Cytokinin mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increases grain yield in rice under water stress. *Plant Biotechnology Journal*, 9 (7):747-58. p.
- PERL, A., PERL-TREVES, R., GALILI, S., AVIV, D., SHALGI, E., MALKIN, S., GALUNA, E. (1993): Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.*, 85 (5)568–576. p.
- PIETERSE, C.M.J., VAN WEES, S.C.M., VAN PELT, J.A., KNOESTER, M., LAAN, R., GERRITS, H., WEISBEEK, P.J., VAN LOON, L.C. (1998): A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1571–1580. p.

- POÓR, P., KOVÁCS, J., SZOPKÓ, D., TARI, I. (2013): Ethylene signaling in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma*, 250, 273-84. p.
- POPP, M., SMIRNOFF, N. (1995): Polyol accumulation and metabolism during water stress. In: Smirnoff N, ed. Environmental and plant metabolism. Flexibility and acclimation. Oxford: Bioscientific Publishers Ltd, 199–215. p.
- PREMACHANDRA, G.S., HAHN, D.T., RHODES, D., JOLY, R.J. (1995): Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought-tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1833–1841. p.
- PRIME-A-PLANT GROUP: CONRATH, U., BECKERS, G.J.M., FLORS, V., GARCÍA-AGUSTÍN, P., JAKAB, G., MAUCH, F., NEWMAN, M.A., PIETERSE, C.M.J., POINSSOT, B., POZO, M.J., PUGIN, A., SCHAFFRATH, U., TON, J., WENDEHENNE, D., ZIMMERLI, L., MAUCH-MANI, B. (2006): Priming: Getting Ready for Battle, *The American Phytopathological Society*, Vol. 19, No. 10, 1062–1071. p.
- RAGHAVENDRA, A.S., GONUGUNTA, V. K., CHRISTMANN, A., GRILL, E. (2010): ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395–401. p.
- RIEMANN, M., GUTJAHR, C., KORTE, A., RIEMANN, M., DANGER, B., MURAMATSU, T., BAYER, U., WALLER, F., FURUYA, M., NICK, P. (2007): GER1, a GDSL motif-encoding gene from rice is a novel early light- and jasmonate-induced gene. *Plant Biol (Stuttg)*, 9(1):32-40. p.
- RIVERO, R. M., GIMENO, J., VAN DEYNZE, A., WALIA, H., BLUMWALD, E. (2010): Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK::IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. *Plant and Cell Physiology*, 51, 1929–1941. p.
- RIVERO, R.M., KOJIMA, M., GEPSTEIN, A., SAKAKIBARA, H., MITTLER, R., GEPSTEIN, S., BLUMWALD, E. (2007): Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19631–19636. p.
- RIVERO, R.M., SHULAEV, V., BLUMWALD, E. (2009): Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, 150, 1530–1540. p.
- ROYCHOUDHURY, A., PAUL, S., BASU, S. (2013): Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Rep.*, 32:985–1006. p.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H.Y., HUNT, M. (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809- 1819. p.
- SAIJO, Y., HATA, S., KYOZUKA, J., SHIMAMOTO, K., IZUI, K. (2000): Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.*, 23, 319–327. p.



- SAKAMOTO, A., MURATA, N. (2000): Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, No. 342.
- SAKAMOTO, A., MURATA, N. (2002): The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, 25:163–71. p.
- SAMBROOK, J., FRITCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTOS, M.G., RIBEIRO, R. V., MACHADO, E. C., PIMENTEL, C. (2009): Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 229-236. p.
- SAWAHEL, W. (2003): Improved performance of transgenic glycinebetaine-accumulating rice plants under drought stress. *Biologia Plantarum*, 47: 39–44. p.
- SCHAFLEITNER, R., GUTIERREZ ROSALES, R.O., GAUDIN, A., ALVARADO ALIAGA, C.A., NOMBERTO MARTINEZ, G., TINCOPA MARCA, L.R., BOLIVAR, L.A., MENDIBURU DELGADO, F., SIMON, R., BONIERBALE, M. (2007): Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 673–690. p.
- SCHAUER, N., ZAMIR, D., FERNIE, A.R. (2004): Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 410.
- SHIN, D., MOON, S.J., HAN, S., KIM, B.G., PARK, S.R., LEE, S.K., YOON, H.J., LEE H.E., KWON, H.B., BAEK, D., YI, B.Y., BYUN, M.O. (2011): Expression of StMYB1R-1, a novel potato single MYB-like domain transcription factor increases drought tolerance. *Plant Physiol.*, 155, 421–432. p.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2000): Molecular response to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol.*, 3:217–223. p.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.*, 58(2):221-7. p.
- SHURE, M., WESSLER, S., AND FEDOROFF, N. (1983): Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize, *Cell*, 35, 225-233. p.
- SI-AMMOUR, A., MAUCH-MANI, B., MAUCH, F. (2003): Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular Plant Pathology*, 4, 237-248. p.
- SOLTÉSZ, A. (2011): Az abiotikus stressz-adaptációt szabályozó osmyb4, tacbf14 és tacbf15 transzkripciós faktorok funkciójának igazolása transzgénikus árpában Doktori értekezés, Martonvásár

