

**Stressztoleranciát biztosító gének azonosítása**  
**a halofita *Lepidium crassifolium*-ból**

Ph.D értekezés

**Valkai Ildikó Anna**

Témavezető: Dr. Szabados László

Dr. Rigó Gábor

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológia Intézet

SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szeged 2018

# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
Génszimbólumok.....	6
<b>1.BEVEZETÉS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>11</b>
2.1 Abiotikus stresszhatások.....	11
2.1.2 A só- és szárazságstressz közös jellemzői.....	12
2.1.2.1 Az abszcizinsav szerepe és hatásmechanizmusa.....	15
2.1.2.2 Az abszcizinsav jelátvitel.....	17
2.1.3 A sóstressz sajátosságai.....	21
2.1.4. Szárazság és sóstressz hatása a fotoszintézisre.....	25
2.2 Halofiták (sótűrő növények) jellemzése, jelentőségük.....	29
2.3 Géntranszfer példák, szűrési rendszerek.....	31
2.3 Fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrési rendszerek.....	32
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>36</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>37</b>
4.1 Az indukálható <i>Lepidium</i> cDNS könyvtár elkészítése.....	37
4.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> növények transzformálása.....	38
4.3 Genetikai szűrés.....	38
4.4 Az inszertek azonosítása és plazmid konstrukciók elkészítése.....	39
4.5 A rozetta méretek meghatározása PlantSize szoftverrel.....	40
4.5.1 Üvegházi növények nevelése, stresszkezelése, jellemzése.....	40
4.6 Prolin tartalom meghatározása.....	41
4.7 Génkifejeződési szintek vizsgálata.....	41
4.8 TAIL-PCR technika ismertetése.....	42
<b>5. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>43</b>
5.1 Stressztolerancia alapú szűrési rendszer kidolgozása és használata.....	43
5.2 A fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrési rendszer kidolgozása.....	45
5.3 PlantSize szoftver kifejlesztése, a növények rozetta méretének monitorozása.....	49
5.4 A <i>Lepidium crassifolium</i> stressztoleranciájának jellemzése.....	52
5.5 A <i>Lepidium</i> cDNS könyvtárat tartalmazó <i>Arabidopsis</i> növények létrehozása.....	56
5.6 Stressztoleranciát biztosító gének azonosítása és klónozása.....	56
5.7 A PL542Na1-es só stressztoleráns vonal jellemzése.....	59

5.8 Az ozmotikus-stressztoleráns PL127P04-es vonal jellemzése.....	63
5.9 Ösztradiol független stressztoleráns vonalak azonosítása és jellemzése.....	66
<b>6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....</b>	<b>68</b>
<b>7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>72</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>73</b>
<b>9. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>94</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>97</b>
<b>11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....</b>	<b>100</b>
<b>12. FÜGGELÉK.....</b>	<b>101</b>

## Rövidítések jegyzéke

ABRE	Abscisic acid-Responsive promoter element
ABS	abszcizin sav
AD	Arbitrary Degenerate primer
ATP	adenozin-trifoszfát
bHLH	basic helix-loop-helix
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation Assay
BY-2	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2 csíranövények kalluszából készült sejt szuszpenzió
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
CAS	Ca <sup>2+</sup> érzékelő receptor (Ca <sup>2+</sup> -sensing receptor)
CCD	töltés-csatolt eszköz (Charge-coupled Device)
CH <sub>2</sub> O	szénhidrát
ChlF	klorofill fluoreszcencia
COS	Conditional cDNA Overexpression System
DNS	dezoxi-ribonuklein sav
DRE/CRT	Dehydration-Responsive Element
EC	a talaj elektromos vezetőképessége (Soil electrical conductivity)
EMS	etil metil szulfonát
ER	endoplazmatikus retikulum
EST	expressed sequence tag
F	egyensúlyi állapotban mért fluoreszcencia
F <sub>m</sub>	maximális fluoreszcencia
F <sub>v</sub>	változó fluoreszcencia
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	PSII maximális kvantum hatékonyság
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-protein kapcsolt receptorok (G protein coupled receptor)
GSH	glutation
H <sub>2</sub> A	redukálható elektron donor

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén peroxid
HSE	heat stress element promóter szakasz
IP <sub>3</sub>	inozitol (1,4,5,) trifoszfát
LB	Left border, a T-DNS bal oldali határoló szekvenciája
LEA	Late Embryogenesis Abundant fehérjék
LIF	laser-induced fluorescence
MPa	mega Pascal
mRNS	hírvivő ribonuklein sav (messenger RNA)
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NaHCO <sub>3</sub>	nátrium hidrogén karbonát
NPQ	nem fotokémiai kioltás (non-photochemical quenching)
ORF	nyílt leolvasási keret (open reading frame)
PAM	pulzus amplitúdó modulált (Pulse Amplitude Modulated)
PCR	polimeráz lánc reakció (Polymerase Chain Reaction)
PP2C	2C típusú foszfatáz
PSII	II fotokémiai rendszer (photosystem II)
Q <sub>A</sub>	plasztokinon a
RB-	T-DNS jobb oldali határoló szekvenciája
RNS	ribonuklein sav
ROS	reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
SNF1	Serine/threonine protein kinase
TAIL PCR	Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction
T-DNS	transzfer DNS
Φ <sub>PSII</sub>	PSII fotokémiájának relatív hatásfoka
XVE	transzkripciós aktivátor kiméra: LexA (X)/ VP16 (V)/ ösztrogén receptor regulátor régiója (E).

## **Génszimbólumok**

ABF3	ABA RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 3
ABI1	ABSCISIC ACID (ABA)-INSENSITIVE 1
ACBP2	ACETIL COENZYME A BINDING PROTEIN
ADOF1	ARABIDOPSIS DOF ZINC FINGER PROTEIN 1
APX1	ASCORBATE PEROXIDASE 1
ARC1	U-BOX/ARM-REPEAT- CONTAINING E3 LIGASE 1
AREB/ABF	ABRE-BINDING (AREB) PROTEINS
ATG2	AUTOPHAGY-SPECIFIC UBIQUITIN-LIKE PROTEIN 2
CAT1	CATALASE 1
CAS9	CRISPR ASSOCIATED ENDONUCLEASE 9
CBL4	CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 4
CHLH/GUN5/ABAR	MAGNESIUM-CHELATASE SUBUNIT H
CIPK24	CBL INTERACTING PROTEIN KINASE 24
COR413	COLD REGULATED 413 PLASMA MEMBRANE 1
DHAR	DEHYDROASCORBATE REDUCTASE
DIG1	DYNAMIC INFLUENCER OF GENE EXPRESSION 1
DREB	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING TRANSCRIPTION FACTOR
DREB2A	DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2A
ERD10	DEHYDRIN 10
ERF1	ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR
SOD	SUPEROXIDE DISMUTASE
GPX	GUAIACOL PEROXIDASE
GR	GLUTHATIONE REDUCTASE
GST	GLUTHATIONE S-TRANSFERASE
HDA6	HISTON DEACETYLASE 6
HKT	PLANT HIGH-AFFINITY POTASSIUM TRANSPORTER
HSFA2	HEAT SHOCK FACTOR A2

HSP	HEAT SHOCK PROTEIN
KAT1	POTASSIUM CHANNEL KAT1
KIN1	COLD AND ABA INDUCIBLE KINASE 1
LEA14	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 14
LTP3,4	NON-SPECIFIC LIPID-TRANSFER 3
MAPK	MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE
MCA	MID1 COMPLEMENTING ACTIVITY
MDHAR	MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE
MIP2	MAJOR INTRINSIC PROTEIN2
MPK1	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1
MKK3	MAPK PHOSPHATASE 3
MVP1/GOLD36/ERMO3	GDSL LIPASE/ACYLHYDROLASE SUPER FAMILY PROTEIN
NHX1	SODIUM HYDROGEN EXCHANGER 1
OST1	OPEN STOMATA 1
P5CS1	DELTA (1)-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE- SYNTHETASE 1
PAR1	PARAQUAT RESISTANT 1
PIP2E	PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2E
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE 2C
PUB9	PLANT U-BOX9 E3 LIGASE
PUT2	POLYAMINE UPTAKE TRANSPORTER 2
PYK10	BETA GLUCOSIDASE 23
PYR/PYL/RCAR	PYRABACTIN RESISTENT
RAB18	RAS RELATED PROTEIN 18
RBOHD	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D
RBOHF	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE F
RD20	DESICCATION RESPONSIVE 20
RSL1	RING/U BOX PROTEIN 1
SAP9	STRESS ASSOCIATED PROTEIN 9

SKIP1	SKI INTERACTING PROTEIN 1
SLAC1	SLOW ANION CHANNEL ASSOCIATED 1
SNRK1	SNF RELATED KINASE 1
SOD	SUPROXIDE DISMUTASE
SOS1	SALT OVERLAY SENSITIVE 1
VSP2	VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2
ZAT12	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 12



## 1. BEVEZETÉS

Napjainkban a globális klímaváltozás következményei egyre nyilvánvalóbbak. Az emberiség számára komoly kihívást jelent és a jövőben is jelenteni fog az éghajlat átalakulása és instabilitása miatt okozott problémák megoldása. A Föld felszínének 11 százaléka áll mezőgazdasági művelés alatt és ennek a területnek a 25 százaléka alacsony termőképességű (FAO jelentés 2011). A talajok sótartalmának növekedése, a túllöntözés következtében fellépő nagyfokú szikesedés problémája, a talaj erózió és a sivatagosodás napjainkban egyre nagyobb kihívások elé állítja az emberiséget. A szikesedés több mint 100 országot és globálisan 1 milliárd hektár földterületet veszélyeztet (FAO jelentés 2015) míg a termőterületek folyamatos leromlása csaknem a szárazföldi területek egyharmadát érinti (Jarraud és mtsai., 2005).

A növények számára a nem megfelelő körülményekhez való alkalmazkodás a fiziológiai és molekuláris folyamatok átprogramozásával jár és alapvető változásokat eredményez a génkifejeződési mintázatokban, az anyagcsere folyamatokban és a fehérje profilokban. A modell organizmusokon végzett kutatások számos olyan gént és szabályozó mechanizmust azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a stresszhatások érzékelésében és a válaszként megjelenő anyagcserefolyamatok változásában (Ahuja és mtsai., 2010). A stresszérzékeny modellfajok, mint az *Arabidopsis thaliana*, használatának korlátozó tényezője, hogy nem vizsgálhatóak extrém körülmények között. Az extremofil növények, a xerofiták (extrém szárazságtűrő) és a halofiták (extrém só-tűrő) olyan sivatagi körülmények között vagy magas só-tartalmú talajokon is képesek megélni ahol egy nem adaptálódott faj egyedei elpusztulnak. A halofiták az összes növényfaj 1 százalékát teszik ki és képesek hosszabb távon elviselni a talajban 50-250mM nátrium klorid koncentrációt is, míg egyes halofiták a 600mM sókoncentrációt is tolerálják (Flowers és Colmer, 2008). A halofiták fiziológiai folyamatait széleskörben kutatták de a molekuláris szabályozó mechanizmusok kevésbé ismertek. Az *Arabidopsis* só-toleráns rokonával az *Eutrema salsugineum*-mal (korábban *Thellungiella salsuginea*) számos összehasonlító elemzést végeztek, amelyekben a halofitizmus genetikai és molekuláris hátterét kutatták (Amtmann, 2009) és több halofita genomja is ismertté vált. Az extremofil fajok természetes genetikai változatossága vonzó genetikai forrás lehet a gazdasági növények változó környezeti tényezőkkel szembeni toleranciájának fejlesztésében (Nevo és Chen, 2010). A fajok közötti géntranszfert azonban az inkompatibilitás akadályozza. A genomikus vagy cDNS könyvtárak transzformációja képes a véletlenszerű génátvitelre a különböző fajok között. Példát találunk *E. salsugineum* cDNS

könyvtár (Du és mtsai., 2008), illetve bináris, bakteriális mesterséges *Eutrema* kromoszóma könyvtár (Wang és mtsai., 2010) kifejeztetésére *Arabidopsis*-ban. Mindkét esetben sikerült azonosítani olyan géneket amelyek az *Arabidopsis* sótűrő képességét javították.

Munkánk során a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett COS (Conditional cDNA Overexpression System) rendszer egy új változatát dolgoztuk ki. A COS rendszer segítségével lehetővé vált a gének véletlenszerű átvitele és irányított kifejeztetése *Arabidopsis*-ban. A rendszer alapja egy kémiaailag indukálható promóter rendszer (Papdi és mtsai., 2008; Rigó és mtsai., 2012). A cDNS könyvtárat egy kevésbé ismert fajból, a *Lepidium crassifolium*-ból készítettük, amely a *Brassicaceae* család tagja és természetes élőhelyei Közép-Európa és Ázsia sós, szikes talajú vidékei. Kutatómunkánk eredményeként bebizonyítottuk, hogy a *L. crassifolium* cDNS-ek szabályozott kifejeztetésével képesek voltunk az *Arabidopsis* növények só-, ozmotikus és oxidatív stressztűrését javítani. A COS rendszer alkalmas a fajok közötti génátvitelre és arra, hogy kevésbé ismert fajokból is értékes géneket azonosítsunk.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Abiotikus stresszhatások

A szárazság, a magas sótartalom, a szélsőségesen alacsony vagy magas hőmérséklet, a levegő ózon tartalma és az elárasztás mind olyan abiotikus stresszhatások, melyek csökkentik a növények növekedési ütemét, és a mezőgazdaságban termesztett növényeknél, a termésátlagot.

