

SZENT ISTVÁN EGYETEM

GÖDÖLLŐ

SZÁRAZSÁGTŰRÉS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ BÚZAJAJTÁKBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Deák Csilla

BUDAPEST

2016

A doktori iskola

Megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Zámboriné Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Papp István
egyetemi tanár, DSc
Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

.....
Dr. Zámboriné Németh Éva

Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Papp István

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
1.BEVEZETÉS.....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
2.1. A vízhiány hatása a növényi növekedésre.....	10
2.2. A növények felosztása a vízhiányos stresszre adott válaszaik szerint.....	12
2.3. Növényi stratégiák vízhiány esetén.....	13
2.4. A növények vízhiányos stresszre adott fiziológiai válaszaik.....	14
2.4.1. Vízhiány hatása a fotoszintézisre.....	14
2.4.2. A prolin szerepe szárazság alatt.....	16
2.4.3. A kutikuláris viaszok szerepe vízhiányos stressz esetén.....	19
2.5. Ozmotikus stressz károsító hatása ellen védő fehérjék.....	20
2.5.1. A dehidrinek kifejeződése az egyedfejlődés során és elhelyezkedésük a sejten belül.....	22
2.5.2. A dehidrinek funkciója.....	23
2.6. Az abszcizinsav (ABA), mint növényi hormon	25
2.6.1. ABA jelátvitel a zárósejtekben.....	28
2.6.2. ABA jelátviteli útvonalak.....	28
2.7. Génkifejeződés szárazság stressz alatt.....	31

2.7.1. A transzkripciós faktorok szerepe a stressz toleranciában.....	33
2.7.2. A szárazság stresszre adott válaszokban szerepet játszó transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatások.....	35
2.8. A búza szárazságtűrését meghatározó tényezők.....	36
3. CÉLKITŰZÉS.....	39
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	40
4.1. Növényanyag.....	40
4.1.1. A szárazságtűrés kísérletekben felhasznált búzák nevelése.....	40
4.1.2. Növényanyag nevelése az <i>in vitro</i> ABA kezeléshez.....	41
4.1.3. PEG-el történő ozmotikus stressz kezeléshez való kísérleti anyag előállítása...	42
4.2. Relatív víztartalom (RWC) meghatározása.....	43
4.3. Prolin meghatározása vízhiányos búzáknál.....	44
4.4. Fotoszintézisre jellemző paraméterek műszeres mérése szárazság kezelt búzákon.....	44
4.5. Statisztikai elemzés.....	45
4.6. Teljes RNS izolálás különböző búza mintákból.....	45
4.7. RNS koncentrációk kiegyenlítése és cDNS írás.....	46
4.8. Az RT-PCR-hez felhasznált primerek	46
4.9. RT-PCR	47
4.10. Genomi DNS kontamináció ellenőrzése.....	48
4.11. Az Arabidopsis WIN/SHN1 (WAX INDUCER/SHINE1) génnel homológ búza gén kiválasztása adatbázisok segítségével és klónozása.....	48
4.12. Valós idejű PCR (qPCR)	49
5.EREDMÉNYEK.....	52

5.1. Szárazságkezelte búza növények gázcsere paramétereinek mérése.....	52
5.2. A szárazságtoleranciában feltételezhetően szerepet játszó gének vizsgálata.....	55
5.2.1. Szárazság stresszelt búza növényekből történő RNS izolálás	55
5.2.2. Kontroll RT-PCR primerek alkalmazhatóságának tesztelése szárazságkezelte búzában	57
5.3. Polimeráz-lánreakció TaH kontroll primer pár alkalmazásával szárazságkezelte mintákon	59
5.4. Genomi DNS szennyezés ellenőrzése a cDNS mintákban	59
5.5. Csíranövények növekedésének vizsgálata eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokon.....	60
5.6. Búza csíranövények kezelése PEG-el	62
5.7. Prolin tartalom meghatározása szárazságkezelte búzában.....	65
5.8. A búza kutikuláris viaszok termelődését szabályozó TaSHN1 gén vizsgálata.....	66
5.8.1. Az Arabidopsis WIN/SHN1 gén kifejeződésének elemzése bioinformatikai eszközökkel.....	67
5.8.2. TaSHN1 gén kifejeződésének vizsgálata a búza különböző szerveiben	68
5.8.3. Az Arabidopsis WIN/SHN1 génnel homológ búza TaSHN1 gén kiválasztása és jellemzése	70
5.8.4. DNS fragment izolálása agaróz gélből, klónozás	72
5.8.5. A TaSHN1 génnel való transzformáció eredménye Arabidopsis-ban és a gén kifejeződésének további tesztelése vízhiányos búzákon	73
5.9. A szárazság stressz alatt kifejeződő szabályozó és effektor gének további vizsgálata....	74
5.10. Nem stresszelt, fiatal búza növényeken végzett expressziós vizsgálat a szárazság stressz válaszban vélhetően szerepet játszó génekkel.....	77
5.11. ÚJ EREDMÉNYEK.....	80

6. KÖVETKEZETÉSEK.....	81
6.1. Vízhiány hatása a gázcserére	81
6.2. Csíranövények gyökerének növekedése eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokban.	82
6.3. Ozmotikus stressz hatásának vizsgálata metabolitokra	83
6.4. Szárazság indukálta génexpresszió elemzése.....	84
6.5. A búza TaSHN1 gén kifejeződésének vizsgálata szárazságkezelt búzánál.....	85
6.6. WIN/SHN1 gén vizsgálata a búza fejlődési állapotaiban.....	86
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	87
8. SUMMARY.....	89
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA - Abscisic Acid (abszicizinsav)

ABRE - ABA-responsive element (abszicizinsav érzékeny elem)

ABRC - ABA-responsive sequence complex (abszicizinsav érzékeny szekvencia komplex)

AREB/ABF - ABRE-binding protein (ABRE kötődő fehérje)

bp - base pair (bázis pár)

bZIP - basic leucine Zipper Domain (bázikus leucin cipzár domain)

Cor/Lea - Cold-responsive/Late-embryogenesis-abundant (hidegre válaszadó/ embriófejlődés késői szakaszában kifejeződő gének)

CBF - C-repeat binding factor (C- ismétlődő szekvenciához kötődő faktor)

DRE/CRT - Dehydration-Responsive Element/C-repeat (dehidratáció érzékeny elem/C-ismétlődő szekvencia)

DREB - DRE binding protein (DRE elemhez kötődő fehérje)

DHN - Dehydrin (dehidrin)

EST - Expressed Sequence Tag (kifejeződő szekvencia)

PEG - Polyethylene-glycol (polietilén-glikol)

QTL - Quantitative Trait Loci (mennyiségi tulajdonságok lókusza)

ROS - Reactive Oxygen Species (reaktív oxigén formák)

RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (reverz transzkripció polimeráz láncreakció)

RWC - Relative Water Content (relatív víztartalom)

TF - Transcription Factor (transzkripció faktor)

WIN/SHN1 - WAX INDUCER/SHINE1 (viasz indukáló/shine1)

1. BEVEZETÉS

A növény helyhez kötött életmódjából fakadóan fokozottan ki van szolgáltatva a különféle kórokozók és kártevők mellett a kedvezőtlen környezeti tényezőknek is. Mind az alacsony, mind a magas hőmérséklet illetve a csapadékhiány is előnytelenül hat az alapvető élettani funkciókra és produktivitásra. A vízhiány az egyik leglimitálóbb tényező a növények produktívitasában.

Egyre égetőbb problémát okoz az emberiség számára az éghajlatváltozással történő versenyfutás. A népességnövekedés mellett a csökkenő tendenciát mutató megművelhető földterületek és a korlátozott vízellátás is tovább súlyosbítja a helyzetet. Ezért kulcs szerepet játszik a vízforrások ésszerű felhasználása, beleértve a tározók, csatornarendszerek kiépítését, és a vízkészletek megőrzését. Ugyanezek a körülmények olyan természetű növényfajták nemesítését sürgetik, melyek terméshozama a változó környezeti feltételek mellett is stabil marad.

A vízhiány hatására a csökkenő ozmotikus potenciál hatással van a növény minden folyamatára, a membrán tulajdonságokra, fehérjekonformációra, a kloroplaszt szerveződésére, az enzim aktivitásokra, a növekedésre. Mindezek tovább növelik a más stresszre való fogékonyságot és csökkenthetik a terméshozamot. A fotoszintetikus aktivitás csökkenése és a gyorsabb levél szenescencia is hátrányosan érintik a hozamnövekedést. A vízhiányos stressz másik hatása, hogy csökkenti a transzspirációt, a tápanyagok felvételét és a transzlokációt, redukálja az asszimilációt, a sejt növekedést és megnyúlást. Ezek a folyamatok jelentősen befolyásolják a termésmennyiséget a fő gabonanövényünk, a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) esetében is.

Ahhoz, hogy növelni tudjuk a haszonnövények szárazsággal szembeni toleranciáját elengedhetetlen, hogy megértsük a fiziológiai, biokémiai és génszabályozási hálózatok alapjait. A modern molekuláris biológia vívmányaival lehetőségünk nyílik arra, hogy betekintést nyerjünk azon útvonalakba, amelyek stressz esetén aktiválódnak. A stressz indukálható gének és transzkripció faktorok működése transzgénikus technikák révén modell növényekben is vizsgálható, mint amilyen például az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű). Ezen túl fontos még azon anyagcseretermékek szerepének a felderítése is, amelyek közvetlenül hozzájárulhatnak a szárazság tolerancia kialakulásához.

Munkánk elsődleges célja két szárazságtoleráns (Plainsman V. és Mv Emese) illetve két szárazságérzékeny (GK Élet és Cappelle Desprez) búza fajtánál fellelni azon fiziológiai és molekuláris bélyegeket, amelyek az eltérő szenzitivitásukat eredményezi elégtelen vízellátás esetén. Ehhez élettani és biokémiai méréseket illetve génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. Másodsorban kutatásaink során tanulmányoztuk egy, a lúdfű viasz borítottságért felelős gén (*SHNI*) búza homológját (*TaSHNI*) normál vízellátásnál és vízhiány esetén is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A vízhiány hatása a növényi növekedésre

A szárazságstressz (vízhiányos stressz) a növénytermesztésben az egyik leggyakoribb abiotikus stressz faktorok közé tartozik. A víz hiánya kihat a természetes vízkörforgási ciklusra a föld és a légkör között, ami végső soron befolyásolja a csapadék mennyiségét. Aszály akkor következik be, amikor a talajnedvesség szintje és a relatív pártartalom a levegőben alacsony, miközben a hőmérséklet magas. A vízhiányos stresszt a csökkent vízutánpótlásból származtatják, amely kihat a növény növekedésére, életfunkcióira, valamint a termés mennyiségére és minőségére is (Akinci és Lösel, 2012).

Azonban a növények képesek megbirkózni a szárazság stresszel különböző genetikai és adaptív mechanizmusaik által. Ezek révén olyan fiziológiai és biokémiai fejlődésen mennek keresztül, mely a vizet jobban hozzáférhetővé teszi (Ali et al. 2014).

Szinte minden növényi folyamatra közvetve vagy közvetlenül kihatással van a rendelkezésre álló vízmennyiség. A legtöbb növény életciklusa során ki van téve rövidebb vagy hosszabb vízhiányos stressznek, amelyhez különböző mechanizmusokkal igyekeznek alkalmazkodni. Néhányuk könnyebben alkalmazkodik a változó környezethez, mint mások, előnyhöz jutva a versenytársakkal szemben. A hozamot erősen korlátozza a vízhiány a világ számos részén. A növények fiziológiai válaszait és termésmennyiségüket stressz esetén a faj, fajta, a talaj típusa, a rendelkezésre álló tápanyagok és az éghajlat is befolyásolja. A termesztésben potenciálisan résztvevő földterületek nagy része vízhiányos (Akinci és Lösel, 2012).

A növény számára kiemelt fontossággal bír az elérhető vízkészlet, ugyanis a legtöbb lágyszárú növény friss súlyának a 80-90%-át víz adja, a fásszárúak frisstömegének pedig átlagosan több mint 50%-át teszi ki. A vízellátás korlátozott a világ számos részén, ahol a produktivitás csak úgy növelhető, ha olyan növényeket termesztünk, amelyek jól adaptálódtak a kedvezőtlen körülményekhez.

A kutatók egyik célja megérteni és feltárni azokat a túlélési mechanizmusokat, amelyek növelik a növények szárazság toleranciáját azokon a területeken, ahol korlátozottak az öntözési lehetőségek, illetve ahol a száraz periódusok gyakoriak. A nemesítési törekvések többnyire a hozam növelésére irányulnak, olyan magas hozamú genotípusokra, amelyek

képesek túlélni a szélsőséges környezeti változásokat, különösen azokban a régiókban, ahol a vízhiány gyakori.

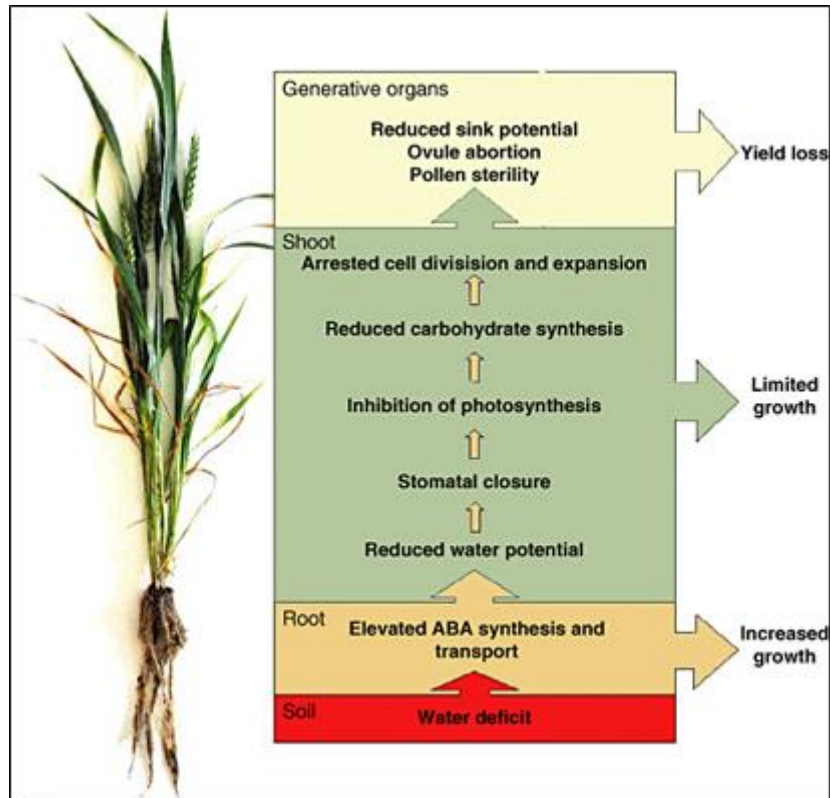
Vízhiány esetén a stressz kezdetben csak napközben, átmenetileg jelentkezik ’’ciklikus vízstresszként’’, este viszont a növény vízháztartása normalizálódik a párologtatás mértékének csökkenésével.

A gabonafélék különböző mechanizmusokkal igyekeznek ellenállni a vízhiányos stressznek. Rambal és Debussche (1995) szerint a stressz indukált változások elsősorban a gyökeret és a xilémet érintik. Az enyhén vízhiányos növények gyökérzete gyakran sokkal mélyebbre hatol a földben, mint azoké, amelyeket rendszeresen öntöztek. A talaj fokozódó kiszáradásakor a gyökér szuberizáció és/vagy a finom gyökérrendszer károsodása következtében csökken a gyökér vízfelvételi képessége, ami mérsékli a vízszállítást a transzspiráló levél felé.

A vízhiányos stresszre adott növényi válaszok nagyon különbözőek lehetnek, ezek alapvetően a fajtól, fajtától és a stressz súlyosságától függnék. A talaj kiszáradása magával vonja a só koncentráció növekedését és a mechanikai ellenállás fokozódását is a gyökerek számára. A vízhiány jelentősen befolyásolja a növekedést, egész növényi szinten nézve a gyökér-hajtás arányt. Ha a vízellátottság csökken, a hajtás növekedése gyakran jobban gátolt, mint gyökéré. Szinte minden növényi folyamatra közvetve vagy közvetlenül kihatással van a vízhiány. A szövetek kémiai és fizikai komponenseinek módosításával a stressz negatívan befolyásolhatja pl. a gyümölcsök ízét és a fák keménységét (Akinci és Lösel, 2012).

Ismert, hogy a vízstressznek a morfológiai bélyegekre olyan hatásai vannak, hogy a biomassza arányban is változások történnek. Kutatók arról számoltak be, hogy bár a vízstressz csökkenti gyökér megnyúlást és a levélterület kiterjedését is, de ezek nem egyformán érvényesülnek. A levélnövekedés általában lényegesen gyorsabban csökken, mint a gyökéré, a fotoasszimilátumok szállításának aránya a gyökér irányában nő. A vízstressz a kontrollhoz képest jelentős elmaradást idézett elő a magasságban, a levélszámban, a levél felület indexben és a száraztömegben többek között gyapot növényeknél és a *Cucurbitaceae* család néhány fajánál (Akinci és Lösel, 2012).

A következő ábra a növény szárazság stresszre adott molekuláris, celluláris valamint élettani válaszait foglalja össze (**1. ábra**):



1. ábra: Az egyes szervekben végbemenő, vízhiány okozta változások. Csökkenő vízpotenciál következtében elsőként a gyökérben növekszik meg az ABA szintézise, mely egy sor láncreakciót indít el a növényben: sztóma zárást, fotoszintézis gátlást, csökkenő szénhidrát előállítás, ami végül a sejtosztódást és sejtmegnyúlást akadályozza a hajtásban. Ennek eredményeként a növekedés lassul. A reproduktív szervekben a tápanyag ellátás csökkenését, magkezdemény abortálást és pollen sterilitást idézhet elő a szárazság (Forrás: Barnabás *et al.* 2008).

2.2. A növények felosztása a vízhiányos stresszre adott válaszaik szerint

A növények szárazságra adott válaszaik oszthatóak úgy, mint: 1) rövid távú változások, amelyek főként élettani válaszokkal kapcsolatosak (pl sztóma szabályozás); 2) akklimáció a rendelkezésre álló vízmennyiséghez (oldott anyagok felhalmozásával történő ozmotikus potenciál szabályozása és morfológia változások); 3) adaptáció a vízhiányos stressz körülményekhez (öröklődő fiziológiai mechanizmusok és specifikus módosulások az anatómiában, felépítésben) (Akincsi és Lösel, 2012).

Azok a növények, amelyek vízhiányos stressz hatására gyors szaporodásba kezdenek és a magok révén biztosítják a következő nemzedék túlélését, a *stresszt elkerülő* közé

tartoznak. A *kiszáradást elhalasztók* vagy a víz felhasználási hatékonyságuk tekintetében jobbak más fajtáknál, vagy azért tudnak több száraz tömeget felhalmozni, mert nagyobb mennyiségű vízhez képesek hozzájutni a mély gyökérzetük révén, mint a sekély gyökérzetet fejlesztő fajok, genotípusok.

A *dehidratáció toleránsak* ugyanolyan vízfelhasználási hatékonysággal bírnak, mint a szárazságérzékeny növények, de alacsonyabb szöveti hidratációs szinteken is képesek növekedni. A toleráns genotípusok nagyobb eséllyel élnek túl a vízvesztést, a stresszt követő rehidratációjuk pedig hatékonyabb, mint az érzékeny növényeké.

A dehidratáció toleranciát egy olyan tulajdonságként definiálhatjuk, ami lehetővé teszi a növénynek, hogy a dehidratált állapotot elviselje, és hogy e körülmények között is képes legyen megőrizni egyes funkcióit. Már a mag embriója rendelkezik ezzel a toleranciával, viszont csírázás után elveszíti azt. Szélsőséges deszikkáció után is egyes növények képesek feléledni, mely sajátosságot a kutatók igyekeznek feltárni és átültetni haszonnövényekbe, hogy javítsák azok stressztűrését. (Blum A., 2005).

A vízhiányos körülmények alapvetően a növény "fitneszére" hatnak, amely a mezőgazdasági kultúrák produktivitására van végső soron kihatással. Így az a faj/fajta nevezhető *szárazság toleránsnak*, amelynek a hozama stabilnak mondható ilyen helyzetekben (Akinci és Lösel, 2012).

2.3. Növényi stratégiák vízhiány esetén

A növények olyan fiziológiai és ökológiai stratégiákat alakítottak ki, hogy a stressz elkerülésével vagy az arra való tolerancia által birkózzanak meg a vízhiánnyal. Kramer és Boyer (1995) a növények szárazság tolerancia stratégiáit a következők szerint csoportosította 1) gyors egyedfejlődés a szárazság következtében, vagy reprodukció indítása a rehidratáció után, 2) a dehidratáció késleltetése mély gyökérzet fejlesztése révén, 3) a transzspiráció elleni védelem vagy víz tartalékolás húsos szövetekben, 4) a szövetek dehidratációjának tűrése, és a növekedés folytatódása.

Azon szárazföldi növényeket, amelyek alkalmazkodtak a mérsékelt vízellátáshoz *mezofitáknak* nevezzük, míg a száraz körülmények között élőket pedig *xerofitáknak*. A növények súlyos és/vagy ismételt vízhiány esetén képesek xeromorfológiai bélyegeket fejleszteni. A fejlődő növényeknél ilyenek az egységnyi levél felületre eső sztómák számának

növekedése, a kisebb méretű gázcserenyílások arányának emelkedése, az epidermális és mezofill sejtek és levél szőrök sűrűségének a növelése valamint a levélerezet sűrűségének növelése, továbbá a külső epidermális sejtfal és a kutikula megvastagítása (Akinci és Lösel, 2012).

A levél adaptációja a környezethez az egyik fő válasz, amely segítségével a növény sikeresen át tudja vészelni a vízhiányos időszakot. Morgan (1980) rámutatott arra, hogy néhány fajta levelének hosszirányban történő bepöndörödése csökkenti a levél napsugárzásnak kitett felületét, amely fontos lehet vízvesztés szabályozása szempontjából és ez változásokat eredményez a levél sejteinek turgorában.

A vízhiány a turgor csökkenésével, azaz hervadással jár együtt, ezen kívül megáll a sejtek növekedése, bezáródnak a sztómák, csökken a fotoszintézis és még sok más alapvető anyagcsere változás történik. Larcher (1995) szintén megállapította, hogy csökken a levelek növekedése vízhiányos feltételek között, a sztómák sűrűbben alakulnak ki az epidermiszen.

A vízhiány általában növeli a viasz lerakódást a levél felületén és vastagabb kutikulát eredményez, ami az epidermisz vízvesztését mérsékelheti (Akinci és Lösel, 2012).

2.4. A növények vízhiányos stresszre adott fiziológiai válaszai

2.4.1. Vízhiány hatása a fotoszintézisre

A fotoszintézis a vízhiányra mérsékeltén érzékeny életfolyamat, a növekedésnél érzékenyebb, a légzésnél ellenállóbb e tekintetben. A növény igyekszik alkalmazkodni a szárazsághoz különböző akklimatizációs válaszok révén, melyek többek között védő hatás gyakorolnak a fotoszintézisre. Így a növény képes fenntartani a dehidratált állapot ellenére a szén asszimilációját (Chaves et al. 2009).

A gabonafélék közül a búza (*Triticum aestivum* L.) a szárazságra érzékeny fajok közé tartozik, különösen szemfeltöltődés idején. Számos kutató beszámolt arról, hogy a virágzás utáni szárazság a búza szenescenciáját stimulálta és növelte a tárolt szénhidrátok remobilizációját a szárból és a levelekből a szemekbe. A levél szenescenciájának jele a klorofill bomlása és a fotoszintetikus aktivitás csökkenése. A fotoszintézis a fő metabolikus folyamat, amely meghatározza a szemtermés mennyiségét a búzánál. Általánosan elfogadott az a tény, hogy ha a levelekben képes fennmaradni a fotoszintézis különösen, ha ez a zászlós

levelekben történik, az nagymértékben pozitív kihatással van a hozamra. A klorofill *a* fluoreszcenciáját gyakran használják a fotoszintetikus apparátus működésének követésére a növény vízstresszre adott válasza közben. Számos kutató úgy tartja, hogy a korlátozott elérhető víz mennyiség valószínűleg nincs szignifikáns hatással a kettes fotokémiai rendszere (PSII) a búzában vagy a durum búzában, viszont más kísérletek arról tanúskodnak, hogy sötétadaptált állapotban a PSII maximális hatásfoka (F_v/F_m) csökkent a zászlós levelekben súlyos aszály esetén (Guóth *et al.* 2009).

A klorofill fluoreszcencia indukció nyomon követése alkalmas arra, hogy megfigyeljük a búza fajtákat vízhiányos körülmények között, ezt további módszerekkel lehet kombinálni a szárazság tolerancia pontosabb értékelése végett (Guóth *et al.* 2009).

A vízhiányos stressz csökkenti a fotoszintézist azáltal is, hogy a fényhasznosítás szempontjából hatékony területek zsugorodnak, így az egységnyi levél felületre eső fotoszintézis aránya is csökkenni fog. A vízhiány a levél növekedését mérsékli, illetve fokozza a levelek öregedését, mely szintén gátolja a fotoszintézist (Akincsi és Lösel, 2012).

A növényeknél több tényező is okozhat sztómazáródást, ezek között van a levél vízpotenciáljának csökkenése is. A fotoszintézis gátlása legegyszerűbben a sztóma zárással és a belső CO₂ koncentráció csökkenésével magyarázható, mivel stressz esetén a sztómák zártsága sokkal nagyobb mértékű, mint normál körülmények között. A fotoszintézis gyakran a sztóma konduktanciával párhuzamosan vagy jobban is csökkenhet. Vízhiányos stressz esetén a magasabb rendű növényekben a fotoszintetikus ráta gyorsabban csökken, mint a légzés. A vízellátás csökkenésének korai hatása a levelekben általában részleges vagy teljes sztóma záródás, így lényegesen csökken a CO₂ mozgása az asszimiláló levelekbe és ezáltal akár tizedrészére csökkenhet a fotoszintetikus ráta (Akincsi és Lösel, 2012).

A fotoszintézis és a levél vízellátottsága közötti kapcsolatot Quick *et al.* (1992) azzal magyarázzák, hogy a szántóföldi körülmények között CO₂ gazdag környezetben a fotoszintézis maximum értéket mutat reggel, ami később a nap folyamán a csökkenő vízpotenciál és növekvő levél vízgőznyomás deficit miatt egyre alacsonyabb lesz (Akincsi és Lösel, 2012).

A szárazság megakadályozhatja a CO₂ belépését a levelekbe, továbbá befolyásolhatja a CO₂ megkötését a karboxilációs folyamatok gátlása révén, ami a nettó fotoszintézis ráta

csökkenését eredményezheti. Számos kutatás igyekszik feltárni azt a kapcsolatot, ami a levelek fotoszintetikus apparátusának fluoreszcenciás jellemezői és a membrán lipidek fotooxidációs folyamatai között van. Az eredmények azt sejtetik, hogy a PS II fény energia rendszer átalakulása és reaktív oxigén formák szorosan köthetőek a stresszhez (Li et al. 2015).

2.4.2. A prolin szerepe szárazság alatt

A prolin aminosav felhalmozódása és szerepe bizonyos környezeti stresszekre adott válaszok során széles körben ismert a magasabb rendű növényekben. Védővegyületként szerepel az ozmotikus stressz elleni védelem beállításában, hozzájárul a szubcelluláris struktúrák stabilitásához (például membránok és lipidek esetében), szabadgyökfogó és pufferolja a celluláris redoxpotenciált a stressz alatt. Kompatibilis ozmotikum, azaz felhalmozódása a citoplazmában nem károsítja az enzimek működését, enyhíti a citoplazma savasodását és fenntartja a megfelelő NADP⁺/NADPH arányokat. Ezen kívül ismeretes, hogy a prolin például a sóstressz válasz gének expresszióját indukálja, amelyek promóterében prolin válasz elemek (PRE) vannak. Vízdeficit vagy sóstressz esetén a prolin a citoszolban akkumulálódik, ahol hozzájárulhat a citoplazma ozmotikus potenciáljának beállításához. Az ozmotikus toleranciában betöltött szerepe, illetve ennek mechanizmusa azonban még kérdéses. Míg számos tanulmány azt mutatja, hogy pozitív kapcsolat van a prolin és a stressz tolerancia között, mások szerint azonban a koncentrációjában történő növekedés a stressz következménye és nem a toleranciához vezető válasz része (Ashraf *et al.* 2007).

A prolin vízoldhatósága rendkívül jó, szilárd halmazállapotban kristályos ionrács szerkezetű vegyület. A citoplazmában hidrotópikus tulajdonsága révén segít a sejteknek megbirkózni az ozmotikus stresszel szemben (Srinivas és Balasubramanian, 1995).

A prolin bioszintézisében két enzim játszik kulcsszerepet, a pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS) illetve a pirrolin-5-karboxilát reduktáz (P5CR). Transzgénikus dohánnyal végzett kísérletben, amiben a P5CS-t túltermeltették, a prolin mennyiség növekedése mellett a növény szárazság és sóstressz toleranciája is megnőtt (Ashraf *et al.* 2007).

A vízstressz előidézheti egyes metabolikus faktorok szignifikáns változását, úgymint a klorofill tartalom csökkenését és a prolin felhalmozódását. A szabad prolin akkumuláció és cukor magas koncentrációja adaptív mechanizmusokat jelent a növényben az abiotikus stressz alatt (Ali et al. 2014).

A prolin akkumulációja stressz alatt számos növényfajban összefügg a stressztoleranciával, ugyanis megfigyelték, hogy a koncentrációja magasabb lehet a stressztoleráns genotípusokban, mint a stresszérzékenyekben. Például, míg a sótoleráns lucerna gyökérben gyorsan megduplázódott a prolin koncentráció sóstressz idején, addig a sóérzékeny növényekben a válasz lassú/késleltetett volt. A prolin felhalmozódását nemcsak a szalinitás indukálja, hanem a szárazság is. A vízhiánynak kitett rizs növényekben a prolin koncentráció a levelekben szintén emelkedést mutatott. A prolin szárazság indukált akkumulációja összefügg a prolin prekursorok (glutaminsav, ornitin, arginin) mennyiségének növekedésével is. Búzában azt találták, hogy a prolin felhalmozódása szignifikánsan nagyobb mértékű volt a szárazság toleráns fajtákban, mint a szenzitívekben (Ashraf *et al.* 2007).

Nayyar és Walia (2003) különböző búza fajtákkal folytatott kísérlete során vízstressz hatását szimulálták polietilén-glikol kezelés révén (PEG-6000), mellyel -1,5 MPa ozmotikus potenciált idéztek elő. A toleráns genotípusokban a prolin szint felhalmozódása jellemzően gyorsabb volt, mint a fogékony fajtákban.

A prolin vizsgálatokkal kapcsolatban számos olyan tanulmányt találunk, ahol bizonyítást nyer, hogy az abiotikus stresszre megemelkedik a szintje a növényekben, viszont az, hogy mely mechanizmus(ok) szabályozzák a bioszintézisét még tisztázatlan. A rendelkezésre álló információk fényében úgy tűnik, hogy a prolin akkumulációja mind ABA-függő mind ABA-független jelátviteli útvonalak által közvetített. Az ozmotikus stresszre válaszként ABA akkumulálódik a növényben, amely szabályozza a P5CS gén expresszióját, ami részt vesz a prolin bioszintézisében. A P5CS gén ABA-közvetített indukációjában szárazság- és sóstressz alatt az abszcizinsav mellett a kalciumnak is bizonyítottan szerepe van (Ashraf *et al.* 2007).