- SONNEWALD, S., SONNEWALD, U. (2014): Regulation of potato tuber sprouting. *Planta*, 239(1):27-38. p.
- SÓS-HEGEDŰS, A., JUHÁSZ, Z., POÓR, P., KONDRÁK, M., ANTAL, F., TARI, I., MAUCH-MANI, B., BÁNFALVI, Z. (2014): Soil drench treatment with  $\beta$ -aminobutyric acid increases drought tolerance of potato. *PLoS ONE* 9(12): e114297. doi: 10.1371/journal.pone.0114297
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J. P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35:235-270. p.
- STIEKEMA, W.J., HEIDKAMP, F., DIRKSE, W.G., VAN BECKUM, J., DE HAAN, P., BOSH, T., LAUWERSE, J.D. (1988): Molecular cloning and analysis of four tuber specific mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, 11, 255-269. p.
- STILLER, I., DULAI, S., KONDRÁK, M., TARNAI, R., SZABÓ, L., TOLDI, O., BÁNFALVI, Z. (2008): Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 227 299–308. p.
- SU, J., WU, R. (2004): Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci.*, 166 941–948. p.
- SUAREZ, R., CALDERON, C., ITURRIAGA, G. (2009): Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop. Sci.*, 49 1791–1799. p.
- SUNDARESAN, S., SUDHAKARAN, P.R. (1995): Water stress-induced alterations in the proline metabolism of drought susceptible and tolerant cassava (*Manihot esculenta*) cultivars. *Physiologia Plantarum*, 94, 635–642. p.
- SUZUKI, N., MILLER, G., MORALES, J., SHULAEV, V., TORRES, M.A., MITTLER, R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol.*, 14(6):691-9. p.
- SZABADOS, L., SAVOURE, A. (2010): Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, 89–97. p.
- SZALONTAI, B., JAKAB, G. (2010): Differential expression of *PRLIPs*, a pathogenesis-related gene family encoding class 3 lipase-like proteins in *Arabidopsis* *Acta Biologica Hungarica*, 61 (Suppl.), 156–171. p.
- SZARKA, A., TOMASSKOVICS, B., BÁNHEGYI, G. (2012): The Ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 4458-4483. p.
- TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYASI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (2002): Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29, 417–426. p.
- TAMURA, T., HARA, K., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N., SANO, H. (2003): Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.*, 131:454–62. p.