Napjainkban az aktuálisan elfogadott meghatározás szerint a stressz olyan fiziológiai állapot, amelyben a növények növekedése, fejlődése és szaporodása a környezeti terhelés miatt a genomban meghatározott lehetőségek alatt marad (Szigeti, 2003) A stresszhatásra adott biokémiai, fiziológiai és molekuláris választ meghatározza a stresszhatás intenzitása és időtartama, a növény faja és fejlődési állapota (Chaves és mtsai., 2002, Verslues és mtsai., 2006).

A megfelelő válasz kialakulásához elengedhetetlen a stressz felismerése. A érzékelést követő szakaszban különböző jelátviteli utak kapcsolódnak be és ennek eredményeképpen a növényben megváltozik a génkifejeződési mintázat, mely fejlődési és növekedési változásokat okoz, és a termésátlagot is befolyásolhatja. A stressz gyakorisága és időtartama határozza meg a válasz és a növény sérülésének mértékét.

Jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre arról, hogy a növények miképpen ismerik fel a stresszt. Élesztőben és baktériumokban is több olyan fehérjét azonosítottak, melyek fontos szerepet játszanak a megváltozott környezeti tényezők érzékelésében. Ezek növényi megfelelőit is sok esetben megtalálták, de szerepük a stressz felismerésben még nem bizonyított. Az ATHK1 a legismertebb ilyen érzékelő fehérje, ami egy membránon átnyúló hisztidin kináz, és ozmoszenzorként működik (Urao és mtsai., 1999). Ilyenek többek között az úgynevezett mechanoszenzitív csatorna fehérjék, melyek képesek a membránok felületén megváltozott ozmotikus nyomást érzékelni és arra reagálni, azzal, hogy szabályozzák az ozmolitok áramlását a membránokon keresztül (Haswell és Verslues, 2015). Az MCA (MID1 complementig activity) fehérje család tagjai feltehetően ilyen csatorna fehérjék és a kalcium ionok beáramlását indítják el mechanikai behatás vagy hiperozmotikus sokk hatására (Kurusu és mtsai., 2013).

A jeltovábbító rendszerek szintjén már több ismerettel rendelkezünk. Több független kutatócsoport is kimutatta, hogy bizonyos hormonok (abszcizinsav, jázmonsav, etilén) és a  $\text{Ca}^{2+}$  fontos másodlagos hírvivők (Devoto és Turner, 2003).

A stressz hatásaként bekövetkező génextpressziós változások következtében az adott génekről átíródó fehérjék mennyisége is megváltozhat a sejtekben. Napjainkban ezen típusú fehérjék kutatása kiemelkedő fontosságú. Ilyen fehérje például a szuperoxid dizmutáz (FeSOD), a glutation S-transzferáz (GST) vagy az aszkorbát peroxidáz (APX) enzim (Parvaiz, 2014).

A megváltozott génextpressziós mintázat mellett a másodlagos anyagcseretermékek szerepe is jelentős a növényi stresszválaszokban. Ezek olyan hidrophil szerves anyagok, melyeknek mennyisége megemelkedik a citoplazmában ha a növénynél vízhiányos állapot alakul ki. Részletesebben a következő fejezetben fogom ismertetni ezeket a vegyületeket.

### **2.1.2 A só- és szárazságstressz közös jellemzői**

Jelen fejezetben azokat a folyamatokat szeretném bemutatni, melyek jellemzőek mind a szárazság, mind a környezet megnövekedett sótartalma miatt bekövetkező változásokra a növényekben.

A két stresszhatásban közös pontként megemlíthető, hogy a stressz mértékétől függő folyadékvesztéssel jár. A sóstressz folyamán azonban a vízvesztésen kívül, ionikus stresszel is számolnia kell a növénynek. A megváltozott ionösszetétel, a sejt élettani folyamatait sokszor jobban károsítja, mint a szárazságstressz önmagában. Mindkét stressz hatására megjelennek a reaktív oxigén formák és károsító hatásuk is érvényesül. Sérülhetnek anyagcsere folyamatok, a sejtek szerkezete és a fotoszintetikus rendszer is. A legfontosabb stressz hormon, az abszcizinsav (ABS) által szabályozott jelátviteli utak is hasonló aktivitást mutatnak mindkét stressz esetében.

Amennyiben a növény vízigénye meghaladja a vízellátottságot, vízhiányról beszélünk. Ez kialakulhat csapadékmentes időszakokban, de olyan esetekben is, amikor megfelelő mennyiségű víz van a növény környezetében, de a felvétele akadályozott. Ilyen például, ha a talajban a megnövekedett só mennyisége akadályozza a gyökereket a vízfelvételben. Az alacsony hőmérséklet szintén okozhat vízhiányt. Fagypont alatt a talajban és a sejtek közötti térben jégkristályok formájában elérhetetlenné válhat a víz a növények számára (Buchanan és mtsai., 2015).

Vannak növények, melyek azonnal hervadással reagálnak a vízhiányra, míg más fajok képesek elviselni a megváltozott körülményeket turgoruk elvesztése nélkül. A növények és a talaj hidratáltsági állapotát a vízpotenciál értékkel ( $\Psi$ ) tudjuk jellemezni. Amikor a talaj víztartalma csökken akkor vízpotenciálja is csökken. Ahhoz, hogy a növény vizet tudjon felvenni a gyökérsejtekben, majd a levélben is, a vízpotenciált a talajénál alacsonyabbra kell állítania. Ez teszi lehetővé, hogy a víz a gyökérszövetbe áramoljon. Egy jól öntözött növény vízpotenciálja  $-0,2$ - $-0,6$  MPa, míg egy erősen vízhiányos növényben kialakulhat akár  $-2,0$ - $-6,0$  MPa-os érték is (Tari és mtsai., 2003).

A vízhiány a levélben vízpotenciál csökkenést eredményez, amely azonnali hatással van a sejtmeignyúlásra. A hajtásban lévő sejtek érzékenyebbek, mint a gyökérszövetek sejtjei, így a növekedésgátlás korábban bekövetkezhet a föld feletti szervek esetében (Saab és mtsai., 1990). Nagyobb mértékű vízhiánynál már a fotoszintézis, a sejtosztódás és a fehérjeszintézis is érintetté válik.

A növényi sejtek a vízhiányos állapot kompenzálására többek között úgy reagálnak, hogy növelik a citoplazmában egyes hidrophil szerves anyagok (ozmoprotektáns anyagok) mennyiségét. Ezzel eléri, hogy a sejt ozmotikus potenciálja és ezen keresztül a vízpotenciálja is csökkenjen, így továbbra is képesek a vízfelvétele. Ezek az oldható anyagok vagy más néven ozmolitok, igen sokfélék lehetnek (cukrok, cukoralkoholok, aminosavak, glicinbetain) és sokrétű feladatot látnak el (Buchanan és mtsai., 2015). A vízfelvétel mellett segítenek megőrizni a sejtben található fehérjék, makromolekulák és membránok szerkezetét, funkcióját, védve azok vízburkát. A sejt anyagcseréjét csak magas koncentrációban befolyásolják (Chen és Murata, 2002). Előállításuk és felhalmozódásuk sokféle lehet és fajonkénti mintázatot mutat. A prolin mint tipikus ozmolit például széles körben elterjedt a különböző fajokban (Szabados és Saviouré, 2010), míg a  $\beta$  alanin betain csak a *Plumbaginaceae* család néhány fajánál fordul elő (Buchanan és mtsai., 2015). Az ozmotikus stressz beindíthatja az ozmolitok szintézisét, megváltoztathatja az egyensúlyt az előállítás és a lebomlás között (például a prolin esetében), vagy elindíthatja lebontásukat a polimerizált formából a monomer formába (ez utóbbi a szénhidrátokra jellemző, keményítőből és fruktánból egyszerű cukrok, fruktóz vagy glükóz képződik). A stresszhatás megszűnésével a szénhidrátok repolimerizálódnak vagy végleg lebomlanak, és energiaforrásként hasznosulnak. (Buchanan és mtsai., 2015).

A plazmamembrán hatékony vízáteresztő rendszerrel is rendelkezik. Az aquaporinok a plazma membránba ágyazott, azon átnyúló vízcsatornák, amelyeken keresztül a vízáramlás gyors, így a sejtek hatékonyan tudják kompenzálni belső vízhiányukat (Kaldenhoff és mtsai., 1998). *Nicotiana excelsior*-ban ozmotikus stresszhatásra a levélszövet sejtjeiben bizonyos aquaporin génekről (NeMip2 és NeMip3) átíródó mRNS mennyisége megnő, és ezen gének expressziós mintázata összefüggést mutat a növény vízellátottságával (Yamada és mtsai., 1997).

Ozmotikus stresszhatás során különböző fehérjék is részt vesznek a sejtek védelmében. Ezek közül fontos megemlítenünk a LEA (late embryogenesis abundant) és a dajkafehérjéket vagy HSP (heat shock protein) fehérjéket. Ezek egyrészt erős hidrofilitásuk révén fejtik ki védő hatásukat, így őrizve meg a sejtek számára a vizet. Másrészt, mint molekuláris chaperonok védik a makromolekulákat és a membránokat a denaturációtól (Buchanan és mtsai., 2015). A hőszokk faktorok (HSF) olyan transzkripciós regulátor fehérjék, melyek számos gén aktivációját szabályozzák magas hőmérsékleti körülmények és más stresszhatások során. Az AtHSFA2 hőszokk faktor számos hőszokk fehérje és az APX1 (ASCORBATE PEROXIDASE 1) kifejeződési szintjét szabályozza (Li és mtsai., 2005). A HSFA4A pedig a ZAT12 és az APX1 expresszióját befolyásolja (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). *Arabidopsis*-ban a HSF géncsaládnak 21 tagja ismert, amelyek az általuk szabályozott gének promóter szakaszában előforduló hőstressz elemekhez (HSE- heat stressz element) kapcsolódnak. A hőszokk faktorok szerkezete konzervált, tartalmaz egy N terminális DNS kötő domént, mely felelős a HSE szakaszok felismerésért. Ehhez közel helyezkedik el a szintén konzervált, hidrofób heptád ismétlődő szakasz, mely a fehérjék di/trimerizációját szabályozza. Ez a transzkripciós szabályozó feladatuk ellátásának alapfeltétele (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

Korábban csoportunkban azonosították és jellemezték a HSFA4A hőszokk faktort, melynek ösztadiol függő túltermelésével sikerült fokozni az *Arabidopsis* növények só- és oxidatív stresszel szembeni toleranciáját (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

Az utóbbi évtizedekben számos kutatóhelyen azonosították és jellemezték azokat a géneket, amelyek részt vesznek ezekben a folyamatokban. Olyan géneket kerestek, melyek kapcsolódnak az oxidatív stresszel szembeni védekezéshez, a fehérje érési és lebomlási folyamatokhoz és a stressz során a különböző anyagcsere folyamatokban bekövetkező változásokhoz (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2006). Ezekről a génekről átíródó

fehérjék nem csak a tolerancia kialakításában, hanem más gének kifejeződésének szabályozásában és a stresszválaszhoz kapcsolt jelátviteli utakban is szerepet játszanak (Bartels és Sunkar, 2005). Microarray módszerrel történő transzkriptóm vizsgálattal számos olyan gént azonosítottak, melynek megnő a kifejeződési szintje szárazság hatására. A dehidratációra indukálódó génekről átíródó fehérjéket két csoportba oszthatjuk (Seki és mtsai., 2002). Az első csoportba azok a fehérjék tartoznak, melyeknek feladata a stresszhatást semlegesíteni. Ilyen fehérjék a chaperonok, LEA fehérjék, ozmotin, mRNS kötő fehérjék, az ozmolitok előállításához nélkülözhetetlen enzimek cukor és prolin bioszintézis, illetve transzport enzimek, detoxifikáló enzimek, a zsírsav anyagcsere enzimek, proteináz inhibitorok, ferritin és lipid transzfer fehérjék (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2006). Ezek közül egyesek (LEA, detoxifikáló enzimek génjei) felhasználásával olyan transzgenikus növényeket állítottak elő, melyek miután túltermelték az adott fehérjét, szárazsággal szembeni toleranciát mutattak (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2006). Ez alapján elmondhatjuk, hogy ezen fehérjéknek fontos szerepe van a növények stressztűrésében. A második csoport tagjai ezzel szemben, a stresszhatásra megváltozott génkifejeződés szabályozásában, ezen fehérjék aktivitásának módosításában játszanak szerepet. A jelátviteli utakban fontos fehérjék a különféle transzkripciós faktorok, kinázok, foszfatázok, foszfolipid anyagcsere enzimek, kalmodulin kötő fehérjék, 14-3-3 fehérjék (Golldack és mtsai., 2014). Bizonyos transzkripciós faktorok túltermeltetése szintén stressztoleranciát okozhat, bizonyítva a stresszválaszban betöltött szerepüket (Golldack és mtsai., 2014).