A stressztolerancia javítására irányuló transzgénikus kísérleti megközelítések közül sikeresnek mondható a prolin dohányban való túltermeltetése, melynek következtében szignifikánsan csökkent a szabad gyökök szintje, és ami növelte a toleranciáját 200 mM NaCl-al szemben (Ashraf *et al.* 2007).

Arabidopsis-szal és babbal végzett kísérletek során vizsgálták a P5CS és P5CR génjeinek expresszióját a dehidratáció alatt. A lúdfűnél a P5CS mRNS szintjének növekedése a szárítás kezdete utáni két órán belül már kimutatható volt és tíz óráig további növekedést mutatott. Amikor a növényeket visszaöntözték tíz óra elteltével, a transzkripció szint öt órán belül lecsökkent, végül visszatért a nem kezelt növények szintjére. Hideg stressz esetén

viszont a P5CS mRNS szintjének csak minimális emelkedését figyelték meg az alacsony hőmérsékleti kezelés kezdetétől számított 24 óra múltán.

Egyes vizsgálatok szerint a P5CR gén expressziója nem mutatott szignifikáns növekedést dehidratáció alatt, magas sótartalomra vagy ABA kezelésre. Verbruggen *et al.* (1993) közlése alapján viszont sóval kezelt *Arabidopsis*-ban a P5CR mRNS szintje ötszörösére nőtt a levelekben és kétszörösére a gyökerekben, a nem kezelt növényekkel szemben. A P5CR gén expressziós szintje azonban még ekkor is nagyon alacsony volt a P5CS mRNS mennyiségével összehasonlítva. Ez az eredmény azt jelentheti, hogy a prolin bioszintézisében stresszhatás alatt is a P5CS gén terméke lehet meghatározó.

Savouré és munkatársainak (1997) kutatásai szerint a P5CS gén hideg vagy ozmotikus stressz indukált expressziója ABA-független, még akkor is, ha e gén átírása exogén ABA kezeléssel előidézhető. Kifejeződését ozmotikus stressz indukálja mind vad típusnál mind ABA-hiányos (*abal*) és ABA-érzéketlen (*abi1* és *abi2*) *Arabidopsis* mutánsoknál. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy dehidratáció alatt a P5CS génjének expresszióját két útvonal indukálhatja, az egyik ABA-független, a másik ABA-függő (Yoshida *et al.* 1997).

A prolin gyors felhalmozódása főként súlyos szárazság stressz esetén történik. Habár akkumulációja nem feltétlenül jó indikátora a vízhiány mértékének, de a genotípusok közötti különbségtételre illetve esetleg a szárazságtolerancia meghatározásra alkalmas. Rendszerint pozitív korrelációt találnak a kutatók a prolin akkumulációja és szárazságtolerancia foka között, habár más esetben negatív kapcsolatot is kimutattak. A felhalmozódás szerepében alapvetően a szárazsággal szembeni adaptációt látják, így kompatibilis ozmolitumként, a citoplazma pH-jának szabályozójaként működik, védi a fehérjéket denaturációtól valamint az enzim inaktivációt is képes megelőzni. Habár egyes javaslatok szerint a prolin akkumulációja csupán tünet és nem teljesít védelmi funkciókat szárazság stressz alatt (Van Heerden és De Villiers, 1996).

Néhány kutatás szerint, mely során egy szárazságtoleráns és egy mérsékelten szárazságtoleráns őszi búza fajtát vizsgáltak vízhiányos körülmények között, azt találták, hogy a prolin felhalmozódás kezdete eltér a genotípusoknál. A prolinszintek között mennyiségbeli különbségek is vannak, az fokozottabban halmozódik fel a virágzás előtt, a virágzás alatt pedig kevésbé. Ezt azzal magyarázták a kutatók, hogy a virágzás előtt a turgorkapcsolt folyamatok, nevezetesen a sejt növekedés és levél megnyúlás vélhetően növeli a

növény érzékenységét a stresszel szemben, ezáltal a prolin felhalmozódással elérhető védelem itt jelentős lehet a növény számára (Van Heerden és De Villiers, 1996).

2.4.3. A kutikuláris viaszok szerepe vízhiányos stressz esetén

A közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) igen érzékeny a szárazságstresszre, különösen a reproductív fázisban. A búza szárazságtoleranciája összetett tulajdonság, amelyet több tényező határoz meg, ami a genotípustól és környezeti körülmények kölcsönhatásaitól függ. Továbbá a kutikula szignifikánsan hozzájárul a sztómás transzspirációhoz, amikor korlátozottan áll rendelkezésre víz. Ennek a rétegnek a mikromorfológiai vonásai és tulajdonságai hatással lehetnek a vízvesztés mérséklésére, a szárazságtoleranciára. A gabonafélék kutikulájának fontos szerepet tulajdonítanak ebben a vonatkozásban, amit újabb kutatások is alátámasztanak (Jäger *et al.* 2014).

A levél transzspirációja sztómás és kutikuláris összetevőből áll. A sztómás transzspirációt a sztómakonduktancia teszi lehetővé, aminek egyik fő szabályozója a rendelkezésre álló víz. A kutikuláris párologtatást a levélfelület fizikokémiai jellemzői befolyásolják, úgy mint a viasz vastagsága, mikrostruktúrája, főként a levélfelület vízáteresztő képessége és transzporttulajdonságai révén. Súlyos vízhiány esetén a sztómák bezáródnak, a sztóma konduktancia visszaesik és csak a kutikulán át történő vízvesztés marad fent (Shepherd és Wynne Griffiths, 2006).

A súlyos víz deficit alatt, amikor a sztómák zárt állapotban vannak, a vízvesztés nanoméretű diffúziós útvonalakon keresztül történik, a kutikulán keresztül. Ez az útvonal hosszú láncú alifás viaszok között halad, amelyeket a kutikula membrán kutin mátrixán belül a víz számára átjárhatatlan viasz kristály részek határolnak. Az útvonal átjárhatósága meghatározza a kutikula permeabilitását.

Az epikutikuláris viaszok mechanikai eltávolítása megnövelte a víz átjárhatóságát a kutikulán keresztül például *Lycopersicon esculentum*-nál és *Prunus avium* gyümölcsnél. A megnövekedett viaszlerakódást összefüggésbe hozták az alacsonyabb párologtatással nem öntözött *Sorghum bicolor* növényeknél (Cameron *et al.* 2006).

Jellemző, hogy növekszik a viasz kutikuláris lerakódása vízstressz esetén, ez általában néhány napon belül következik be. Azok a növények, amelyek stressztoleránsak - ilyenek az

arid körülmények között élők - gyakran eleve vastagabb (vagy/és könnyebben vastagodó) kutikuláris viaszbevonattal rendelkeznek, mint a mérsékelt égövön élők, utóbbiak emiatt is érzékenyebbek a stresszre (Shepherd és Wynne Griffiths, 2006).

A kutikuláris lipidek bioszintéziséért felelős gének még csak részben vannak felderítve a gabonafélékben, habár e folyamatok egyes szabályozó génjeinek funkciója már ismert lúdfüben. Wang és munkatársai (2012) például az *Arabidopsis WIN/SHN1* kutikula képződést szabályozó génnel ortológ rizs OsWR1 transzkripciós faktort vizsgálták. Az OsWR1 kölcsönhat az *OsLACS2* és *OsFAEI-L* viaszgének promóterében található DRE és GCC motívumokkal, így közvetlenül szabályozza azokat. Az OsWR1 túltermelő és RNS interferencia alapján csendesített vonalakkal, valamint gázkromatográfiás vizsgálatok során sikerült alátámasztani, hogy a gén a viasz bioszintézis pozitív szabályozójaként működik közre, következésképpen hozzájárul a vízvesztés mérsékléséhez és a szárazságtolerancia növekedéséhez.

A kutikula vízpermeabilitása azonban nincs egyszerű összefüggésben a kutikula vastagságával vagy a viaszborítottsággal. A kutikula átjárhatóságát a környezeti körülmények is befolyásolják. Ilyen például a hőmérséklet – a permeabilitás növekszik, amikor a levél felületének hőmérséklete 15°C-ról 30°C-ra nő (Shepherd és Wynne Griffiths, 2006).

A kutikula struktúrája és működése a gázcsere optimalizálását szolgálja a vízvesztés elkerülése érdekében. A növények életében kihívást jelent olyan határoló felület kialakítása, amely korlátozza a vízvesztést. A kutikula képes ezt a feladatot ellátni. Jellemzően a levegővel érintkező hajtást teljesen beborító, vékony (0,1-10 µm) lipidekből képződő polimer mátrixot (kutin), poliszacharidokat és szerves oldószerrel leoldható lipideket (kutikuláris viaszokat, terpenoidokat) tartalmazó folyamatos membránként ismeretes (Riederer és Schreiber, 2001).

2.5. Ozmotikus stressz károsító hatása ellen védő fehérjék

Az aminosavak és a fehérjék bioszintézisének változásairól gyakran tesznek említést különböző tanulmányokban, amelyekben megállapították, hogy a vízhiányos stressz ezekben különböző válaszokat idéz elő a növénytől és a stressz szintjétől függően. Dasgupta és Bewley (1984) rámutatott arra, hogy a vízhiány általában csökkenti a fehérjék szintézisét az árpa minden levélrégiójában. A stressz gátolja a sejtek osztódását, megnyúlását és ennek

következtében a levél méretének növekedését, továbbá akadályozhatja néhány specifikus fehérje szintézisét is.

Treshow (1970) is azt a következtetést vonta le a kísérleteiből, hogy a vízhiányos stressz gátolja az aminosavak hasznosítását és a protein szintézist. Eredményei szerint a valin szintje növekedett, a glutaminsav és az alaninszintek csökkennek, míg a szabad aszparagin 10-100-szorosára növekedett szárazságstressz alatt. Későbbi kutatások azonban kimutatták, hogy az ozmotikus stressz egyes védőhatású fehérjék termelődését specifikusan indukálja.

A növényt fejlődésének több fázisában érheti ozmotikus stressz. Egy ilyen fejlődési fázis az embrióállapot, amikor a magfejlődés késői stádiumában az embrió erős deszikkációt szenved el. A vízvesztés káros következményeinek elkerülésében segítséget nyújtanak az ún. LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjék, amik ekkor nagy mennyiségben termelődnek, és képessé teszik az embriót a kiszáradás tolerálására. A LEA fehérjék több konzervált motívumot tartalmaznak. Az osztályozási rendszertől függően hat vagy hét csoportra oszthatjuk őket. Jellemzően gazdagok Ala, Gly és Ser és néhány egyéb hidrofób aminosavban. Ezekre a proteinekre jellemző, hogy hiányzik a kialakult másodlagos struktúrájuk, ezért nem rendezett térbeli szerkezetű fehérjéknek is nevezik őket (Graether és Boddington, 2014).

A LEA fehérjék egyik családja a magfejlődés mellett szárazság esetén is indukálódó dehidratációs fehérjék (dehidrinek). A dehidrinek jól jellemzett fehérjék (pl. árpa, kukorica, borsó és *Arabidopsis* fajokban), amelyeknek mennyisége vízhiány esetén megnövekszik. Több bizonyíték is mutat arra, hogy fontos szerepet töltenek be a növény védelmében vízdeficit alatt.

A dehidrinek kifejeződése összefüggésbe hozható számos abiotikus stresszel, mint a vízhiány, só és hidegstressz, de stresszmentes körülmények között is megtörténhet. Ozmotikusstressz hatására a károsodott membránokon keresztül elektrolitok szivárgása indul meg a citoplazmából a környezetbe. Számos esetben magas dehidrin expressziósszint mellett alacsony elektrolit szivárgási szintet figyeltek meg. Ez összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a dehidrinek részt vesznek a membránok stabilizálásában stresszhatások alatt. Ezen túl Hara *et al.* (2003) megfigyelése szerint a dehidrinek hatással vannak a lipidperoxidációra is, ugyanis egy mandarinból származó dehidrin (CuCOR19) megakadályozta a liposzómák oxidációját a reaktív oxigénformák hatástalanítása által. Újabb

kutatások szerint a dehidrinek hagyományosan elismert szerepei mellett részt vehetnek a stresszfüggő génszabályozásban is. Ezt az alapján állíthatjuk, hogy a *Medicago truncatula* MtCAS31 dehidrinje kölcsönhatott az ICE1 transzkripció faktorral, amelynek révén csökkent a sztómasűrűség, a szárazságtűrés pedig nőtt (Graether és Boddington, 2014).

2.5.1. A dehidrinek kifejeződése az egyedfejlődés során és elhelyezkedésük a sejten belül

Néhány dehidrin (DHN) főként a magok érése során fejeződik ki. Ezen belül a RAB18-at (Y₂SK₂-típus) *Arabidopsis*-ban, a RAB17-et (DHN1; YSK₂) a kukorica (*Zea mays*) embrió minden részében illetve az érett mag endospermiumában mutatták ki. Borsó esetében a DHN-COG (SK₂) dehidrin a szikleveleiben a közép- és késői embriógenezisben, illetve a dehidratált magokban expresszál. Az ismert dehidrinek legtöbbje a vegetatív szövetekben normál növekedési körülmények között is megtalálható, valamint a virágban is kifejeződik. Így például az *Arabidopsis* ERD14 (SK₂) és ERD10 (LTI29, SK₃-típus) a gyökércsúcsban, a gyökér szállítószövetében, szárban, levélben és virágzatban lokalizált. Más dehidrinek, például a búza WCOR410 (SK₃) felhalmozódását főként a gyökér szállítószöveiben, a levelekben és a virágzatban mutatták ki. De ismeret az előfordulásuk specifikus sejt típusokban is, mint amilyen a pollen zsák sejtjei, vagy a sztómazáró sejtek (Rorat, 2006).

A mag érésének természetes velejárója a dehidratáció; a dehidrinek az érett mag különböző szöveiteiben találhatóak meg. Amikor viszont környezeti stressz (szárazság, alacsony hőmérséklet vagy magas sótartalom) vezet a celluláris dehidratációhoz, akkor szintén megnőhet egyes DHN-ek kifejeződési szintje. Továbbá olyan szövetekben is megjelenhetnek, ahol normál fejlődési körülmények között nem nyilvánultak meg. Például az *Arabidopsis* ERD14 és ERD10 (LTI29) dehidrinek, amelyek elsődlegesen a fentiekben már leírt helyen lokalizáltak, hidegstressz esetén más szövetek sejtjeiben is megjelennek. Hideg akklimatizált árpában a P-80 nevű dehidrin található meg. Búzában a WCS120 DHN (K₆) protein család főként a búza virágzat szállítószöveiteiben lelhetők fel hideg akklimatizált egyedeknél. Ezek nem mutathatók viszont ki érett xylémekben és a hajtás apikális merisztémában vagy laterális gyökér primordiumban. Más búza dehidrinek (WCOR410; SK₃) viszont elsőként hideg akklimatizáció alatt fejeződnék ki a gyökér szállítószöveiteiben, a levelekben és a virágzatban (Rorat, 2006).

A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy a dehidrinek olyan fehérjék, amelyek a generatív vagy vegetatív szervek szöveteiben, normál körülmények között illetve dehidratáció következtében is kifejeződhetnek a növényekben.

A dehidrinek sejten belüli lokalizációja részben összefüggésbe hozható a különböző motívumok meglétével vagy hiányával, valamint azzal is, hogy az expressziójukat milyen abiotikus stressz idézte elő. Számos helyen megtalálhatóak a sejtben, legfőképpen a citoplazmában és a sejtmagban. Továbbá előfordulnak még a mitokondriumban, kloroplasztisban és feldúsulhatnak a plazmamembrán közelében.

Érdekes módon a motívumok előfordulása és a fehérjét indukáló abiotikus stressz között kapcsolatot mutattak ki. A K_n , SK_n és K_nS fehérjék nagymértékben termelődtek hidegstressz esetén, az egyéb típusok kifejeződése pedig vízhiányra és sóstresszre nő meg (Graether és Boddington, 2014).

2.5.2. A dehidrinek funkciója

A dehidrinek széles körben elterjedtek a növényeknél, mint dehidratáció hatására kifejeződő fehérjék. Ismeretes, hogy normál körülmények között is kimutathatóak a vegetatív szövetekben, ami azt sugallja, hogy lényeges szerepük lehet a növekedés alatt. A kérdés inkább az, hogy mennyiben különbözik az egyes dehidrin típusok szerepe és működése a különböző szövetekben a növekedés során, valamint vízhiányban.

A dehidrinek különböző csoportjai specifikus funkciót mutatnak *in vitro*: Az YSK_2 típusúak lipidekhez kötődnek, a K_3S -típusúak szabadgyök fogó aktivitást mutatnak, a KS -típusúak fém-kötő aktivitásúak, míg a SK_n - és K_n -típusúak az alacsony hőmérsékletre való akklimatizációban játszhatnak szerepet. A dehidrinek fagyvédő, lipid- és fémkötő képességük illetve antioxidáns aktivitásuk révén is ismertek a növényeknél (Rorat, 2006).

Mint fehérjék, alapvetően a stabil másodlagos térszerkezet hiánya jellemzi őket, de a célmolekulához való kapcsolódáskor felvesznek egy térszerkezetet. A DHN-ekre jellemző motívumok közül a K-szegmens hasonlít a lipid-kötő A2 típusú amfipatikus α -helix szegmenshez, amely az apolipoproteinekben és α -szinukleinben található meg. Az α -szinuklein protein kötődik a savas foszfolipidekhez és a kisméretű vezikulákhoz, amit az α -helikális szerkezet stabilizációja kísér. A K-szegmens indukált α -helikális szerkezete, ami

hasonlít az A2 típusú amfipatikus α -helixhez, hidrofób kölcsönhatások révén kötődik a membránokhoz és a denaturált fehérjékhez. Azt feltételezik, hogy a dehidrinek felületaktív anyagként működnek, együttműködnek a kompatibilis oldott anyagokkal, hogy megelőzzék a kolloidok és makromolekulák koagulációját. Hogy a DHN-ek hidrofób kölcsönhatásai a K-szegmens amfipatikus α -helix konformációja révén valósulhat meg, *in vitro* körülmények között bizonyították. Cirkuláris dikroizmus vizsgálat során *Vigna unguiculata* egy kb. 35-kD molekula tömegű dehidrinje (Y₂K) nátrium-dodecil szulfátban (sodium dodecil sulfate – SDS) amfipatikus α -helikális formát mutatott. A mérések szerint SDS nélkül, natív állapotban a polipeptidek olyan szerkezeti jellemzőket mutattak, ami a stabil másodlagos struktúra hiányára utalt; csak véletlenszerűen volt megtalálható orsó konformáció (Rorat, 2006).

A dehidrinek esetenként a sejtorganellumok, úgy mint a mitokondrium és a kloroplastisz, membránjához kívülről asszociálva voltak megtalálhatóak. Azonban számos más helyen is előfordulnak a sejtben belül, így az endoplazmatikus retikulumban, vakuólumban, a fehérje és lipid testekben, a plazmalemma belső oldalán stb. Főként azokban a szövetekben és szervekben halmozódnak fel, amelyek ki vannak téve a hirtelen víztartalom változásnak, például a sztóma záró sejtek, a virágrügyek külső sejtjai, a lágyszárú növények epidermisze és fásszárú növények kérge (Kosová et al. 2010).

A *Vigna unguiculata* 35-kDa dehidrin expressziója korellált a hideg stresszel szembeni toleranciával csíranövényeknél, habár nem találtak egyértelmű összefüggést az elektronszivárgás tekintetében, vagyis a jelenség nem volt magyarázható a membránok védelmével.

A dehidrineknek vannak szabadgyök fogó tulajdonságaik is. A *Citrus unshiu*-ból származó CuCOR19 a K₃S-típusú dehidrinhez tartozik. Ez a fehérje transzgenikus dohányban növelte a hideg toleranciát, meggátolta a liposzómák peroxidációját, amiben közrejátszott a megnövekedett glutation, prolin és cukor tartalom is. Kutatások szerint a dehidrinek hozzájárulnak a hideg akklimatizációhoz, ugyanis a gyökfogó képességük révén védik a membrán rendszereket hideg stressz alatt. A lipid peroxidációval szembeni védő szerepükre például a CuCOR19 esete mutatott rá. Ez a fehérje gazdag glicin, hisztidin és lizin aminosavakban, amelyek a hidroxil gyökökkel reagálni képesek. Így e gyökfogó tulajdonsága révén a protein képes csökkenteni az oxidatív károsodást, amelyet vízhiányos stressz okoz a növényben (Rorat, 2006).

Egy másik citrus dehidrin, a CuCOR15 (K-típus) fém-kötő képessége is ismert, ugyanis a polipeptid egy speciális fém-kötő domént tartalmaz.

A dehidrinek stressz toleranciához való hozzájárulása tehát sokrétű. Számos tanulmány eredménye pozitív korrelációt mutat a dehidrin transzkriptumok vagy fehérjék felhalmozódása, illetve a fagy-, szárazság- és sóstresszre való tolerancia között. Fagytolerancia esetében a krioprotektív tulajdonságot a fagy-érzékeny enzimekre gyakorolt védő hatással magyarázták. A *Citrus unshiu* CuCOR19 dehidrin a katalázt és laktát dehidrogenázt védi a fagy inaktiváló hatásától, ami még hatásosabb volt cukor, glicin betain, prolin vagy BSA jelenlétében. Ugyanennek a fehérjének a túltermelése dohányban kissé csökkentette az ionszivárgást hideg és fagy stressz alatt (Rorat, 2006).

Fellelhetők olyan tanulmányok is, amelyek szerint nem minden esetben jelenik meg a dehidrinek fagyvédő hatása. Transzgenikus dohányban a spenót CAP85 (K₁₁) dehidrinjét expresszáltatták túl, de a transzgenikus növény fagytoleranciája nem mutatott szignifikáns javulást. Hasonlóan *Arabidopsis* esetében, amiben a RAB18 (Y₂SK₂) gént túltermeltették vagy antiszensz módszerrel gátolták, a beavatkozások azonban nem változtatták meg a növények faggyal szembeni tűrőképességét. Puhakainen *et al.* (2004) eredményei szerint a lúdfű a *LTI29* (ERD10, SK₃-típus) és *LTI30* (K₆) DHN gének túltermeltetése viszont növelte az alacsony hőmérsékleten való túlélést, hozzájárulva a fagytoleranciához (Rorat, 2006).

2.6. Az abszcizinsav (ABA), mint növényi hormon

A vízdeficit károsan hat a növény vegetatív és reprodukív növekedésére, a sejtek dehidratációját okozza, ami az alapvető fiziológiai folyamatokra és a differenciációra is jelentős hatással van: A sejtek/levél kiterjedése redukálódik, az anyagcsere aktivitása csökken, a stressz sztóma zárást idéz elő, gátolja a fotoszintézist, elősegíti a levél öregedését, destabilizálja a membránokat, a vakuólumokból kiáramló ionok sejtmérgezést idéznek elő. Mivel a fotoszintetikus reakciócentrumban az elektronok nem tudnak a szabályos módon továbbadni és áthelyeződni a NADP⁺ irányába, így a rendszer reaktív oxigén formákat és szabadgyököket generál. Ezek súlyosan károsíthatják a sejt makromolekuláit és metabolitjait, melynek következtében például a fehérje szintézis gátolódik, oxidálódhatnak a fotoszintetikus pigmentek illetve a membrán lipidjeinek peroxidációja következhet be. Mindezen folyamatok végső soron sejthalált okozhatnak, ami az egyed pusztulásával jár. A stressz hatására

termelődő abszcizinsav (ABA) ezt hivatott kivédeni, különböző hatásmechanizmusai révén a növény nagyobb eséllyel vészeli át a vízhiányos időszakot (Mittler *et al.* 2010).

Az ABA egy széles körben elterjedt fitohormon, amely megtalálható az edényes növényeken kívül a mohákban, valamint például néhány növényt fertőző gombában is. A hormon egy 15 szénatomszámú terpenoid származék, amelyet 1960-ban fedeztek fel, és mint növekedési inhibitor komponenst határoztak meg. Felfedezésekor összefüggésbe hozták a rügy-dormancia elindításával, fenntartásával és a gyapot termés leválásának elősegítésével (Taiz *et al.* 2010).

A növények vízhiányos stresszre adott válaszai közül az egyik legmarkánsabb az ABA bioszintézise. Szárazság esetén a hormon koncentrációja ötvenszeresre is megnőhet, amely kiemelkedő a többi hormon szintjének változásaihoz képest. Az ABA fő szerepe, hogy szabályozza a növény vízegyensúlyát és ozmotikus stressz toleranciáját. Az ABA sztómazárást indukál vízhiány alatt, megelőzve ezzel az intracelluláris vízvesztést. Ez a hormon szerepet játszhat még hideg- és sóstressz esetén is. Az abszcizinsav tehát nagy szerepet tölt be a vízdeficit körülményekhez való alkalmazkodásban, elősegíti a különböző típusú stresszek túlélését a növény fiziológiájának és növekedésének megváltoztatásával (Mittler *et al.* 2010).

Az ABA bioszintézisben számos gén terméke szerepel, ABA receptorokat illetve "downstream" jelút komponenseket is több gén kódol. A növényben különböző stresszszignálokra válaszként az ABA bioszintézisben szerepet játszó, béta-karotin bioszintézisért felelős enzimek génexpressziója indukálódik. Az abszcizinsav bioszintézis egyik génjét, a 9-cisz epoxikarotinoid dioxigenázt túltermeltették *Arabidopsis*-ban (AtNCED3) ami megnövelte a dehidratációs stressz elleni toleranciát. Ugyanennek a génnek a csendesítése pedig szenzitív fenotípust eredményezett a transzgenikus növényeknél. Ez azt jelentheti, hogy az AtNCED3 fontos szerepet tölt be a stressztűrésben, valószínűleg az ABA akkumuláción keresztül szárazság idején (Roychoudhury *et al.* 2013).

Az abszcizinsav és az egyéb különböző stressz szignálok kölcsönhatnak, közös "cross-talk" elemük van. A citokinin és az ABA antagonisták hatásúak a sztóma nyitást, transzpirációt és fotoszintézist illetően. Míg az előbbi szintje csökken, addig az utóbbié növekszik szárazság alatt. E két hormonon kívül még a gibberelinsav, az auxin, a szalicilsav, az etilén, a jázmonsav és a brassinoszteroidok is fontos szerepet töltenek be az abiotikus

stresszre adott válaszokban. A szinergista és az antagonisták hormon akciók és koordinációk valamint a hormon bioszintézis útvonalak közös szabályozása nagy jelentőségű a növény számára, hogy akklimatizálódjon az abiotikus stresszkörülményekhez (Blumwald és Mittler, 2010).

Búza esetében a vízhiányos stressz megnöveli a zászlós levelekben az ABA szintet és transzlokációjával a floémbe, hozzájárul a magasabb ABA tartalomhoz a szemekben (Guóth *et al.* 2009).

Az exogén ABA kezelés megnöveli a klorofill veszteséget, növeli az előretartalékolt szén remobilizálását a szárból az endospermiumba és növeli a szemtömeget. Más tanulmányok viszont az ABA szemnövekedésre gyakorolt káros hatásáról tanúskodnak, ugyanis az ABA gátolhatja az endospermium sejtosztódását. Mivel az endospermium sejtszáma csökken, ez maga után vonja a búza szemtömegének redukcióját, aminek következtében romlik a mag tárolókapacitása is. Más tanulmányok arról is beszámolnak, hogy a folyamatosan magas ABA szint a sejtosztódás idején megakadályozza a cukor felvételét a szemekbe, ezáltal a szemtöltődésre is negatív hatással van (Guóth *et al.* 2009).

Egyes vizsgálatok szerint az endospermium keményítő bioszintézisében résztvevő enzimek (pl. a keményítő láncok elágazásáért felelős enzim) aktivitása és az oldható keményítő szintézise megnő szárazság stressz alatt és ez összefüggést mutatott az ABA szinttel. Ezzel szemben az ABA felhalmozódásra szelektált genotípusok hozama szárazság stressz alatt nem lett jobb, sőt rosszabbnak mondható az átlagosnál.

A gabonafélék a szárazságra a virágzás kezdetén és a virágrészek pre-meiotikus differenciálódásakor a legérzékenyebbek.

Megállapítható volt, hogy a környezeti tényezők hatással vannak a tartalék fehérjék felhalmozódására is. A megnövekedett ABA szintek negatív hatással lehetnek a keményítő tartalomra, de kedvezően befolyásolják a tartalék fehérjék felhalmozódását (Guóth *et al.* 2009).

Összegzésként elmondható, hogy a szárazság, mint negatív környezeti tényező, kedvezőtlenül hat a hozamra. Így a szelekciónál fontos kritériumnak számít a szárazságra való tolerancia, ami a gabonafélék esetében nagy gazdasági jelentőségű.

2.6.1. ABA jelátvitel a zárósejtekben

Vízhiány alatt az ABA koncentrációja drámaian megnő a levelekben, ami sztómazárást eredményez. Ez a turgornyomásban bekövetkező csökkenés hozadéka, amelyet erős K^+ és anion kiáramlás idéz elő a záró sejtekből. A plazma membrán K^+ csatornái csak akkor vannak nyitva, amikor a plazma membrán depolarizálttá válik. Az ABA képes ilyen állapotba hozni a membránt azáltal, hogy megnöveli a citoszólikus Ca^{++} koncentrációt, amely két úton következhet be: 1) a Ca^{++} ionok átmeneti beáramlásának előidézésével a plazma membránon keresztül 2) a Ca^{++} ionok felszabadításával a belső tárolókból (endoplazmatikus retikulum vagy vakuólum). Ennek eredményeként megnő a citoszol Ca^{++} koncentrációja 50-350 nM-ről akár 1100 nM-ra (1,1 μ M) is, mely következtében megnyílnak a Ca-aktivált anion csatornák a plazma membránban (Blumwald és Mittler, 2010).

Az anion csatornák hosszabb nyitva tartása lehetővé teszi a negatív töltésű Cl^- és malát²⁻ ionok nagyobb mennyiségű kijutását a sejtéből, melynek hatására annak elektrokémiai gradiense csökken, a membrán depolarizálódik, és ez előidézi a K^+ csatornák kinyitását. Továbbá ismeretes, hogy az ABA képes a citoszol pH 7,7-ről 7,9-re emelni, amely tovább serkenti a K^+ csatornák nyitva tartását. Az abszcizinsav képes gátolni a plazmamembrán H^+ -ATPázot, tovább megtartva ezáltal a depolarizációt. A plazmamembrán proton pumpa gátlásához a citoszol megemelkedett Ca^{++} koncentrációja és a sejt plazma lúgosodása is hozzájárul.

A záró sejtek szignál transzdukciójában protein kinázok és foszfatázok is részt vesznek. A H^+ -ATPázok aktivációja protein kinázok által történik, amely a zárósejt plazmamembrán potenciál csökkenéséhez vezet (polarizáció). A protein foszfatázok a specifikus H^+ -ATPázok aktivációjában módosításokat végeznek, amelyek az anion csatornák működésében okoznak további változásokat. Tehát megállapítható, hogy a jelátvivő proteinek foszforilálása és defoszforilálása fontos szerepet játszik a záró sejtek ABA jelátviteli útvonalában (Zeiger *et al.* 2010).