- TANG, L., KIM, M.D., YANG, K.S., KWON, S.Y., KIM, S.H., KIM, J.S., YUN, D.J., KWAK, S.S., LEE, H.S. (2008): Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Res.*, 17, 705–715. p.
- TEIXEIRA, J., PEREIRA, S. (2007): High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental & Experimental Botany*, 60, 121-126. p.
- THOMAS, J.C., SEPAHI, M., ARENDALL, B., BOHNERT, H. J. (1995): Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 18, 801–806. p.
- THOMPSON, A.J., ANDREWS, J., MULHOLLAND, B.J., MCKEE, J.M.T., HILTON, H.W., HORRIDGE, J.S., FARQUHAR, G.D., SMEETON, R.C., SMILLIE, I.R.A., BLACK, C.R., TAYLOR, I.B. (2007): Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.*, 143 1905–1917. p.
- THORNTON, M. K. (2002): Effects of heat and water stress on the physiology of potatoes. Idaho Potato Conference
- UMEZAWA, T., FUJITA, M., FUJITA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (2006): Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 17 113–122. p.
- UMEZAWA, T., NAKASHIMA, K., MIYAKAWA, T., KUROMORI, T., TANOKURA, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2010): Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology*, 51, 1821–1839. p.
- UPDEGRAFF, E.P., ZHAO, F., PREUSS, D. (2009): The extracellular lipase *EXL4* is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sexual plant reproduction*, 22:197-204. p.
- VALLIYODAN, B., NGUYEN, H.T. (2006): Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol.*, 9:189–195. p.
- VALLURU, R., VAN DEN ENDE, W. (2011): Myo-inositol and beyond - emerging networks under stress. *Plant Sci.*, 181:387–400. p.
- VAN DER ENT, S., VAN HULTEN, M., POZO, M.J., CZECHOWSKI, T., UDVARDI, M.K., PIETERSE, C.M., TON, J. (2009): Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol.*, 183, 419–431. p.
- VAN LOON, L. C., REP, M., PIETERSE, C.M. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135–162. p.
- VAN LOON, L. C., VAN KAMMEN, A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40, 190–211. p.

- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.*, 36: 453–483. p.
- VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E. A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85–97. p.
- VENDRUSCOLO, E.C.G., SCHUSTER, I., PILEGGI, M., SCAPIM, C.A., MOLINARI, H.B.C., MARUR, C.J., VIEIRA, L.G.E. (2007): Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.*, 164 1367–1376. p.
- WANG, F. Z., WANG, Q. B., KWON, S. Y., KWAK, S.S., SU, W.A. (2005): Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 162, Issue 4, 465–472. p.
- WANG, F., CUI, X., SUN, Y., DONG, C.H. (2013): Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32:7, 1099-109. p.
- WANG, G. P., HUI, Z., LI, F., ZHAO, M. R., ZHANG, J., WANG, W. (2010): Improvement of heat and drought photosynthetic tolerance in wheat by overaccumulation of glycinebetaine. *Plant Biotechnol. Rep.*, 4 213–222. p.
- WANG, W., VINOCUR, B., ALTMAN, A. (2003): Plant responses to drought, salinity, and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14. p.
- WANG, Y., WISNIEWSKI, M., MEILAN, R., CUI, M., FUCHIGAMI, L. (2006): Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) overexpressing cAPX exhibits enhanced tolerance to UV-B and heat stress. *J. Appl. Horticulture*, 8 87–90. p.
- WATERER, D., BENNING, N.T., WU, G., LUO, X., LIU, X., GUSTA, M., MCHUGHEN, M., GUSTA, L.V. (2010): Evaluation of abiotic stress tolerance of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Mol Breeding*, 25:527–540. p.
- WEGENER, C. B., JANSEN, G. (2013): Antioxidants in Different Potato Genotypes: Effect of Drought and Wounding Stress. *Agriculture*, 3, 131-146. p.
- XIAO, B., HUANG, Y., TANG, N., XIONG, L. (2007): Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet.*, 115:35–46. p.
- XIAO, B.Z., CHEN, X., XIANG, C.B., TANG, N., ZHANG, Q.F., XIONG, L.Z. (2009): Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol. Plant*, 2, 73–83. p.
- YAKIMOVA, E.T., KAPCHINA-TOTEVA, V.M., LAARHOVEN, L.J., HARREN, F.M., WOLTERING, E.J. (2006): Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 581-589. p.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (2006): Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57:781–803. p.