### **2.1.2.1 Az abszcizinsav szerepe és hatásmechanizmusa**

Az abszcizin sav (ABS) kis molekulású lipofil szeszkviterpén ( $C_{15}$ ) vegyület, az egyik legfontosabb növényi hormon. Vízhányos állapotban magasabb szinten termelődik a növényekben és fontos szerepe van a szárazságtolerancia kialakításában. Az ABS kutatások korai szakaszában a hormon mint „dormin” vagy „abszcizin” szerepelt, mivel elsősorban az áttelelő rügyekben és az éretlen gyapottermésben halmozódott fel és gátolta az auxin és az etilén által előidézett szervleválást (Pareek és mtsai., 2010). Később az is kiderült, hogy ezek a növények a mintagyűjtéskor vízhányos állapotban voltak és ez rávilágított ennek a hormonnak az igazi szerepére. További kutatások kiderítették, hogy nem csak a rövid távú szárazságstresszben, de a vízhánytal szembeni hosszú távú adaptációban is fontos az ABS szintje, a szövetek és szervek közötti transzportja. Fontos szerepe van továbbá bizonyos növényi patogének fertőzőképességének (virulencia) kialakításában is. Egyes kórokozók

(például a *Cercospora* spp. és a *B. cynerea*) képesek szintetizálni ABS-at, és ezzel befolyásolni a növény védekezését a gombafertőzéssel szemben (Asselbergh és mtsai., 2008).

Az ABS sokrétűen befolyásolja a növények fejlődését és növekedését. Vízhány hatására negyvenszeres ABS tartalom növekedés következik be a növény vegetatív szöveteiben és amint helyreáll a vízháztartás egyensúlya az ABS szintje is visszaesik a kiindulási pontra. Külsőleg alkalmazott ABS hatására a növényi gének 8-10 százaléka reagál expressziós szintű változással (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2006). Számos olyan gént ismerünk, amelyek az ABS-ra indukálódnak, közülük a legismertebbek a dehidratáció során felhalmozódó védő funkciójú fehérjéket kódolók, mint például a KIN1, KIN2, RD29B, LTP3, LTP4, ERD10, RD20, COR413, RAB18, P5CS1, LEA14, VSP2, egyes transzkripciós faktorok, kinázok és foszfatázok, mint az ABF3, ABI1, és az ABI2. Ismerünk olyan géneket is, melyek ABS-ra represszálódnak, például a WRKY (At2g38470), a ZAT10 (At2g28200) és az ADOF1 (At1g51700) transzkripciós faktorok (Huang és mtsai., 2008). Ugyanakkor olyan géneket is leírtak, amelyek a szárazságra és a hidegre is válaszolnak de ABS-val nem indukálható a kifejeződésük (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2005). Ez azt feltételezi, hogy lenniük kell ABS függő és az abszcizinsavtól független, szárazsághoz kapcsolható, génkifejeződést szabályozó jelátviteli utaknak is. Az ABS-al indukálható gének egy része egy úgynevezett ABRE (ABA-responsive element: PyACGTGGC) elemet tartalmaz a promóter régiójában. Az ABRE cisz DNS regulátorként működik az ABS által befolyásolt génexpressziós szabályozás során. Az *Arabidopsis* RD29B gén promóter szakasza két ABRE elemet is tartalmaz, ami szükséges a gén ABS általi indukációjához mind vegetatív szövetekben, mind a magban (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2006). Rizsben és *Arabidopsis*-ban az SnRK2 kinázok egy 10 tagú családot alkotnak, a család mindegyik tagja indukálódik hiperozmotikus stresszre és három tag ABS-ra is (Kulik és mtsai., 2011).

A sejtek külső felülete a sejtfa és a plazmamembrán lehetnek az elsődleges helyei az ozmotikus stressz érzékelésének. Erre utalhat többek között az, hogy az *abi8* (ABSCISIC ACID (ABA)-INSENSITIVE-8) mutáns növényekben az ABS nem tudja szabályozni a gének kifejeződését és ezekben a növényekben, a cukorérzékelés zavart szenved, nem megfelelő a sejtmelegnyúlás és a cellulóz bioszintézis sem. A szállító szövetek kialakulása és a gyökér osztódó szöveteiben az osztódás fenntartása is zavart szenved. Az ABI8-GFP fúziós fehérje sejten belüli lokalizációját vizsgálva *Arabidopsis* hipokotil sejtekben, főként a plazmamembránban, a sejtfaiban, a sejtmagban és pontszerűen a citoplazmában láttak fluoreszcens jelet (Wang és mtsai., 2015). A fehérje lokalizáció alapján az *abi8* kapcsol lehet a



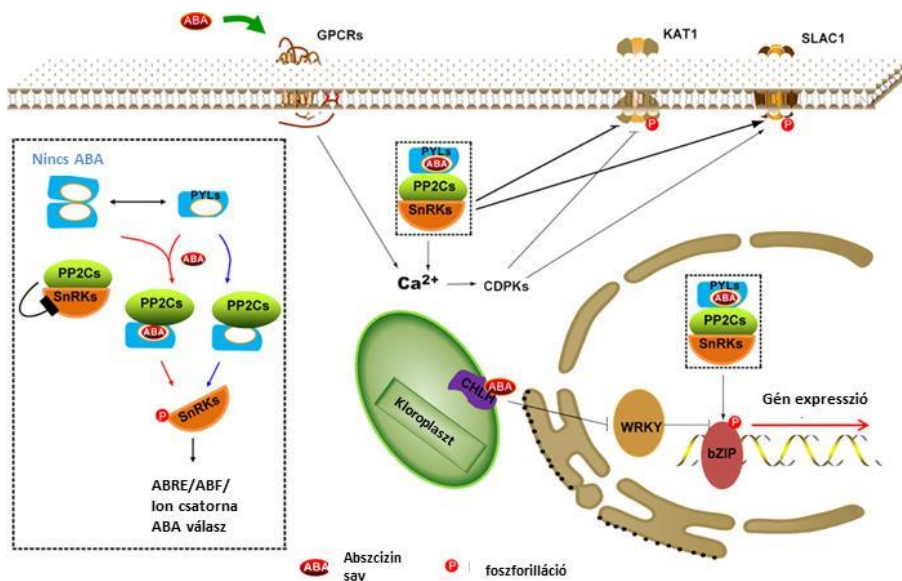
sejtfal, a sejtmembrán és az ABS jelátvitel között (Brocard-Gifford és mtsai., 2004). Az ABS egy glikozil transzferáz szerű fehérje, amely a sejtfalban a cellulóz bioszintézis szabályozásán keresztül hat (Wang és mtsai., 2015). Ez is azt támasztja alá, hogy a stresszérzékelés elsődleges helyei a sejtfal és a plazmamembrán lehetnek.

### 2.1.2.2 Az abszcizinsav jelátvitel

Más növényi hormonokhoz hasonlóan (gibberelin, auxin, brasszinoszteroid) az ABS is indukál különböző jelátviteli utakat, amelyeket a receptor fehérjék és az effektor molekulák (jelen esetben az ABS) közötti kölcsönhatás szabályoz (Hayashi és Kinoshita, 2014).

A legfontosabb ABS receptorok a sejtben a sejtmagi és citoplazmás lokalizációt egyaránt mutató PYR/PYL/RCAR (PYL) fehérjék. Kevésbé ismert receptorok a kloroplastban elhelyezkedő magnézium kelatáz H alegysége (CHLH/GUN5/ABAR) és egy, a plazmamembránban elhelyezkedő GPCR típusú G fehérje (1. ábra) (Miyakawa és mtsai., 2013). Központi szignál elem a PYL, PPC2 és SnRK2 fehérjékből álló komplex és annak szubsztrátjai, melyek a génexpressziót (hosszú ABS jelút) és a sztóma mozgásokat (rövid ABS jelút) szabályozzák (1. ábra). Az ABS a citoplazmában hozzákapcsolódik a PYR/PYL/RCAR (PYL) receptor család tagjaihoz. A kapcsolódás következtében az ABS stabilizálja a PYL-ek és a 2C típusú foszfatázok (PP2C) közötti fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Az abszcizinsav úgy viselkedik ebben a folyamatban, mint egy alloszterikus ligand, amely konformációs változást hoz létre a PYL receptoron így aktivizálva azt. Az aktiv PYL fehérje hozzákapcsolódik a PP2C-hez, így inaktiválva azt (Hayashi és Kinoshita, 2014). A felszabadult SnRK fehérje autofoszforillálódik és aktivál bizonyos ABS-ra válaszoló transzkripciós faktorokat (bZIP), amelyek azután génexpressziós változásokat indukálnak (Zhang és mtsai., 2015). A rövid jelút részeként az SnRK -k a SLAC1 (Slow Anion Channel-associated 1) fehérjén keresztül a kation csatornákat, a KAT1-en (Potassium Channel in *Arabidopsis thaliana*) keresztül pedig a sztómák záródását indukálják (1. ábra) (Zhang és mtsai., 2015). Ez a jelátviteli út blokkolva van, amikor az ABS szintje alacsony a sejtben, mert ekkor a PP2C-k, a PYL gátló hatásának hiányában, az SNF1 típusú kinázokat defoszforillált állapotban tartják. Soma és munkatársai (2017) arról számolnak be, hogy feltárták az I-es típusú SnRk-k (amelyek nem reagálnak az ABS szintek változására) szabályozásának új típusát, ahol a Varicose nevű mRNS sapka eltávolítását aktiváló fehérjével együtt a mRNS-ek lebontását szabályozzák ozmotikus stresszhatás alatt. A

különböző stresszkezelések következtében bekövetkező RNS mennyiségi és lokalizációs változások a kutatások új, rendkívül izgalmas területe, amely a növényi reakciók még komplexebb képét mutatják.



1. ábra Az abszcizinsav által szabályozott jelátviteli út (Zhang és mtsai., 2015

[.http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00088/full](http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00088/full))

A másodlagos jelátviteli rendszer komponenseinek azonosításához a gázcserenyílások sztóma zárósejtjeinek ABS által szabályozott záródási mechanizmusát tanulmányozták modellrendszerként. Az ABS szint megemelkedésével összefüggésben megnőtt a foszfolipidek, a kalcium, a nitrogén monoxid (NO) és a reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species: ROS) mennyisége a sejtekben (Pareek és mtsai., 2010). Ezek a molekulák mint lehetséges másodlagos jeltovábbító elemek működhetnek az ABS által szabályozott folyamatokban.

A citoszolikus kalcium ionok koncentrációját több különböző jelátviteli út szabályozza, többek között az ABS is (Tang és mtsai., 2007). A növényekben ez a kalcium szint diurnális oszcillációt mutat és összefügg a sejteken kívüli, külső kalcium ionok, mennyiségével. A kapcsolat a külső és belső kalcium ion mennyiségek összehangolásában a CAS (Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor) Ca<sup>2+</sup> érzékelő receptor (Tang és mtsai., 2007). A CAS receptor közvetlenül az inozitol (1,4,5,) trifoszfát (IP<sub>3</sub>) mennyiségét szabályozza. Amikor az inozitol (1,4,5,) trifoszfát (IP<sub>3</sub>), szintje megemelkedik, akkor az endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> raktáraiból Ca<sup>2+</sup> ionok szabadulnak fel, és ezek aktiválják a vakuoláris kalcium csatornákat is

(Han és mtsai., 2003). Ez az ABS hatására bezáródó sztóma záró sejtek csukódásának egyik kulcslépése (Takahasi és mtsai., 2001).

Az ABS úgy is ismert, mint a  $H_2O_2$  felhalmozódás előidézője, és ezen keresztül a ROS jelátviteli út aktiválója. A ROS-ok által szabályozott folyamatokat úgy kell elképzelni, mint egy csomópontot a sejtben, ahol több különböző jeltovábbító rendszer fut össze. A ROS felhalmozódáshoz NADPH-ra van szükség, mely a NADPH oxidáz szerepére utal ezekben a folyamatokban (Kwak és mtsai., 2003). A sztóma zárósejtekben mindkét, NADPH oxidázt kódoló gén kifejeződési szintje magas és ABS-ra még jobban megemelkedik. Dupla mutáns növényekben a NADPH oxidáz katalitikus alegységeinek (*AtrbohD* és *AtrbohF* gének) egyidejű hiánya, blokkolja az abszcizinsav indukálta sztóma záródást és ROS felhalmozódást (Kwak és mtsai., 2003). A *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* négyszeres ABS receptor mutáns *Arabidopsis* növényekben megszűnt a reaktív oxigén gyökök mennyiségének ABS függő megemelkedése. A sztóma zárósejteknek szükségük volt külsődleges ROS forrásra (hidrogén peroxid) ahhoz, hogy a  $Ca^{2+}$  csatornák aktiválódjanak, és megtörténjen a zárósejtek záródása. Ez is bizonyítja, hogy a PYR/PYL/RCAR receptorok az ABS-al együtt aktiválják a plazmamembránok kalcium csatornáit, és ROS függő jelátviteli utakon keresztül, váltják ki a sztómák záródását (Wang és mtsai., 2013).