2.6.2. ABA jelátviteli útvonalak

Mint az ismeretes, számos stressz esetén a növényben emelkedik az ABA szint, amely különböző jelátviteli útvonalakat aktivál, aminek eredményeként bizonyos gének expresszálódnak. Viszont léteznek olyan stressz válaszhoz vezető jelutak is, melyek a hormon

részvétele nélkül működnek. Ez alapján megkülönböztetünk ABA – függő és – független jelátvitelt.

ABA-indukálta gének kódolhatnak például ozmolitok bioszintéziséért, detoxifikálásért felelős enzimeket, egyes LEA fehérjéket, ion transzportereket, csatorna fehérjéket, aquaporinokat, transzkripciós faktorokat, portein kinázokat és foszfatázokat.

A legtöbb ABA- indukálható gén promótere tartalmaz egy konzervált 8 bp hosszúságú *cis*-ható szekvenciát, amelyet abszcizinsav érzékeny elemeként (ABRE, PyACGTGG/TC) ismerünk és egy ACGT motívumot, ami a szintén a promóter régióban található. Összehasonlítva négy rizs *Rab16* gén promóter szekvenciáját, két erősen konzervált régiót találtak, az egyik az 5'-GTACGTGGC-3', a másik pedig az 5'-CGG/CCGCGCT-3' volt. Az ABRE elemek általában a stressz-indukálható gének "upstream" régióiban vannak és más GC-gazdag szekvenciával hatnak kölcsön, amit csatlakoztató elemnek (coupling element, CE) neveznek. Az ABRE és a CE kevesebb, mint 20 bp távolságra vannak egymástól, együtt alkotják az abszcizinsav-érzékeny szekvencia komplexet (ABRC) (Roychoudhury *et al.* 2013).

Léteznek olyan transzkripciós faktorok (TF), amelyek kölcsönhatnak az ABA útvonal jelátvivő komponenseivel. Ezek gyakran a bázikus leucin cipzár (bZIP) TF családba tartoznak, amik az ABRC-hez kötődnek és szabályozzák a stressz-indukálható gének expresszióját. A bZIP-ABRE rendszer egy ABA-függő stressz szignáltranszdukciós útvonal. Az *Arabidopsis* AREB1/AREB2, AREB2/AREB4 és AREB3 TF-ok jellemzően dehidratációra és magas sótartalomnál fejeződnek ki a vegetatív szövetekben, viszont a magban nem. Ha transzgénikus lúdfűben túltermeltették az AREB1 aktív formáját, a növény ABA túlérzékenységet mutatott illetve megnőtt a szárazság toleranciája (Roychoudhury *et al.* 2013).

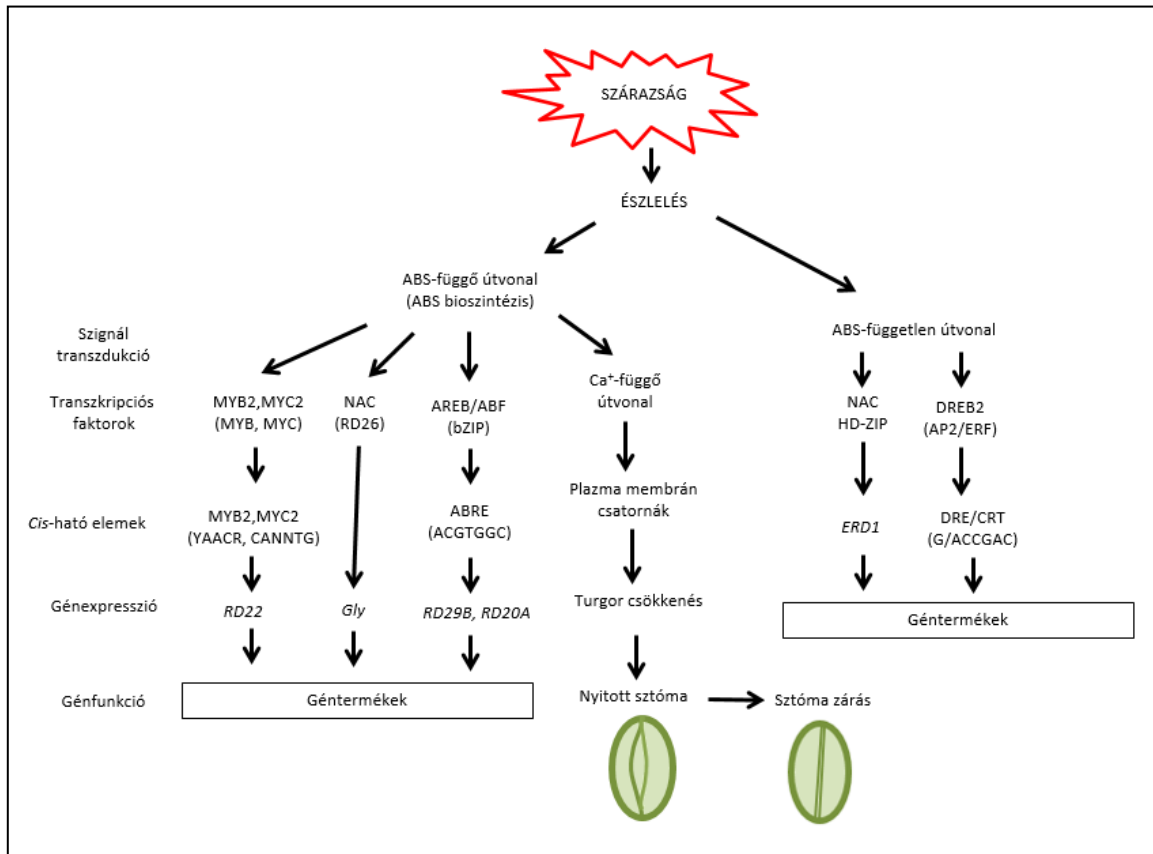
Egy másik kísérlet során transzgénikus dohányban expresszáltatták túl a *Rab16A* gént, ami egy sótoleráns rizs fajtából (Pokkali) származott. A *Rab16A* kifejeződése a rizsben víz- és sóstresszre valamint ABA-ra indukáltnak mutatkozott, a transzgénikus dohány sótoleranciája pedig megnőtt (Roychoudhury *et al.* 2013).

Egyes szárazság-, magas só- és hideg-indukálható gének [RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29A (RD29A)/ COLD-REGULATED78 (COR78)/ LOW-TEMPERATURE-INDUCED 78 (LTI78)] promótereivel kapcsolatban azt találták, hogy az

ABA-érzékeny elem (ABRE) mellett egy másik nagy cisz-ható motívumot is tartalmaznak, ami a dehidratáció-érzékeny elem (DRE)/C-repeat (CRT), amely szintén részt vesz a stressz indukálható génexpresszióban. Míg a DRE/CRT motívum az ABA független jelátvitelben szerepel, az ABRE és DRE/CRT elemeket is tartalmazó promóterek ABA-függő és -független génexpresszió során is működésbe lépnek, válaszolva az abiotikus stresszre.

A cisz-ható dehidratáció-válasz elem (DRE) promóter motívum fontos szerepet játszik a génexpresszió szabályozásokban az ozmotikus stresszre adott válaszokban. A DREB1A transzkripciós faktor például specifikusan kölcsön hat a DRE-vel és stressz tolerancia gének expresszióját indukálja (Shinozaki *et al.* 2003).

Az ABA-függő és -független útvonalakat az 2. ábra foglalja össze.



2. ábra: ABA-függő és -független szignáltranszdukciós útvonalak. Az ABA-függő útvonal során a MYB/MYC, AREB/ABF, DREB és NAC transzkripciós faktortok felismerik és kapcsolódnak a válasz gének *Cis*-ható elemeihez és indukálják azok expresszióját. Az ABA-független útvonal esetében más transzkripciós faktorok és gének játszanak szerepet, amelyek aktiválásához nem szükséges a hormon. Mindkét esetben a folyamat eredményeként olyan géntermékek keletkeznek, melyek hozzájárulnak a növény túléléséhez szárazság idején. Az abszcizinsav képes közvetlenül előidézni a sztómák zárását azáltal, hogy hat a kalcium szintekre, amely megnyitja a Ca^{++} - aktivált csatornákat. Ez további folyamatokat indukál a membránban, amely turgor csökkenést vált ki, ami végül pedig a légrések zárását okozza. (forrás: Blumwald és Mittler, 2010; Roychoudhury *et al.* 2013 nyomán, átszerkesztve).

2.7. Génkifejeződés szárazság stressz alatt

A szárazság stressz számos fiziológiai és biokémiai választ idéz elő a növényben. Ide tartoznak a sztóma zárás indukálása, a sejtnövekedés és fotoszintézis gátlása és a légzés aktiválása. A növények reagálnak és adaptálódnak a vízhiányhoz mind celluláris mind

molekuláris szinten, így például ozmolitokat és prolint halmoznak fel. A különböző funkcióval rendelkező géneket vagy indukálja vagy éppen gátolja a stressz (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Az abiotikus stresszek, mint amilyen a szárazság, hideg, só és nehézfémstressz, megbontják az ozmotikus és ionhomeosztázist, továbbá a proteinek és a sejtmembrán struktúrák károsodását okozzák. A károsodás során a növény stresszszignálokat termel, amelyek receptorokhoz kapcsolódnak, és "stresszinformációvá" alakulnak át a protein kináz hálózat által, amely bizonyos válaszgeinek aktivációját váltja ki. A folyamat végén, a celluláris homeosztázis helyreáll, a fehérjék és a sejt membránok regenerálódnak. Ezekben a folyamatokban több hormon, illetve jelátviteli út is részt vesz, amelyek együttműködése "cross-talk" révén valósulhat meg (Hu *et al.* 2010).

A válaszfolyamatok sokrétűek lehetnek, megnyilvánulhatnak például az epidermisz struktúra változásaiban, amely fontos lehet az abiotikus stresszel szembeni védekezés szempontjából. A válasz fehérjék működése révén képes a növény túlélni a kedvezőtlen környezeti tényezőket (Hu *et al.* 2010).

Amikor a növényt valamilyen stressz éri, újraprogramozza metabolikus és élettani folyamatait, amelyeket jelátviteli események hálózata idéz elő. A folyamat a stressz észlelésével kezdődik, amit a növény a szignálok közvetítésével akklimációt célzó válaszokra fordít le. Eredményül a sejtanyagban bizonyos gének kifejeződése meg fog változni. A válaszok között a sztóma zárósejteknek különösen nagy jelentőségük van, mivel kulcsszereplők a növény vízgazdálkodásában. Az ozmotikus stressz megelőzése, amelyet szárazság vált ki, függ a sztómás és kutikuláris vízvesztés minimalizálásától és a vízfelvétel maximalizálásától. A vízvesztést a sejtek ozmotikus védekezéssel is elkerülhetik (Roychoudhury *et al.* 2013). A prolin, betain, szabad aminosavak, cukrok, cukor alkoholok, alkaloidok, stb. ozmotikusan aktív komponensek. Fiziológiai működésük révén részt vesznek a sejt nyomáspotenciál megtartásában, a proteinek és sejt struktúrák stabilizálásban és ROS semlegesítésében. Jelentőségüket a bioszintézisükben kulcs szerepet játszó enzimek túl-expresszállásával bizonyították (Hu *et al.* 2010). A kompatibilis oldott anyagok felhalmozása mellett a víz- és iontranszport rendszer (vízcsatorna proteinek és membrán transzporterek) változásai is védik és stabilizálják a sejt struktúrákat a deszikkációtól és a károsodástól. A sejtes védekezés további elemei az antioxidáns és detoxifikáló enzimek, mint amilyen a

glutation S-transzferáz, kataláz, szuperoxid dizmutáz stb); a zsírsav metabolizmus bizonyos enzimeit, proteínáz inhibitorok, ferritin és lipid-transzfer proteinek; LEA, ozmotin és fagyvédő fehérjék stb. Ezek a sejtszintű változások a szabályzó TF-ok átírásának változásai mellett a szignál transzdukció "downstream" génjeinek a szabályozása révén is megtörténhetnek (Roychoudhury *et al.* 2013).

A jelátviteli láncokban számos proteín kinázt (MAPK, kalcium-függő proteín kináz stb.); proteín foszfatázt és proteázt azonosítottak. Az elsőként indukált TF-ok kölcsönhatnak a "downstream" stressz-szabályozott jelátviteli és válasz gének promótereinek *cis* elemeivel, amelyek a válaszoló gének expresszióját szabályozzák, ezáltal segítve elő a növény stressz toleranciáját (Roychoudhury *et al.* 2013).

A génexpressziót szabályozó molekuláris mechanizmusok függenek a kromatin struktúrájától is, azaz hogy milyen a transzkripciót végző RNS polimeráz komplex hozzáférhetősége a DNS-hez, beleértve a nem-kódoló RNS-eket, hisztonban történő változásokat, hiszton módosulásokat és DNS metilációt is. A DNS metilációban és/vagy hiszton kódban történő változások összefüggenek a génexpresszió változásaival, amelyet a növény a különböző stresszekre adott válaszok során generál. A hiszton amino-terminális végek kémiai módosulásai a nukleoszóma átszerkesztését idézik elő, ami elősegítheti a stresszindukált transzkripciót az RNS polimeráz II által (Roychoudhury *et al.* 2013).

2.7.1. A transzkripciós faktorok szerepe a stressz toleranciában

Számos transzkripciós faktor bizonyult stressz indukálhatónak, ami azt mutatja, hogy az átírást szabályozó mechanizmus működhet a szárazság, a hideg vagy a sóstressz szignáltranszdukciós útvonalakban. Ezek a faktorok szabályozhatják a stressz indukálható gének expresszióját akár közvetve vagy közvetlenül is (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

A tolerancia vagy érzékenység egy nagyon összetett jelenség, mivel a stressz a növényt több fejlődési állapotában érheti. Az abiotikus stressztolerancia genetikai meghatározottsága több faktor által szabályozott; a különböző környezeti tényezőhöz való adaptáció egy komplex jelleg.

Az abiotikus stressz, úgy, mint a szárazság, hőmérséklet és a só csökkenti a közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) hozamát. Ilyen körülmények között a növényi sejtek

drasztikus fiziológia, biokémia és metabolikus változásokon mennek keresztül, amelyek sejtszinten a stressztolerancia emelkedéséhez vezethetnek. A stressztolerancia kifejlődése háttérben álló mechanizmusok része, hogy egyes *Cor* (cold-responsive)/*Lea* (late-embryogenesis-abundant) gének indukálódnak. A *Cor/Lea* fehérjék hozzájárulnak a stressztolerancia kialakulásához, ami a stresszvédő sejtes komponenseknek köszönhető. A *Cor/Lea* gének nemcsak alacsony hőmérsékletre válaszolnak, hanem közülük több szárazságra és abszcizinsavra is indukálódik. Az alacsony hőmérséklet- és szárazság-indukált gének mind C-repeat (CRT)/dehydration-responsive element (DRE), mind ABA-responsive element (ABRE) motívumokat tartalmaznak a promóterjükben; ezen *cis* elemek funkciót függetlenül tartják. Alacsony hőmérséklet és ozmotikus stressz hatása alatt a *Cor/Lea* gének expressziója a CBF/DREB és AREB/ABF családba tartozó transzkripciósfaktorok által szabályozott (Kurahashi *et al.* 2009).

Az ABA a környezeti stresszre adott válaszokban kulcsszerepet játszó növényi hormon. Egyes *Cor/Lea* gének expressziója összefügg a fagy és szárazság toleranciával, több közülük külső ABA-val is indukálható. Az *Arabidopsis*-nak ezen *Cor/Lea* gének promóter régióiban ABRE szekvenciák vannak. Az ABRE motívumokhoz dimerként kötődnek az AREB/ABF proteinek (a bázikus leucin zipzár régió keresztül; bZIP) és aktiválják az ABA-függő génexpressziót.

A CRT/DRE, ABRE és más stressz-érzékeny motívumok a búza *Cor/Lea* gének 5' upstream régióiban találhatóak, például a *Wdhn13* és *Wrab17* gének esetében is. A búza *CBF* homológok például a *TaCBF*, *TaDREB1* és *WCBF2* transzkripciósfaktorokat kódolnak, amelyek CRT motívumokhoz kötődnek. A *CBF* (core binding factor) homológok közül a *TaDREB1* egyértelműen szárazság és ABA hatására fejeződik ki. Búzában a *Cor/Lea* gének expresszióját CBF/DREB és bZIP transzkripciósfaktorok serkentik, és központi szerepet játszanak az abiotikus stressztolerancia kialakulásában (Kurahashi *et al.* 2009).

Vízhiány hatására aktiválódó egyes gének promóter régióinak vizsgálata ABA-független expressziót mutatott. Ezen indító szakaszok DRE/CRT elemet tartalmaztak (A/GCCGAC szekvencia). A lúdfű DREB1/CBF és DREB2 fehérjék az AP2/ERF TF családba tartoznak. A DREB1/CBF fehérje specifikusan kölcsönhat a DRE/CRT motívummal és nagyszámú stresszválasz gén expresszióját ellenőrzi. Szárazság, só- és fagytoleranciában javulást mutatott az a transzgenikus lúdfű, amelyben a DREB1/CBF TF-t túltermeltették, habár ez a konstitutív

expresszió fejlődési rendelleneségeket is okozott. Más kutatások során, a stressz-érzékeny *RD29A* promóter használatával a növény stressztoleranciáját növelni lehetett anélkül, hogy a beavatkozás növekedésbeli hibákat okozott volna. Érdekes módon a fagy tolerancia nagy hatású QTL-jeit a lúdfűben, diploid búzában (*T. monococcum*) és árpában a *DREB1/CBF* gének közelébe térképezték és a *DREB1/CBF* gének expressziós szintje összefüggésben volt a fagy toleranciával. Transzgenikus lúdfűben a *DREB1* gén és rizsben az *OsDREB1* gén erős kifejezése megnövelte a szárazságra, magas sótartalomra és hidegstresszre való toleranciát, habár fejlődésbeli elégtelenségeket okozott. Megfigyelték, hogy megemelkedett az ozmoprotektánsok (szabad prolin és oldható cukor) szintje a transzgenikus rizsben. Ez azt valószínűsíti, hogy a *DREB1/CBF* regulon funkciója konzervált rizsben és lúdfűben, valamint hogy a *DREB1/CBF*-típusú gének alkalmasak lehetnek a különböző környezeti stresszre való tolerancia növelésében transzgenikus egyszikű valamint kétszikű növényekben is (Kauzo *et al.* 2003).

2.7.2. A szárazságstresszre adott válaszokban szerepet játszó transzkripció faktorok közötti kölcsönhatások

Számos gén transzkripció szinten válaszol szárazságra, miként hidegstresszre is (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000) és így vesznek részt a tolerancia kialakításában.

Microarray technológiával végzett transzkriptom analízissel feltártak néhány gént, amelyek indukálódtak abiotikus stressz által. Ezek két nagy csoportra oszthatóak. Az egyik csoport olyan géntermékeket kódol, amelyek közvetlenül védik a sejtalkotókat a stressz káros hatásaival szemben, míg a másik csoport termékei szabályozzák a génexpressziót és szignáltranszdukciót a stressz válaszokban. A molekuláris és genomikai analízisek azt mutatják, hogy több különböző transzkripcionális szabályozó rendszer vesz részt a stressz-válasz genetikai szabályozásában. Néhányban ezek közül részt vesz az ABA stresszhormon, míg másokban nem. A stressz-indukált válasz gének expressziója tehát lehet ABA-függő vagy attól független. Néhány gén mind szárazságra mind hidegstresszre indukálódik, ami azt mutatja, hogy a szárazság és hidegstressz jelátviteli útvonalak között párbeszéd, "crosstalk" áll fenn (Kauzo *et al.* 2003).

A kutatók microarray technológia segítségével megállapították, hogy az ismert szárazság-indukálható gének több mint a fele kifejeződött magas só és/vagy ABA kezelés hatására, ami

azt bizonyítja, hogy szignifikáns átfedés áll fenn a szárazság, sóstressz és ABA válaszok között. Ezzel ellentétbe, a szárazság-indukálható géneknek csak kb 10%-a indukálódott hidegstresszre is. Számos, különböző típusú TF volt megtalálható a stresszekre indukálható gének között, ami azt sugallja, hogy többféle transzkripcionális szabályozó mechanizmus működik a szárazság-, hideg- vagy magas sóstressz jelátviteli útvonalakban. E stressz-indukálható TF-ok tartalmazzák a DRE-kötő fehérje (DREB) család tagjait, az etilén-érzékeny elem kötő faktor (ERF), a cink-ujj, a WRKY, MYB, a bázikus helix-hurok-hélix (bHLH), a bázikus-domén-leucin cipzár (bZIP), a NAC és a homeodomén TF családokat. Ezek a TF-ok együttesen vagy külön szabályozhatják a stressz indukálható a jelátviteli hálózatokat és géneket (Kauzo *et al.* 2003).

2.8. A búza szárazságtűrését meghatározó tényezők

A szárazságtűrés több gén által meghatározott (poligénes) kvantitatív (mennyiségi) tulajdonság. Egy poligénes jelleg fenotípusos kifejeződését nagymértékben befolyásolja a környezet. A kromoszómákon azokat a régiókat, ahol a mennyiségi tulajdonságok kialakításában szerepet játszó gének helyezkednek el, mennyiségi jellegeket meghatározó lókuszoknak, röviden QTL-eknek nevezzük. Jellemzően egy nagy (major) illetve több kis (minor) QTL felelős egy adott tulajdonságért. A szárazságtoleranciát általában kis hatású QTL-ek befolyásolják.

A búzanemesítés történhet hagyományos módszerekkel illetve géntechnológiát felhasználva. Mindkét eljárás célja elsősorban a minőség javítása, a hozam növelése és a stresszekkel szembeni ellenállóság fokozása.

Ahhoz, hogy megértsük a szárazságra adott válaszok molekuláris mechanizmusait, elengedhetetlen a szárazságtolerancia molekuláris szintű kutatása. Jelenleg többféle lehetőség közül választhatunk, melyek révén növelni tudjuk a búza szárazsággal szembeni ellenállóságát, stabil hozam mellett.

A növényben a tolerancia kialakulását több szinten is nyomon követhetjük: transzkriptom, proteom és metabolom szinteken. Ezen analízisekkel meghatározhatóak azok a gének, amelyek szárazságstressz során indukálódnak és kapcsolatban vannak a jelátviteli és szabályozó útvonalakkal. Mindehhez hozzásegít a búza genom szekvencia szintű ismerete, melynek révén ma már könnyebben tudunk fényt deríteni az egyes gének funkciójára.

A transzformációs technológia egy lehetőség, hogy megértsük azokat a hatásmechanizmusokat, amelyek közrejátszanak e tulajdonság kialakításában. Ezen módszerek nemcsak a növény túlélését célozzák meg, hanem a produktivitás megtartását, növelését is mérésékelt vízellátás esetén.

Számos kutatás alapján elmondható, hogy a szárazság toleranciát több „kihatású” QTL befolyásolja. A géntérképezés és funkcionális genomikai technológiák a szárazságtolerancia molekuláris vizsgálatának új eszközeinek tekinthetőek. A molekuláris markerek és/vagy a potenciális gének meghatározása segíthet megérteni a szárazsággal szembeni ellenállóság molekuláris alapjait, illetve azt felhasználva molekuláris módszerekkel támogatott nemesítést lehet végezni. Az utóbbi tíz évben számos olyan tanulmány született, amelyekben a QTL-ek térképezésével több gabona esetében is olyan lókuszokat azonosítottak, amelyek összefüggésbe hozhatóak a szárazságtoleranciával (Mir *et al.* 2012).

A transzkriptomika és funkcionális genomika alkalmazása is lehetőséget nyújt jobban megérteni a stresszválasz mechanizmusait a haszonnövényeknél. A szárazságtoleranciában szerepet játszó gének transzkripció profil meghatározására az EST szekvenciák (expressed sequence tag/ kifejeződő szekvencia szakasz) alkalmasak. Az EST szekvenciák bioinformatikai analízise (például BLAST programmal) segíthet azonosítani azokat az ígéretes géneket, amelyek a tolerancia kialakításában részt vehetnek.

Az ellenállóképesség növelhető transzgenikus technológiával is, amikor egy, vagy néhány génnel transzformálják az adott növényt, melynek növekszik az ellenállóképessége a stresszel szemben a gén(ek) kifejeződése által. A tudomány jelenlegi állása szerint már képesek vagyunk transzgenikus búzát is előállítani. Vendruscolo *et al.* (2007) túlteremeltették a prolin bioszintézisben kulcs szerepet játszó gén cDNS-ét. A prolin felhalmozódás eredményeként a transzformáns búzák oxidatív stresszel szembeni védelme javult, és jobban tolerálták a vízdeficites körülményeket, mint a kontroll csoport.

Harsh Chauhan és Paramjit Khurana (2011) portok kultúrán *Agrobacterium*-közvetített transzformációt végeztek búzán, a szárazság toleranciában ismert módon szerepet játszó árpa *HVA1* gént felhasználva. A regenerációt követően a pozitív haploidokat kolhicin kezelésnek vetették alá, mellyel stabil transzgenikus dihaploid növényeket nyertek. Ezek jellemzően gyorsabban csíráztak és a szárazság toleranciájuk is jobb volt, mint a nem transzgenikus növényeké.

Bahieldin *et al.* (2005), szintén a LEA fehérjék 3. csoportjába tartozó *HVA1* génnel végzett búza transzformációt, melynek konstitutív expressziója javított a biomassza produktivitáson és vízfelhasználáson vízhiányos körülmények között.

A hazai viszonylatban az aszálytűrő búza fajták közül a GK Hunyad és GK Csillag említhető meg, amelyeknek szárazságtűrő képességét 2002-ben már elismerte az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet. Újabb, nagy termőképességű és stressz toleráns fajták kerültek bejelentésre 2003-ban és 2004-ben. Ezek a GK Álmos, GK Nyár, GK Sámán, GK Szörény és GK Rábé voltak (Hoffman *et al.* 2006).

A dolgozatomban szereplő fajták közül agronómiai szempontból a Gk Élet és Cappelle Desprez vízhiányra érzékeny, az Mv Emese és Plaisman V toleráns genotípusok; kategorizálásuk a szárazság stressz alatti terméshozam változások alapján történik (Jäger *et al.* 2014). Más fiziológiai paraméterek, mint a fotoszintetikus aktivitás és hormon szintek (Guóth *et al.* 2009; Guóth *et al.* 2010) vagy a mikro- és makrosporogenezisek érzékenysége illetve a megtermékenyülési folyamat, mind együttesen határozzák meg az adott búzafajta érzékenységét a talajszárazságra nézve (Guóth *et al.* 2010). Ennek függvényében a toleráns fajtákkal magasabb hozam valósítható meg szárazság idején is, szemben az érzékeny genotípusokkal.

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk céljaul azt tűztük ki, hogy a hazai viszonyok között is egyre inkább szélsőséges időjárásnak kitett közönséges búza egyes genotípusainak szárazságra adott válasza között különbségeket tegyünk. Választ kerestünk arra a kérdéskörre, hogy mi okozza a vízdeficitre való eltérő érzékenységet az általunk vizsgált két szárazságtoleráns (Plainsman V. és Mv Emese) és két szárazságérzékeny (GK Élet és Cappelle Desprez) fajta között. Ehhez genetikai, biokémiai és növényélettani módszereket alkalmaztunk.

A fajták közötti különbségtétel céljából a következő vizsgálatokat végeztük:

- a vízhiány gázcserére gyakorolt hatásának mérése
- indukált ozmotikus stressz alkalmával szintetizálódó ozmoprotektánsok meghatározása
- egyes, szárazság esetén várhatóan megnyílvánuló gének kifejeződésének vizsgálata
- azon transzkripciós faktorok felkutatása, amelyek szabályozhatják az előbbieken említett gének kifejeződését
- a desszikasiós válaszokban kulcsfontosságú abszcizinsav hormonra való érzékenység meghatározása

Azonosítani és klónozni kívántunk továbbá egy búza gént, amely a szárazságtűrésben lényeges viaszborítottság kialakulásáért felelős lehet. Meg kívántuk határozni az ilyen jelölt gén kifejeződését kifejllett búza növény szerveiben, valamint vízhiányos stressz hatása alatt a zászlós levelekben.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

Kísérleteinket két szárazságtoleráns fajtára, a martonvásári nemesítésű *Triticum aestivum* L. cv. Mv Emese-re illetve az amerikai eredetű *T. aestivum* L. cv. Plainsman V-ra alapoztuk. Az összehasonlítás érdekében további két szárazságérzékeny genotípust vontunk be a kutatásunkba: a Gabonakutató Nonprofit Kft. által nemesített *T. aestivum* L. cv. GK Élet-et és a francia eredetű *T. aestivum* L. cv. Cappelle Desprez-t.

Az egyes kísérleteinkhez felhasznált vetőmagokat az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet Növényi Sejtbiológiai Osztálya biztosította a számunkra.

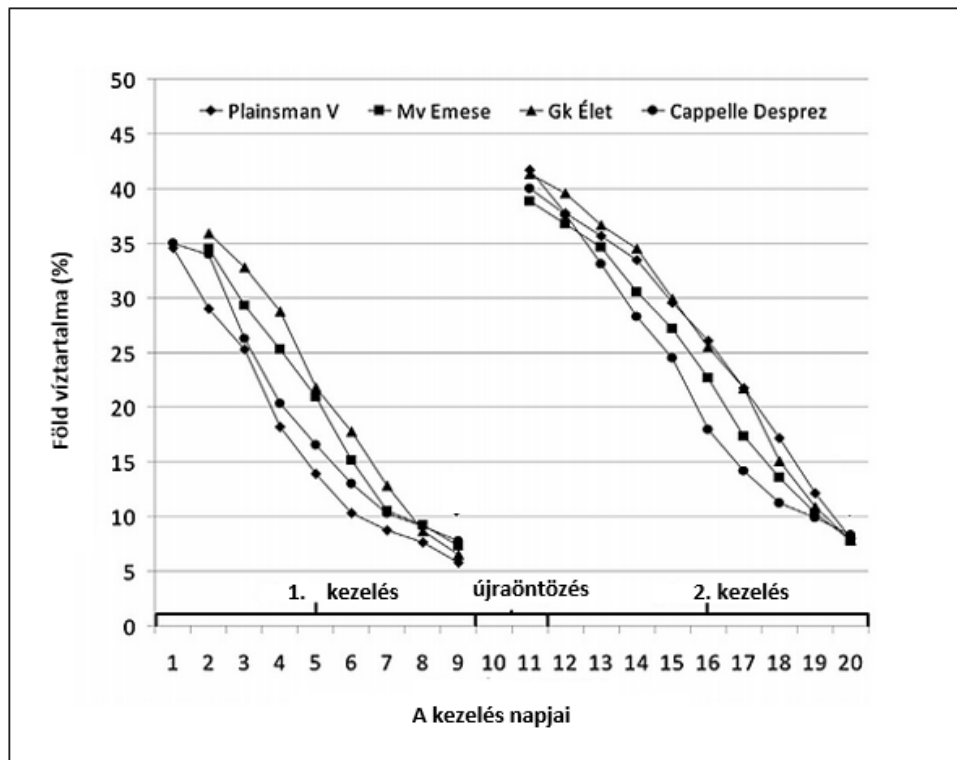
4.1.1. A szárazságtűrési kísérletekben felhasznált búzák nevelése

A szárazságtűrés vizsgálatához a búzmagokat föld-homok-tőzeg keverékébe (3:1:1, v/v/v) vetettük, majd 7 hét 2 °C-on történő vernalizációt követően a csíranövények PGV-15 növénynevelő kamrákban (Conviron, Winnipeg, Kanada) nevelkedtek, őszi klimatikus program (T1) alatt (Jäger *et al.* 2015). A kísérletek a MTA ATK Mezőgazdasági Intézet fitotronjában történtek, ahol társ kutató csoportunkat Jäger Katalin vezette. A minimum/maximum hőmérsékletet 12.5/5.5 °C-ról 21/14 °C-ig emeltük virágzásig. Az öntözés rendszerint reggel történt azonos térfogattal (150 ml/cserép/nap).