- YANG, S., VANDERBELD, B., WAN, J., HUANG, Y. (2010): Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant*, 3, 469–490. p.
- YEO, E.T., KWON, H.B., HAN, S.E., LEE, J.T., RYU, J.C., BYUN, M.O. (2000): Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells*, 10, 263-268. p.
- YU, T.S, KOFLER, H., HAUSLER, R.E, HILLE, D., FLÿGGE, U.I., ZEEMAN, S.C., SMITH, A.M., KOSSMANN, J., LLOYD, J., RITTE, G., STEUPE, M., LUEA, W-L., CHEN, J., WEBER, A. (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*,13:1907-1918. p.
- YUNYUN, J., RONGJUN, C., JIALI, D., ZHENGJUN, X., XIAOLING, G. (2012): Analysis of GDSL lipase (GLIP) family genes in rice (*Oryzasativa*). *Plant omics journal* 5(4):351-358. p.
- ZEEMAN, S.C., SMITH, S.M., SMITH, A.M. (2007): The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J.*, 401: 13–28. p.
- ZHANG C.S, LU Q, VERMA D.P.S (1995): Removal of feedback inhibition of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 270:20491–20496.
- ZHANG, H., ZHOU, C. (2012): Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, Vol. 82, Issue 6, 539-545. p.
- ZHANG, N., SI, H.J., WEN, G., DU, H.H., LIU, B.L.,WANG, D. (2011): Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach. *Plant Biotechnol. Rep.*, 5, 71–77. p.
- ZHANG, P., WANG, W.Q., ZHANG, G.L., KAMINEK, M., DOBREV, P., XU, J., GRUISSEM, W. (2010): Senescence-inducible expression of isopentenyltransferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 653–669. p.
- ZHU, B.C., SU, J., CHAN, M.C., VERMA, D.P.S., FAN, Y.L., WU, R. (1998): Overexpression of a d-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis oftolerance to water-stress and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.*, 139, 41–48. p.
- ZHU, J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 53:247–273. p.
- ZIMMERLI L, JAKAB G, MÉTRAUX J.P, MAUCH-MANI B (2000): Potentiation of pathogen-specific defence mechanisms in *Arabidopsis* by b-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12920–12925. p.
- ZIMMERLI, L., HOU, B.H., TSAI, C.H., JAKAB, G., MAUCH-MANI, B., SOMERVILLE, S. (2008): The xenobiotic beta-aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *The Plant Journal*, 53, 144-156. p.

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

**Publikációk referált folyóiratokban**

1. Kondrák M, Marincs F, Kalapos B, **Juhász Z**, Bánfalvi Z (2011) Transcriptome analysis of potato leaves expressing the *trehalose-6-phosphate synthase 1* gene of yeast. PLoS ONE 6(8): e23466 doi: 10.1371/journal.pone.0023466

IF: 4.411, Cit: 9

2. Kondrák M, Marincs F, Antal F, **Juhász Z**, Bánfalvi Z (2012) Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. BMC Plant Biology 12:74 doi: 10.1186/1471-2229-12-74

IF: 4.09, Cit: 7

3. **Juhász Z**, Dancs G, Marincs F, Vossen M, Allefs S, Bánfalvi Z (2014) Vitamin C, B5, and B6 contents of segregating potato populations detected by GC-MS: a method facilitating breeding potatoes with improved vitamin content. Plant Breeding 133: 515-520 doi: 10.1111/pbr.12169)

IF: 1.338, Cit: 0

4. Uri C, **Juhász Z**, Polgár Z, Bánfalvi Z (2014) A GC-MS-based metabolomics study on the tubers of commercial potato cultivars upon storage. Food Chemistry 159: 287-292 doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.010

IF: 3.259, Cit: 1

5. **Juhász Z**, Balmer D, Sós-Hegedűs A, Vallat A, Mauch-Mani B, Bánfalvi Z (2014) Effects of drought stress and storage on the metabolite and hormone contents of potato tubers expressing the yeast *trehalose-6-phosphate synthase 1* gene. Journal of Agricultural Science 6: 142-166 doi: 10.5539/jas.v6n5pxx

IF: 2.891, Cit: 0

6. Sós-Hegedűs A, **Juhász Z**, Poór P, Kondrák M, Antal F, Tari I, Mauch-Mani B, Bánfalvi Z (2014) Soil drench treatment with  $\beta$ -aminobutyric acid increases drought tolerance of potato. PLoS ONE 9(12): e114297. doi: 10.1371/journal.pone.0114297