Ma már széleskörűen elfogadott tény, hogy a nitrogén monoxid (NO) is jeltovábbító molekulaként működik a növényi sejtekben. A külsőleg adott NO sztómazáródást idéz elő a növényeknél és az ABS megemelkedett szintje NO felhalmozódást okoz a sejtekben. Ez a felhalmozódás  $H_2O_2$  függést mutat (Bright és mtsai., 2006).

Számos bizonyítékát találták annak, hogy a reverzibilis fehérje foszforillációnak fontos szabályozó szerepe van a stresszválaszokban. Árpa protoplastok esetében az ABS kezelést pár perccel követte a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválódása (Knetsch és mtsai., 1996). Lúdfüben 20 MAPK ismert és négy fő csoportba sorolták őket (Colcombet és Hirt, 2008). Az ABS aktiválja az AtMPK1-et, AtMPK2-öt és az AtMPK3-at (Hwa és Yang, 2008). Hwa és Yang által előállított AtMPK1, AtMPK2 illetve az AtMKK3 túltermelő növényeknek nőtt az ABS érzékenysége és ezzel párhuzamosan a transzgenikus növények só- és szárazságtűrése is (Hwa és Yang, 2008).

Az abszcizinsav az antioxidáns enzimeken alapuló védekezési mechanizmus aktiválója is, amely szorosan kapcsolódik a ROS-ok semlegesítéséhez. Oxidatív stressz során a katalázok kulcsszerepet játszanak a ROS-ok semlegesítésében (Mittler és mtsai., 2004). A

MAPK foszfatázok a MAPK-ok negatív szabályozói. *Arabidopsis* esetében az oxidatív stressz aktiválja az MAPK foszfatáz 3-at (AtMPK3) és az AtMPK6-ot (Kovtun és mtsai., 2000). Az AtMPK6 túltermelő növényekben megemelkedik a kataláz1 (CAT1) gén kifejeződési szintje ABS függő módon (Kovtun és mtsai., 2000). További kapcsolódási pontja az ABS által szabályozott jelátviteli utaknak a MAPK foszfatáz 1 (AtMPK1), amely egy kalciumkötő fehérje és foszfatáz aktivitását a kalmodulin  $Ca^{2+}$  függő módon aktiválja (Lee és mtsai., 2008).

Az ABS által aktivált kinázok közül fontos megemlíteni az SnRK2 csoportba tartozó OST1/SRK2E/SnRK2.6 kinázt. *Arabidopsis*-ban és rizsben ez a fehérje család 10 tagú. Az SnRK2 a gázcsere nyílások zárósejtjeinek mozgásának szabályozásában tölt be fontos szerepet. Ezek a kinázok sóra, ABS-ra és vízhiányos állapotra is aktiválódnak. A hármas funkcióvesztéses mutáns növényben, melyben nem működik sem a SnRK2.2, sem a 2.3, sem a 2.6-os kináz, már komoly növekedéssel eltérések tapasztalhatóak (Fujii és Zhu, 2009). Ezen kívül a csírázásban, a sztóma záródásban és a gyökérnövekedés szabályozásában is hasonló eltéréseket tapasztalhatunk. Abszcizinsav hiányában a már korábban említett PYL fehérjékkel kölcsönható 2C típusú foszfatázok (PP2C) defoszforillálják és ez által gátolják a három SnRK2 fehérjét. A só- illetve szárazságstressz hatására termelődő ABS hatására a PP2C fehérjék inaktiválódnak a PYR/PYL/RCAR (PYL) komplexen keresztül, az SnRK2 fehérjék pedig a gátlás alól kikerülve, foszforillációval aktiválnak bizonyos transzkripciós faktorokat, többek között az AREB/ABF-eket (ABRE-binding (AREB) proteins vagy ABRE-binding factors (ABFs)) (Nakashima és mtsai., 2009). Az AREB/ABF-ek bZIP típusú transzkripciós faktorok, amelyek aktivált állapotban hozzákapcsolódnak a célgénjeik ABRE (abscisic acid-responsive) promóter szekvencia elemeihez és elindítják a génátíródást (Nakashima és mtsai., 2009).

*Arabidopsis*-ban meg kell még említenünk a DREB (Dehydration-responsive element binding transcription factor) transzkripciós faktorok közül a DREB2A-t, amely az AP2/ERF fehérjecsalád tagja. A DREB2A az ABS-hoz és ezen keresztül a só- és szárazságstresszhez köthető feladatát a célgének promótereinek DRE/CRT (dehydration-responsive element) cisz elemeihez való kötődésen keresztül látja el. A DREB2A célgénjei fontosak a stresszválaszok kialakításában. Ilyen gének többek között a LEA fehérjék, a hősokk fehérjék és faktorok és az RD29 is. Az RD29 egy kiszáradásra, sóra, hidegre és ABS-ra indukálódó gén (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1993). Az RD29 gén promóterében talált két ABRE típusú cisz szekvencia elem jelentette az első lépést az ABS-hoz kapcsolható transzkripciós szabályozó

elemek meghatározása során. Az RD29 gén átíródási szabályozása arra utal, hogy az ABRE és a DRE/CRT cisz elemekhez köthető transzkripciós faktorok között kölcsönhatások állhatnak fenn (Nakashima és mtsai., 2009). A közelmúltban Song és munkatársai erre találtak bizonyítékot, amikor meghatározták az általuk vizsgált 27 ABS-ra aktiválódó transzkripciós faktor közötti hierarchiát. Az általuk használt kromatin immunoprecipitációs szekvenálás technológiával egy új transzkripciós faktor családot (DIG, Dynamic Influencer of Gene expression 1) is sikerült azonosítaniuk (Song és mtsai., 2016). Ezek a transzkripciós regulátorok az abszcizinsavhoz és sóérzékenységhez kapcsolódóan fejtik ki hatásukat. Túltermelésük (DIG1, DIG2) lúdfüben ABS és sóérzékenységet okoz (Song és mtsai., 2016).

Az ubiquitináció és a proteozómán keresztül történő fehérjelebomlás egy élettanilag nélkülözhetetlen folyamat a növényi sejtekben is. Az ABS-hoz kapcsolt szabályozásban fontos szerepe van az ubiquitinációnak és a hozzá hasonló szumoilációnak is. Az ubiquitináció folyamatának komponensei az ubiquitin E3 ligáz, egyes F box fehérjék, és a proteozóma különböző alegységei, amik nélkülözhetetlen részei az ABS-hoz kapcsolt és egyéb stresszválaszoknak. Az AtPUB9 (Plant U-Box9 E3 ligáz) lokalizációja ABS kezelés hatására megváltozik dohány BY-2 sejtek plazmamembránjában, de csak akkor ha együtt fejeztették ki az ARC1 kináz (U-box/ARM-repeat-containing E3 ligase) aktív kináz doménjével (ARK1). *ARK1* és *AtPUB9* kettős mutánsban pedig megváltozott a magvak ABS érzékenysége a csírázás során (Samuel és mtsai., 2008). Az RSL1 E3 ubiquitin ligáz kölcsönhat a PYL4 és a PYR1 ABS receptor fehérjékkel a plazmamembránban. Az RSL1 fehérje megnövekedett mennyisége csökkenti az ABS érzékenységet, míg az RNS interferenciával előállított növényekben a géncsalád több tagja is alacsonyabb kifejeződést mutat és megnő a növények ABS érzékenysége (Bueso és mtsai., 2014).

A szárazságstressz folyamán a kromatin szerkezet is átalakul. A vízvesztés hatására a növényekben a glikolitikus anyagcsereút átkapcsol acetát szintézisbe, annak érdekében, hogy a jázmonsav jelút aktiválásával válaszoljon a növény a stresszre. *Arabidopsis*-ban ennek a folyamatnak a legfontosabb szabályozó eleme a Histon Deacetylase 6 (HDA6) fehérje, ami ki-be kapcsolja az említett anyagcsereutakat (Kim és mtsai., 2017).

### 2.1.3 A sóstressz sajátosságai

A szikes talajok, melyek Magyarországon is megtalálhatóak, jellemzője a vízben oldható sók magas koncentrációja. Ezek a sók többnyire a nátrium klorid (NaCl) és a nátrium szulfát, (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), emellett kalcium illetve magnézium klorid és különböző karbonát

vegyületek is előfordulnak. A  $\text{NaHCO}_3$ -nak köszönhetően  $\text{Na}^+$  ionokban erősen gazdag, magas pH-jú (10-11), kötött agyagos talajú, mezőgazdasági művelés szempontjából értéktelen szikes területek a szikes szolonyec és szoloncsák (a felszín közelében magas nátrium ion-koncentrációjú) talajok. Szeged-Sziksósfürdő környékén is található ilyen talaj, melynek magas a  $\text{NaHCO}_3$  tartalma és ehhez magas pH (pH:11) érték társul (Rigó Gábor saját adat). Akkor beszélünk szikes talajról ha a talaj elektromos vezetőképessége, EC értéke, 4dS/m vagy több. Ez az érték 40mM NaCl tartalomnak felel meg és 0,2MPa ozmotikus nyomásnak. Ezek az értékek bizonyos érzékeny növényfajoknál, mint a rizs és a lúdfű, már okozhatnak növekedésgátlást és terméskiesést is (Munns és Tester, 2008).

A NaCl a leggyakrabban előforduló és a legjobban oldódó só, ezért minden növény képes szabályozni a mennyiségét a sejteken belül. Jellemző, hogy a növények a vízfelvétel során kiválasztják a gyökéren keresztül a talajba.

Amikor a sóstressz élettani hatásait vizsgáljuk fontos elkülöníteni a talaj sótartalma miatt akadályozott vízfelvételből eredő ozmotikus stresszt, amely időben ugyan korábban jelentkezik, de a növények számára már ez is toxikus. Az ozmotikus stressz következtében először csökken a növények növekedési üteme, míg a második, lassabb szakaszban, a levélszövetben megnövekszik a sótartalom, ami az idősebb levelek elhalását eredményezi (Munns és Tester, 2008). Az ozmotikus stressz nagyobb mértékben csökkenti a növekedési ütemet, mint a később fellépő ionikus stressz. A legtöbb fajnál a  $\text{Na}^+$  hamarabb eléri a toxikus koncentrációt mint a klorid ion, és a legtöbb tanulmány ezért a  $\text{Na}^+$  vizsgálatára koncentrál. Vannak bizonyos fajok (szója, citrusfélék, szőlő), melyeknél viszont a  $\text{Cl}^-$  bizonyul mérgezőbbnek (Munns és Tester, 2008). A megfigyelések szerint, 100 mM  $\text{Na}^+$  koncentráció felett bizonyos enzimek működése gátlódik (Munns és mtsai., 2006). Azok az enzimek, melyeknek a működéséhez szükség van  $\text{K}^+$ -ra különösen érzékenyek a magas  $\text{Na}^+$  tartalomra, vagy a magas  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  arányra. A sóhoz tartósan hozzászokott növényeknél megfigyelték, hogy az aminosav, nitrogén, szénhidrát és poliol anyagcsere utak elsődleges anyagcsere termékeinek a mennyisége megnőtt. Ezek az anyagok az ozmotikus egyensúly beállításában, a fehérjék és membránok védelmében, illetve a ROS-ok és az ammónium ionok, semlegesítésében fontosak (Chaves és mtsai., 2009).

A sótolerancia három típusát különböztetjük meg. Az első az ozmotikus stressz tolerancia, amely következtében a növény képes megőrizni növekedési ütemét a talaj limitált nedvességtartalma mellett is. A második típusú tolerancia a  $\text{Na}^+$  kiválasztásán alapul, vannak

fajok, melyek nagyfokú hatékonysággal képesek nátrium iont a gyökereiken keresztül kiválasztani, így akadályozva meg, hogy az a levelekben felhalmozódjon. Amennyiben ez a folyamat nem működik, az az idősebb levelek elhalásához vezet. A tolerancia harmadik típusa az úgynevezett szöveti tolerancia, amely a toxikus anyagok elkülönítésén alapul a mezofillum sejtekben (a sót a vakuolumokba raktározzák) (Munns és Tester, 2008). A különböző toleranciák működésének hatékonyságát sok tényező befolyásolja, úgy, mint a sóstressznek kitettség időtartama, a só koncentrációja, a helyi környezeti viszonyok, a talaj nedvességtartalma, a levegő páratartalma, a transzspirációs ráta és a levél vízpotenciálja (Munns és Tester, 2008). A gyökér által érzékelt sóstressz olyan folyamatokat is indukál, amelyek a hajtásban is változásokat idéznek elő és az ABS szabályozása alatt állnak. Ez szintén alátámasztja, hogy a szárazság és a sóstressz mechanizmusai hasonlóak. A gyökérsejtek érzékelik először a megnövekedett  $\text{Na}^+$  koncentrációt. A növény reakciója során a gyökér igyekszik fenntartani működőképességét és jelzést küld a hajtásban lévő sejtek felé is.