Mivel a Cappelle Desprez-nek a címerhányása és virágzása később történik a többi genotípussal szemben (előzetes kísérletek szerint), a fejlődési különbségek kiegyenlítése érdekében ezt a fajtát két héttel korábban ültettük (Jäger *et al.* 2015).

A szárazságstresszt teljes vízmegvonással idéztük elő, a növények fejlődési fázisait a Zadoks-féle fenológiai kódrendszer (GS58) segítségével állapítottuk meg. A virágzás előtt 3 nappal kezdtük a vízmegvonást, amit legalább a nevelőközeg 10% -os víztartalmának eléréséig folytattunk (**3. ábra**). Az első vízmegvonást követően két napig visszaöntözést (150 ml) végeztünk, majd egy második vízhiányos stressz következett 10 napig. A kontroll növények 21°C-on nevelkedtek, 10/14 óra világos/sötét megvilágítási ciklus alatt. Genotípusonként és kezelésként húsz növényt neveltünk teljes fejlettségig, a végső maximum/minimum hőmérséklet 32/18°C között volt (Jäger *et al.* 2015).

A kísérletet kétszer ismételtük meg 2010-ben és 2011-ben, mindkét évben két biológiai ismétlésben.



3. ábra: A talaj víztartalma a szárítás két ciklusa alatt (Jäger *et al.* 2014 nyomán, átszerkesztve).

4.1.2. Növényanyag nevelése az *in vitro* ABA kezeléshez

Kurahashi és munkatársai 2009-ben közölt publikációjára támaszkodva végeztük a kísérleti anyag előállítását az ABA hatását célzó vizsgálatunkhoz. A magokat 5 órán keresztül csapvízben áztattuk a hidratáció végett, majd a nedvesedett magokat egy éjszakán át 4 °C-on tartottuk. Ezután a magokat desztillált vízzel átitatott szűrőpapírokra helyeztük Petri-csészékbe, és egy napig 20 °C-on sötétben inkubáltuk.

A kontroll csoport desztillált vizes, míg a kezelt vonalak növényei 10 μM, 20 μM és 50 μM koncentrációjú (±)-cisz, transz-abszcizinsavval telített szűrőpapírokon fejlődtek ugyanazon körülmények között (23 °C). Minden kezelésnél genotípusonként tíz magot használtunk fel, majd három nap elmúltával lemértük a csíranövények gyökérhosszát. A kísérletet három alkalommal ismételtük meg.

4.1.3. PEG-el történő ozmotikus stressz kezeléshez való kísérleti anyag előállítása

A vetőmagokat 3%-os hidrogén-peroxiddal kezeltük 5 percig a maghéj sterilizálása miatt, majd többszöri Milli-Q vizes mosással mentesítettük annak maradványaitól. Ezt követően desztillált vízzel átitatott szűrőpapírral bélelt Petri-csészékbe raktuk a szemeket és fényszobába helyeztük azokat. A már hajtással és gyökérrel rendelkező csíranövényeket tíz nap letelte után hidropóniás rendszerben, Hoagland-tápoldatban (pH: 5,8) neveltük tovább (Hoagland és Arnon, 1950). A makro- és mikroelemekből törzsoldatot készítettünk, és ebből mértük ki a szükséges mennyiségeket. Így 10 l tápoldathoz 1 l makrotörzsoldatot, 2,5 ml mikrotörzsoldat valamint 100 ml Fe(III)-EDTA törzsoldatot használtunk fel. Az egyes törzsoldatok összetevői a következők voltak:

Makrotörzsoldat:

5,055 g/L KNO_3

11,81 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

4,932 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

1,361 g/L KH_2PO_4

Mikrotörzsoldat:

286 mg/L H_3BO_3

362 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

22 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

12 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Fe(III)-EDTA törzsoldat:

4 g/L Fe(III)-EDTA

Az algák elszaporodásának megelőzésére tetejükön lyuggatott alufóliával burkoltuk be a tenyészedényeket (**4. ábra**). Genotípusonként 40 növényt neveltünk (20 növény/800 ml) ilyen vízkultúrák körülmények között. A további optimális külső környezet biztosítása érdekében a kísérletet klímakamrákban végeztük.



4. ábra: Búza növények vízkultúrák rendszerben

Az ozmotikus stressz kiváltására a Hoagland-tápanyoldatba növekvő koncentrációban 8 w/v %-os, 12 w/v %-os, 15 w/v %-os majd 18 w/v %-os 6000-es molekulatömegű polietilén glikolt (PEG, Duchefa) használtunk, a kontroll csoport kizárólag Hoagland tápanyoldatban fejlődött. A stressz kezelést a tápanyoldatra helyezést követő 10. napon kezdtük és a PEG koncentrációját hetente növeltük folyamatosan.

Előzetes kísérletek alapján (nem bemutatott adatok) a stresszhatás optimális megfigyeléséhez a PEG koncentrációjának több lépcsős emelésére volt szükség, ugyanis ezzel a módszerrel elkerülhető a növények hirtelen sokkolása, ami azok pusztulásához vezetne.

Az anoxia elkerülése érdekében akváriumi levegőztető rendszert alkalmaztunk, az elpárolgott/párologatott víz fogyasztásának folyamatos pótlása végett pedig a kontroll ill. PEG tartalmú tápanyoldatokat heti két alkalommal utántöltöttük desztillált vízzel.

4.2. Relatív víztartalom (RWC) meghatározása

A leveleket ért ozmotikus stressz mértékét a relatív víztartalom vizsgálatán keresztül követtük a 18%-os PEG kezelést követően, melyhez a levél közepéről vett 2 cm-es szegmenseket használtunk.

A relatív víztartalmat (Relative water content, RWC) a következő egyenlet alapján határoztuk meg: $RWC = (FW - DW) * 100 / (SW - DW)$. Ahol az FW a friss súly (Fresh weight, FW), az SW a 4 órás, desztillált vízben történt áztatás után mért víztelített súly (Water-saturated weight, SW), míg a DW 80°C-on tömegállandóságig történő szárítás után mért száraz súly (Dry weight, DW) (Ristic és Jenks, 2002).

Minden vonalból 15 darab növényt neveltünk, a kísérletet háromszor ismételtük meg. A kapott RWC eredmények közti különbséget t-próba segítségével értékeltük.

4.3. Prolin meghatározása vízhiányos búzáknál

A prolin tartalom meghatározása Bates (1973) publikációja alapján történt. A -80 °C-on tárolt mintákból kimértünk kb. 100 mg-ot, amelyet eldörzsöltünk kvarchomok segítségével 3% szulfoszalicilsavat tartalmazó oldatban. Az így nyert homogenizátumot 10 percig maximális fordulatszámon centrifugáltuk. A kapott felülúszó 100 µl-éhez 200 µl 96%-os ecetsavat illetve 200 µl savas ninhidrint (2,5% (w/v), ninhidrin, 60% (v/v) 96%-os ecetsavat, 40% (v/v) 6 M foszforsav) adtunk hozzá. A mintákat 96 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Miután az elegyünk kéz melegre lehűlt, 1 ml toluolt mértünk hozzá.

Az így kapott piros színű terméket OD₅₂₀ nm-en spektrofotométerrel megmértük, ehhez a toluolt használtuk referenciaként. A prolin koncentráció meghatározásához kalibrációs görbét készítettünk ismert mennyiségű prolin tartalmakat alapul véve.

A kísérleteket három ismétlésben végeztünk, ismétlésenként több párhuzamos mérést felhasználva.

4.4. Fotoszintézisre jellemző paraméterek műszeres mérése szárazság kezelt búzákon

A növényi gázcsere vizsgálatának egyik eszköze az infravörös gázanalízis (Infra Red Gas Analysis, IRGA), amely egy mérés során több paramétert képes mérni (pl. a levelek vízleadása, a fotoszintetikus szén-dioxid fixáció, sztóma konduktancia).

Az MTA Martonvásári Agrártudományi Kutatóközpont fitotronjaiban nevelt szárazságkezelt búzákon LiCor6400 készülékkel (LI-COR Biosciences) végeztünk ilyen irányú vizsgálatokat. Az analízist a vízmegvonási periódus alatt kétnaponta végeztük el, genotípusonként öt cserép növényeinek egy zászlós levelén, mivel az marad a legtovább

metabolikusan aktív. A fotoszintetikus folyamatok tanulmányozásának szempontjából ez a legmegfelelőbb vegetatív szerv a kalászosok körében.

A készülék beállítási paraméterei a következők voltak: levegő beáramlás 500 ml/min, a mérés 380 $\mu\text{mol/mol}$ légköri CO_2 koncentráció mellett történt.

4.5. Statisztikai elemzés

Az eredmények kiértékeléséhez statisztikai próbát alkalmaztunk, hogy megtudjuk van-e szignifikáns különbség az egyes mérések között. Az abszcizinsav gyökérnövekedés gátló hatására vonatkozó adatokat Welch féle ANOVA teszttel értékeltük ki. A levél RWC eredmények adatait a Microsoft Office 2013 Excel program T-próbájával elemeztük, mely során meghatároztuk a kezelések hatását az egyes genotípusokra nézve. A qRT-PCR alapján kapott expresziós szintek közötti különbség szignifikanciájának meghatározásához One-way ANOVA és post-hoc Tukey HSD tesztet alkalmaztunk.

4.6. Teljes RNS izolálás különböző búza mintákból

Búzák RNS kivonásához kezdetben Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System-et használtunk, azonban a gyenge kinyerése miatt elálltunk ennek további alkalmazásától. Így a mintáinkat végül TRI Reagent-el (Molecular Research Center, Inc.) izoláltuk, amely módszer eredményesnek bizonyult.

A kétféle (ABA-, szárazság-) kezelésnek alávetett növényanyag RNS kivonásánál ugyanazt a protokollt követtük, némi eltérésekkel a gyártó utasításaitól. Vizsgálatunkhoz a búzák levelét Eppendorf csövekbe gyűjtöttük és a helyszínen fagyasztottuk, majd azt $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig.

Kinyeréskor steril dörzsmozsárban 200 mg mintát homogenizáltunk folyékony nitrogén felhasználásával, majd ehhez hozzáértünk 1 ml TRI Reagenst és áttöltöttük Eppendorf csövekbe. 10 perc szobahőmérsékleten való inkubálás következett, majd az előre $4\text{ }^\circ\text{C}$ -ra lehűtött centrifugában 10 percig 12 000 rpm-en választottuk szét fázisokra a mintákat. Az ezt követően keletkezett felülúszót új csövekbe töltöttük, vigyázva hogy az alsó fázis sejttörmelékei ne kerüljenek át. Ezután következett a szerves oldószerral történő kezelés, amikor is 200 μl kloroformot mértünk rá a felső fázisra. Intenzív vortexelés után 15 percig $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on, a csöveket 12 000 rpm-en centrifugáltuk. Ennek során a minta három részre vált szét, melyből a felső vizes fázis tartalmazta az RNS-eket. Ezt új Eppendorf csövekbe pipettáztunk át, hozzáértünk 1:1 arányban izopropanolt, majd enyhe rázatás után

10 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Az újabb centrifugálást követően, ami 10 percig 12 000 rpm-en és $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt, a felülúszót eltávolítottuk a rendszerből és a keletkezett RNS üledéket 1ml 75%-os etanollal mostuk. A minták alkohol maradványainak eltávolítása érdekében, attól szárítás során szabadultunk meg. Végül az így keletkezett csapadékot 50 μl Milli-Q vízzel szuszpendáltuk fel.

Az izolált RNS minőségi és mennyiségi elemzését NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) segítségével végeztük illetve gélelektroforézis révén is ellenőriztük, mely során 1,5%-os TBE agaróz gélen megfuttattuk a kivonatokot 100 V-os feszültség mellett. Az RNS kiegyenlítésnél kezdetben csak a gélképekre hagyatkoztunk. Azonban ezt a módszert követve nem volt teljes mértékben eredményes a koncentrációkülönbségek kiküszöbölése. Így tértünk rá későbbiekben a NanoDrop mindenkori használatára. Azon minták esetében, amelyeknél az A260/A280 arány nem volt kielégítő, nem érte el az 1,7-es értéket, amely megfelel a fehérjétől való mentesség minőségének, újabb kivonásokat hajtottunk végre.

4.7. RNS koncentrációk kiegyenlítése és cDNS írás

A fentiekben vázolt elvárásoknak megfelelő RNS-eket a NanoDrop-pal mért koncentráció értékek alapján adtuk a reakcióelegyekhez, hogy a mennyiségi különbségeket már itt is kiegyenlítsük. Az RNS-ek cDNS-é való átírására a Fermentas First Strand cDNA Kit-et alkalmaztuk. Az adott ribonukleinsavhoz 1 μl Oligo(dT)18 Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) adtunk és DEPC-vízzel 12 μl végtérfogatra egészítettük ki. A gyártó által javasolt protokollt követve, 1 mM dNTP, 20 U RiboLock és 220 U M-MuLV reverz transzkriptáz enzimet használtunk egy reakcióelegy elkészítéséhez. A kapott komplementer DNS-ken a továbbiakban még 2,5x hígítást végeztünk MQ-val.

4.8. Az RT-PCR-hez felhasznált primerek

A kontroll primerek (TaL, TaH) (**1. táblázat**) megtervezéséhez irodalmi ismeretekre támaszkodtunk (Paolacci *et al.*, 2009). A „housekeeping” ubiquitin génre specifikus primerpárt Szikriszt Bernadett munkatársunk biztosította a számunkra.

A *Wdhn13* célgénrel folytatott vizsgálathoz Fuminori *et al.* (2010) publikációjában közölt primer szekvenciák szolgáltak alapul (**2. táblázat**).

A *Cbf14* és *Cbf15* génekre specifikus primereket Dr. Vágújfalvi Attila szolgáltatta a számunkra (MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Növényi Molekuláris Biológia Osztály) (**2. táblázat**).

A gélekből kinyert DNS fragmentumokat a Biomi Kft (Gödöllő, Hungary) segítségével szekvenáltattuk meg.

1. táblázat: Kontroll primerek

Primer neve	Primer szekvenciája	Termék hossza (bp)	Szekvencia azonosítója
TaH Ka, Kb	5'- TCGTCACCACCATCGAAACCA - 3' 5' - GGAGAGCCAGTCAAGACCCTC - 3'	398	Ta.2291
TaL Ka, Kb	5'-GTAGCATTATGTTTGTGCCTTG-3' 5'-GGAGAGCCAGTCAAGACCCTCG-3'	350	Ta.2776
Ubiquitin	5'-GCATGCAGATATTTGTGAAGACC-3' 5'- CCACACCAGCAGAAGTTTGA-3'	403	AY862401

2. táblázat: A célgének primer párjai

Primer neve	Primer szekvenciája	Termék hossza (bp)	Szekvencia azonosítója
Wdhn13	5'- AGAACCAGTGTTCAGATTTCCCT - 3' 5' - ATTCTGCAAAGTAGCGGGTC - 3'	361	AB076807
Cbf14	5'-TTGTCTCAACTTCGCCGACT-3' 5'-CCAAACCAGTGTCAATTCAA-3'	247	AY785901
Cbf15	5'-GTGTCTCAACTTCGCCGACT-3' 5'-ATGTGTCCAGGTCCATTTC-3'	336	EU076383

4.9. RT-PCR

A célgénekkal folytatott kísérletek előtt, a cDNS koncentráció kiegyenlítés sikerességéről kontroll primerekkel végzett RT-PCR útján győződünk meg. Egy RT-PCR reakció 2 µl cDNS-t, 1x GoTaq Flexi puffert, 0,6-0,6 µM primert, 1,5 mM MgCl₂-ot, 0,15 mM dNTP-t, 1,25 U GoTaq DNS polimerázt tartalmazott, Milli-Q-val 20µl végtérfogatra kiegészítve. Az RT-PCR reakciót az Eppendorf Mastercycler segítségével végeztük. Az enzim hőaktiválása 95 °C-on 2,5 percig történt, majd a következő lépések ismétlődtek harminc cikluson keresztül: a DNS denaturációja 30 másodpercig 95°C-on, primerek tapadása 30 másodpercig 60 °C-on és a polimerizáció egy percen keresztül 72°C-on. A reakció végét a 4°C-ra való hűtés jelentette.

A folyamat során kapott termékeket 1,5%-os agaróz gélben választottuk el és GelGreen festéssel tettük láthatóvá. A fragmentumok molekulatömeg meghatározásához markerként a lambda fág DNS-ének PstI enzimmel történt emésztését használtuk fel („M” sáv).

4.10. Genomi DNS kontamináció ellenőrzése

A cDNS-eket további vizsgálatnak vetettük alá, mellyel a genomi DNS maradványok meglétéről kapunk információt. Ehhez egy speciális primer párral (**3. táblázat**) végzett RT-PCR-t használtunk (Ciaffi *et al.* 2006). Ennek az indító szekvenciának az a különlegessége, hogy célgénje az amplifikált régióban egy intront tartalmaz, amelynek az mRNS érése során ki kell vágódnia. Az intron az átírt mRNS-ben már nem fog szerepelni, tehát a cDNS-en sem fog megjelenni. Ebből kiindulva, ha a polimeráz láncreakció utáni gélelektorforézis képen intron nélküli, azaz 266 bp hosszúságú terméket kapunk, akkor biztosak lehetünk abban, hogy a mintáink nem szennyezettek (genomi) gDNS-el. Ezzel az eljárással kiszűrhető, hogy csak azokról a génekről kapjunk képet, amelyek az adott pillanatban megnyilvánulnak, s amelyekről érett mRNS keletkezik.

3. táblázat: A genomi DNS szűréshez használt primer pár szekvenciái

Primer neve	Primer szekvenciája	Termék hosszúsága intronnal (bp)	Célgén azonosítója
TaG Ka	5'-AAGAACATCCAGGAATACAAGG-3'	618	AJ868102
TaG Kb	5'-TCTCCAAAGCAGAAACATCAAA -3'		

4.11. Az *Arabidopsis WIN/SHN1 (WAX INDUCER/SHINE1)* génnel homológ búza gén kiválasztása adatbázisok segítségével illetve annak klónozása

BLAST program segítségével kerestünk a lúdfű WIN/SHN1 génhez (NP_172988.1) hasonló szekvenciákat az NCBI *Triticum aestivum* EST adatbázisban. A legnagyobb egyezést a Ta31753 és Ta44806 búza UniGene-ekkel találtuk. További keresést folytattunk a fenti szekvenciákkal a Triticeae Full-Length CDS adatbázison. Az UniGene-ek szekvenciái egy adott génnek feleltek meg, nevezetesen a tplb0011g14-nek, amely egy 227 aminosav hosszú fehérjét kódol. Ezt a gént a továbbiakban *TaSHN1*-ként (**4. táblázat**) neveztük, ami a legnagyobb hasonlóságot a búza UniGene Ta44806-al mutatta. A kódolt protein 58.1%-ban volt azonos az *Arabidopsis* WIN/SHN1 fehérjével és 72.8 %-ban az ortológ rizs *OsWRI*

transzkripciós faktorról. A lúdfű, búza és rizs szekvenciák többszörös szekvencia illesztését a CLUSTAL W programmal (v. 2.1) végeztük (Jäger *et al.* 2015).

4. táblázat: A *TaSHN1* gén primer párjai

Primer neve	Primer szekvenciája	Termék hossza (bp)	Célgén azonosítója
buSWk1	5'-AGAGGATCCAACAATGGTACAGTCCAAGAAGAAGTTTCGC-3'	618	tplb0011g14
buSWk2	5'-GTGGAATTCTCAGATGACGAGGCTGCCTTCTTCACCG-3'		

A klónozás során az RT-PCR-el felszaporított DNS szakaszt (*TaSHN1*) elsőként restriktációs enzimmel kell hasítani, hogy megfelelő ragadós végű inszertet kapjunk, mely révén beépíthetővé válik a szakasz a vektorba.

Az RT-PCR során felszaporított búza gént pBluescript KSII vektorba történő ligálása az alábbiak szerint történt: elsőként az RT-PCR fragmentumot és a vektort BamHI és EcoRI enzimmel emésztettük. Az így előkészített DNS fragmensek 2-2 µl-éhez 5 µl ligáz puffert illetve 1 µl T4 ligáz adtunk hozzá. Utolsó lépésként a végtérfigatot 50 µl-re egészítettük ki MQ-víz hozzáadásával.

A következő lépés a ligátum *Escherichia coli* baktériumba történő transzformálása volt. A ligálási elegy 2 µl-ét 0,2 ml kompetens sejthez pipetáztunk, melyet előzőleg jégen felengedtünk. Ezután a keveréket 30 percig jégen állni hagytuk. Ezt követően 2 percig 42°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd 5 percre újra jégre raktuk. Antibiotikum nélküli 1 ml folyékony táptalajjal 37°C-on 1 órán keresztül rázattuk a mixet.

Annak érdekében, hogy a klónozott DNS szakaszt tartalmazó vektort hordozó baktériumokat kiszelektáljuk a baktérium telepek közül, agar lemezeket készítettünk Ampicilin 100µg/ml és IPTG X-Gal felhasználásával. A transzformáció révén kapott elegyet ezekre az antibiotikumot tartalmazó agar lemezekre volt szükség kiszéleszteni. A megjelenő Ampicillin rezisztens, fehér színű kolóniákat ezután tovább vizsgáltuk, hogy a klónozni kívánt inszertet valóban tartalmazzák-e.

4.12. Valós idejű PCR (qPCR)

Azért, hogy megbizonyosodjunk a szemi kvantitatív RT-PCR eredmények megbízhatóságáról, valós idejű PCR-t végeztünk a nem stresszelt, fiatal búza levélből származó, kiegyenlített cDNS koncentrációjú mintákon. A kísérletet egy Corbett Research gyártmányú Rotor Gene 6000 készülékkel végeztük.

A qPCR reakcióelegy összetétele:

2x My Taq HS mix	6,25 µl
20x Eva Green fluoreszcens festék	0,62 µl
Forward és reverse primer	0,5-0,5 µl (0,6-0,6 µM)
<u>cDNS-templát</u>	<u>0,75 µl</u>
Milli-Q-víz	12 µl végtérfogatra kiegészítve

Az amplifikálás paraméterei a következők voltak:

- denaturálás-hőaktiválás 95 °C → 10 perc
- denaturálás 95 °C → 5 másodperc
- primer tapadás 60 °C → 15 másodperc
- amplifikáció 72 °C → 20 másodperc

A reakció 55 cikluson keresztül ismétlődött. Ezután az olvadáspont analízis (*Melting Curve Analysis*) következett, mely lehetővé teszi a PCR végtermék minőségi ellenőrzését az olvadáspontjuk (*melting temperature* - T_m) segítségével. Ennek során a minták felfűtése 66 °C-ról 99 °C-ig történt, mely 0,5 °C-onként emelkedett.

A real-time PCR eredmények kiértékeléséhez az általunk használt készülék Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 programot használtuk, azon belül pedig a „Comparative Quantitation Analysis” funkciót alkalmazva. Ez a szoftver a C_T (Threshold cycle = C_T) értékkel rokonítható TOP („Take Off Point”) pontokat adja meg, mely a nyers fluoreszcencia értékek második deriváltjának segítségével számolja ki azt a pontot, ami a görbe exponenciális szakaszának a kezdetét jelenti (McCurdy *et al.* 2008). Ezen értékeket alapul véve, meghatározhatóak különbségek az egyes minták között.

Az eredményeket relatíve kvantifikáltuk, az alábbi egyenletet felhasználva:

$$\Delta C_T = C_T(\text{célgén}) - C_T(\text{referencia})$$

ahol a ΔC_T értéke megadja számunkra a kontroll és kezelt minták küszöbérték-ciklusszáma közötti különbségeket. Ezt követően az expresszióbeli különbség megállapítása a kettőnek az így nyert érték szerint negatív hatványra emelésével történt:

$$2^{-\Delta C_T}$$

Így megkaptuk, hogy a referencia génhez (TaL) képest mekkora a vizsgált gének expressziós szintje.

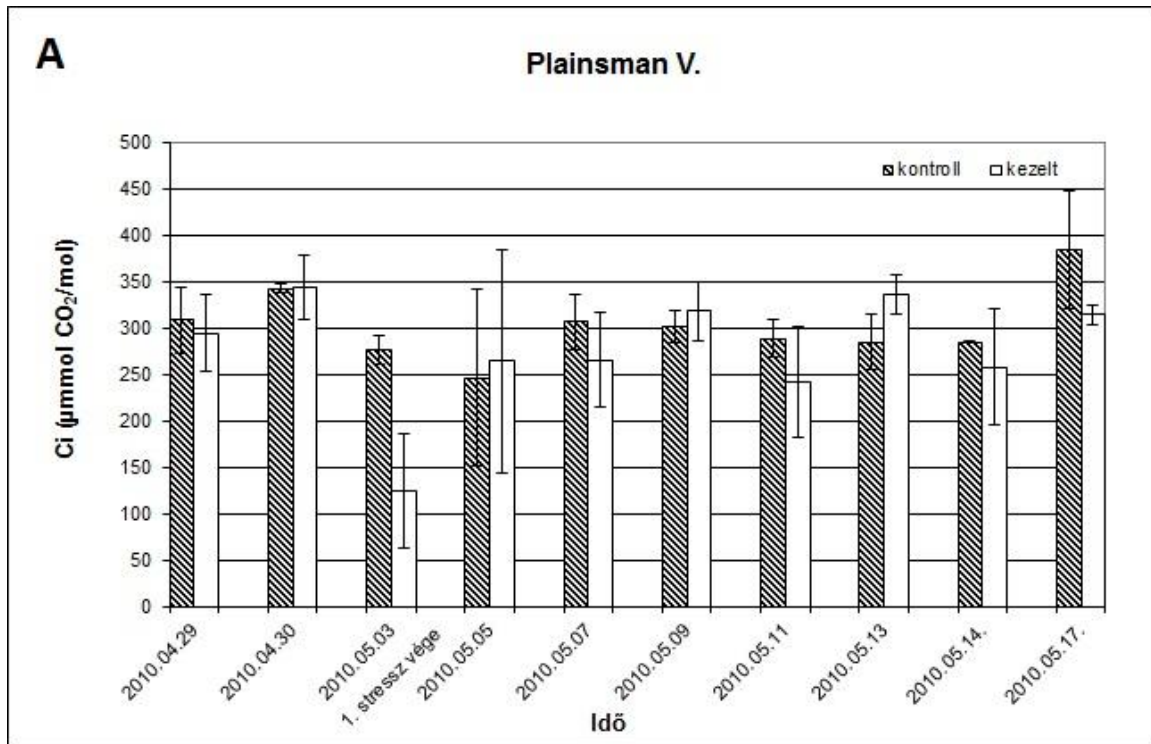
5. EREDMÉNYEK

5.1. Szárazságkezelt búza növények gázcsere paramétereinek mérése

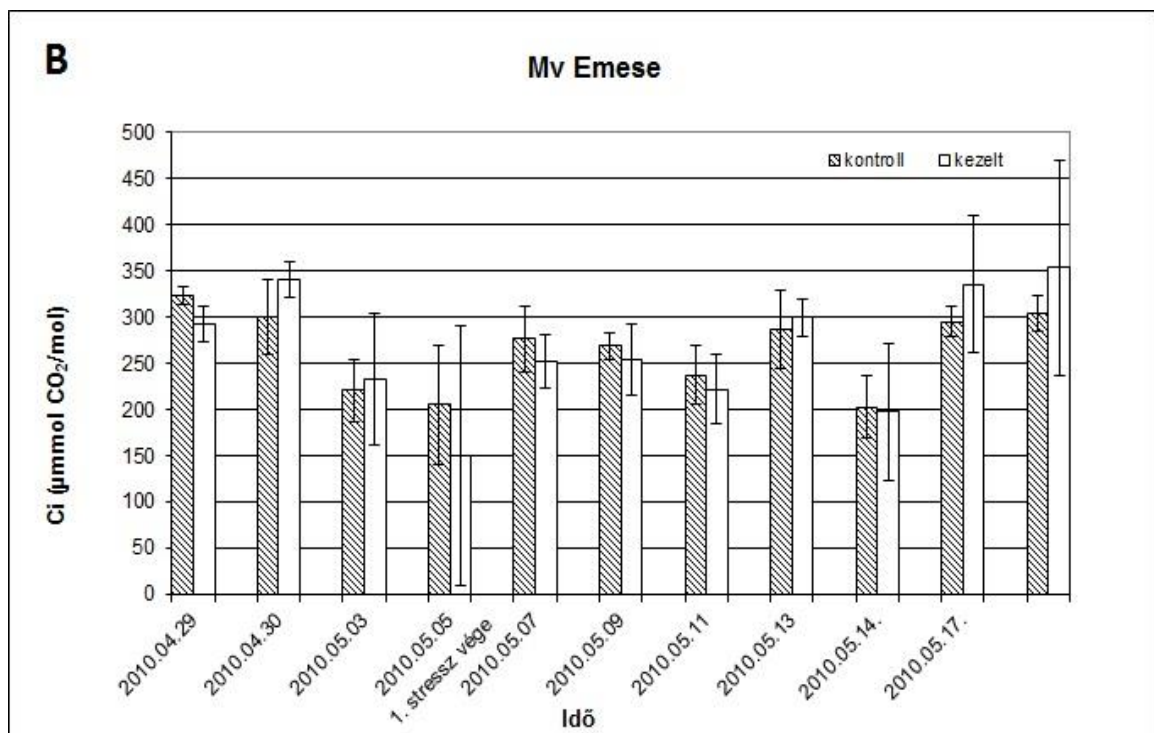
Számos stressz, ahogy vízhiány is, a növények élettani folyamatai közül a fotoszintézisre is kihatással van. A fotoszintetikus apparátus viszonylag védett a környezeti hatásokkal szemben, de károsodás érheti súlyos vagy hosszantartó stressz esetén. Így az erre irányuló műszerrel való mérés lehetőséget ad a stressz okozta károsodás meghatározására.

A CO₂ asszimiláció megköveteli a sztómák nyitását, aminek elkerülhetetlen következménye a párologtatás (Kriedemann, 1999). A hatékony vízhasznosítás, ami a levél gázcseréje során lehetővé teszi a fotoszintézist, de megelőzi a kiszáradást, erős szelekciós nyomásként érvényesül a növények között vízhiányos környezetben.