IF: 3.534, Cit: 0

**Konferencia kiadványok**

1. **Juhász Z**, Kocsy G, Galiba G, Bánfalvi Z (2012) Metabolic changes in a *VRN-1* mutant wheat line. Proceedings of the 11th Alps-Adria Scientific Workshop, Smolenice, Slovakia, 26th-31st March, Harcsa M (ed), Növénytermelés Suppl. 5 pp. 443-446. doi: 10.1556/Novenyterm.61.2012.Suppl.5
2. **Juhász Zs**, Boldizsár Á, Kocsy G, Marincs F, Galiba G, Bánfalvi Zs (2014) A búza 5A kromoszómája által befolyásolt metabolit változások a hideghez való alkalmazkodás és a vegetatív/generatív átmenet idején. XX. Növénynevelési Tudományos Nap, Budapest, 2014. márc. 18., Növénynevelés a megújuló mezőgazdaságban c. könyv, szerk.: Veisz O., kiadó: MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága, 210-214. old.

**Konferencia összefoglalók**

1. **Juhász Z**, Kondrák M, Marincs F, Bánfalvi Z (2010) Transcriptional and metabolic changes in drought tolerant potato expressing the *TPSI* gene of yeast. Advances in Metabolic Profiling, Firenze, Italy, November 9-10, Abstract p. 119
2. **Juhász Zs**, Bánfalvi Zs (2011) A *TPSI* gént expresszáló, szárazságtűrő burgonya vonalak gumóinak metabolit vizsgálata. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, április 27, Összefoglaló 106. old.
3. Kondrák M, Marincs F, **Juhász Zs**, Antal F, Bánfalvi Zs (2011) A *TPSI* gént expresszáló, szárazságtűrő burgonya vonalak leveleinek transzkripció és metabolikus jellemzése. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, április 27, Összefoglaló 107. old.
4. Kondrák M, Marincs F, Antal F, **Juhász Z**, Bánfalvi Z (2012) Molecular changes elicited by drought stress in *TPSI*-expressing potato plants. Plant Abiotic Stress Tolerance, International Conference, Vienna, Austria, February 22-25, Abstract p. 63
5. **Juhász Zs**, Kocsy G, Galiba G, Bánfalvi Zs (2012) A búza *Vrn-1* génjének szerepe a vegetatív/reproduktív átmenet metabolikus folyamataiban. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, március 6, Összefoglaló 92. old.
6. **Juhász Z**, Balmer D, Mauch-Mani B, Bánfalvi Z (2012) Metabolic and hormonal changes in tubers of drought tolerant potato plants expressing the *TPSI* gene of yeast. Advances in Plant Breeding and Plant Biotechnology in Central Europe, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Debrecen, June 4-6, Abstract p. 45-46
7. Kondrák M, Marincs F, Antal F, **Juhász Z**, Bánfalvi Z (2012) Transcriptional and metabolic changes elicited by drought stress in *TPSI*-expressing potato leaves. Advances