A gyökérben az egyik közelmúltban azonosított folyamat, a sóstresszel kapcsolatban, az autofágia. Luo és munkatársai megállapították, hogy pár perccel a sókezelés után autofagoszómák jelentek meg az *Arabidopsis* gyökér sejtekben. Az autofágiában fontos *atg2* és *atg7* (autophagy-specific ubiquitin-like proteins (UBLs)) fehérjéket nem kifejező növényekben ez a válasz elmaradt és a növények só- illetve ozmotikus stressz érzékenysége megnőtt. Elmondható, hogy az autofágikus folyamatok közreműködnek az adaptációban és a gyökér kéreg sejtek központi vakuolumaiban a  $\text{Na}^+$  ionok kiválasztásához is szükségesek (Luo és mtsai., 2017).

A növények pár másodperc alatt közvetlen és specifikus válaszokat adnak a megnövekedett, külső  $\text{Na}^+$  koncentrációra (Tracy és mtsai., 2008). Az első mérhető változás a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjában következik be. A plazmamembránból és a tonoplastból  $\text{Ca}^{2+}$  áramlik a citoszolba, ez a koncentráció változás meglehetősen komplex folyamat és az egyik legfontosabb eszköze a növényi sejtnek, amellyel a külső környezetben bekövetkező  $\text{Na}^+$  tartalom változásokat követni tudja. A komplexitást jelzi, hogy lúdfű gyökereiben az endodermiszben és a periciklusban más a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  áramlás és felhalmozódás dinamikája és mértéke (Kiegle és mtsai., 2000). Az egyik legrészletesebben jellemzett  $\text{Ca}^{2+}$  felhalmozódással járó folyamat során a külső  $\text{Na}^+$  koncentráció emelkedést feltehetően a CBL4 (calcineurin B-like protein 4) érzékeli, melyet korábban SOS3-ként (salt overlay sensitive3) is azonosítottak (Zhu és mtsai., 1998, Munns és Tester, 2008). A CBL4

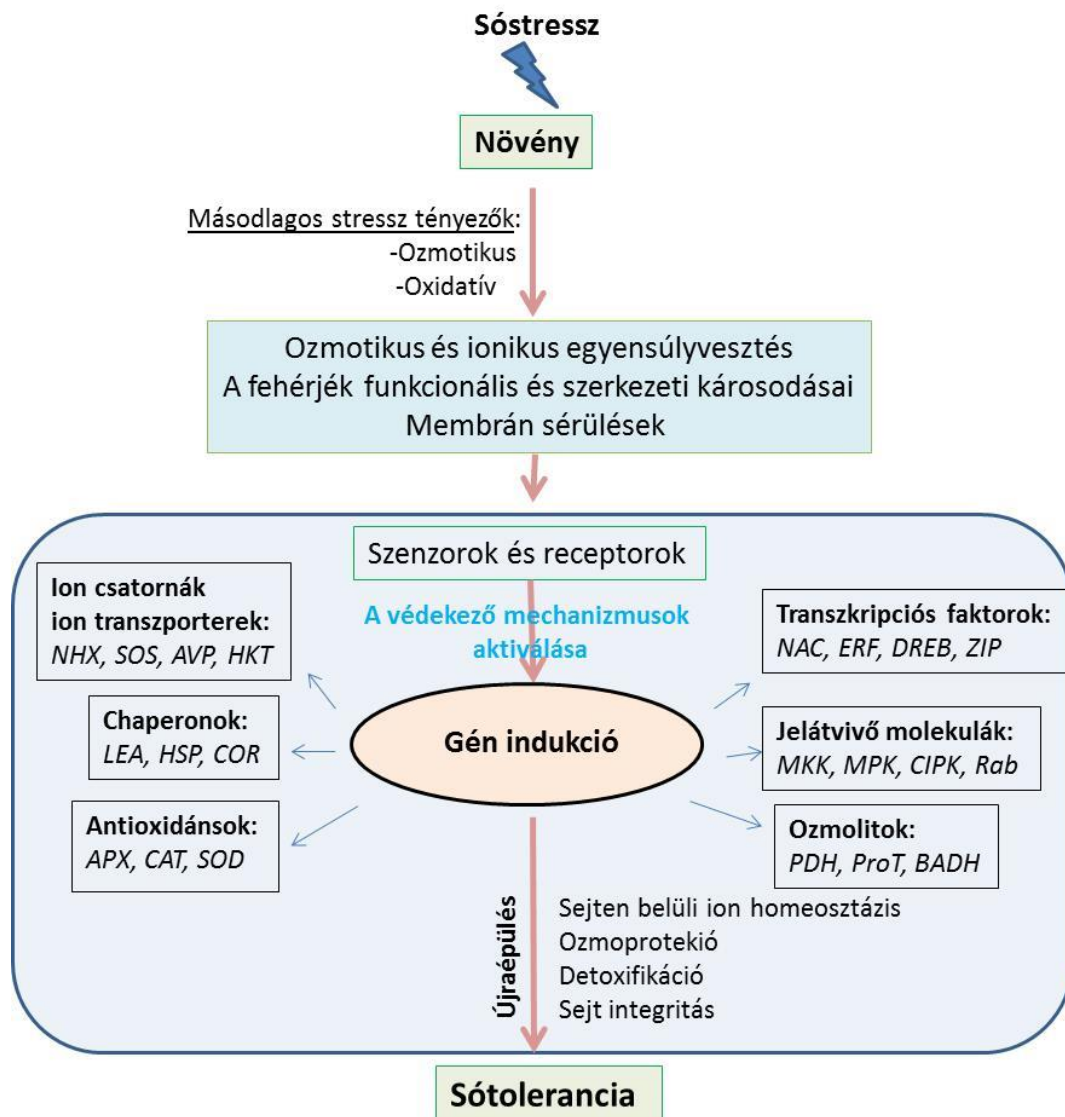
kalciumkötő képessége ugyan nem igazolt, de a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációnövekedés együtt jár a CBL4 dimerizálódásával és azzal, hogy kölcsönhatásba lép a CIPK24 (CBL interacting protein kinase 24) kinázzal, amely azonos a SOS2-vel (salt overlay sensitive 2) (Halfter és mtsai., 2000). A CBL4/CIPK24 komplex egy mirisztóil lipid láncsal kikötődik a plazmamembránhoz. A lokalizációban bekövetkező változás lehetővé teszi a membránkötött  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS1 fehérje foszforillációját (Munns és Tester, 2008, Hanin és mtsai., 2016).

A sóstresszhez kapcsolódó transzkripció szintű szabályozás azonosított komponensei közül, számosra jellemző, hogy nem csak a sóstresszben, hanem a szárazságstresszhez kapcsolódó folyamatokban is regulátorként működhetnek (Munns és Tester, 2008). Ilyen transzkripció faktor az AtSKIP1 (Ski-interacting protein), amelynek expressziója emelkedést mutat mannitol, só és abszcizinsav kezelésre, túltermelése pedig, a növények számára, sótoleranciát biztosít (Lim és mtsai., 2010). Paradicsomban 2011-ben azonosították Lu és munkatársai a SIERF1 (*Solanum lycopersicon* Ethylene-responsive factor1) gént, amelynek túltermelése következtében a paradicsom csíranövények gyökérfejlődése kevésbé gátlódott 150mM NaCl tartalmú táptalajon. SIERF1 túltermelés hatására megnőtt a növények szabad prolin és oldott cukor tartalma, valamint a *LEA*, *P5CS* és a *DREB3-1* stresszindukált géneknek megemelkedett a kifejeződési szintje (Lu és mtsai., 2011). Rasmussen és munkatársai 2003-ban megjelent tanulmányában, 10 *Arabidopsis* ökotípusban végzett komplex génexpressziós változásokról számoltak be különböző kombinált stresszkezelések hatására. Az abiotikus stresszkezelés modulban a sókezelést önmagában alkalmazták illetve kombinálva magas intenzitású fényvel vagy hővel. A transzkripció faktorok közül 24 esetében találtak változást, pl. DREB4A (Dehydration-responsive element binding transcription factor) cink ujj és bHLH (basic helix-loop-helix) típusú faktorok esetében, melyek zömében a gyökér, a levél és az internódiumok fejlődését szabályozzák (Rasmussen és mtsai., 2013).

A génexpressziós változások mellett meg kell említeni az RNS érési mechanizmusokat, az RNS splicing szintén megváltozhat a növények sóstresszre adott reakciói során. Az *Arabidopsis* genom intront tartalmazó gèneinek 49%-a alternatív formában érhet a sóstressz hatására. Az alternatív splicing mértéke szignifikánsan megnőtt a sóstressz hatására, ugyanakkor az alternatívan érő gének kifejeződési szintje sok esetben nem változott, amely arra utalhat, hogy az alternatív érés a szabályozó mechanizmusok egy újabb rétege a sóstresszre adott válasz folyamatokban (Ding és mtsai., 2014).



A sótolerancia kialakulásának folyamatát a 2. ábrán szemléltetem Mishra és Tanna alapján (Mishra és Tanna, 2017).

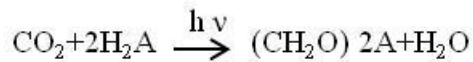


2. ábra A sótolerancia kialakulása (Mishra és Tanna, 2017).

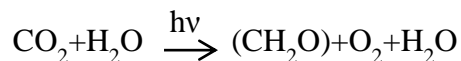
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5435751/figure/F1/> )

#### 2.1.4. Szárazság- és sóstressz hatása a fotoszintézisre

A fotoszintetizáló élő szervezetek a fényenergiát alakítják át stabil, kémiai vegyületekké. A fotoszintézis egy biológiai oxidáción és redukción (redox) alapuló folyamat, amit az alábbi egyenlettel lehet szemléltetni:



A fenti egyenletben a  $\text{CO}_2$  mint elektron akceptor szerepel, a  $\text{H}_2\text{A}$  pedig bármilyen olyan vegyületet jelölhet, amely redukálódva elektron donorként szolgál. A  $(\text{CH}_2\text{O})$  jelöli azt a szénhidrátot, amely a  $\text{CO}_2$  redukciója során keletkezett és az A pedig a  $\text{H}_2\text{A}$  oxidációjából keletkező terméket. Az oxigéntermelő fotoszintézis esetében a víz redukálódik ( $\text{H}_2\text{O}$ ). A folyamat eredménye  $\text{O}_2$ , víz és szénhidrát.



Az oxigén termelő fotoszintézis a cianobaktériumok evolúciós újítása volt és ez eredményezte az  $\text{O}_2$  felhalmozódását a Föld légterében 2 milliárd évvel ezelőtt. Az 1950-es és 60-as években fedezték fel, hogy izolált kloroplasztok képesek voltak a  $\text{CO}_2$ -t szénhidráttá alakítani fény jelenlétében (Buchanan és mtsai., 2015). Azt is feltárták, hogy a fotoszintézisnek két fázisa van, a fényreakció, amelynek eredménye az  $\text{O}_2$ , az ATP és a NADPH, illetve a karbon reakció (Calvin-Benson ciklus), amely során a  $\text{CO}_2$  redukálódik szénhidráttá. Ebben a második szakaszban használódik fel az ATP és NADPH, amely a fényszakaszban termelődött (Buchanan és mtsai., 2015).

A fotoszintézis kimagasló jelentőséggel bír és a földi élet alapjául szolgál. A magasabb rendű növények ennek a folyamatnak a segítségével építik fel testüket és működtetik az élettani folyamataikat. A különböző stresszhatások során rendkívül fontos a növények számára a fotoszintetikus mechanizmusok fenntartása és működtetése. A fotoszintetikus folyamatokat jellemző paraméterek megváltozása már komoly károsodásokról és a növények számára igen erős stresszhatásokról árulkodnak. Ezeknek a paramétereknek a megváltozása mögött komplex folyamatok állnak. A szárazság során sérülnek a különböző anyagcsere és fiziológiás folyamatok, melyek hatásaként megfigyelhető a növekedési ütem, a szövetek klorofill és víz tartalmának csökkenése, és a fluoreszcencia paraméterek megváltozása. A tápanyagok felvétele szintén mérséklődik a csökkent transzpiráció következményeként. A fent említett folyamatok nagy része érinti a növények fotoszintetikus aktivitását is (Colom és Vazzana, 2003, Souza és mtsai., 2004, Nayyar és Gupta, 2006). Több tanulmány is azt mutatja, hogy a szárazságstressz alatt bekövetkező fotoszintetikus aktivitás csökkenés mögött a sztómák záródása által limitált folyamatok állnak (Shangguan és mtsai.,

1999). Az egyik legkorábbi válasz a vízhiányra a sztómák záródása, amely lehetővé teszi a növény számára a transzspiráció és ezen keresztül a vízveszteség csökkentését, de ugyanakkor a CO<sub>2</sub> felvételét is gátolja, és ezzel a fotoszintézis aktivitását is csökkenti (Nayyar és Gupta, 2006). Ezen kívül a CO<sub>2</sub> felvétel csökkenése előmozdíthatja az egyensúly felbomlását a II fotokémiai rendszer (photosystem II, PSII) aktivitása és a Calvin-Benson ciklus elektron igénye között. Ez az megkötött, gerjesztett energia túlzott felhalmozódásához vezethet és sérüléseket okozhat a PSII reakció centrumaiban (Foyer és Noctor, 2000, Baker és Rosenqvist, 2004). Ezek a károsodások egyrészt a PSII vízbontásért felelős komplexében (Lu, és Zhang, 1999) másrészt a D1 fehérje degradációján keresztül a PSII reakciócentrumában jelentkeznek (Cornic, 2000). Feltételezések szerint a károsodások mind visszavezethetőek a reaktív oxigén fajták (ROS-reactive oxygen species) keletkezésére és felhalmozódására a PSII-ben (Nishiyama és mtsai., 2006). A növények sokféle védekező mechanizmust fejlesztettek ki, hogy megakadályozzák a ROS-ok felhalmozódásából eredő károsodásokat. Ilyen védekező reakciójuk a feleslegben elnyelt energia kisugárzása hő formájában (úgynevezett disszipáció) illetve, a fénysugárzással szembeni védekezésésként, pigmentek (karotenoidok és antocianinok) szintézise (Pietrini és mtsai., 2002). A keletkezett ROS-ok semlegesítésének két fő útja ismert. Az enzimatis detoxifikáció, melyben számos enzim SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), APX (ascorbate peroxidase), GPX (guaiacol peroxidase), GR (glutathione reductase), MDHAR (monodehydroascorbate reductase), és a DHAR (dehydroascorbate reductase) vesz részt (Kaushik és Roychoudhury, 2014). A nem enzimatis semlegesítésben az aszkorbin sav, a redukált glutation (GSH),  $\alpha$ -tokoferol, a már említett karotenoidok, flavonoidok és a prolin játszik fontos szerepet (Kaushik és Roychoudhury, 2014).