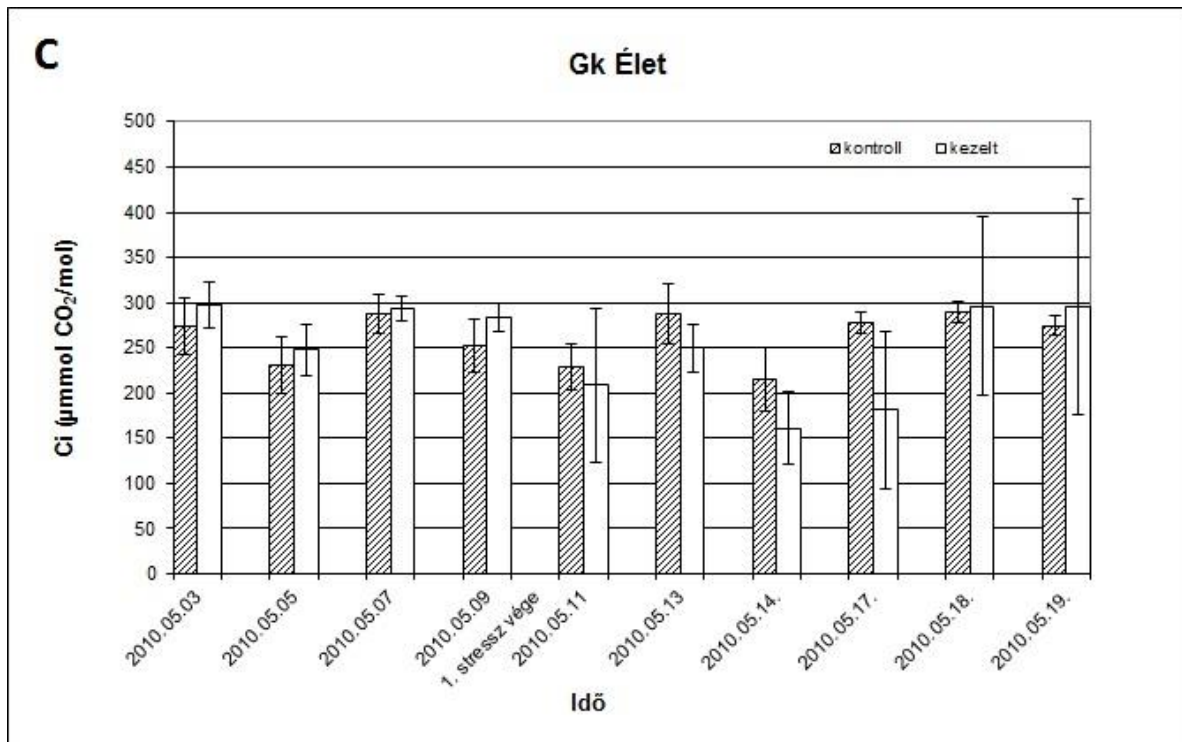
Fitotronjainkban szárazságstressz alatt nevelkedett búzákon egymást követő két évben végeztünk méréseket LiCor 6400 műszerrel. Ezek közül az első év eredményeit közöljük (azokból is a Ci értékeit, **5A, 5B, 5C, 5D ábra**), ugyanis a második évjárattól kezdve méréseink a műszer meghibásodása miatt már nem voltak értékelhetőek, a harmadik évi vízmegvonási kísérletnél pedig mellőztük a műszerrel való vizsgálatot.



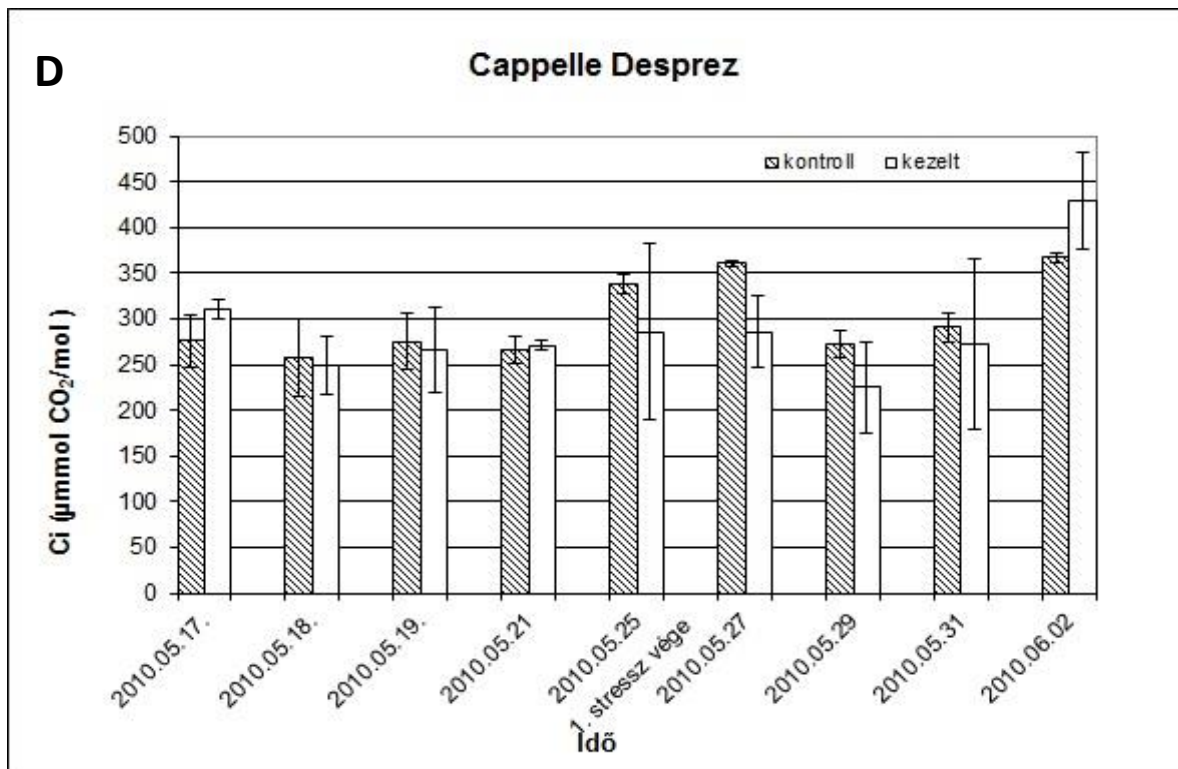
5A ábra: Intercelluláris CO_2 koncentráció (C_i) Plainsman V. fajtánál



5B ábra: Intercelluláris CO_2 koncentráció (C_i) Mv Emese fajtánál



5C ábra: Intercelluláris CO_2 koncentráció (C_i) Gk Élet fajtánál



5D ábra: Intercelluláris CO_2 koncentráció (C_i) Cappelle Desprez fajtánál

A diagramok alapján elmondható, hogy a Plainsman V toleráns fajta esetében a levél belső terében mért CO₂ koncentráció csökkenését figyelhettük meg az első stressz kezelés végén. Ezzel szemben a többi genotípusnál (cvs. Mv Emese, GK Élet, Cappelle Desprez) ez nem volt jellemző.

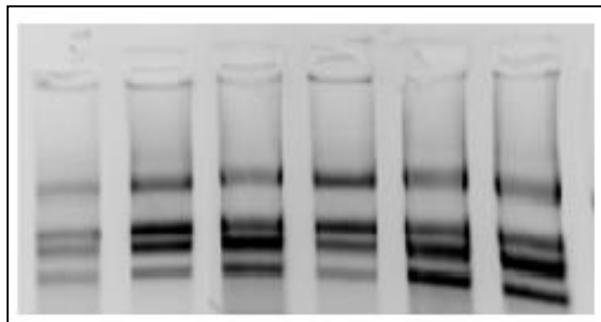
Ez az ellentét vélhetően a szárazság toleráns Plainsman V növények fenntartott fotoszintetikus aktivitásával magyarázható, amelyek így elhasználják a levél belső légterének szén-dioxidját. A vízmegvonás más mért paraméterei (a fotoszintetikus széndioxid asszimiláció, sztóma konduktancia, levél transzspiráció) nem mutattak szignifikáns, jellemző különbséget egyik fajta esetében sem (nem bemutatott adatok).

Kutatócsoportunk közreműködő partnerei a vizsgált növényeket részletes mikroszkópos vizsgálatoknak is alávetették (Deák *et al.* 2011). Azt találták, hogy a szenzitív fajtáknak alacsonyabb a sztómasűrűsége, a zászlós levelek kisebbek és így itt a leveleken szignifikánsan kevesebb sztóma volt található (össz sztómaszám/levél). Az össz sztómaszám/levél érték a szárazság toleráns Plainsman V fajtánál volt a legalacsonyabb, és a szenzitív Cappelle Desprez-ben pedig a legmagasabb. Ezek az adatok összefüggésbe hozhatóak a Ci érték ebben a fajtában megfigyelt változásával, bár a LiCor 6400 fotoszintézis mérő műszerrel kapott eredményeink a gázcsere nyílások hatékonyabb zárását és/vagy a magasabb fotoszintetikus aktivitást közvetlenül nem támasztották alá ebben a fajtában.

5.2. A szárazságtoleranciában feltételezhetően szerepet játszó gének vizsgálata

5.2.1. Szárazság stresszelt búza növényekből történő RNS izolálás

Az egyik 2011-es szárításos kísérlet során vett levelekből kinyert RNS-ek közül néhány agaróz gélen való futtatás eredményeit a **6. ábrán** láthatjuk. A minták nagy elemszáma és a hatékonyabb izolálás miatt több napra osztottuk a kivonást.



6. ábra: RNS minták jellemző gélképe. A bemutatott minták sorrendje a következő: Plainsman V 2. nap, Plainsman V 10. nap, Mv Emese 4. nap, Mv Emese 10. nap, Gk Élet 10. nap, Cappelle Desprez 6. nap, Plainsman V 6. nap

A fentiekben bemutatott ábra alapján az RNS intakt volt, ugyanakkor pontos mennyiségi meghatározásra és a különbségek korrigálására volt szükség. Az RNS koncentrációk mérését NanoDrop készülék segítségével végeztük el. Erre azért van szükség, hogy majd a cél génekkel folytatott kutatások során valóban az expresszióbeli különbségeket tudjuk detektálni és ne a cDNS-ek kiegyenlített koncentrációjából adódó eltéréseket.

A kinyert RNS-ekről mennyiségi meghatározáson túl, minőségi információhoz is jutunk a spektrofotometriás méréssel. Ezt a 260/280 nm-en illetve a 260/230 nm-en mért optikai denzitások (OD) arányával kapjuk. Tiszta RNS-nek tekinthető a minta, ha az OD érték 260/280 nm-en 1,9-2,1 értékhatárok között mozog (**5. táblázat**). Az előbbi esetben a fehérjékkel való szennyezettség mértékéről bizonyosodhatunk meg, míg utóbbinál a klorofill, szerves oldószer maradványok esetleges meglétéről. Főként a fehérjékkel való szennyezettségnek lehet jelentősége ennél a lépésnél. Mivel a fenti elvárásoknak eleget tettek a fenti kivonataink, így ezekkel folytathattuk a kísérleteket.

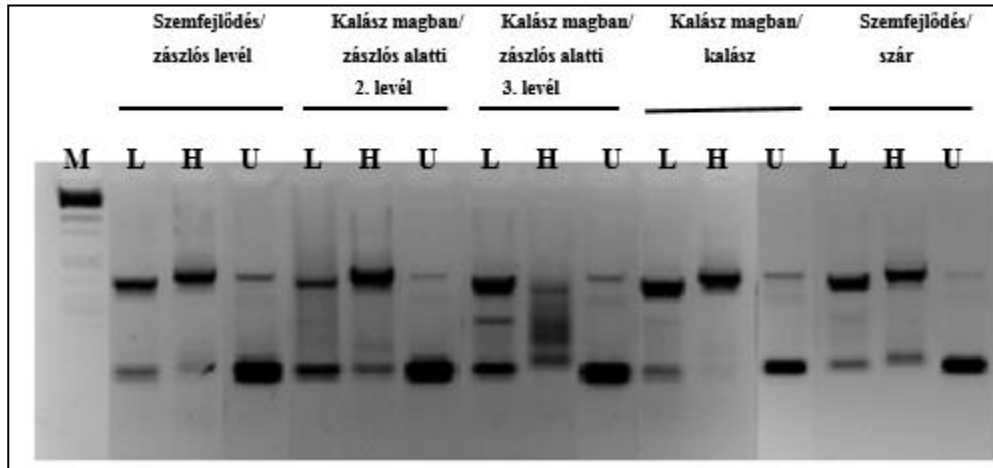
5. táblázat: A kivont RNS-ek mennyisége és OD adatainak aránya NanoDrop spektrofotométer alapján

Minták	ng/μl	260/280 nm
Plainsman V kontroll	2016,78	2,11
Plainsman V 2. nap	1180,7	2,11
Plainsman V 4. nap	1178,25	2,12
Plainsman V 6. nap	1708,59	2,1
Plainsman V 8. nap	650,87	2,02
Plainsman V 10. nap	1183,49	2,08
Plainsman V 12. nap	995,25	2,03
Mv Emese kontroll	677,32	2,1
Mv Emese 2. nap	2895,4	2,09
Mv Emese 4. nap	3663,55	1,91
Mv Emese 6. nap	655,73	1,97
Mv Emese 8. nap	423,84	2,06
Mv Emese 10. nap	1270,49	2,11
Mv Emese 12. nap	1218,26	2,09
Gk Élet kontroll	1090,98	2,1
Gk Élet 2. nap	973,48	2,11
Gk Élet 4. nap	2821,21	2,06
Gk Élet 6. nap	831,13	2,08
Gk Élet 8. nap	1143,05	2,16
Gk Élet 10. nap	1930,56	1,96
Cappelle D. kontroll	1357,87	2,1
Cappelle D. 2. nap	870,39	2,05
Cappelle D. 4. nap	287,93	1,97
Cappelle D. 6. nap	1286,15	2,12
Cappelle D. 8. nap	1602,16	2,07

5.2.2. Kontroll RT-PCR primerek alkalmazhatóságának tesztelése szárazságkezelt búzákbán

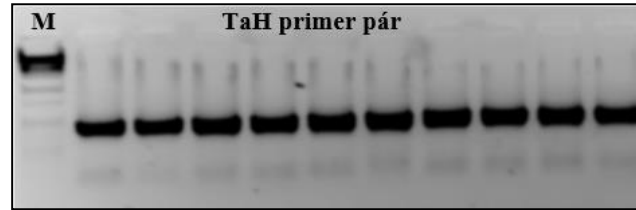
A célgénekkal folytatott hiteles génexpressziós vizsgálathoz olyan RT-PCR reakciók szükségesek, amelyek megbízhatóan amplifikálják az adott kontroll gén cDNS-ét, amely minden szövettájban, a környezeti tényezőktől függetlenül fejeződik ki. Ez lehetővé teszi az összehasonlítást azon génekkal szemben, melynek kifejeződési szintjére kíváncsiak vagyunk.

Ezen ún. konstitutív géneken használható indító szekvenciákhoz irodalmi adatok révén (Paolacci *et al.* 2009) jutottunk hozzá, s teszteltük azokat a búza mintáinkon. Az alábbi RT-PCR futtatás 40 ciklusszámmal történt, ahol több lehetséges kontroll primer alkalmazhatóságát teszteltük, melynek eredményét a **7. ábra** mutatja be:



7. ábra: Három féle lehetséges kontroll primerrel végzett RT-PCR a búza hajtás különböző szerveiből vételezett mintákon. Jelölések: L – TaL Ka, Kb; H – TaH Ka, Kb; U – ubiquitin R3, F3 primerpárok, marker (M sáv).

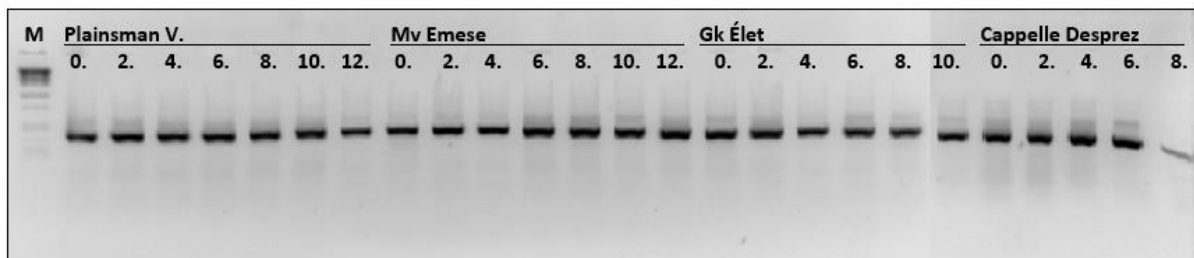
A fentiek alapján elmondható, hogy TaH (*H) primer bizonyult a legstabilabban amplifikáló szekvenciának, amely az irodalmi adatok szerint is jól felhasználható a későbbi cDNS kiegyenlítésre. Ezt más ilyen irányú kísérleteink is alátámasztották (**8. ábra**). A TaL (*L) primer pár is e gékép alapján megfelelőnek bizonyult a különböző szövetekben 40 ciklusszámmal. Ilyen magas ciklusszámmal azonban a cDNS koncentrációkban meglevő esetleges különbségek ellenére a termékek mennyiségei kiegyenlítődnek. Ezen kívül a szennyeződések, nem cél szekvencia felszaporításának a valószínűsége rendkívül megnő. Továbbá célunk volt olyan primer párra leszűkíteni a kört, amely alacsony ismétlésszám mellett is megbízhatóan amplifikál. Mivel ezen indító szekvencia kifejeződése alapvetően gyenge, így a ciklusszám csökkentése is hasonló eredményt szolgáltatott.



8. ábra: TaH primer pár tesztelése (ABA kezelt) búza mintákon, marker (M sáv).

5.3. Polimeráz-láncreakció TaH kontroll primer pár alkalmazásával szárazságkezelt mintákon

A génkifejeződési vizsgálatban az előző kísérletek alapján a TaH konstitutív génre specifikus primer párt alkalmaztuk azonos mennyiségű RNS-ből átitrt cDNS kiegyenlítésére, mely RT-PCR reakciók eredményét láthatjuk a **9. ábrán**.



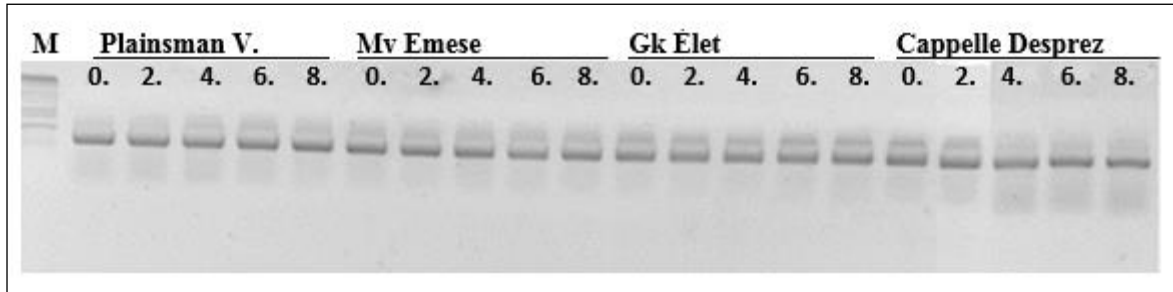
9. ábra: RT-PCR reakció TaH primerpárral 2011 évi, kétnaponta vett szárazságkezelt mintákon. Kontroll primerként a folyamatosan kifejeződő TaH génre specifikus primert választottuk (marker: M sáv).

A gélek alapján elmondhatjuk, hogy sikerült elkerülni a cDNS koncentráció különbségeiből adódó hibaforrást, ezért lehetőség nyílt a célgénnel való vizsgálatok megkezdésére.

5.4. Genomi DNS szennyezés ellenőrzése a cDNS mintákban

Az amplifikálandó mintákat célszerű megvizsgálni genomi DNS kontamináció szempontjából, mellyel kizárható, hogy a cDNS templát helyett genomi DNS amplifikálódjon a PCR során. A szűréshez olyan célszekvencia szükséges, amely intront kell, hogy tartalmazzon, amely az mRNS érése során kivágódik. E szakaszok szűrése erre a célra tervezett primerekkel végzendő, amely esetünkben a TaG primer pár volt (Ciaffi *et al.* 2006).

Mivel itt a genomi célszekvencia alapján várt termék 618 bp, a cDNS-ről képződő termék pedig 266 bp nagyságú, a gélen látható **(10. ábra)** fragmentek alapján így megállapítható volt, hogy a cDNS-ek mentesek voltak a gDNS-től, nem tartalmazták az intron szekvenciát.

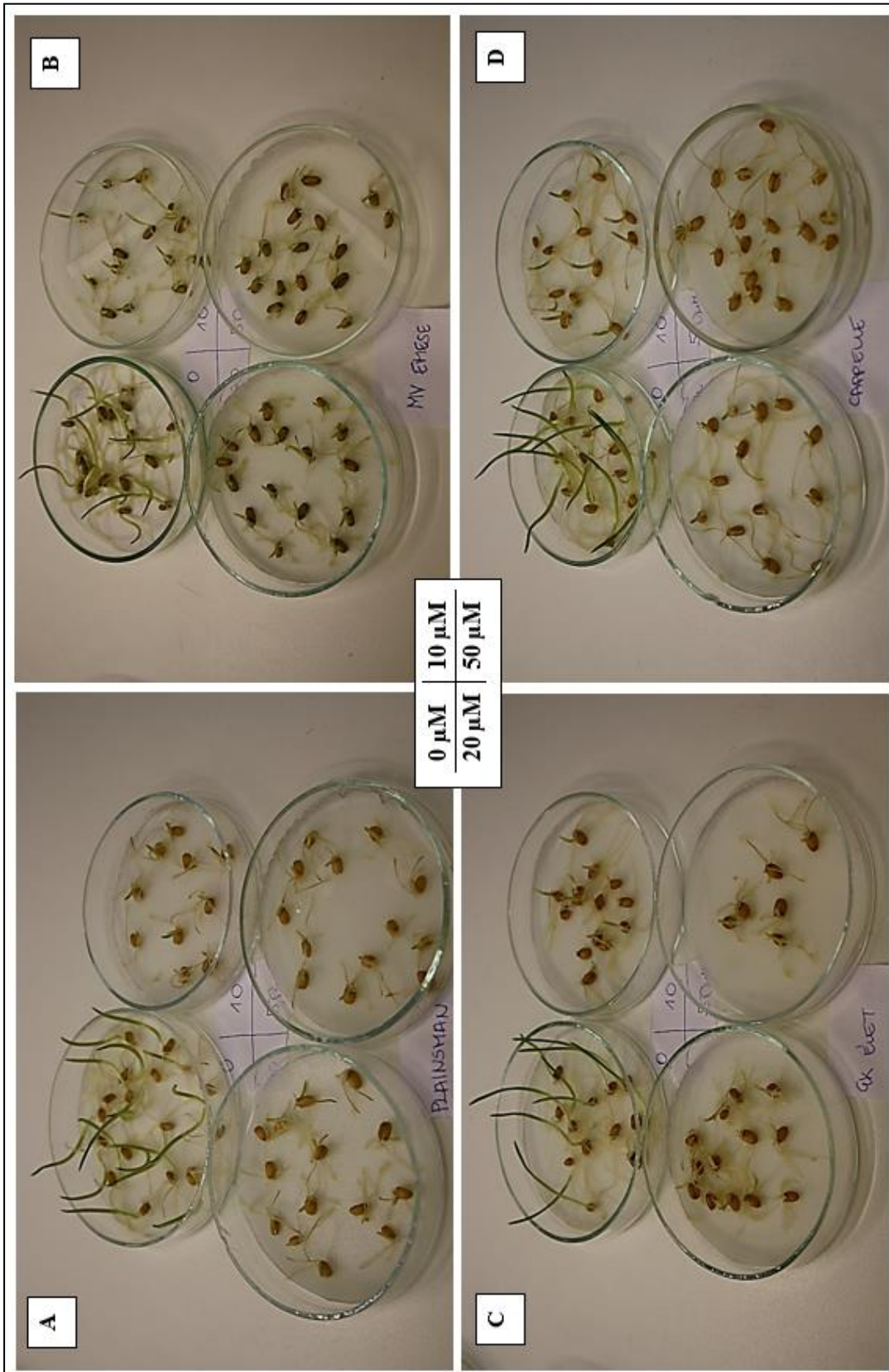


10. ábra: 2012 fitotron melletti szárított minták genomi DNS szűrése arra alkalmas primerekkel

A tesztelt minták 2012 évjáratú szárításos kísérletből származtak. Az itt kapott eredmény alapján, további kísérletek esetében **(pl. 5.8. fejezet, 26. ábra)** már nem végeztük el ismételten ezt a szűrést.

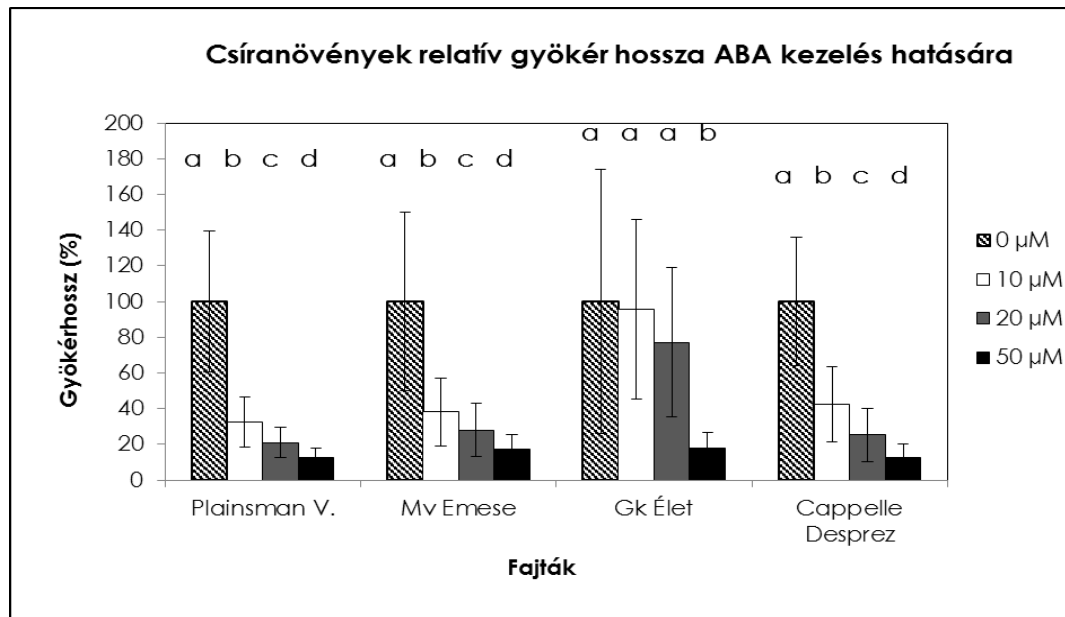
5.5. Csíranövények növekedésének vizsgálata eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokon

Az abszcizinsav több fontos szerepet is betölt a szárazságstresszre adott válaszokban; szabályozza a növény vízgazdálkodását a sztómazárás által illetve olyan géneket indukál, melyek a sejt dehidratációs toleranciájában részt vevő proteinek kódolnak (Guóth *et al.* 2010). A csíranövény gyökérhossz növekedés gátlás mérése egy egyszerű módja a külsőleg alkalmazott ABA iránti érzékenység jellemzésének (Thole *et al.* 2014). A vizsgálat eltérő hormon koncentrációjú vizes oldattal átitatott szűrőpapíron, Petri-csészékbe vetett magokkal történt. A kísérletet három ismétlésben végeztük, melyek közül egy jellemzőt a **11. ábrán** láthatunk:



11. ábra: A négy genotípus csíranövényeinek növekedése különböző ABA koncentrációk (0, 10, 20 és 50 μM , a Petri csészék a középén jelzett elrendezésben vannak). A fajták a következő sorrendben láthatóak a képeken: 'A': Plainsman V, 'B': Mv Emese, 'C': Gk Élet és 'D': Cappelle Desprez.

Ahhoz, hogy statisztikailag értékelhessük a látottakat, a gyökérhosszak lemérésére, és növekedésük összehasonlítására volt szükség (12. ábra).



12. ábra: A csíránövények gyökérhossz növekedésének vizsgálata desztillált vízben és különböző ABA (10, 20 és 50 µM) koncentrációjú oldatokon nevelve. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan eltérnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.

Az exogén ABA kezelésnél az alacsonyabb koncentrációknál figyelhettünk meg különbségeket. A Gk Élet fajta gyökérzete szignifikánsan kevésbé érzékeny a 10 és 20 µM ABA hormonkezelés növekedés visszatartó hatására, a többi genotípussal szemben. Hasonlóképpen viselkedtek a genotípusok az ismétlésként végzett további kísérletekben is. A két szárazság toleráns fajta és a Cappelle Desprez gyökérnövekedése alul maradt a Gk Élettel szemben az alacsony ABA koncentrációk esetén.

5.6. Búza csíránövények kezelése PEG-el

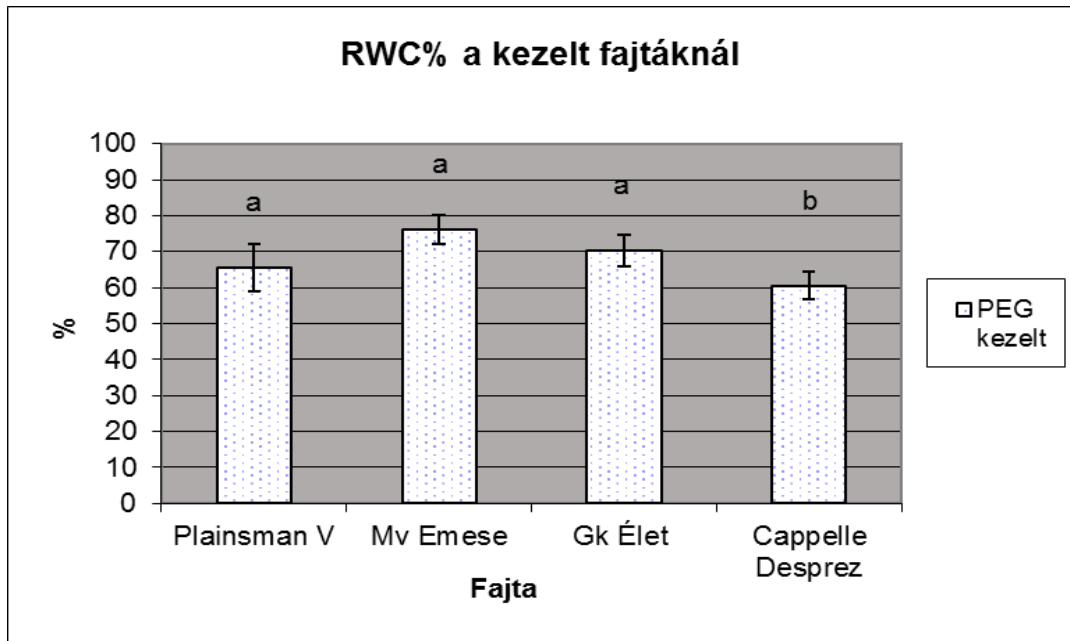
A vízhiány csökkenő vízpotenciált és ozmotikus stresszt eredményez a növényben, amely a metabolitok széles körét valamint fiziológiai és morfológiai válaszokat indukál, továbbá jelátvivők szintézisét is előidézi, mint például abszcizinsav (ABA) (Guóth *et al.* 2010).

A természetes környezeti tényezők közül az alacsony talaj víztartalom az ozmotikus stressz egyik legfőbb kiváltója a növényeknél, aminek ez az egyik legkárosabb hatása is egyben, amit a produktivitásra kifejt.