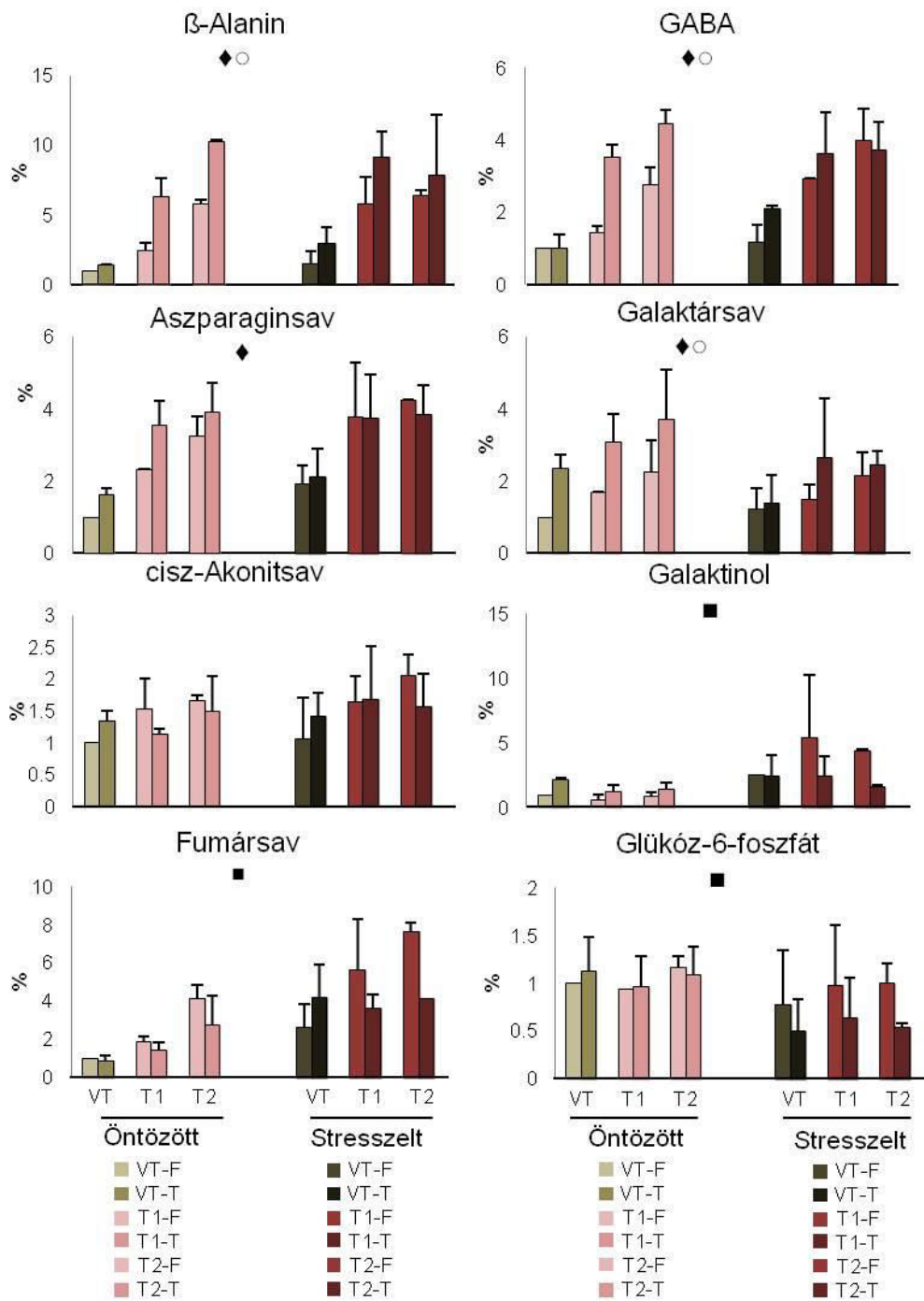
in Plant Breeding and Plant Biotechnology in Central Europe, Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Debrecen, June 4-6, Abstract p. 47-48