A fotoszintézis válasza a sóstresszre meglehetősen komplex, a korlátozó tényezők mind a sejtek mind a szervek szintjén is hatnak, és időben is nagy változatosságot mutatnak. A választ befolyásolja a stressz intenzitása, időtartama és gyakorisága, a levél életkora (az idősebb levelek több sót akumulálnak, mint a fiatalabbak) és, hogy melyik növényfajról van szó (Flexas és mtsai., 2004).

Amennyiben a szárazság- és sóstressz fokozatosan éri a növényt az a fotoszintézis szempontjából hasonló folyamatokat eredményez. A sztómák nyitottságának korlátozásán keresztül befolyásolják a CO<sub>2</sub> diffúzióját a kloroplasztba és a mezofillumon keresztüli CO<sub>2</sub> transzportot, amely megváltoztatja a levelek fotokémiáját és szén metabolizmusát (Chaves és mtsai., 2009). A mezofillum konduktanciájának változása mögött elképzelhető, hogy a

levelek fonnyadásával párhuzamosan a sejt közötti tér szerkezeti változásai állnak (Lawlor és Cornic, 2002). A mezofillumban a CO<sub>2</sub> diffúziójának útjában a levél morfológiai és anatómiai sajátosságai állnak, melyek nem változnak a stressz alatt. Ezzel ellentétben Genty és munkatársai bizonyították, hogy a belső ellenállás nagy része a lipid fázisban van, a sejten belül, és nem a sejt közötti térben (Genty és mtsai., 1998). Ezt erősíti meg Flexas és munkatársainak a munkája, amiben azt találták, hogy a sztóma konduktancia pár perccel a vízvesztés kezdete után csökken és ABS kezeléssel visszaállítható az eredeti szintre (Flexas és mtsai., 2006). Valószínű, hogy a sztóma konduktanciát biokémiai folyamatok is szabályozzák az anatómiai sajátosságok mellett. Gyakran előfordul, hogy a levélfelületre vetített fotoszintetikus aktivitás nem változik a só kezelés során a lecsökkent sztóma konduktancia ellenére sem (James és mtsai., 2002). Ennek a látszólagos ellentmondásnak a hátterében az a korábban már említett jelenség áll, hogy a fonnyadó levelekben a vízvesztés miatt a kloroplasztok denzitása megnő (sűrűbben helyezkednek el).

A fotoszintézis csökkent intenzitása előidézi a ROS-ok képződését és a detoxifikáló enzimek megnövekedett aktivitását is. Amikor a növények alkalmazkodnak a megváltozott környezeti tényezőkhez, akkor megváltozik a levélmorfológiájuk, a pigment összetételük és azok a biokémiai folyamataik, melyek megvédik a fotoszintetikus rendszereket az oxidatív károsodásoktól. Amennyiben a növény nem képes kezelni a stresszhatásokat fotoinhibíció következik be, melynek során a PSII-ben szerkezeti változások figyelhetők meg. A D1 fehérje leválik a komplexről és szintézise gátlódik a ROS-ok felhalmozódásának következtében, továbbá a különböző javító (repair) mechanizmusok is sérülnek (Nishiyama és Murata, 2014). A két folyamat, amely megakadályozza a fotoinhibíciót, a xantofill pigmentek hő kibocsájtása és az oxigén használata elektron akceptorként a víz helyett. Ez utóbbi folyamatban szükség van a ROS-ok szintjét szabályozó enzimek, mint például a szuperoxid dizmutáz, aszkorbát peroxidáz, kataláz és különböző peroxidázok aktivitásának növelésére (Apel és Hirt, 2004). Ezeknek az enzimeknek az összehangolt működése kell ahhoz, hogy a különböző sejt kompartmentumokban kialakuljon az egyensúly a képződő és a semlegesített ROS-ok között és a hidrogén-peroxid tartalom is a sejt számára megfelelő szinten maradjon. Ez a ROS semlegesítő rendszer normál körülmények között is jelen van a kloroplasztokban és arra hivatott, hogy megőrizze a fotokémiai rendszereket az esetlegesen hirtelen bekövetkező fotoinhibíciótól, amit a fényintenzitás gyors növekedése idézne elő (Apel és Hirt, 2004).

A sótoleranciában megfigyelhető genetikai különbségek nem következnek szükségszerűen a ROS semlegesítő képességekből. Az irodalomban számos közlemény

számol be megváltozott antioxidáns enzim aktivitásról és ez bizonyos esetekben toleránsabb, más esetekben viszont érzékenyebb genotípussal párosul. Feltételezhető, hogy az antioxidáns kapacitásbeli különbségek az egyes fenotípusok között a különböző mértékű sztóma záródással együtt hatnak és így alakítják ki a növény fotoinhibícióval szembeni védekezőképességét (Munns és Tester, 2008).

Yamaguchi Shinozaki és kutatócsoportja komplex transzkripciós és metabolit profilt készített olyan rizs növényekről, amelyek szigorúan kontrollát körülmények között 3 féle moderált és egy erős szárazságstressznek voltak kitéve (Yamaguchi Shinozaki és mtsai., 2017). Megfigyeléseik alapján elmondható, hogy a fotoszintézishez köthető gének (fény szakaszhoz és a Calvin-Benson ciklushoz) kifejeződésének csökkenése csak erős szárazságstressz jelenlétében volt megfigyelhető. A szénhidrát anyagcseréhez köthető gének magasszintű kifejeződése, már alacsonyabb szintű, még moderált stressznél is megváltozott, a cukorbontás és a keményítő szintézis fokozódott, míg erős szárazság esetén már az érintett gének nagy részének expressziója is csökkent (Yamaguchi Shinozaki és mtsai., 2017). Az adatok elemzéséből kiderült, hogy van egy kritikus időszak amikor a szénhidrát anyagcsere megváltozik és bizonyos metabolitok, köztük ozmolitok, felhalmozódása figyelhető meg, ekkor a fotoszintézis gátlódik és a hajtásnövekedés üteme is visszaesik. A növekedési ütem csökkenése maga is okozhatja ezt a szénhidrát metabolit feldúsulást, ami a további száraz időszak során raktárként is funkcionálhat (Yamaguchi Shinozaki és mtsai., 2017).

## **2.2 Halofiták (sótűrő növények) jellemzése, jelentőségük**

A halofiták jellemzően a magas sótartalmú talajokon élő növények és képesek megélni extrém körülmények mellett is. A tudományos irodalomban több módon is csoportosították őket, ezek közül az egyik Grigore és Toma nevéhez fűződik, akik megkülönböztetnek extrém és mezo halofitákat (Mishra és Tanna, 2017). Az extrém halofita csoportba tartozó fajok egyedei kiválóan alkalmazkodtak és kizárólag sós környezetben élnek, de képesek túlélni akkor is ha a környezetükben időlegesen alacsonyabb só koncentráció alakul ki. Ebbe a csoportba tartoznak a *Chenopodiaceae* (az *Amaranthaceae* is) család fajai és a szukkulens növények (*Salicornia*, *Suaeda*, *Halimione*, *Petrosimonia*) (Mishra és Tanna, 2017). A mezo halofiták nem elsősorban a sós élőhelyeket kedvelik de ha szükséges képesek ott is megélni, ide tartoznak a *Atriplex*, *Bassia* és *Camphorosma* fajok egyedei. Flowers és munkatársai az alapján csoportosították a halofita fajokat, hogy képesek-e 200mM sókoncentráció felett befejezni az életciklusukat (Flowers és Colmer 2008). További javaslatok a csoportosítás

alapjára a fajok természetes élőhelyei vagy a hajtás kémiai összetétele illetve, hogy a növények, hogyan választják ki a számukra káros ionokat. (Flowers és Colmer 2008).

A halofiták adaptációját két stratégia határozza meg, a tolerancia és az elkerülés. A tolerancia kialakításánál három mechanizmust különböztetünk meg, (1) a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és a  $\text{Cl}^-$  ionok szabályozott felvételét, (2) a kompartmentalizációt és (3) a felvett só ionok hatékony kiválasztását (Flowers és mtsai., 2008). A kiválasztást igen sokrétűen oldják meg a növények, a gyökéren vagy a hajtáson keresztül. Előfordul, hogy a kiválasztott magas sótartalmú oldat kikristályosodik a növény felszínén. Az elkerülési folyamatok során a felvett folyadékmennyiség és só minimalizálásával (szukkulencia), az árnyékolással (a növény a felvett sót az idősebb, árnyékolt levelekben halmozza fel) és a só kiválasztásával igyekszik a növény elkerülni a só bejutását illetve felhalmozódását (Flowers és Colmer 2008, Mishra és Tanna, 2017).

A halofitákban meglévő előnyös tulajdonságok kutatását nehezíti az a tény, hogy nincs általánosan használt halofita modell növény faj. Az *Eutrema salsugineum* és a *E. parvula* az *Arabidopsis* igen közeli rokonai, melyek talán a legalkalmasabbak erre a célra. Az *Arabidopsis* egy glikofita, vagyis nem sótűrő növény, amiről elmondható, hogy 100mM NaCl koncentráció mellett már nem képes befejezni az életciklusát, míg az *Eutrema* fajok növekedésére ez a NaCl koncentráció nincs hatással (Flowers és Colmer., 2008). Az *Eutrema*, mint modell növény, több előnyös tulajdonsággal is rendelkezik. Ma már elérhető olyan EMS mutáns, amely rövid életciklusú, nem igényel vernalizációt a virágzás indukcióhoz, megrendelhetőek különböző inszerciós mutánsok, EST klónok és teljes hosszúságú cDNS könyvtár is. A *E. parvula* és *E. salsugineum* teljes genomja ismert és hozzáférhető. A virágszerkezetük szintén hasonló az *Arabidopsis*-hoz ezért könnyen transzformálhatóak *Agrobacterium* mediált, virág bemeztési módszerrel (thellungiella.org).

A  $\text{Na}^+$  kiválasztása, kompartmentalizációja a vakuolumokba és a felvétel megakadályozása a sejtek szintjén a legfontosabb eszközei a növényeknek (Kronzucker és Britto, 2011). A glikofitákból származó transzporterek (NHX, SOS1, HKT) túltermelése, konstitutív promóterrel 150-250 mM koncentrációig biztosította a sótoleranciát gazdasági növényekben, míg a halofitákból származó homológokkal a tolerancia küszöb 400mM sókoncentrációra emelkedett (Kronzucker és Britto, 2011). Példa erre az NHX1 vakuoláris  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gén. Az *Artiplex gmelini*-ből származó AgNHX1 75%-os szekvencia homológiát mutatott az *Arabidopsis* AtNHX1-el és magasabb só koncentráció mellett is (3-

400mM) toleranciát biztosított a rizs növények számára (Ohta és mtsa., 2002). Egyes gének fajoként eltérő kifejeződési szintjei is eredményezhetnek toleranciát. Erre példák az antiporter SOS1, NHX1 és HKT1 gének, melyek *Eutrema*-ban a rizshez képest magasabb szinten expresszálódnak (Taji és mtsai., 2010). Hasonló eltéréseket tapasztaltak

Az ALSAP (*Aeluropus littoralis* stressz-associált protein) stressz asszociált fehérje túlermelletése dohányban, búzában és rizsben is növelte a sótűrést és a kutatók bizonyították, hogy a gén különböző abiotikus stresszre indukálódik még rizs homológja az OsSAP9 csak alacsony és magas hőmérsékletre (Ben-Saad és mtsai., 2015).

Az eddig elért kutatási eredmények alapján a halofiták megfelelő génforrásokként szolgálhatnak a gazdaságilag fontos növényfajok stressztűrésének javításában (Mishra és Tanna, 2017).