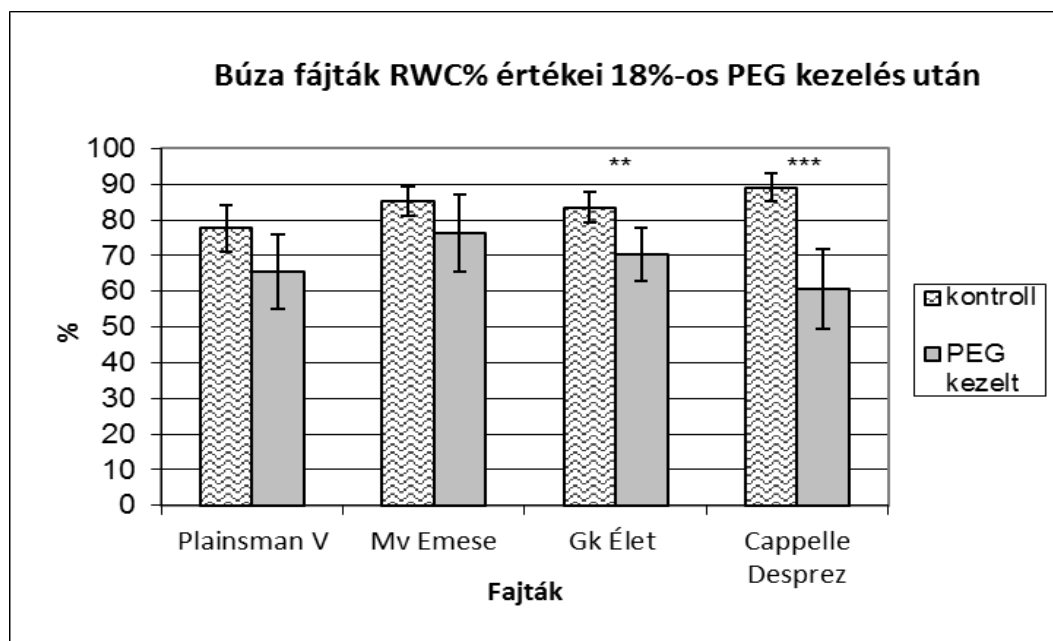
Az ozmotikus stressz tolerancia vizsgálatánál széles körben elterjedt módszer a csíranövények nevelése tápoldatban, nem toxikus ágenssel beállított alacsony ozmotikus potenciál mellett (például mannitol vagy polietilén glikol - PEG 6000), amelyet gyakran alkalmaznak gabonaféléknél is (Guóth *et al.* 2010). Habár ezt a tesztet sokan megbízhatónak tartják a szárazság toleráns növények ozmotikus stressztűrő képességének meghatározására, ez a kezelés a valódi vízhiánytól eltérő génexpressziós vagy fiziológiai változásokat is indukálhat (Guóth *et al.* 2010).

A polietilén-glikollal történő kezelés végén mért relatív víztartalom (RWC%) meghatározása megmutatja, hogy a vizsgált levélben a kontrollhoz és a többi fajtához képest milyen a víztartalom változása. Ezáltal következtethetünk arra, hogy az egyes genotípusok milyen mértékben képesek megtartani a vizet, ami szárazság stressz alatt szelekciós előnyt jelent. A szárazságtolerancia mértéke összefüggésben lehet, de nem feltétlenül egyezik meg az ozmotikus stresszre való érzékenységgel.

A várakozásunkkal ellentétben a genotípusok közül a Plainsman V toleráns fajtánál tapasztaltuk az egyik legalacsonyabb relatív víztartalmat 18%-os PEG kezelést követően (három biológiai ismétlést alapul véve, ebből egy jellemzőt mutatok be) **13. ábra**. A PEG kezelt növények relatív víztartalom értékeit külön ábra is szemlélteti (**14. ábra**). A legmagasabb RWC értéket a toleráns Mv Emese-nél figyelhetjük meg. Az érzékeny fajták esetében a Gk Élet magasabb RWC% szinteket mutatott a szenzitív Cappelle Desprez-hez viszonyítva.

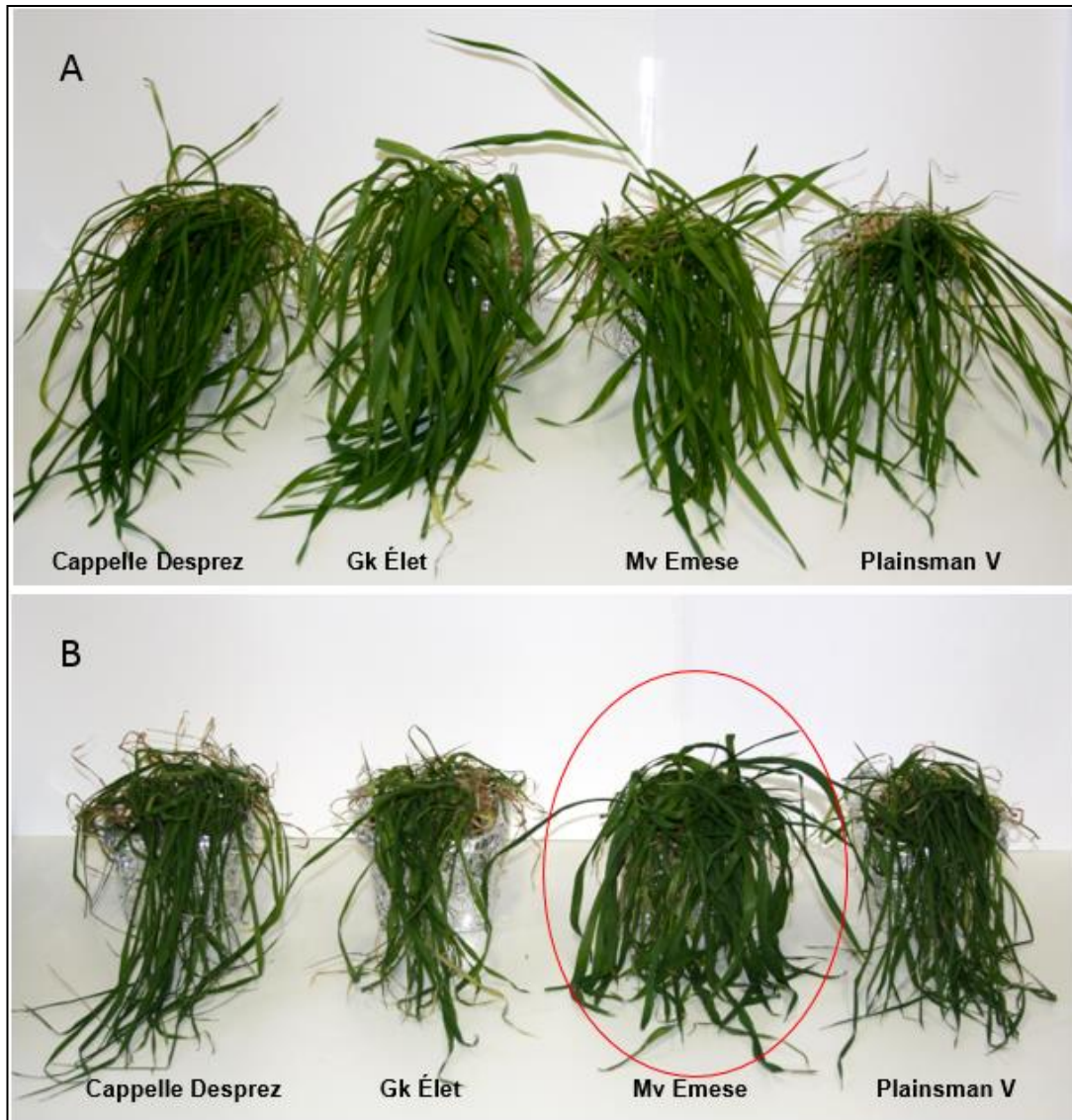


13. ábra: PEG kezelt búza zászlós levelek relatív víztartalom értékei százalékban kifejezve. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan eltérnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.



14. ábra: Relatív víztartalom értékei százalékban kifejezve kontroll körülmények között és ozmotikus stressz hatására (A kontroll és kezelt értékek különbsége ** Szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten, *** Szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten)

A kezelés során legmagasabb RWC% értékeket mutató Mv Emese-nél ezen túlmenően a tolerancia fenotípusos megnyilvánulását is tapasztalhattunk, ugyanis a legkevesebb elszáradt levéllel rendelkezett a többi genotípushoz képest, míg tipikusan a Plainsman levelei szenvedtek a legtöbb látható károsodást (**15. ábra**).



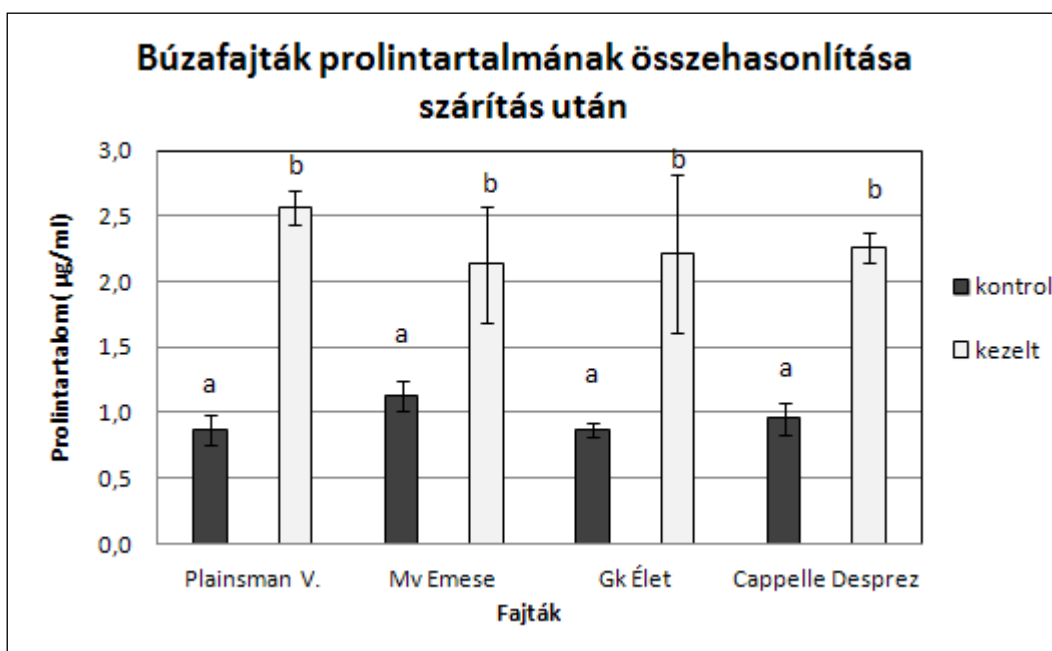
15 ábra: (A) Kontroll növények Hoagland-tápoldaton nevelve valamint (B) kezelt növények Hoagland + 18%-os PEG oldatban

5.7. Prolin tartalom meghatározása szárazságkezelt búzákbán

Ismeretes, hogy egyes ozmolitok megemelkedő bioszintézise kedvezően hat a szárazság stressz toleranciára sejtszinten. Ezek a felhalmozódó protektánsok, mint amilyen a

prolin is, ozmoregulátor hatásuk révén megakadályozzák a túlzott vízkiáramlást a sejtből (ami a növény deszikkációjához vezetne), valamint védhetik az enzimeket és membrán struktúrákat, és gyakran antioxidáns hatásúak is.

Ezekre az ismeretekre alapozva végeztünk prolin tartalom meghatározást a szárazságkezelt növényeknél. A prolinszint mindegyik fajtában szignifikánsan megemelkedett, azonban a kísérletek nem adtak olyan egyértelmű különbségeket, ami a fajták toleráns vagy szenzitív jellegét ezzel a bélyeggel magyarázhatta volna (**16. ábra**). Vélhetően más paraméterekben lelhető a magyarázat a genotípusok különböző szárazságstresszre való érzékenységére.



16. ábra: Prolin tartalom vizsgálata szárazság kezelt búzáknál. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan eltérnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.

5.8. A búza kutikuláris viaszok termelődését szabályozó *TaSHN1* gén vizsgálata

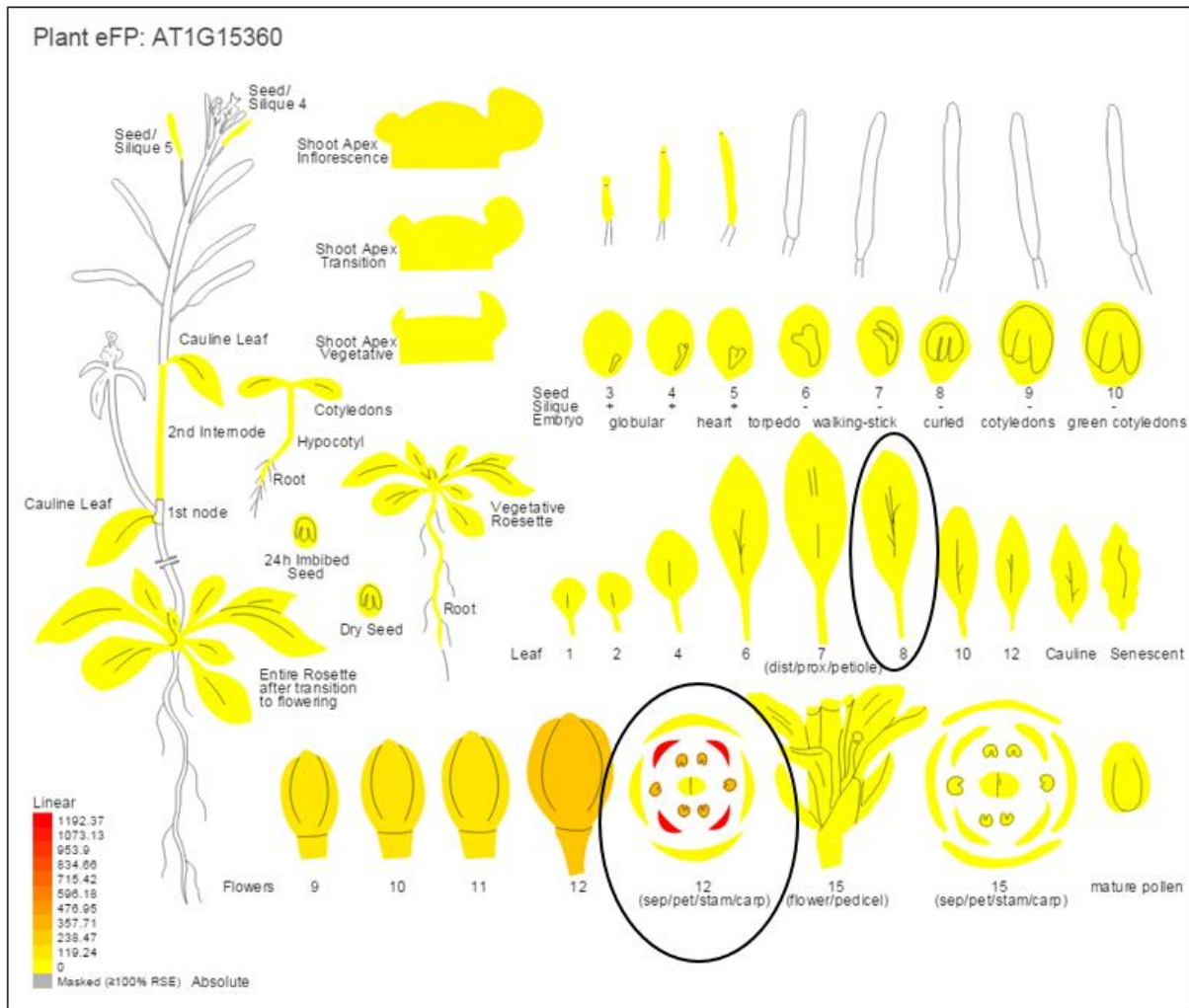
A sztómás transzspiráció mellett a kutikula is hozzájárul a növény vízvesztéséhez, különösen szárazság esetén. A búza levelekből történő totális vízvesztés csökkentésében a kutikula tekintélyes részt vállal fel száraz időszakban (Jäger *et al.* 2015).

A kutikuláris lipidek bioszintéziséért felelős gének még csak részben vannak azonosítva gabonafélékben, habár e folyamatok egyes transzkripcionális szabályozói funkcionálisan már ismertek lúdfűben (Jäger *et al.* 2015).

5.8.1. Az *Arabidopsis* WIN/SHN1 gén kifejeződésének elemzése bioinformatikai eszközökkel

A növénybiológiai kutatások terén széles körben elterjedt egy újszerűnek mondható program az ún. ePlant használata, amely *Arabidopsis*-al végzett nemzetközi szintű kutatások eredményeinek gyűjteménye. Szemlélteti a DNS szekvenciák, molekuláris struktúrák, fehérje interakciók és gén expressziós mintázatok közötti kapcsolatokat különböző vizualizációs eszközök útján lúdfűnél.

A program (<http://bar.utoronto.ca/~dev/eplant/>) segítségével megállapítható, hogy az *Arabidopsis* WIN/SHN1 génjének (At1g15360) szerv specifikus megnyilvánulása van, ami a virágban mutatja a legmagasabb expressziós szintet, szemben például a rozetta levéllel (**17. ábra**). A program a szervspecifikus EST szekvenciák elemzésén alapszik, a szervekből izolált és szekvenált cDNS fragmentumok azonosítása adja, és azok száma meg egy gén expressziós értékét az adott szervben és fenológiai fázisban.



17. ábra: Az *Arabidopsis* At1g15360 génjének szervspecifikus kifejeződése a virágban ePlant program alapján

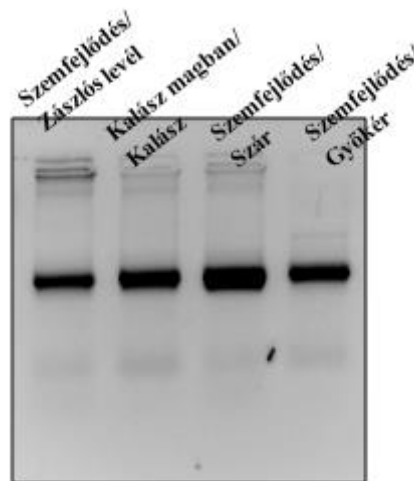
5.8.2. *TaSHN1* gén kifejeződésének vizsgálata a búza különböző szerveiben

A lúdfű régóta használt modellnövény a molekuláris biológia kutatások terén, főként a feltérképezett génállománya és a gyors reprodukciós képessége miatt. Az *Arabidopsis* génekhez való hasonlóságot felhasználva más fajokban, esetünkben búzában mint haszonnövényben is vizsgálódhatunk génszinten.

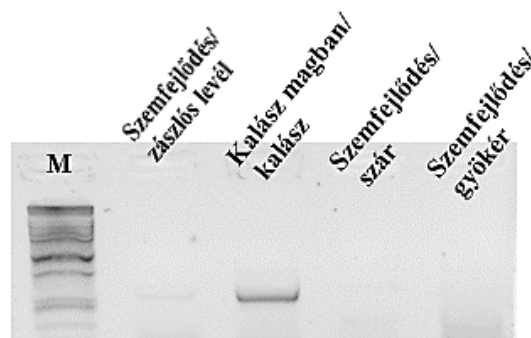
A fentiekre (6.8.1. fejezet) támaszkodva feltételeztük, hogy hasonló expressziós mintázatot fog produkálni a WIN/SHN1 gén búza megfelelője (*TaSHN1*). Ezért miután szekvencia homológia alapján BLAST program segítségével kiválasztottuk a búza adatbázisból a jelölt génünket (triDFLB: tplb0011g14), arra primereket terveztünk (buSWK1, buSWK2). Elsőként a kontroll primerrel kiegyenlítettük a búza különböző fejlődési

állapotaiban az adott szervből (szemfejlődés/ zászlós levél, kalász magban/ kalász, szemfejlődés/ szár, szemfejlődés/ gyökér) származó cDNS mintákat (**18. ábra**). Majd RT-PCR-t végeztünk a *TaSHN1* indító szekvenciákkal (**19. ábra**).

Mivel itt a célunk a szervenkénti megnyilvánulás tesztelése volt, így elegendőnek láttuk e minták polimeráz láncreakcióját elvégezni, a 'kalász magban/ zászlós levél alatti 2. levél' illetve 'kalász magban/ zászlós levél alatti 3. levél' mintákat kihagyva.



18. ábra: Kontroll primerrel való cDNS kiegyenlítés



19. ábra: A búza különböző fejlődési fázisaiban vizsgált *TaSHN1* gén expressziós mintázata. Marker (M sáv).

A gélképen jól látszik, hogy a szervek közül a kalászban nyilvánul meg a lúdfű *WIN/SHN1* kutikuláris viaszokat szabályozó gén búza homológja (*TaSHN1*) a 'kalász magban' fejlődési állapotban.

Tehát elmondható, hogy a feltevésünk helytálló volt, az *Arabidopsis*-al homológ búza gén szintén főleg a virágzatban fejeződik ki, ami azt valószínűsíti, hogy ortológ, azaz hasonló funkcióval rendelkezik, mint a lúdfűnél.

5.8.3. Az *Arabidopsis* WIN/SHN1 génnel homológ búza TaSHN1 gén kiválasztása és jellemzése

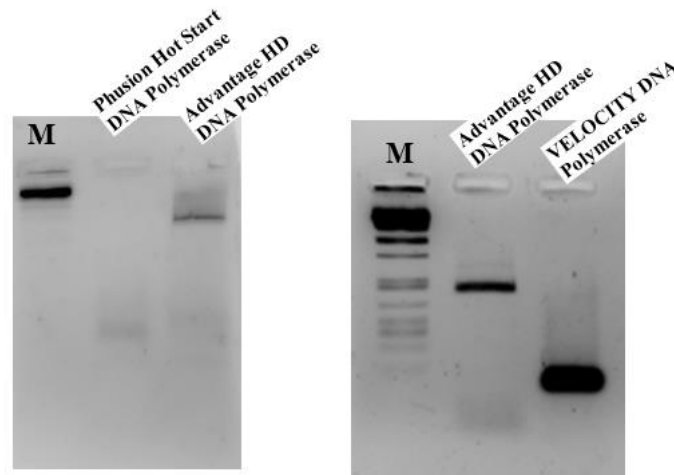
A kutatócsoportunk célja a búza kutikula kialakulás potenciális szabályozójának meghatározása és jellemzése volt a transzkripciós faktorok WIN/SHN családjának tagjai között. (Jäger *et al.* 2015).

Ahhoz, hogy egy adott gén organizmusban betöltött szerepére fényt deríthessünk, kiváló módszer a célgénnel való transzformálás, azaz vektorokba (például plazmidba) történő klónozás, majd a szekvencia T-DNS révén való bejuttatása az adott növényi szervezetbe. Ehhez elsőként izolálni kell a vizsgálni kívánt gént.

A gén kódoló szekvenciáját cDNS templát alapján, RT-PCR segítségével terveztük klónozni. RNS kivonásához *in vitro* nevelt búza csíranövényekről szedett mintákat használtuk fel, mivel a kutatásaink ebben az időszakában adatok a gén kifejeződéséről fitotronból származó növényi minták esetén még nem álltak rendelkezésünkre, ezekben a növényekben viszont már kimutattuk a gén megnyilvánulását. A vizsgált fajták közül az Mv Emese genotípust használtuk, ugyanis a gén expressziója itt volt az egyik legerősebb (nem bemutatott adatok).

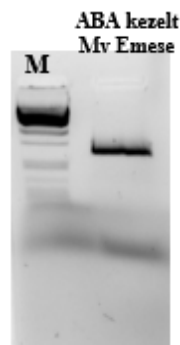
A génilólásnál az egyik kulcsfontosságú lépés a PCR amplifikáláshoz a megfelelő, hatékony és szekvencia hű polimeráz enzim kiválasztása, amely alapkövetelmény a célgén pontos felszaporításához. Ehhez több polimeráz enzimet kellett kipróbálnunk, hogy az optimálist felhasználva majd kinyerhessük a klónozendó génünket

Az alábbi gélképeken (**20. ábra**) a három enzimmel való RT-PCR eredményét láthatjuk. Az itt használt enzimek precízebb polimerizációt végeznek, mint a hagyományos polimerázok.



20. ábra: Szekvencia hű polimeráz enzimekkel végzett RT-PCR eredménye *in vitro* nevelt Mv Emese csíranövények cDNS mintáin. Marker (M sáv).

Amint azt láthatjuk, az Advantage HD DNA Polymerase enzimmel való RT-PCR adott a várt méretű amplifikátumot a célgénről (684bp). A másik két esetben a Phusion Hot Start DNA Polymerase-al való felszaporítás nem adott terméket, míg a VELOCITY DNA Polymerase estében erős primer dimer képződést tapasztalhattunk. Így az utóbbit elvetve, az előbbit megtartva, az Advantage HD DNA Polymerase enzimmel folytattuk tovább kísérletünket. A gén RT-PCR-el való felszaporítása (**21. ábra**) majd annak a gélelektroforézisét követően, a termék gélből való visszaizolálása volt soron az illustra GFX PCR DNA a Gel Band Purification Kit-el (GE Healthcare).



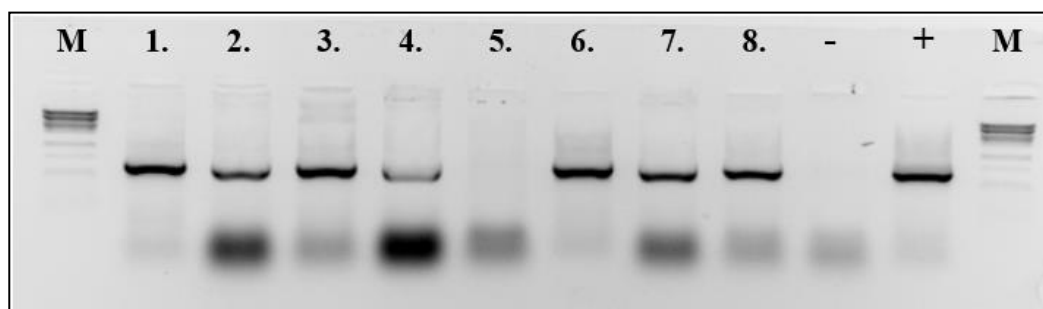
21. ábra: A *TaSHN1* célgén Advantage HD DNA Polymerase enzimmel való RT-PCR gélképe Mv Emese mintánál, marker (M sáv).

A sikeres visszaizolálást követően a *TaSHNI* célgén ligálása plazmidba majd annak transzformálása *Escherichia coli* baktériumba történt.

5.8.4. DNS fragment izolálása agaróz gélből, klónozás

A 1,5%-os agaróz gélen megfuttatott *TaSHNI* specifikus RT-PCR termékeket az Illustra GFX PCR DNA és Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) segítségével, a gyártó által javasolt protokollt alkalmazva izoláltuk. Az így kinyert DNS fragmentumokat BamHI és EcoRI enzimek segítségével pKSII vektorba (Stratagene) klónoztuk, majd a klónok szekvenálásával (Biomi Kft, Gödöllő) megbizonyosodtunk arról, hogy a felszaporított termék valóban a kívánt szekvenciát tartalmazta-e. A klónozni kívánt DNS szakasz restriktions emésztését, ligálását pBluescript II KS vektorba (Stratagene) és a bakteriális transzformációt standard módszerekkel végeztük (Sambrook *et al.* 1989).

Ezt követően a *TaSHNI*-el transzformált baktérium telepekkel folytatott kolónia PCR következett. Ennek révén további bizonyosságot nyerhettünk – az antibiotikum rezisztencia elvén alapuló és kék/fehér szelekción kívül - azon telepekről, amelyek hordozzák a plazmidba épített célgént. Ennek eredményét a **22. ábra** mutatja be. A futtatás során érdemes pozitív és negatív kontrollokat használni a reakció tisztaságának ellenőrzése végett.



22. ábra: Az antibiotikus rezisztenciát hordozó fehér színű baktérium telepekkel végzett kolónia RT-PCR gélképe. A számokkal jelzett sávok (1-8.) az egyes telepeket, a '-' jelzésű negatív, míg a '+' jelzésű a pozitív kontrollokat jelentik. Marker (M sáv).

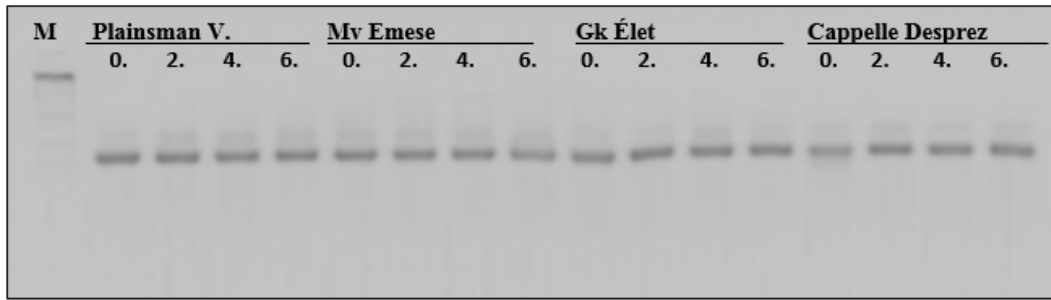
A fenti gélkép alapján elmondható, hogy az 5. klón kivételével a baktérium telepek tartalmazzák a vizsgálni kívánt gént. Azért, hogy meggyőződjünk a klónozott amplifikátum bázissorrendjéről, hogy az valóban egyezik-e a célgénével, 3 klónból tisztított plazmid DNS-t elküldtünk szekvencia meghatározásra a BIOMI Kft-nek (Gödöllő).

A kapott szekvenálási eredmények alapján valóban a célgént sikerült klónoznunk, amit ezután *TaSHN1* géneként vittük tovább. Ezután következett a *TaSHN1* gén bevitele *Agrobacterium tumefaciens* segítségével *Arabidopsis cv Columbia*-ba vákuum infiltrációs módszerrel (Jäger *et al.* 2015). A transzformáció során olyan lúdfű növényeket sikerült kapnunk, melyek tartalmazták a transzgént, a búza kutikula fejlődést szabályozó *TaSHN1*-et.

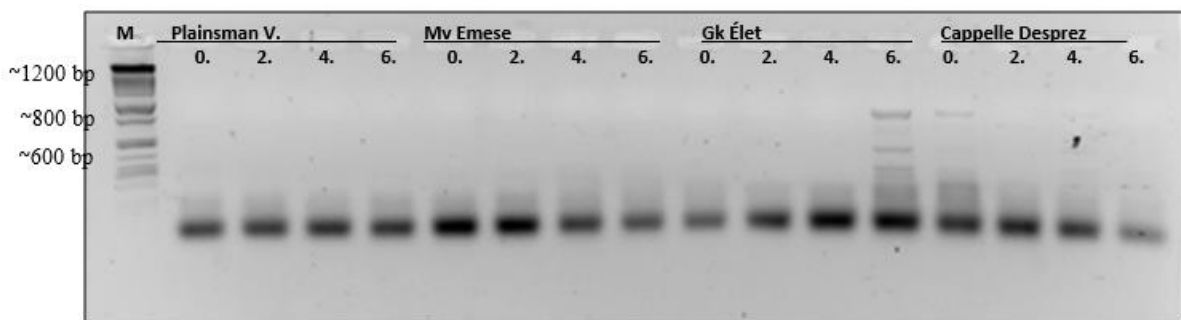
5.8.5. A TaSHN1 génnel való transzformáció eredménye Arabidopsis-ban és a gén kifejeződésének további tesztelése vízhiányos búzákon

Tanszéki munkatársaim valamint Jäger Katalin és kutatócsoportja (MTA ATK Mezőgazdasági Intézet) megfigyelték, hogy a búza kutikuláris szabályozógén homológ *TaSHN1*-el transzformált *Arabidopsis*-ok levele csillogó, fényes lett, a kutikula áteresztőképességét valamint annak ultrastruktúráját a transzgén megváltoztatta. A gén kifejezése a sztómaszám/levél mennyiségét mérsékelten csökkentette a vad típushoz képest, a lúdfű szárazságtűrését pedig nem növelte (Jäger *et al.* 2015).