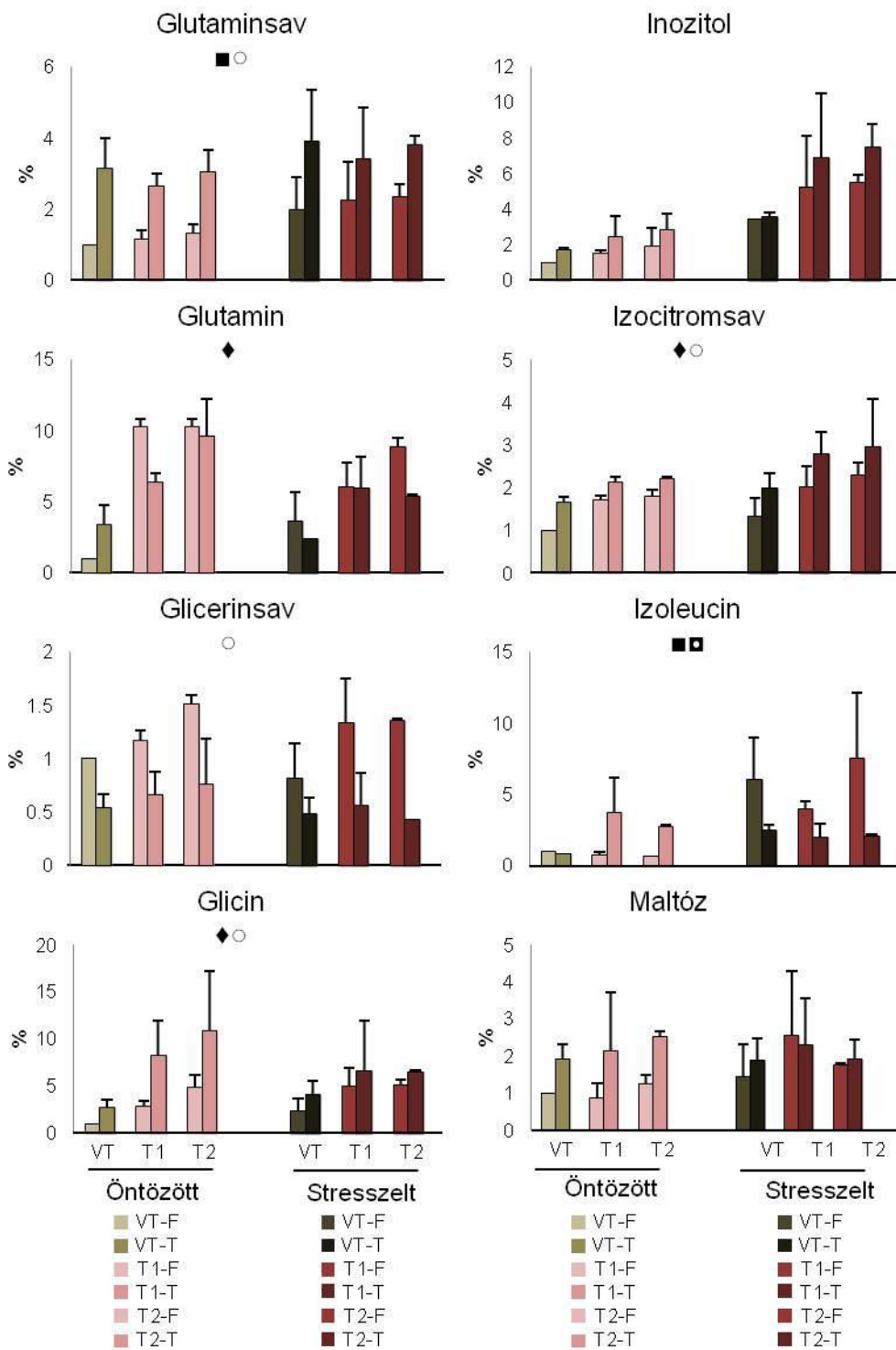
8. Sós-Hegedűs A, **Juhász Z**, Antal F, Kondrák M, Mauch-Mani B, Bánfalvi Z (2012) Chemical priming for drought tolerance in potato. 9th Solanaceae Conference, Neuchatel, Switzerland, August 26-30, Abstract p. 185
9. Bánfalvi Z, **Juhász Z**, Dancs G, Marincs F, Vossen M, Allefs S (2012) Vitamin C, B5, and B6 contents of segregating diploid potato populations. 9th Solanaceae Conference, Neuchatel, Switzerland, August 26-30, Abstract p. 210
10. Bánfalvi Z, Kondrák M, **Juhász Z**, Sós-Hegedűs A, Marincs F, Stiller I, Balmer D, Mauch-Mani B (2013) Improving drought tolerance of potato. The 17th Joint Meeting of EAPR Breeding and Varietal Assessment Section EUCARPIA Section Potatoes, Hévíz, Hungary, June 30-July 4, Abstract p. 12
11. **Juhász Z**, Uri C, Polgár Z, Bánfalvi Z (2013) Metabolomics study on stored potato tubers of Hungarian potato cultivars. The 17th Joint Meeting of EAPR Breeding and Varietal Assessment Section EUCARPIA Section Potatoes, Hévíz, Hungary, June 30-July 4, Abstract p. 21.