### **2.3 Géntranszfer példák, szűrési rendszerek**

A stressztűrésben szerepet játszó ma ismert gének többségét genetikai szűrések sorozatával azonosították. A kísérletekben használt növényfajok többnyire a laboratóriumokban használt modell növények voltak (*Arabidopsis*, rizs, dohány), de az így kapott eredmények más, gazdaságilag jelentős haszonnövény szempontjából is előremutató és hasznosítható adatokkal szolgáltak.

A genetikai analízishez szükséges genetikai variabilitást a természetes sokféleség mellett mesterségesen, különböző mutagenizálási eljárásokkal lehet elérni. Az előállított mutáns növényeket fizikai behatással (gamma-sugárzás), kémiai kezeléssel (pl. etil-metil-szulfonát, EMS), T-DNS vagy más inszerciós mutagenézissel hozták létre. Ezeknek a mutagenézis kísérleteknek köszönhetően számos olyan mutáns növényt azonosítottak, amelyek segítettek megismernünk többek között a stressztolerancia kialakulásában szerepet játszó gének szerepét és hatásmechanizmusát is (Weigel és Glazebrook, 2002).

A SOS mutáns (*sos1*, *sos2*, *sos3*) növényeket EMS kezeléssel állították elő, amely az egyik legelterjedtebb mutáns előállító módszer. A szűrést a sókezelés hatására fokozottan csökkent gyökérnövekedést mutató növényekre végezték (Liu és mtsa., 2000). A SOS fehérjék által alkotott jelátviteli utat, amely a  $K^+/Na^+$  homeosztázis fenntartója a sejtekben mint a sótolerancia fő szabályozóját írták le (Matrinez-Atienza és mtsai., 2007).

Az inszerciós mutagenézis szintén elterjedt és nagyszámú mutáns növény előállítására alkalmas módszer. A módszer előnye, hogy a beépülési helyet PCR alapú technikával pontosan azonosítani lehet. Az inszert lehet egy transzpozon (kukorica Ds/As transzpozon) vagy az *Agrobacterium tumefaciens* transzfer DNS-e (T-DNS) (Koncz és mtsai., 1992). Ezeknek a T-DNS-eknek a hossza több ezer bázispár és segítségével főleg *Arabidopsis* és rizs növényekből állították elő mutáns vonalak ezreit. Egy 250 ezer független inszerciós vonalból álló gyűjteményből közel 200 olyan gént azonosítottak, melyek ozmotikus vagy sóstresszhez kapcsolódó fenotípusos eltérést mutattak (Koiwa és mtsai., 2006). A T-DNS-el létrehozott mutánsok többsége funkcióvesztéses mutáns, de funkció-nyeréses mutánsok is előállíthatóak. Ha a T-DNS promótert vagy enhancer elemet tartalmaz, ezt nevezzük aktivációs taggingnek, melynek hatására a beépülési hely közelében található gének kifejeződési szintje megemelkedik, és ez okoz fenotípusos eltéréseket (Weigel és mtsai., 2000). A T-DNS beépülése a genomba nem specifikus és majdnem teljesen véletlenszerű (Szabados és mtsai., 2000). A legújabb CRISPR/Cas9 genom szerkesztési eljárás már célzott genom módosítást tesz lehetővé (Belhaj és mtsai., 2015).

Az irodalomban a fajok közötti génátvitelre is találunk példát. Hirotaka és munkatársai 2015-ben *Eutrema salsugineum*-ban olyan teljes hosszúságú cDNS-eket kerestek amelyek az *Eutrema*-ban stressz hatására indukálódnak vagy kontroll körülmények között is magasabb szinten fejeződnek ki, mint az *Arabidopsis*-ban. Így azonosították a CSP41b-t gént, amely egy kloroplasztban lokalizálódó RNS kötő fehérjét kódol és *Arabidopsis*-ban hiánya kisebb, halványzöld rozetta fenotípust eredményez. A mutáns növények kloroplasztjai alaki eltéréseket mutatnak és a fotoszintézis hatékonysága is csökken. Mind az *Arabidopsis* mind az *Eutrema* CSP41b túltermelése növelte a növények hő és sótoleranciáját (Hirotaka és mtsai., 2015). Wang és munkatársai, 2010-ben ismertett kutatásukban, *Eutrema* bináris, bakteriális, mesterséges *Eutrema* kromoszóma könyvtár klónokkal transzformáltak *Arabidopsis* növényeket és keresték a sótűrő egyedeket. Átlagosan 200 vonalból azonosítottak egy megemelkedett sótűrést mutató növényt. A toleranciáért felelős lókuszt nem határozták meg pontosan, de beazonosították a inszertet és igazolták, hogy az *Eutrema* genom szakasz áll a tolerancia hátterében (Wang és mtsai., 2010).

## **2.4 Fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrési rendszerek**

A klorofill a fluoreszcencia ugyan csak 2-4 százaléka a növény által visszavert sugárzásnak, de fontos információt hordoz a fotoszintetikus apparátus, különösen a kettes



fotokémiai rendszer működéséről (Baker, 2008). Jól használható paraméterré teszi az, hogy mértéke megváltozik mind biotikus, mind abiotikus stressz hatására. A klorofill a mellett a levél számos más komponense is képes fluoreszcens jelet kibocsájtani (ferulasav és más fenolos vegyületek, NADP(H), flavonoidok). Ezek egy része a felső epidermisz sejtekben is előfordul, de emissziós mintázatuk elkülöníthető a klorofill a-tól (Mishra és mtsai., 2016). A klorofill fluoreszcencia (ChlF) maximuma ~685 nm-nél van (vörös tartomány) és emellett mérhető egy távoli vörös komponens is, 730 és 740nm között (Lichtenthaler és mtsai., 2005). A vörös és távoli vörös hullámhosszon mért sugárzás hányadosa ( $F_{685}/F_{735}$ ) csökken a klorofill tartalom emelkedésével, mert a vörös sugárzást reabszorbeálja a klorofill, míg a távoli vöröset nem. A klorofill a fluoreszcencia időben dinamikusan változik és így lehetővé válik különböző molekuláris mechanizmusok vizsgálata (Ruban, 2016). Számos közepes áteresztő képességű rendszer áll már a kutatók rendelkezésére, amely képes monitorozni a növények ChlF értékeit. A PSII maximális hatásfoka az egyik legszélesebb körben vizsgált paraméter, amelyet a változó és a maximális fluoreszcencia értékek hányadosaként ( $F_v/F_m$ ) adnak meg (Lichtenthaler és mtsai., 2005). Ez a paraméter megmutatja, hogy a PSII által megkötött fényenergia milyen maximális hatékonysággal képes redukálni a plasztokinon a-t ( $Q_A$ ), az elektron transzportlánc első tagját (Baker, 2008). További fluorszcenciából számolt paraméterek is vannak, melyek sokkal érzékenyebben követik a növény fiziológia állapotát. Ezek közül a nem fotokémiai kioltást (NPQ-non-photochemical quenching) kell megemlítenünk, melyet az  $(F_m - F_m')/F_m'$  képlettel számítunk ki, ahol az  $F_m'$  a fényadaptált maximális fluoreszcencia. Az NPQ a ciklikus elektron transzport folyamatokat jellemző érték. Fő komponense a hő kibocsájtás, amely révén a növény igyekszik kioltani a PSII által megkötött, de a lineáris elektron transzportban nem hasznosuló többlet energiát. További összetevői a zeaxantin-violoxantin pigment arányok változása, a fotoszintetikus membránok két oldalának pH különbségeinek alakulása és ezen keresztül az ATP szintézis. Általánosan használt paraméter a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ) is, melyet a Genty és munkatársai által 1998-ban meghatározott képlettel lehet számolni:  $(F_m' - F)/F_m'$ , ahol az F a mérés során alkalmazott telítési fényimpulzus alatt mért fluorszcencia értékek átlaga (Genty és mtsai., 1998). Ezzel a paraméterrel a PSII által megkötött fényenergiának a maximális hatásfokát tudjuk megadni a  $Q_A$  redukációjában, adott fényintenzitáson (Baker, 2008). Az F érték vagy más néven az egyensúlyi állapotban mért fluoreszcencia szintén igen érzékeny paraméter, amely a növény fiziológiájában bekövetkező változásokat követi (Mishra és mtsai., 2012). Meg kell említeni továbbá a klorofill a fluoreszcencia korai, gyors, tranzienst változásainak követését (OJIP görbék felvétele) amik a PSII fotokémiai rendszer

hatékonyságának monitorozását teszik lehetővé a stresszkezelések során. A svájci Reto Strasser és munkatársai dolgozták ki az elméleti hátterét és alkalmazási lehetőségeit a JIP tesztnek a növény fiziológiában (Mishra és mtsai., 2012). Az OJIP görbék értékei alapján számos index és paraméter számítható, melyek információt adnak a PSII elektron akceptor molekuláinak redukciós dinamikájáról és az elektron transzport lánc redukáltsági állapotáról is (Marques da Silva, 2016). A WALZ fluoriméter (<http://www.walz.com>) a pulzus amplitúdó modulált (PAM) fluoreszcenciát méri, és lehetővé teszi az effektív és a potenciális kvantum hatékonyság, az elektron transzport ráta és a nem fotokémiai kioltás mérését a kettes fotokémiai rendszer esetében, de nem képes OJIP görbék felvételére. A kép alapú PAM mérés (imaging PAM) lehetővé teszi a sejtek szintjétől (mikroszkóp PAM) egészen a teljes növényekig az egyidejű mérést, továbbá szabadföldi körülmények között egész növénypopulációk is monitorozhatóak. A hagyományos és a kép alapú mérési módszerek más eljárással érzékelik a fluoreszcens jelet (fotodióda vs. CCD), ezért a kapott értékek összevetésénél ezt figyelembe kell venni. A kép alapú mérés mindazonáltal olyan hatékony eljárás, amely félautomata mérési rendszerekben is használható és megnyitotta a lehetőségét a nagy áteresztő képességű növénymonitorozó és szűrő rendszerek kiépítésének (Marques da Silva, 2016). Ezeket a rendszereket több cég is kidolgozta és forgalmazza, többek között a PSI (Csehország, Brnó, <http://plantphenotyping.com> ) és a Lemnatech (Németország, Aachen, <http://www.lemnatec.com/> ).

A LIF (laser-induced fluorescence) vagy lézer indukált fluoreszcencia mérési módszer a szabadföldi méréseknél alkalmazható, akár drónokról vagy repülőgépekről is mérhető vele nagy kiterjedésű növényfelület. Használatával megbecsülhető az anyagcsere alakulása egy adott időperiódus alatt. A technika alkalmazásával megkülönböztethetjük a növényfajokat egymástól, detektálhatjuk a kalcium hiányt, a gomba és bakteriális fertőzéseket, a vízellátottság mértékét, a fényviszonyok alakulását, a légszennyezés hatásait és a növények ammónium nitrát és nikkellátottságát (Marques da Silva, 2016). Az 1. táblázatban a különböző mérési módszerek összehasonlítása és az elérhető platformok láthatóak Marques da Silva, 2016 nyomán. további információ az IPPN (International Plant Phenotyping Network) oldalán <https://www.plant-phenotyping.org/> található.

1. Táblázat Fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrési rendszerek (Marques da Silva, 2016)

Technológia	Lehetőségek	Hátrányok	Felhasználó által fejlesztett platform	Cég által fejlesztett platform
JIP teszt	-nagyon gyors technika, -jól kidolgozott módszer, -alacsony áteresztő képességű fenotipizáláshoz.	-sötétadaptáció szükséges, -a detektort a növényre kell helyezni,	IPK* (Lemna Tech modul)	Lemna Tech
LIF	-közép hatótávolságú távirányítható szenzor, -szabadföldi mérésekre alkalmas, -a kvantumhatékonyság számolható vele.	-a kapott fluoreszcens spektrum kevésbé informatív, mint a variábilis fluoresz., -kevesbé használt modellnövények esetében.	JPPC**	Nincs.
Hagyományos PAM	-nagyon informatív, -fiziológiai értelmezés jól kidolgozott.	-a legtöbb protokoll sötét adaptációt igényel, -szűk áteresztő képesség.	Nincs.	PlantScreen (Photon System Instrument)
Imaging PAM	-egy autotróf felületen a heterogenitást mérhetjük, -ismételhető, nagy áteresztőképességű rendszerekbe integrálható.	-a legtöbb protokoll sötét adaptációt igényel, -drága és érzékeny detektor.	JPPC M3P*** MTA SZBK, Szeged	PlantScreen (Photon System Instrument)

\*IPK- Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research

\*\* JPPC- Jülich Plant Phenotyping Centre

\*\*\* M3P- INRA—Montpellier Plant Phenotyping Platforms (PHENOPSIS)

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja az volt, hogy egy stressztűrő növényfajból olyan géneket vigyünk át egy stresszérzékeny fajba, amelyek növelik annak különböző stresszkezelésekkel szembeni toleranciáját. Az *Arabidopsis thaliana* glikofita, azaz sóérzékeny faj és széles körben elterjedt modell organizmusa a növénybiológiai kutatásoknak, jól jellemzett genetikával, ezért ezt a fajt választottuk célnövénynek. Stressztűrő fajként génforrásnak a régióinkban is őshonos halofitát, a *Lepidium crassifolium*-ot, sziki zsászt választottuk. Keresztes virágúként a lúdfüvel rokon faj, és az extrém magas sótartalmú szikes talajokon is jól érzi magát. Megvalósítandó feladataink voltak:

-Olyan szabályozható módon működő random *Lepidium* cDNS könyvtár elkészítése amely alkalmas, a gének átvitelére és kifejeztetésére *Arabidopsis*-ban.