Mivel tanulmányaim fő irányvonala a búza szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó gének kutatása, így kézenfekvő volt, hogy a szárazságstresszelt búza növényekben is teszteljük az *Arabidopsis* WIN/SHN1-el homológ búza gént. A gént (a korábban kalászban kimutatott expresszió mellett) munkatársaim a fejlődésben levő búza levélhüvelyi régióiban találták kifejeződni. Kíváncsiak voltunk, hogy a kalászban és levélhüvelyben való kifejeződésén kívül, esetlegesen megnyilvánul-e a szárazságkezelt búza levéllemez mintáinkban is, ahol eredményeink szerint a felszíni viaszok termelése fokozódott (Jäger *et al.* 2014). *TaSHN1* specifikus primereinkkel tehát RT-PCR-t végeztünk, először a mintáinkból nyert cDNS kiegyenlítését végeztük el (**23. ábra**), majd azok célgénnel való RT-PCR-je következett, aminek eredményét (**24. ábra**) szemlélteti.



23. ábra: PCR reakció TaH primerpárral (2012 a/ kísérlet) kétnaponta vett szárazságkezelt mintákon. Marker (M sáv).



24. ábra: TaSHN1 gén primereivel (buSWk1 és buSWk2) végzett RT-PCR reakció gélképe szárított mintákon (2012 a/ kísérlet). Marker (M sáv).

A kísérlet során 618 bp hosszúságú génszakaszt várunk, amely a fent látott **24. ábrán** nem detektálható. Mindkét szárítási kísérlet esetében a gélképek „üresnek” mondhatóak, vagyis a gén nem nyilvánult meg fokozottan a vízvesztés hatására (sőt két minta kivételével egyáltalán nem). Mivel a szárazságkezelt növények mindegyikén munkatársaim egyértelműen kimutatták a viaszoltság növekedését, feltételezhetjük, hogy azért más, a *TaSHN1* géntől különböző szabályozó gén lehet felelős. Lúdfüben is a *WIN/SHN1* gén mellett a géncsaládnak további két tagja működik átfedő funkciókkal, de eltérő kifejeződési mintázatot mutatva, valamint számos további TF is szabályozhatja a stressz kiváltotta viaszosodást (Jäger *et al.* 2014).

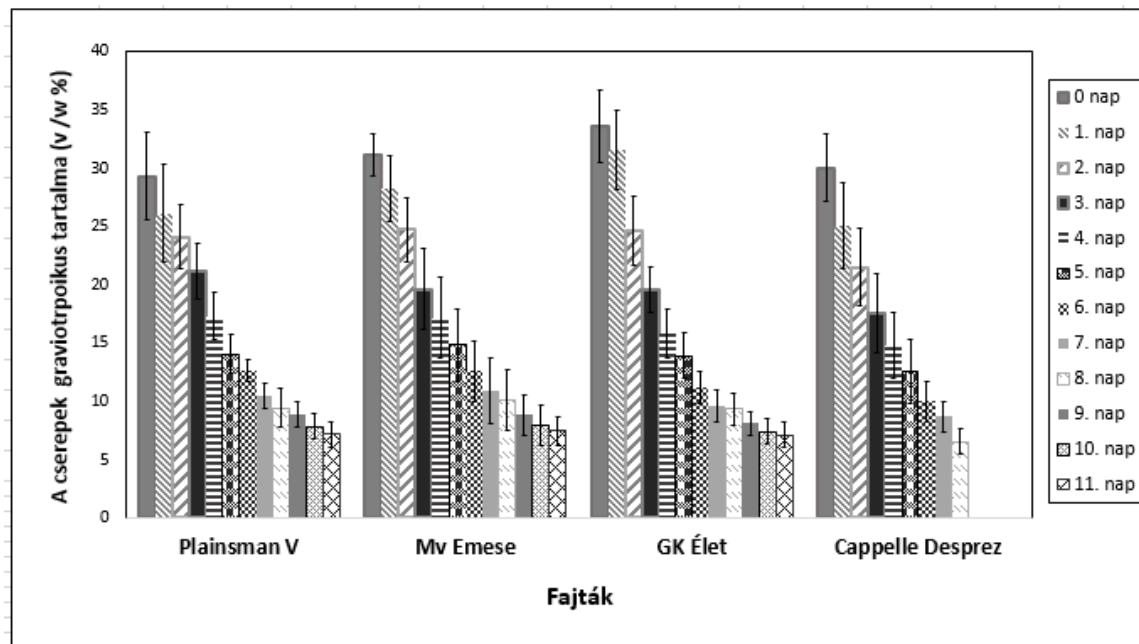
5.9. A szárazságstressz alatt kifejeződő szabályozó és effektor gének vizsgálata

Néhány gént már gabonafélékben is meghatároztak, amelyek specifikusan részt vesznek a vízhiányos stresszre adott válaszokban. Ezek között vannak a DHN fehérjét kódoló gének. E géncsalád a *LEA* génekhez tartozik, amelyeknek expressziója „felszabályozott” a

mag érésekor az embrióban, valamint egyes stresszhatások alatt. A dehidrin fehérjék felhalmozódása és a stresszekre való tolerancia - beleértve dehidratációt - között kapcsolat mutatkozott néhány faj esetében, mint amilyen a napraforgó, az árpa vagy a búza (Rampino *et al.* 2006).

A következőkben bemutatott kísérleteink arra irányultak, hogy az irodalmi adatok alapján szárazságstressz alatt búzában feltehetőleg megnyilvánuló gének kifejeződése miként változik a vízhiányos periódus alatt. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az esetleges változások összefüggésbe hozhatók-e a fajta szárazságtűrésének fokával, illetve a dehidrin gének és a CBF transzkripciós faktorok kifejeződése között van-e összefüggés.

25. ábra: A cserepek gravimetrikus víztartalma (v/w %, GWC) szárazság stressz alatt 11



napon keresztül, 2011 a/ szárításos kísérlet (Jäger Katalin, 2011 személyes közlés)

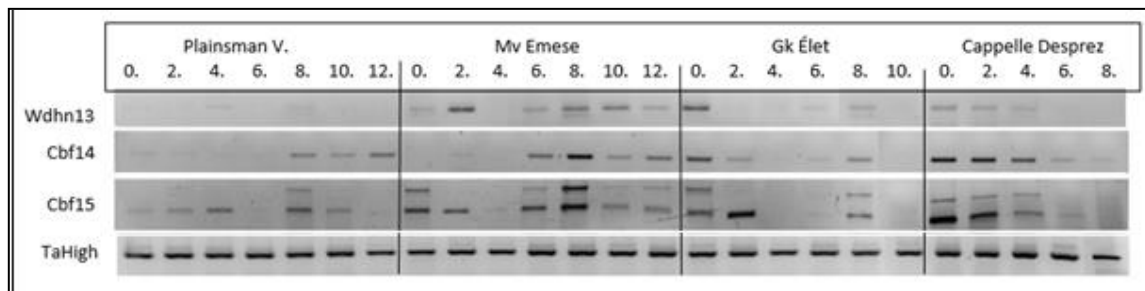
Vízmegvonásos kísérletről lévén szó, egyik kulcsfontosságú szempont volt, hogy a génexpressziós vizsgálatokat jól meghatározott szintű talaj víztartalommal rendelkező növényanyaggal végezzük. Ehhez gravimetriás mérést végzett a kutatócsoportunk. A vízmegvonás addig történt a genotípusoknál, míg az egyes cserepek talaj víztartalma nem mutatott 10%-os GWC értéket (**25. ábra**).

A dehidrin géncsalád számos, az abiotikus stresszben expresszáldó gént ölel fel. Erre vonatkozó irodalmi adatok széles köre állt rendelkezésünkre az adott gének kiválasztásának

tekintetében. Kutatásainkat több ilyen szekvenciával kezdtük, amelyekben többek között a DHN5, LEA2, LEA3 gének is szerepeltek Ezek RT-PCR termékeit azonban nem tudtuk a megfelelő biztonsággal, reprodukálhatóan amplifikálni a mintáinkból. Ekkor a géncsalád további tagjait is bevontuk a vizsgálatokba, amelyek így végül eredménnyel szolgáltak a számunkra.

Kísérleteinkben transzkripció faktorokat, nevezetesen a CBF-eket (C-repeat binding factor) is vizsgáltunk, ugyanis e gének expresszióját a dehidrin gén indukciójához kapcsolják például a *Brachypodium distachyon* szárazság tolerancia válaszában (Ryu *et al.* 2014).

A búzával való szárításos kísérlet két egymást követő évben történt, évenként két biológiai ismétlésben. Ezek közül a 2011-es évjárat egyik kísérleti eredményei kerülnek bemutatásra, melyet az **26. ábra** szemléltet.



26. ábra: RT-PCR eredménye kétnaponta történő mintavételezéssel a négy genotípusnál, 2011a/ kísérletben szárított mintákon.

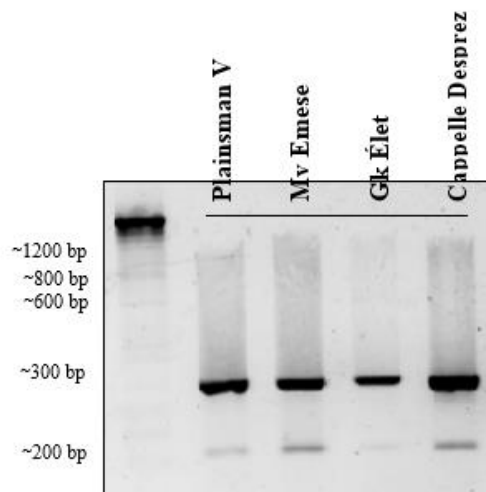
A *Cbf14*, *Cbf15* és a *Wdhn13* gének az Mv Emesénél indukálódtak és kifejeződésük kisebb volt Plainsman V és Gk Élet esetében a szárításos kezelés késői fázisában (6-8 naptól). A *Wdhn13* alig detektálható Plainsman V-nél és az Mv Emesénél szintén alacsony szinten fejeződik ki (**26. ábra**). Az mRNS mennyiségben csökkenés figyelhető meg mindegyik génnél a Cappelle Desprez esetében. A *Cbf14*, *Cbf15* és *Wdhn13* gén expressziós változásaiban jelentős, de nem szigorú párhuzamot vélhetünk felfedezni. A *Cbf14*, *Cbf15* és a *Wdhn13* PCR fragmetumok azonosítása érdekében, azokat izoláltuk gélből és elküldtük szekvencia meghatározásra, amelyek igazolták, hogy a kívánt géneket amplifikáltuk.

Kísérleteink megmutatták, hogy a *Wdhn13*, *Cbf14* és *Cbf15* nagy vonalakban koordinált indukciója történik vízmegvonás alatt, ami az Mv Emese fajtában a legerőteljesebb. Ez az expresszió úgy tűnik, hogy két fázisú; a kezdeti kifejeződés után, majd a teljes vízmegvonás után kb. egy héttel fejeződnek ki újra a gének.

Ahhoz, hogy teljes bizonyosságot nyerjünk az előbbieken bemutatott RT-PCR-el kapott génexpressziós mintázatról, mindenképpen szükség van annak valós idejű PCR-el való megismétlésére. Ennek a nagy volumenű vizsgálatnak az elvégzését a doktori képzésem ideje alatt nem állt módombam elvégezni.

5.10. Nem stresszelt, fiatal búza növényeken végzett expressziós vizsgálat a szárazság stressz válaszában vélhetően szerepet játszó génekkel

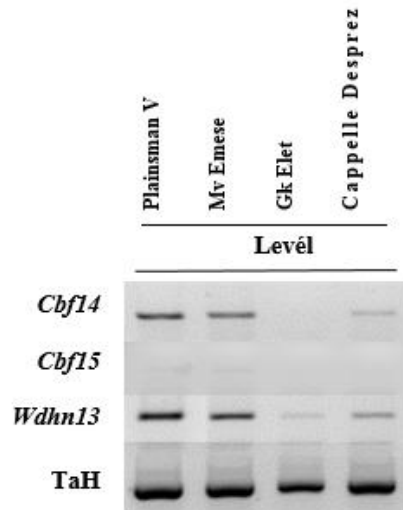
Rorat és munkatársainak (2006) megfigyelései szerint öt *Solanaceae* faj és árpa fiatal, fejlődő leveleire magas dehidrin fehérje szint volt jellemző stressz hiányában is. Ez felvetette számunkra azt a kérdést, hogy vajon stresszmentes körülmények között búza esetében is történik-e *DHN* expresszió, esetleg ko-expresszió a *DHN* és/ vagy *Cbf* gének esetében. Elsőként, hogy meggyőződjünk a minták tisztaságáról, genomi DNS szűrést végeztünk, melynek gélképét az **27. ábra** mutatja.



27. ábra: Genomi DNS szűrése csíranövényekből származó cDNS mintákon

A mintákon a genomi DNS-ből származó PCR termék nem jelentkezett. Miután sikeresen kizártuk a cDNS minták genomi szennyezettségét, hozzáfoghattunk a célgének expressziós vizsgálatához.

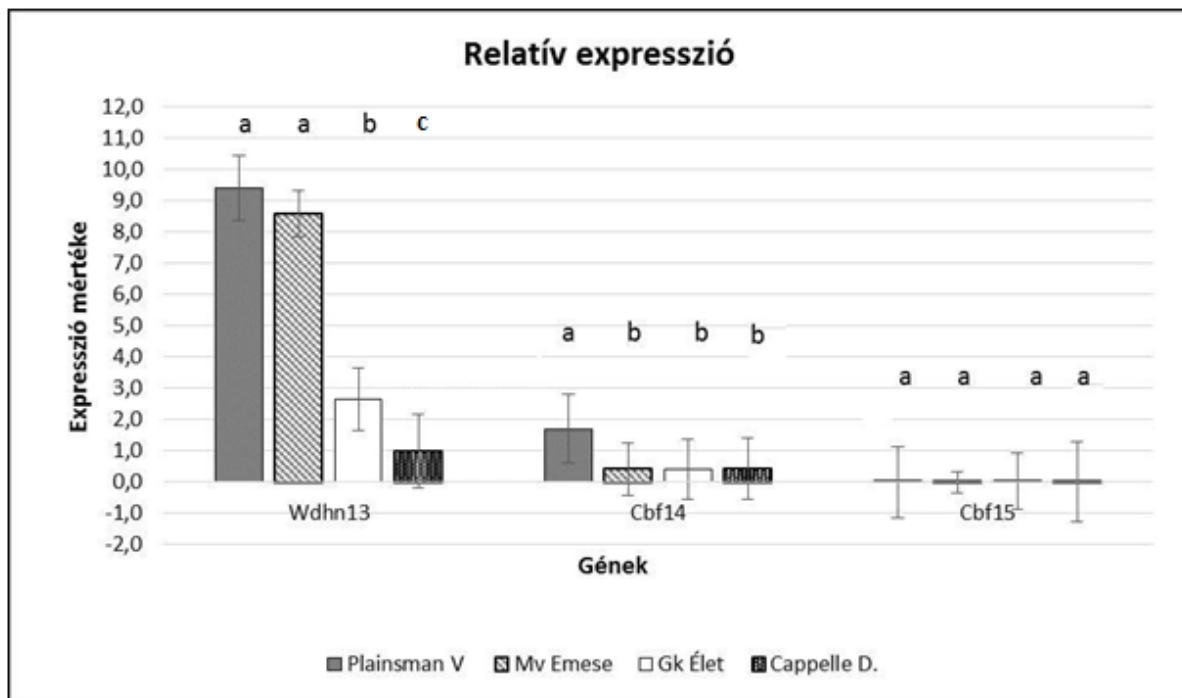
Ahhoz, hogy elkerüljük a stresszfaktorok fellépését a kísérletünk során, a csíranövényeket vízzel jól ellátott feltételek között neveltük. A génkifejeződés érdekében RT-PCR-t végeztünk, melynek eredményét az **28. ábra** mutatja be.



28. ábra: Csíranövényeken végzett génexpressziós vizsgálat

A csíranövényekben a *Cbf14* expresszáldott, a *Cbf15* nem, ami nem várt eredmény volt a felnőtt, szárazság stresszelt növényeknél megfigyelt génkifejeződés ismeretében. Hideg stressz esetében szintén megfigyelték, hogy ez a két *Cbf* gén különbözőképpen szabályozódott (Knox *et al.* 2008). A fenti eredményeink azt sugallják, hogy a két gént különböző mechanizmusok szabályozhatják szárazság stressz alatt is. Ezzel egybevé, hogy nem bemutatott eredményeink szerint ABA kezelés hatására búza növényekben a *Cbf14* expresszáldik, míg a *Cbf15* nem. Lehetséges, hogy a stresszhormon szint kismértékű ingadozásai indukálják a *Cbf14* és a *Wdhn13* expresszióját a fiatal növényekben. Kísérletünk kapcsolatot mutat a *Cbf14* és *Wdhn13* expressziója között.

A kísérletet megismételtük real-time PCR-el is, hogy megbizonyosodjunk a tapasztalt génkifejezések mennyiségi viszonyait illetően, és hogy a szemi kvantitatív RT-PCR eredményeink valóságát általában bizonyítani tudjuk (**29. ábra**).



29. ábra: Csíranövényeken végzett qPCR eredménye. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikánsan eltérnek egymástól $p < 0,05$ valószínűségi szinten.

A qPCR-el kapott eredmények nagyrészt alátámasztják az RT-PCR-nél látott expressziós mintázatot (29. ábra). A legmagasabb expressziós szintet a *Wdhn13* és *Cbf14* gének esetében a toleráns genotípusoknál láthatjuk (Plainsman V, Mv Emese), szemben a *Cbf15*-el, ahol genotípustól függetlenül alacsony marad a kifejeződés. A qPCR eredményeket számszerűsítve elmondható, hogy a Plainsman V esetében a *Wdhn13* kifejeződése 9x-es, míg az Mv Emesénél ez 8,5x-os a másik két fajtaéhoz képest (Gk Élet, Cappelle Desprez).

A *Wdhn13* és a *Cbf14* koexpresszióját tekintve elmondható, hogy bár kifejeződési szintjük között vannak különbségek, viszont a *Cbf15* standard 0 érték körüli megnyilvánulását alapul véve, a *Cbf14* kifejeződési szintje mégis jelentősnek mondható.

5.11. ÚJ EREDMÉNYEK

- Kimutattuk, hogy a Plainsman V fajta zászlós leveleiben vízhiányos stressz hatására a CO₂ koncentráció a vizsgált többi fajtánál erőteljesebben csökkent.
- Sikerült megbízhatóan működő kontroll géneket azonosítani búza RT-PCR és qPCR kísérletekhez, továbbá olyan genomi szennyeződés vizsgálatához alkalmas primerpárt alkalmaztunk, mellyel szűrhető a genomi DNS kontamináció búza cDNS mintákban.
- Teljes vízmegvonás alatt a *Wdhn13* dehidrin és a *Cbf14* és *Cbf15* transzkripciós faktor gének nagy vonalakban koordinált indukciója történt, ami az Mv Emese fajtában volt a legerőteljesebb. A génexpresszió két fázisú volt, a kezdeti kifejeződés után a gének kb egy héttel ismét megnyilvánultak. A *Wdhn13* gén expressziója nem stresszelt csíranövények levelében a toleráns fajtákra (Plainsman V, Mv Emese) volt jellemző. A *Cbf15* gén megnyilvánulása egyik fajta csíranövényeiben sem volt tapasztalható stresszmentes körülmények között.
- *in silico* azonosítottuk és klónoztuk a kutikula fejlődésért felelős *Arabidopsis* *WIN/SHN1* transzkripciós faktorra ortológ búza gént, és annak szervek szerinti kifejeződési mintázatát búzában meghatároztuk. További eredményeink szerint a gén a vízhiányos stressz hatására nem lépett működésbe egyik genotípus zászlós levelének középső régiójában sem.
- A vizsgált toleráns és érzékeny búza genotípusok között, gyökérnövekedés gátlás hatáson alapulva, az Élet fajta abszcizinsavra való relatív érzéketlenségét állapítottuk meg.

6. KÖVETKEZETÉSEK

6.1. Vízhiány hatása a gázcserére

A vízhiány hatásának nyomon követésével a gázcsere paraméterek műszeres mérése, azon belül is a zászlós levél belső szén-dioxid (C_i) tartalmának vizsgálata információt nyújthat a fajták fotoszintetikus folyamatairól, így támpontot adhat az esetleges különbségek eredetéről. Vízhiányos körülmények között jellemzően a sztómák részlegesen vagy teljesen bezáródnak, de a fotoszintetikus szén-dioxid fixáció (kezdetben gyakran alig csökkenő intenzitással) folytatódik, ami a C_i csökkenését okozhatja. Ennek az értéknek a további növekedése akkor fordulhat elő, ha a fotoszintézis intenzitása a stresszhatás miatt már erősen lecsökken, a légzés azonban változatlanul erős. Azt a pontot, ahol szárazságstressz esetén a C_i elkezd növekedni, hívják C_i inflexiós pontnak. A fentieket összegezve tehát megállapítható, hogy ez a pont a szárazság rezisztencia fokának jelzőjeként szolgálhat. Így, ha minél később jelentkezik a C_i inflexiós pontja, abból arra következtethetünk, hogy az adott fajta fotoszintetikus folyamatai jobban tolerálják a vízhiányos időszakot (Fábián *et al.* 2013).

Az általunk vizsgált fajták közül a Plainsman V esetében figyeltünk meg C_i értékének csökkenését az első vízmegvonásos kezelés végén. Ezt az eredményt támasztják alá a Fábián és munkatársai (2013) valamint Paul és munkatársai (2016) által végzett kísérletek is, amelyben vízhiánynak tettek ki általunk is vizsgált búza fajtákat. A szárazságérzékeny Cappelle Desprezt fajta tekintetében saját adataink illetve Fábián *et al.* (2013) eredményei között eltérés figyelhető meg, ugyanis ebben a genotípusban kísérleteink során mi nem detektáltunk csökkenést a C_i értékekben. Fábián és munkatársai több fejlődési állapoton (meiózis, virágzás, magfejlődés korai szakasza) keresztül alkalmaztak szárazságstressz kezelést. Ezek közül a meiózis és a virágzás során volt megfigyelhető eltérés a két genotípus között, azaz a Plainsman V C_i inflexiós pontja később jelentkezett, mint a Cappelle Desprez esetében. A mi kísérleti rendszerünkben két stresszkezelést alkalmaztunk. Az első vízmegvonásos periódus után visszaöntözés következett, ami a Plainsman V esetében valószínűleg megelőzte a várható C_i inflexiós pontot. Kísérleti összeállításunkban a többi vizsgált fajta esetében a Plainsman V-hez hasonló, markáns C_i érték csökkenést nem tudtunk detektálni. Fábián és munkatársai (2013) kutatási eredményei tehát a Plainsman V fajta tulajdonságait tekintve egybevágtak a mi vizsgálatainkból leszűrhető következtetésekkel, megerősítik azt.

Balla és munkatársai 2014-ben közölt vizsgálata során kombinálták a hő- és szárazság stresszt, amely erősebben csökkentette a C_i értéket Plainsman V fajtánál annál, mint amikor a stresszfaktorokat külön alkalmazták. Megfigyelték, hogy a 35 °C-os kezelés intenzívebb transzspirációt eredményez és ez a C_i érték csökkenését is eredményezi, míg a szárazságkezelés esetén a sztóma zárás következtében kissé nőtt ezt az érték. A cikk megerősítette a Plainsman V kiemelkedő szárazságtoleranciáját a vizsgált fajták közül.

A fentieket összegezve feltételezzük, hogy az általunk vizsgált genotípusok közül a szárazság toleráns Plainsman V növények az alkalmazott első vízhiányos periódus végén feltehetően tovább képesek voltak fenntartani a fotoszintetikus aktivitást, ami magasabb széndioxid fixációt és alacsonyabb C_i értékeket eredményezett.

6.2. Csíranövények gyökerének növekedése eltérő koncentrációjú abszcizinsav oldatokban

A csökkenő vízpontenciál ozmotikus stresszt vált ki a növényeknél, ami számos biokémiai, fiziológiai és morfológiai választ indukál. Továbbá olyan másodlagos szignálokat idéz elő, mint amilyen az abszcizinsav hormon termelődésének növekedése. Az ABA fontos szerepet játszik a dehidratációs válaszokban, kihat a sztóma konduktanciára valamint stresszfüggő génkifejeződést képes indukálni (Guóth *et al.* 2010).

A gyökérnövekedés ABA érzékenységét kapcsolatba hozták a szárazság toleranciával búza esetében (Kurahashi *et al.* 2009). Tanulmányunkban megfigyelhető volt, hogy a külsőleg alkalmazott alacsony koncentrációjú ABA kezelés különbözőképpen hatott a genotípusok gyökér megnyúlására. Egy növény minél kevésbé érzékeny e hormonra, ami tudvalevő, hogy számos védekezési mechanizmust indukál a szervezetben a stressz kivédésére, annál kevésbé ellenálló a káros hatásokkal szemben. Ezek alapján a hormonra való inszenzitivitás és a stresszel szembeni alacsony tolerancia között párhuzam vonható. Ebből pedig az következik, hogy erre a hormonra megkülönböztető bélyegként tekinthetünk a szárazságra való érzékenység meghatározásánál, a búza fajták elkülönítése esetében.

Kísérleteink során a GK Élet fajta esetében intenzív növekedés volt megfigyelhető 10 és 20 μM -os hormon koncentrációnál, szemben a többi fajtával. Ez az ABA-ra való érzéketlenség valószínűleg hozzájárul a fajta alacsonyabb szárazságtűréséhez.

A gyökér növekedés ABA gátlására való érzéketlenségét Guóth és munkatársai is (2010) megfigyelték a GK Élet fajtánál. A külsőleg alkalmazott PEG kezelés során azt tapasztalták,

hogy az aránylag magas endogén ABA szint a GK Élet gyökér növekedését kevésbé gátolta, mint a toleráns Emese fajtánál.

Az ABA-val kapcsolatos adataink magyarázatot nyújthatnak arra, hogy a relatív magasabb abszcizinsav tartalom miatt volt kisebb hatással a GK Élet gyökér csúcs retardációjára.

Az ABA okozta növekedés - visszamaradással más publikációkban is találkozhatunk, amelyet búza magoncokban a Cor-LEA gének expressziójával is kapcsolatba hoztak (Iehisa *et al.* 2011).

6.3. Ozmotikus stressz hatásának vizsgálata metabolitokra

A növény a sejtek turgorának és növekedésének fenntartása érdekében ozmotikumokat termelhet, amivel képes lehet kompenzálni a külső ozmotikus stresszt (Bray A. E. *et al.* 2002). A környezeti stresszek közül a talaj szárazság az ozmotikus stressz leggyakoribb okozója, és többek között ez a legnagyobb limitáló tényező a növény produktivitása szempontjából.

A valósághoz hű szárazságstressz előidézése és követése laboratóriumi körülmények között igen nehézkes. A leginkább természetközeli módja ennek a növények földben való nevelése, majd szárítása. E rendszer viszont felveti a vízstressz mérésének pontos és precíz kvantifikálásának és ismételhetőségének a problematikáját. Ezért a gyakran alkalmazott és jól bevált módszerként a növényeket hidropóniás nevelést alkalmazva egy ozmotikus ágenst, polietilén glikolt tartalmazó oldatba helyezik (Erlandsson, 1979).

Számos tanulmány született a vízhiánnyal szembeni eltérő szenzitivitású gabonafélék ozmotikus stresszre adott válaszáiról. Guóth és munkatársai (2010) a szárazság toleráns Mv Emese illetve az általunk is vizsgált egyik érzékeny genotípus Gk Élet válaszait vizsgálták ozmotikus stresszre nézve, 400 mOsm-os polietilén-glikol koncentráció mellett. Az Mv Emese vízpotenciálja kevésbé csökkent, de nem változott meg szignifikánsan a stressz körülmények között a 21 napig folyó kísérlet során. Szemben a Gk Élettel, ahol az eltérések szignifikánsak voltak. Továbbá a levél vízpontenciál értékek jellemzően alacsonyabb szintet mutattak a kontroll növényekhez képest.

Egy hasonló, hidropóniás PEG alapú ozmotikus kezelési vizsgálattal szerettük volna igazolni az általunk tanulmányozott genotípusok érzékenységét az ozmotikus stresszre nézve. A kísérleteinkben kapott eredmények összhangban vannak a fentiekben felvázoltakkal, miszerint a Gk Élet, szenzitív fajtaként erősebben reagált az ozmotikus stresszre, mint a toleráns Mv Emese genotípus. A Plainsman V toleráns fajtaként ismert genotípus az ozmotikus stresszt nem tűrte jól, így vélhetően más szárazságtűrési módszert alkalmaz.

A prolin aminosav fokozott termelődése szorosan kapcsolódik az ozmotikus stresszhez. A vegyület ozmotikumként is ismeretes, ezért a kísérleti eredményekből levonható következtetések ebben a fejezetben kerülnek megvitatásra. A prolin erőteljes felhalmozódását rendszerint vízhiányos stressz esetén figyelték meg. Akkumulációja növelte a növény túlélését vagy toleranciáját stressz alatt. A magas prolin szintről úgy tartják, hogy a citoplazmában ozmotikus védővegyületként működik (Handa *et al.* 1985). Irodalmi adatokból ismeretes, hogy szintje stressz hatására megemelkedik a növényekben, hogy betölthesse védő funkcióját (Ashraf *et al.* 2007). Számos tanulmány párhuzamot von az akkumulációja és a stresszel szembeni tolerancia között (Nayyar és Walia, 2003).

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a prolin felhalmozódás mértékét a PEG kezelt növényekben és párhuzamot próbáltunk vonni a szárazságra való érzékenység és prolin felhalmozódás között. Azonban várakozásunkkal ellentétben, kísérleteink során nem kaptunk szignifikáns különbséget az egyes fajták között, ami alátámasztotta volna a prolin felhalmozódás feltételezett védő szerepét.

6.4. Szárazság indukálta génexpresszió elemzése

A kiválasztott búza fajtákat az élettani méréseken kívül génexpressziós vizsgálatoknak is alávetettük. Az általunk vizsgált genotípusokkal több publikációban is találkozhatunk, amik egybevágóan a Plainsman V és Mv Emese toleráns illetve a Gk Élet és Cappelle Desprez szenzitív tulajdonságával vízhiányos stressz esetén (Guóth *et al.* 2009; Jäger *et al.* 2014). Az adott fajta szárazsággal szembeni eltérő toleranciájához számos (pl morfológiai) bélyeg együttese járul hozzá, amelyek részben már ismeretesek ezeknél a fajtáknál (Jäger *et al.* 2014). A toleráns fajtákra kisebb levélfelület és alacsonyabb sztómaszám jellemző, míg vékony és víz számára átjárható kutikulát találtak a szenzitív Cappelle Despreznél. Ismételt szárítási ciklusok esetén az érzékeny fajtákra jellemző volt a celluláris integritás csökkenése. Ezt a fokozott elektrolit szivárgás, a kloroplastisz nagyobb mértékű ultrastrukturális károsodása és a levelek relatív víztartalmának gyorsabb hanyatlása jelezte (Jäger *et al.* 2014). A két toleráns genotípus erősebb védelmet mutatott az oxidatív károsodással szemben sejt szinten. Ezt támasztja alá a magasabb glutation szintáz és glutation peroxidáz aktivitás a Plainsman V fajtában, amit korábban Gallé és munkatársai (2009) mutattak ki.