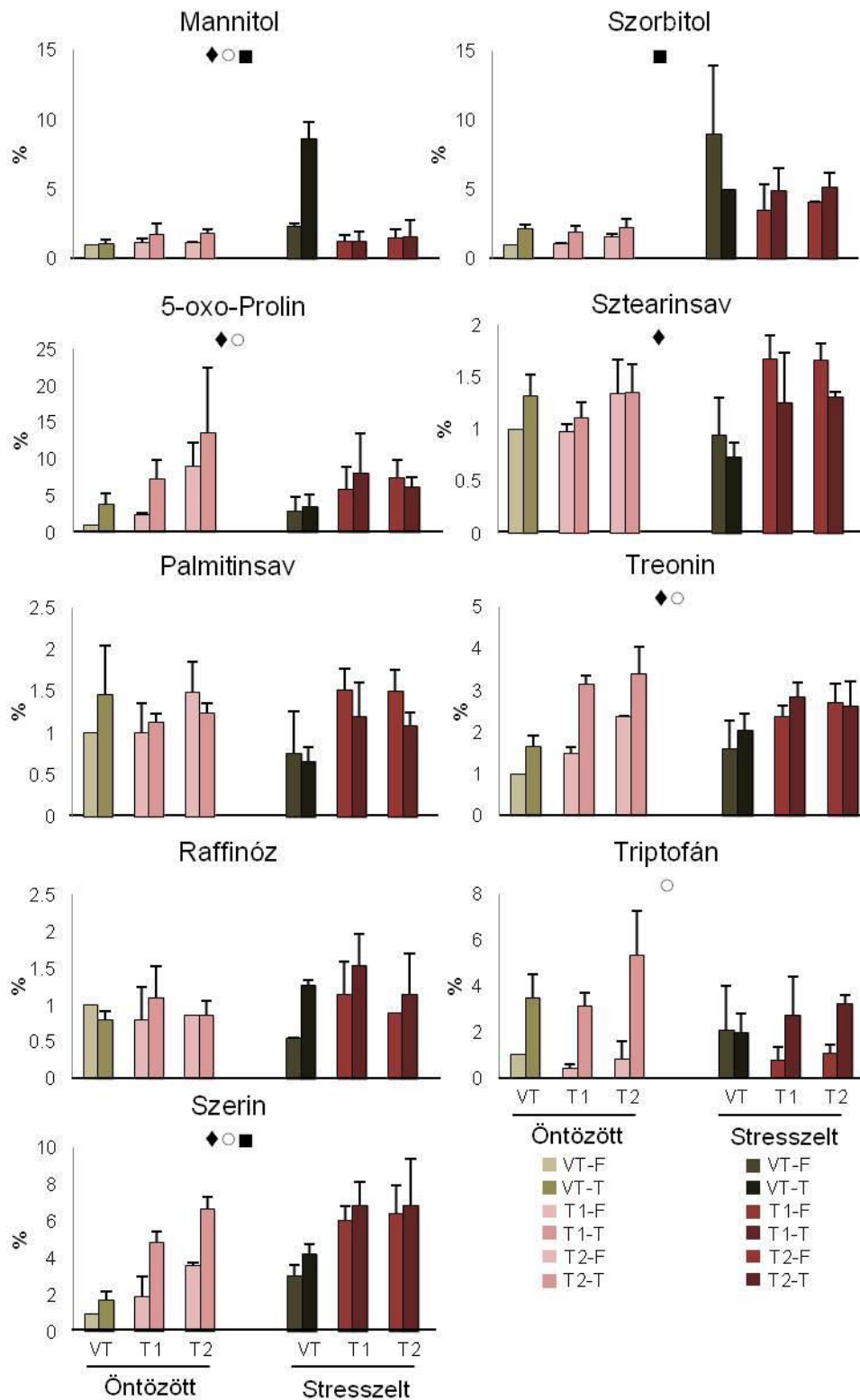


## MELLÉKLETEK

## 1. SZ. MELLÉKLET







<sup>a</sup> az 5-oxoprolin a származékolás során a glutaminból képződik

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Kiss György Botondnak és Dr. Burgyán Józsefnek, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont korábbi főigazgatóinak, hogy lehetőséget nyújtottak számomra a munkám elvégzéséhez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Zsófiának, a támogatásért, a kísérletek háttérének biztosításáért, valamint az elméleti és gyakorlati útmutatásokért.

Köszönöm mentoraimnak, Dallmann Gézának és Marincs Ferencnek, hogy időt szakítottak kísérleteim meghallgatására, és hasznos tanácsokkal láttak el.

Köszönet a Molekuláris Növényfiziológia és Biokémia Csoport korábbi és jelenlegi munkatársainak a türelemért, a kísérleteimhez nyújtott szakmai tanácsokért, technikai praktikákért és nem utolsósorban a kiváló munkakörnyezetért.