A *Triticum aestivum* *TaCbf14* és *TaCbf15* génjeinek funkcióját árpába való transzformáció révén tesztelték, és megállapítást nyert, hogy szerepet töltenek be a

fagytoleranciában (Soltész *et al.* 2013). Ezekkel a transzkripció faktorokkal transzgénikus árpa vonalakban dehidrin gének fokozott kifejeződését is megfigyelték.

Kísérleteink azt mutatták, hogy az Mv Emese fajtában vízhiánynál a *Wdhn13*, *Cbf14* és *Cbf15* gének nagy vonalakban koordinált kifejeződése történik. Ez a kifejeződés úgy tűnik, hogy két fázisú, a kezdeti (nem egyöntetű) expresszió lecsengését követően a teljes vízmegvonás után kb. egy héttel (a Cappel Desprez kivételével) újra indukálódtak a gének. Ez a második válaszgen kifejeződési maximum az Mv Emese fajta esetében volt a legkifejezettebb.

A *DHN* és a *Cbf* gének kifejeződése között több más esetben is párhuzamosságot mutattak ki (pl. Kume és munkatársai [2005] hideg stressz alkalmazása során). Újabban egy CBF gén expresszióját a dehidrin gén indukciójához kapcsolták a *Brachypodium distachyon* szárazság tolerancia válaszában (Ryu és mtsai. 2014). A *Wdhn13* gént több TF is szabályozza. Ismeretes, hogy a *Wcbf2* and *Wdreb2* búza gének a *Wdhn13* promóterét aktiválják dohányban (Takumi *et al.* 2008; Kobayashi *et al.* 2008). A *Cbf* gének részvétele szárazságstressz alatt a *Wdhn13* gén transzkripcionális szabályozásában jól egyezik az általunk kapott eredményekkel. A szárazság stresszelt búza növényekben a *Wdhn13* valószínűleg *Cbf* gének által szabályozott.

6.5. A búza *TaSHN1* gén kifejeződésének vizsgálata szárazságkezelt búzánál

Jäger és munkatársai (2015) *Arabidopsis*-ba való transzformálás révén vizsgálták a búza *TaSHN1* génjét, ami homológ a lúdfű saját *WIN/SHN1* génjével. A morfológiai és génexpressziós vizsgálaton túlmenően tanulmányozták a transzformáns vonalak szárazságtűrését is. A gén kifejeződése számos morfológiai változást indukált - pl. fényesebb levél felület - a gén viasz bioszintézist szabályozó jellegéből adódóan. Vízhányos körülmények között azonban a vad típusú és a *TaSHN1* transzgénikus növények toleranciája nem mutatott szignifikáns különbséget. Tehát a transzgen nem hatott kedvezően a növények vízmegtartására.

Búzával folytatott kísérleteinkben szárazság stresszt alkalmaztunk négy genotípuson. Kíváncsiak voltunk, vajon a stresszkezelés során bekövetkező viaszfedettség növekedés együtt jár-e a *TaSHN1* gén esetleges indukciójával. Ezért a kontroll és stresszkezelt búzák zászlós leveleiből nyert mintákon a *WIN/SHN1*-el homológ búza génre (*TaSHN1*) specifikus RT-PCR reakciót végeztünk. A génexpressziós vizsgálat eredménye az volt, hogy nem kaptunk a tesztelt gén kifejeződésére utaló jelet egyik genotípus esetében sem.

Kilian és munkatársai (2007) az *Arabidopsis thaliana* genom kifejeződését vizsgálták microarray technikával. Kvantifikálni próbálták a kifejeződő géneket és azok megnyilvánulási szintjeit az idő előrehaladtával abiotikus, közöttük szárazság stresszre nézve is. Azt találták, hogy idő függvényében a felszabályozott gének gyarapodnak és erősödnek a szárazság során (Kilian *et al.* 2007). Miként azt látjuk a molekuláris biológia modellnövényénél is, feltételezhető, hogy búzánál is helytálló hogy a *TaSHN1* génen kívül más szabályozó gének illetve transzkripciós faktorok játszhatnak jelentősebb szerepet a szárazság stressz indukált kutikula gyarapodás folyamatában.

6.6. *WIN/SHN1* gén vizsgálata a búza fejlődési állapotaiban

A növények hajtását borító kutikula rétegnek több szerepe van. Egyrészt elsődleges határoló felületet biztosít a növény és a környezete között, másrészt védelmi funkciókat is betölt mind biotikus mind abiotikus tényezőkkel szemben.

Ismeretes, hogy az *Arabidopsis* kutikula kialakulásában nagy szerepet játszik a *WAX INDUCER/SHINE (WIN/SHN)* fehérje, mely egy az APETALA2/ERF típusú transzkripciós faktor (Aharoni *et al.* 2004). Broun és munkatársai (2004) lúdfüben vizsgálták a gén kifejeződését. Az RT-PCR eredményeként a virágban találták annak a legnagyobb kifejeződését (a levélben és szárban megfigyelt kis mennyiségű géntermék mellett).

Mivel a virágrészek gyors fejlődése során a kutikula komponensek és a viaszok fokozott képződése is jellemző, az ebben szerepet játszó gének magas expressziója nem meglepő.

A *WIN/SHN* gének szárazságban betöltött szerepéről a Wang és munkatársai (2012) által publikált cikkben is olvashatunk. Kísérleteik során az *Arabidopsis WIN/SHN1*-el homológ rizs gént (*OsWRI*) vizsgálták. Megfigyelték, hogy vízhiány esetén a vad típusúaknál ellenállóbbak voltak azok a vonalak melyekben az *OsWRI*-et túlexpresszáltatták.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A búza szárazságra való toleranciája egyre fontosabbá válik a jelenben és vélhetően a jövőben is. Ez az abiotikus stressz nagymértékben meghatározza a gabona termésmennyiségét. A szárazságtűrés genetikai és fiziológiai hátterének felderítésében modern molekuláris biológiai technikák és klasszikus élettani módszerek nyújtanak segítséget. Ezek révén lehetőségünk van megtalálni azokat az élettani tényezőket, géneket illetve szabályozó elemeket, melyek befolyásolhatják az ezzel a stresszel szembeni ellenállóságot.

Élettani vizsgálataink során a szárazság stressz hatásait a fotoszintézis és gázcsere paramétereinek nyomon követésével kezdtük. A genotípusok közül a Planisman V levélen belüli CO₂ koncentrációja erősen lecsökkent vízmegvonás hatására, amiből arra következtethettünk, hogy ebben a fajtában a fotoszintézis folyamatai az alkalmazott stresszel szemben ellenállóbb lehettek. Mértük a stressz során a zászlós levelek prolin tartalmát, amely a várakozásokkal megegyező módon minden fajta esetében emelkedett. A fajták között azonban ebben a tekintetben nem kaptunk szignifikáns különbséget, mely a genotípusok elkülönítésében segítséget nyújtott volna. Ismertes, hogy az abszcizinsav a stressz válaszok szempontjából kulcsfontosságú a növényeknél. Erre a hormonra való szenzitivitást gyakran összefüggőnek találták a szárazságra való érzékenységgel. Erre támaszkodva végeztünk búza csíranövényeken ABA kezelést, melynek során a Gk Élet fajta gyökernövekedése bizonyult a legkevésbé érzékenynek a hormonra nézve. A továbbiakban PEG kezeléssel kiváltott ozmotikus stressz során vizsgáltuk az egyes búza genotípusok relatív víztartalom változásait. A Gk Élet szenzitív fajtaként rosszabbul viselete azt, mint az Mv Emese. Utóbbi esetében a látható fenotípusban is megfigyelhető volt a jobb stressztűrés. Várakozásunkkal ellentétben a PEG kezelés hatására a Plainsman V fajta mutatta a legalacsonyabb RWC értékeket.

Génexpressziós kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy egy, az irodalmi adatokból ismeretes, feltételezhetően stressztoleranciában szerepet játszó dehidrin gén (*Wdhn13*) illetve az azt valószínűleg szabályozó transzkripciós faktorok miként fejeződnek ki a toleráns és szenzitív búza fajtákban. E célból vízmegvonásnak tettük ki a genotípusokat és ezt követően polimeráz láncreakciót végeztünk a zászlós levelekből készített cDNS mintákon. A sikeres genomi DNS szűrés és kontroll primerrel való kiegyenlítés után a *Wdhn13* gént valamint a *Cbf14* és *Cbf15* transzkripciós faktorok kifejeződését mutattuk ki. Az expressziós vizsgálatok eredményeként láthattuk, hogy a *Cbf14*, *Cbf15* és *Wdhn13* kifejeződései között

nem szigorú, de észrevehető párhuzamosság volt megtalálható. Mindemellett kíváncsiak voltunk arra, hogy normál (stresszmentes) körülmények között miként alakul a *Wdhn13* gén és a két transzkripció faktor kifejeződése. A *Wdhn13* gén kifejeződését real-time PCR-el módszerrel a toleráns fajtákban magasabb szintűnek találtuk. *Cbf15* esetében mindkét eljárással azt mutattuk ki, hogy a transzkripció faktor stresszmentes csíranövényben nem fejeződik ki, szemben a vízhiányos, virágzó növényekkel.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy búzában olyan további gént/transzkripció faktort azonosítsunk, amelynek feltételezett szerepe kapcsolható a szárazság stresszre adott válaszokkal. E célból bioinformatikai módszerekkel azonosítottunk egy, a lúdfű *WIN/SHNI* transzkripció faktorral homológ búza gént (*TaSHNI*), amelynek a kutikula képződésben betöltött szerepe valószínűsíthető volt. Az így kiválasztott génre specifikus expressziós vizsgálatokat végeztünk a búza különböző szerveiben. A gén legerősebb kifejeződését a kalászban tapasztaltuk, ami valószínűsítette, hogy a homológ lúdfű és búza gének ortológoknak is bizonyulnak majd. Elvégeztük a búza gén klónozását, ami a későbbi lúdfű transzformációs kísérletek alapja volt. Tanulmányoztuk *TaSHNI* megnyilvánulását a vizsgált búza genotípusok zászlós leveleiben vízhiányos stressz során. Ennek kapcsán elmondhatjuk, hogy a *TaSHNI* gén nem fejeződött ki a zászlós levelek középi régióiban vízmegvonás idején, bár a levelek viasz borítottsága ott jellemzően fokozódott. Feltételezhető tehát, hogy bár a *TaSHNI* gén a kutikula fejlődését biztosan szabályozza, ezt azonban a levél kialakulása során a levélalapi régióban teszi, és nem a stressz hatására bekövetkező viaszoltság növekedés során.

8. SUMMARY

The drought tolerance of wheat is becoming increasingly important in these days and presumably will have a relevance in the future as well. This abiotic stress largely determines the quantity of grain harvest. Modern molecular biology techniques and classical physiological methods give assistance to the exploration of the roots of genetic and physiological drought tolerance. Thereby, we have the possibility to identify those physiological factors, genes and regulatory elements which have an influence on the resistance against the above mentioned stress.

We started off our physiological studies by monitoring the parameters of the photosynthesis and gas exchange while under drought stress. As a result of water deprivation the CO₂ concentration inside the leaves strongly decreased for the genotype Plainsman V, which implies that the photosynthetic processes of this particular species have become more resistant against the applied stress. We measured the proline content of the flag leaf under stress which as expected rose for each type alike. In this regard, however, we did not get a significant difference between the genotypes that would have helped to distinguish them from one another. It is known that the abscisic acid plays a key role inside plants in terms of stress responses.

Sensitivity to this hormone is oftenly found to be related to drought sensitivity. On that basis we carried out ABA treatment on wheat seedlings whereby the Gk Élet types root growth was the least sensitive to the hormone. Hereinafter, we examined each wheat genotypes relative water content changes under osmotic stress that was induced by PEG treatment. Gk Élet for one bore it worse compared to Mv Emese as it is a rather more sensitive type. For the latter case, a stronger stress tolerance was also observed in the phenotype. Contrary to our expectations, the Plainsman V variety exhibited the lowest RWC values under PEG treatment.

The aim in our gene expression experiments was to find answers to how the dehydrin gene (*Wdhn13*) – suspected of playing a role in stress tolerance – and the transcription factors – that presumably regulate it – are expressed in the tolerant and sensitive wheat varieties. For this purpose we placed the genotypes under water deprivation, then performed the polymerase

chain reaction (PCR) on the cDNA samples which were made from flag leaves. After the successful filtering of genomic DNA and equalization with primer controls the *Wdhn13* gene, *Cbf14* and *Cbf15* transcription factors expression could be detected.

As a result of the expression studies we found a noticeable parallelism between the *Cbf14*, *Cbf15* and *Wdhn13* expressions. In addition, we were also interested in how the *Wdhn13* gene and the two transcription factor's expressions take place in plants grown in normal (stress-free) environment. Under these circumstances according to the results obtained by qRT-PCR we could observe higher level expression expressions of the *Wdhn13* gene in the tolerant genotypes. In case of *Cbf15* we demonstrated that for both treatment types the transcription factors can not be expressed in stress-free seedlings, oppositely to the dehydrated and blooming plants.

Our further aim was to identify additional genes/transcription factors inside the wheat, which may have a presumed role in the response induced by the draught stress. For this purpose we identified a wheat gene (*TaSHN1*) that is homologous with the *Arabidopsis* WIN/SHN1 transcription factor, which may play a role in the cuticle formation. We then performed specific expression studies on the various organs of the wheat for the selected gene. The gene's strongest expressions could be found in the ear of corn, which led to the assumption that the homologous *Arabidopsis* and wheat genes will prove to be orthologous as well. Then cloning of *TaSHN1* was carried out, which was fundamental for the later *Arabidopsis* transformation experiments. Studies were also made on *TaSHN1* expression inside the examined wheat genotypes' flag leaves while under dehydration stress. In this regard, we can conclude that the *TaSHN1* gene was not expressed inside the mid-regions of the flag leaves while under water deprivation, although the wax coverage typically increased at this location. For this reason we can assume, that although the *TaSHN1* gene surely regulates cuticle development, this mostly occurs in the basal sheath region during leaf formation and not in connection with the increased wax production due to the effect of stress.

9. IRODALOMJEGYZÉK

AHARONI A., DIXIT S., JETTER R., THOENES E., VAN ARKEL G., PEREIRA A. (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(9): 2463–2480. p.

AKINCI S., LÖSEL M.D. (2012). Plant Water-Stress Response Mechanisms, Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, In Tech, DOI: 10.5772/29578. Available from: <http://www.intechopen.com/books/water-stress/plant-water-stress-response-mechanisms>

ALI M., BAKHT J., D. G. (2014) Effect of water deficiency and potassium application on plant growth, osmolytes and grain yield of Brassica napus cultivars. *Acta Bot. Croat.* 73(2): 299–300 p.

ALONSO J. M., STEPANOVA A. N., LEISSE T. J., KIM C. J., CHEN H., SHINN P., STEVENSON D. K., ZIMMERMAN J., BARAJAS P., CHEUK R., GADRINAB C., HELLER C., JESKE A., KOESEMA E., MEYERS C. C., PARKER H., PREDNIS L., ANSARI Y., CHOY N., DEEN H., GERALT M., HAZARI N., HOM E., KARNES M., MULHOLLAND C., NDUBAKU R., SCHMIDT I., GUZMAN P., AGUILAR-HENONIN L., SCHMID M., WEIGEL D., CARTER D. E., MARCHAND T., RISSEEUW E., BROGDEN D., ZEKO A., CROSBY W. L. , BERRY C. C., ECKER J. R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 301(5641):653-657. p.

ASHRAF M., FOOLAD M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2):206–216. p.

BAHIELDIN A., HESHAM T. MAHFOUZ T. H., HALA F. EISSA F. H., OSAMA M. SALEH O. M., AHMED M. RAMADAN M. A., ISMAIL A. AHMED A. I., WILLIAM E. DYER E. W., HANAIYA A. EL-ITRIBY A. H., MAGDY A. MADKOUR A. M. (2005) Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 123(4):421–427. p.

BALLA K., BENCZE SZ., BÓNIS P., ÁRENDÁS T., VEISZ O. (2014) Changes in the photosynthetic efficiency of winter wheat in response to abiotic stress. *Open Life Sciences*, 9(5):519–530 p.

BARNABÁS B., JÄGER K., FEHÉR A. (2008): The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environ*, 31(1):11-38. p.

BATES L.S. , WALDREN R. P., TEARE I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1):205-207. p.

BLUM A. (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 1159–1161 p.

BLUMWALD E., MITTLER R. (2010) Abiotic stress. Stress-sensing mechanisms in plants. Early-aciting stress sensor provide the initial signal for the stress response. In: Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A. (Edit.) *Plant physiology and development*.

BRAY A. E. (2002) Regulation of gene expression during abiotic stresses and the role of the plant hormone abscisic acid. In: Pessaraki Mohammad: *Handbook of plant and crop physiology Part VI*: 747 p.

BROUN P., POINDEXTER P., OSBORNE E., JIANG C-Z., JOSE' LUIS RIECHMANN J. L. (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *PNAS*, 101:4706–4711- p.

CAMERON D. K., TEECE A. M., SMART B. L. (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiology*, 140:176–179 p.

CHAUHAN H., KHURANA P. (2011) Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnol J.*, 9(3):408-17. p.

CHAVES M., FLEXAS J., PINHEIRO C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*,103:551-553 p.

CIAFFI M., PAOLACCI AR., D'ALOISIO E., TANZARELLA OA., PORCEDDU E. (2006) Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences. *Gene*, 366(2):209-18. p.

CLOSE T.J., KORTT AA., CHANDLER PM. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration - induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol.*, 13(1):95-108. p.

CLOSE T. J., LAMMERS P. J. (1993) An osmotic-stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.*, 101:773–779. p.

DASGUPTA J., BEWLEY D. (1984) Variations in protein synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of imposed water stress. *Journal of Experimental Botany*, 35(10):1450-1459. p.

DEÁK C., JÄGER K., FÁBIÁN A., V. NAGY A. V., ALBERT Z., MISKÓ A., BARNABÁS B., PAPP I. (2011) Investigation of physiological responses and leaf morphological traits of wheat genotypes with contrasting drought stress tolerance. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1):69-71. p.

FÁBIÁN A., JÄGER K., BARNABÁS B. (2013) Developmental stage dependency of the effect of drought stress on photosynthesis in winter wheat (*triticum aestivum* L.) varieties. *Acta Agronomica Hungarica*, 61(1):13–21. p.

GALLÉ A., CSISZÁR J., SECENJI M., GUÓTH A., CSEUZ L., TARI I., GYÖRGYÉY J., ERDEI L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. *J Plant Physiol.*, 166(17):1878-91. p.

GRAETHER S. P., BODDINGTON K. F. (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Plant Science*, 5(576):1-11. p.

GUÓTH A., TARI I., GALLÉ Á., CSISZÁR J., PÉCSVÁRADI A., CSEUZ L., ERDEI L. (2009) Comparison of the Drought Stress Responses of Tolerant and Sensitive Wheat Cultivars During Grain Filling: Changes in Flag Leaf Photosynthetic Activity, ABA Levels, and Grain Yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2):167-176. p.

GUÓTH A., BENYÓ D., CSISZÁR J., GALLÉ Á., HORVAÁT F., CSEUZ L., ERDEI L., TARI I. (2010) Relationship between osmotic stress-induced abscisic acid accumulation, biomass production and plant growth in drought-tolerant and -sensitive wheat cultivars. *Acta Physiol Plant*, 32:719-727. p.

ERLANDSSON G. (1979) Efflux of Potassium from Wheat Roots Induced by Changes in the Water Potential of the Root Medium. *Physiologia Plantarum*, 47(1):1-6. p.

EUI CHEOL K., HYO SHIN L., DONG-WOOG C. (2012) Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in “*Populus tremula*” x “*Populus alba* var. *glandulosa*.” *Plant Omics*, 5(2):122-127. p.

HANDA S., HANDA AK., HASEGAWA PM., BRESSAN RA. (1986) Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress. *Plant Physiol.* 80(4):938-45. p.

HARA M, TERASHIMA S, FUKAYA T, KUBOI T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217:290-298. p.

HARA M., TERASHIMA S., KUBOI T. (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.*, 158:1333-1339. p.

HEERDEN VAN P.D.R., VILLIERS DE O.T. (1996) Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance in spring wheat cultivars. *South African Journal of Plant and Soil*, 13(1):17-21. p.

HOAGLAND DR., ARNON DI. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. *Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.*, 347.

HOFFMAN B., CSEUZ L., PAUK J. (2006) Az őszi búza szárazságtűrésére történő nemesítésének lehetőségei és korlátai In: Dudits D. (Edit.) A búza nemesítésének tudománya. A funcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair KFT., Szeged

HU X. J., ZHANG Z. B., XU P., FU Z. Y., HU S. B., SONG W. Y. (2010) Multifunctional genes: the cross-talk among the regulation networks of abiotic stress responses. *Biologia Plantarum*, 54(2):213-223. p.

IEHISA J. C. M., KURAHASHI Y., TAKUMI S. (2011) Identification of chromosomes controlling abscisic acid responsiveness and transcript accumulation of Cor–Lea genes in common wheat seedlings. *Functional Plant Biology*, 38(10):758-766. p.

JÄGER K. , FÁBIÁN A., EITEL G., SZABÓ L., DEÁK C. , BARNABÁS B., PAPP I. (2014) A morpho-physiological approach differentiates bread wheat cultivars of contrasting tolerance under cyclic water stress. *Journal of Plant Physiology*, 171(14):1256-1266. p.

JÄGER K., MISKÓ A., FÁBIÁN A., DEÁK C., KISS-BÁBA E., POLGÁRI D., BARNABÁS B., PAPP I. (2015): Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the *Arabidopsis* leaf cuticle. *Biologia Plantarum*, 59(1):29-36. p.

KILIAN J., WHITEHEAD D., HORAK J., WANKE D., WEINL S., BATISTIC O., D'ANGELO C., BORNBERG-BAUER E., KUDLA J., HARTER K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal*, 50(2):347-63. p.

LI J., CANG Z., JIAO F., BAI X., ZHANG, D., ZHAI R. (2015) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001>

KOBAYASHI F., ISHIBASHI M., TAKUMI S. (2008) Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 17(5):755-67. p.

KOBAYASHI F., TAKUMI S., HANDA H. (2010) Identification of quantitative trait loci for ABA responsiveness at the seedling stage associated with ABA-regulated gene expression in common wheat. *Theor Appl Genet.*, 121(4):629-41. p.

KRAMER P. J., BOYER, J. S. (1995). *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego

KRIEDEMANN P. E. (1999) Stomatal physiology. In: Atwell B. J., Kriedemann P. E., Turnbull C. G. N.. *Plants in Action*. 15. 2. Electronic edition: <http://plantsinaction.science.uq.edu.au/edition1/>

- KUME S., KOBAYASHI F., ISHIBASHI M., OHNO R., NAKAMURA C., TAKUMI S. (2005) Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. *Genes Genet Syst.*, 80(3):185-97. p.
- KURAHASHI Y., TERASHIMA A., TAKUMI S. (2009): Variation in dehydration tolerance, ABA sensitivity and related gene expression patterns in D-genome progenitor and synthetic hexaploid wheat lines. *Int. J. Mol Sci.*, 10(6):2733-2751. p.
- LABHILILI M., JOUDRIER P., GAUTIER M-F. (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Sci.*, 112(2):219-230. p.
- LARCHER W. (1995) Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer, Berlin.
- LI R., BRAWLE H. S., CLOSE J. T. (1998) Proteins immunologically related to dehydrins in fucoid algae. *J. Phycol.*, 34(4):642–650. p.
- MCCURDY R. D., MCGRATH J. J., MACKAY-SIM A. (2008) Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 12(1):15-24. p.
- MIR R. R., ZAMAN-ALLAH M., SREENIVASULU N., TRETOWAN R., VARSHNEY RK. (2012) Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(4):625-627. p.
- MOLNÁR I., GÁSPÁR L., SÁRVÁRI É., DULAI S., HOFFMANN B., MOLNÁR-LÁNG M., GALIBA G. (2004): Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31(12):1149-1159. p.
- MUNDY J., CHUA N. H. (1988) Abscisic-acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.*, 7(8):2279-2286. p.

- NAYYAR H., WALIA D. P. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 46(2):275-279. p.
- PAOLACCI A. R., TANZARELLA O. A., PORCEDDU E., CIAFFI M. (2009) Access Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10:11
- PAUL K., PAUK J., DEÁK Z., SASS L., VASS I. (2016) Contrasting response of biomass and grain yield to severe drought in Cappelle Desprez and Plainsman V wheat cultivars. *Peer J*, 4 (1708):1-24. p.
- PUHAKAINEN T., HESS M.w., MÄKELA P., SVENSON J., HEINO P., PALVA E. T. (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 54:743-753. p.
- QUICK W. P., CHAVES M. M., WENDLER R., DAVID M., RODRIGUES M. L., PASSAHARINHO J. A., PEREIRA J. S., ADCOCK M. D., LEEGOOD R. C., STITT M. (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment*, 15(1):25-35. p.
- RAHMAN I. M. M., HASEGAWA H. (2012): Water stress. In: Şener Akıncı and Dorothy M. Lösel: Plant Water-Stress Response Mechanisms. Electronic edition:
<http://www.intechopen.com/books/water-stress>
- RAMBAL S., DEBUSSCHE G. (1995) Water balance of Mediterranean ecosystems under a changing climate. In: Moreno J. M. et al. (Eds.) Global change and Mediterranean-type ecosystems. Springer-Verlag, New York, Inc. 1995
- RAMPINO P., PATALEO S., GERARDI C., MITA G., PERROTTA C. (2006) Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment*, 29(12):2143-2152. p.
- RIEDERER M., SCHREIBER L. (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 52(363):2023-2024. p.
- RISTIC Z., JENKS M.A. (2002) Leaf cuticle and water loss in maize lines differing in dehydration avoidance. *J Plant Physiol*, 159(6):645-651. p.

- RORAT T. (2006) Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters.*, 11(4):536-556. 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(7): 985-1006. p.
- RUIBAL C., SALAMÓ I.P., CARBALLO V., CASTRO A., BENTANCOR M., BORSANI O. ET AL. (2012) Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Science*, 190:89-102. p.
- RYU J. Y., HONG S. Y., JO S. H., WOO J.-C., LEE S., PARK C.-M. (2014) Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol*, 14:15
- SAAVEDRA L., SVENSSON J., CARBALLO V., IZMENDI D., WELIN B., VIDAL S. (2006) A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.*, 45(2):237-49. p.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SAVOURE A., HUA X.-J., BERTAUCHE N., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN N. (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 254(1):104-109. p.
- SHEPHERD T., WYNNE GRIFFITHS D. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3):469-99. p.
- SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3):217-23. p.
- SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SEKIZ M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Plant Biology*, 6(5):410-417. p.

- SOLTÉSZ A., SMEDLEY M., VASHEGYI I., GALIBA G., HARWOOD W., VÁGÚJFALVI A. (2013) Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *J Exp Bot.*, 64(7):1849-62. p.
- SRINIVAS V., BALASUBRAMANIAN D. (1995) Proline Is a Protein-Compatible Hydrotrope? *Centre for Cellular & Molecular Biology*, 11(7):2830-2833. p.
- TAKUMI S., SHIMAMURA C., KOBAYASHI F. (2008) Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat CBF gene in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem.* 46(2):205-211. p.
- TARI I., GUÓTH A., BENYÓ D., KOVÁCS J., POÓR P., WODALA B. (2010) The roles of ABA, reactive oxygen species and nitric oxide in root growth during osmotic stress in wheat: comparison of a tolerant and a sensitive variety. *Acta Biologica Hungarica*, 61(1):189-196. p.
- THOLE JM., BEISNER ER., LIU J., VENKOVA SV., STRADER LC. (2014) Abscisic Acid Regulates Root Elongation Through the Activities of Auxin and Ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3 (Bethesda)*, 4(7):1259-74. p.
- TRESHOW M. (1970) Disorders associated with adverse water relations. In: *Environment & Plant Response*. McGraw-Hill, New York
- YOSHIBA Y., KIYOSUE T., NAKASHIMA K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1997) Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. *Plant Cell Physiol.*, 38(10):1095-1102. p.
- VENDRUSCOLO E. C. G., SCHUSTERB I., PILEGGIC M., SCAPIMD C. A., MOLINARIE H. B. C., MARURE C. J., VIEIRAE L. G. E. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164(10):1367-1376. p.
- VERBRUGGEN N., VILLARROLE R., MONTAGU VAN M. (1993) Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 103:771-781. p.
- WALKER-SIMMONS MK., ANDERBERG RJ., ROSE PA., ABRAMS SR. (1992) Optically Pure Abscisic Acid Analogs-Tools for Relating Germination Inhibition and Gene Expression in Wheat Embryos. *Plant Physiol.*, 99(2):501-507. p.

WANG Y., WAN L., ZHANG L., ZHANG Z., HAIWEN Z., QUAN R., ZHOU S., HUANG R. (2012) An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Molecular Biology*, 78(3):275-288. p.

ZADOKS JC, CHANG TT., KONZAK CF. (1974) A decimal code for growth stages of cereals. *WeedRes*, 14(6):415-421. p.

ZEIGER E. (2010) Stomata biology. Light-dependent stomatal opening. Sucrose is an osmotically active solute in guard cell. In: Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A. (Edit.) *Plant physiology and development*.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek és tanszékvezetőmnek Dr. Papp Istvánnak, a szakmai irányításáért, tanácsaiért, melyek nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Lukács Noémi volt tanszékvezető asszonynak, nyugalmazott egyetemi tanárnak, professor emeritának, hogy doktorim kezdetekor lehetőséget adott a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken folyó munkákba való bekapcsolódásba.

Szeretnék köszönetet mondani Dr Jäger Katalinnak, az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet, Növényi Sejtbiológiai Osztály vezetőjének és munkatársainak, mint társkutatócsoportunknak, amiért biztosították számunkra vizsgálataink anyagát és helyszínét. Továbbá Dr. Janda Tibornak, az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet, Növényélettan Osztály vezetőjének, amiért rendelkezésünkre bocsájtotta a fiziológiai mérésekhez használt infravörös gázanalizátort. A statisztikai kiértékeléseknél kapott segítségért szintén köszönettel tartozom Dr Ittész András docens úrnak a Biometria és Agrárinformatika Tanszék munkatársának.

Köszönet illeti jelenlegi és egykori kollégáimat a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken, akik laboratóriumi munkámban nyújtott tanításukkal hozzájárultak a szakmai fejlődésemhez.

Hálás vagyok kutatási témámban résztvevő szakdolgozó hallgatóimnak: Nagy Anna Veronikának, Auth Mariannak és Végh Annamáriának, hogy munkájukkal segítették a dolgozatom elkészültét.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Oszlányi Réka PhD hallgatónak, mind szakmai mind baráti támogatásáért, valamint Kertész Katának, amiért a lelkemre beszélt a doktori befejezése kapcsán.

Végezetül köszönöm szüleimnek, Ormosy Péternek és barátaimnak a rengeteg támogatást, tanácsot és lelkesítést s hogy mellettem álltak a doktori éveim alatt valamint dolgozatom elkészítése idején.