-Az ozmotikus, ionikus és oxidatív stressztolerancia mérésére alkalmas, rozetta növekedésen és fotoszintetikus paramétereken alapuló, Petri csészés szűrési rendszer kidolgozása.

-A magasabb stressztűrő képességgel rendelkező növényekben kifejeződő *Lepidium* gének azonosítása, izolálása.

-A kiválasztott *Lepidium* gének klónozása, a stressztűrést javító tulajdonságok igazolása a független transzgenikus *Arabidopsis* vonalak segítségével.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Az indukálható *Lepidium* cDNS könyvtár készítése

A cDNS könyvtár készítésekor a laboratóriumunkban már korábban alkalmazott módszert követtük (Papdi és mtsai., 2008, Rigó és mtsai., 2012). Az összRNS tisztításhoz Petri-csészében és üvegházban nőtt *Lepidium crassifolium* növények leveleit és gyökereit gyűjtöttük be. A Petri-csészében nőtt növényeket 200mM NaCl-al kezeltük 30 percig, 5 vagy 72 óráig. A növények egy részét nyitott csészében a laborasztalon hagytuk száradni 3 órán keresztül majd az összegyűjtést követően folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk. A 6 hetes üvegházban nevelt növényeket kezelésenként 250mM NaCl-al öntöttük vagy 10 illetve 20 nap vízmegvonást alkalmaztunk stresszkezelésként. A gyökér és levélmintákból az összRNS-t külön tisztítottuk RNeasy kittel (Qiagen, Valencia, CA, USA). A kapott RNS oldatokat 100 $\mu$ g/ $\mu$ l-es koncentrációra hígítottuk és mindegyik mintából 1 $\mu$ l-t azaz 100 $\mu$ g-ot pipettáztunk össze egy Eppendorf csőbe. Egy éjszakán át liofilizáltuk az így kapott oldatot, majd másnap 1 ml vízben feloldottuk és mRNS tisztítottunk belőle.

A cDNS átírását SuperScript Full Length cDNA Library Construction kittel (Invitrogen, Cat.No.:A11406, Carlsbad, CA, USA) végeztük, amely a Gateway klónozási rendszert alkalmazza. A elsődleges könyvtár a pDONR222 vektorban készült el és  $1,7 \times 10^7$  egyedi telepet kaptunk. A következő lépésben a cDNS klónokat a pTCES vektorba építettük be Gateway LR klonáz reakcióval. A pTCES vektort (Függelék 1. ábra) mi állítottuk elő speciálisan ehhez a projekthez. A céljainknak megfelelő vektort pGSC1700 alapú bináris vektorból állítottuk elő (Cornelissen és Vandewiele, 1989). A vektor növényi szelekciós markere a bar gén, amely lehetővé teszi a gyorsabb, egyszerűbb növény szelektálást és emellett tartalmaz egy a csoportunkban korábban már alkalmazott ösztadiol indukciós rendszert is (XVE, optimalizált kodonokkal). A kialakított plazmid vector egy transzkripció aktivátor kimérát tartalmaz, az XVE-t, amely tartalmazza a LexA bakteriális represszor DNS kötő doménjét (X), a VP16 transzaktivációs domént (V) és a humán ösztrogén receptor regulátor régióját (E, ER). Az XVE faktor transzaktiváló hatása erősen ösztrogén függő (Zuo és mtsai., 2000), a kifejeződését a mi módosított rendszerünkben a P35S2 Cab22L konstitutív promóter szabályozza.

A DNS plazmid preparátumot a kapott  $1,3 \times 10^6$  kolóniából tisztítottuk majd elektroporációval a GV3101/pMP90 *Agrobacterium* törzsbe transzformáltuk (Koncz és mtsai., 1994). A transzformálás után  $1,7 \times 10^6$  kolóniát kaptunk. A sejteket 30% glicerint tartalmazó folyékony

YEB táptalajba mostuk össze, majd alapos keverés után, 2 ml-enként szétmérve, folyékony nitrogénben tároltuk. A fagyasztás után -80°C-on tároltuk a szuszpenziókat az infiltrációig.

#### **4.2 *Arabidopsis thaliana* növények transzformálása**

A *Lepidium* cDNS könyvtárat, illetve az egyedi génkonstrukciókat vad típusú, Columbia-0 ökotípusú *Arabidopsis thaliana* növényekbe infiltráltuk (Clought és Bent 1998, Rigó és mtsai., 2012). Alkalmanként 100-150 cserép, virágzó növényt mártottunk be összesen 6-8 körben. A kezeléseket növényenként kétszer végeztük el 7-10 napos különbséggel. A bemelegítések követően a növényeket tovább neveltük a maghozásig. A begyűjtött és kitisztított magokat szaporító ládába vetettük (Terracult palántázó földkeverékbe) és csírázás után 10 nappal elkezdtük a gyomirtószeres válogatást (Finale 14SL (Bayer CropScience) gyomirtószer, amely 300mg/L glufozinát-ammóniumot tartalmaz). 3 alkalommal, 3-4 naponta permeteztük a növényeket míg a gyomirtórezisztens növények egyértelműen elkülöníthetőek voltak az érzékenyektől. 1 ml begyűjtött magból 100-120 transzformáns növényt szelektáltunk ki. A rezisztens növényeket cserepekbe ültettük át és a magok beéréséig tovább neveltük. A magok begyűjtésekor 5 növény magját összekevertük és együtt kezeltük. Utóbb a szűrések során az 5-ös keverékekből 25-ös magkeverékeket készítettünk.

#### **4.3 Genetikai szűrés**

A szűrések során egy Petri csészében az összekevert 25 db T2-es generációjú növény magjait ½ MS táptalajon csíráztattuk (0,8% agar és 0,5% szacharóz tartalommal) (Koncz és mtsai.,1994), amely a génexpresszió indukálásához 5µM β-ösztadiolt (Sigma Aldrich E2758) is tartalmazott. A stressztoleranciára történő szűréshez a táptalaj paraquatot (0,2 µM) (Sigma Aldrich 856177), szorbitolt (200mM) vagy nátrium kloridot (150mM) is tartalmazott. A magok csírázási képességét ½ MS táptalajon ellenőriztük. A lemezeket a szűrés során növénynevelő kamrában tartottuk, ellenőrzött körülmények között. A hőmérséklet 22 °C, a fényintenzitás 200µE, a nappalhossz 12 óra, a páratartalom 50% volt. A növények toleranciáját a kísérletek során a 3. héten vizsgáltuk. Az intenzívebb növekedésű, nagyobb méretű növényeket ½ MS táptalajra raktuk át és a gyökérzetük megerősödése után virágföldbe ültettük és üvegházban tovább neveltük a magok beéréséig.

A fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrésnél nylon membránnal (Sefar mesh 07-20/13) borított ½ MS táptalajon nevelt 7 napos növényekből indultunk ki. Első lépésként 5 µM β-

ösztradiolt és 0,01%Silwet L-77-et tartalmazó oldattal permeteztünk, majd 2 nappal később a membránnal együtt áthelyeztük a növényeket szacharózt nem tartalmazó, magas ozmózisnyomású táptalajra, amely 600mM szorbitolt és 5  $\mu$ M  $\beta$ -ösztradiolt tartalmazott. A klorofill fluoreszcencia méréseket 48 óra elteltével végeztük Imaging-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) műszer maxi mérőfejének használatával. A mérés előtt 30 percig sötétben tartottuk a növényeket. A mérés során a következő beállításokat alkalmaztuk: az aktinikus fény intenzitása 145  $\mu$ E és a szaturációs pulzus intenzitása 3000  $\mu$ E volt. A toleráns növényeket a PSII maximális fotokémiai hatékonysága ( $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ ) és a fényadaptált (145  $\mu$ E) fotokémiai hatékonyság  $Y(II) = (F_m' - F) / F_m'$  alapján választottuk ki (Genty és mtsai., 1998), viszonyítási alapnak vad típusú Col-0 növényeket használtunk. Az eltérő  $F_v/F_m$  vagy  $Y(II)$  értéket mutató növényeket ozmotikum mentes  $\frac{1}{2}$  MS táptalajra helyeztük át, majd üvegházban tovább nevelve begyűjtöttük a magjaikat.

#### 4.4 Az inszertek azonosítása és plazmid konstrukciók elkészítése

A genomi DNS-t a transzgenikus növényekből Aquagenomic (<http://www.aquaplasmid.com/AquaGenomic.html>) kittel tisztítottuk. A cDNS inszerteket PCR technikával, Phusion High Fidelity polimeráz enzimmel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) szaporítottuk fel, a pTCRE8A5', pTCLEXA3' és a p35S vektor specifikus primerek használatával (Függelék 1. táblázat).

A PCR termékeket 0,8%-os agaróz gélen méret szerint elválasztottuk, majd GeneJET™ (K0691 gélextrakciós kittel (Thermo Scientific) tisztítottuk ki. A fragmentumok DNS szekvenciáját p35S2 primerrel (Papdi és mtsai., 2008) (Függelék 1. táblázat) határoztattuk meg, mert a cDNS beépülési hely előtt található közvetlenül egy minimál 35S promóter szakasz, és az erre kitapadó primerrel hosszabb DNS szakaszt tudunk szekvenáltatni, mint egy távolabb kitapadó primerrel. A kapott szekvenciák azonosításához az NCBI Blast szekvenciahomológia kereső szolgáltatását hívtuk segítségül (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A szekvencia párosításokat pedig a Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) weboldallal készítettük el. Az izolált DNS fragmentumokat pDONR222 vektorba építettük be Gateway BP Clonase II enzimmel (Life Technologies, Rockville, MD, USA) majd ellenőriztük a bázissorrend helyességét. A következő lépésben az inszerteket pTCO272RD29 vagy pTCO27235S bináris vektorokba helyeztük át (Függelék 4. ábra). Ennél a folyamatnál Gateway LR Clonase (Life Technologies) enzimet használtunk. A pTCO272RD29 vagy pTCO27235S vektorok alapja a

pK7WG2 bináris plazmid volt (Karimi és mtsai., 2002). A pK7WG2 bináris plazmidból a 35S promótert a ccdB génnel együtt kivágtuk és ezt klónoztuk át a pTCO272-es vektorba. Ez a konstrukció adta az RD29-es promótert tartalmazó génkonstrukció alapját is. Ebben az esetben a 35S promóter ki lett cserélve az RD29 promóterre, amelyet a Bayer CropSciencetől kaptunk. A beépült fragmentumok DNS bázissorendjét a RD29B5', illetve pTCO35SNEW5' primerek felhasználásával határoztuk meg (Függelék 1. táblázat)

#### **4.5 A rozetta méretek meghatározása PlantSize szoftverrel**

A növekedési ütem vizsgálatokat a Genetikai szűrés fejezetben ismertetett módon és körülmények között három hetes ciklusokban végeztük. A növények táptalaját 100mM, 125mM vagy 150mM nátrium kloriddal, 200mM szorbitollal vagy 0,2 $\mu$ M paraquáttal egészítettük ki. A 3 hét alatt 3-4 naponta transzilluminátoron, alulról megvilágítva, mindig ugyanolyan beállításokat használva, fényképeket készítettünk a növényekről. A növények rozetta méretét és növekedési ütemét az általunk fejlesztett PlantSize szoftverrel is mértük (Faragó és mtsai., 2018). Ehhez a növényeket a fent leírt módon szögletes Petri csészében 4x4-es vagy 4x5-ös mátrix elrendezésben neveltük. A színes felvételeket szigorúan egységes körülmények között digitális kamerával készítettük. A PlantSize szoftver használatához szükséges rendszerkövetelmények: 4 GB RAM (ajánlott), Windows 64 bit (Windows7 vagy Windows10), képernyő felbontás 1920x1080 pixel, a MATLAB Runtime R2016b verziója, amely letölthető az <http://www.mathworks.com/products/compiler/mcr/index.html> oldalról. Online segítség elérhető: <http://www.mathworks.com/help>. A PlantSize program a <http://www.brc.hu/pub/psize/index.html> linkről tölthető le.

A PlantSize a kapott numerikus értékeket Excel formátumba exportálja, ahol a további számítások elvégezhetőek.

##### **4.5.1 Üvegházi növények nevelése, stresszkezelése, jellemzése**

Üvegházban nevelt növények só vagy ozmotikus stressztűrő képességének mérésekor 6 db egyedi növényt neveltünk 1 műanyag nevelő edényben, ebből 2 db vad típusú, 4 pedig génmódosított volt. A különböző genotípusú vonalak elhelyezkedését a tálcán belül mindig változtattuk. Kezelésenként egy vonalból minimum 20 egyed stressztűrését vizsgáltuk. 4 hetes korukban kezdtük a stresszkezeléseket a növények öntözővize 250mM NaCl-ot vagy 10% 6000-es polietilén glikolt (KAT-CHEM Kft) tartalmazott, kiegészítve 1g/l Volldünger Linz komplex műtrágyával (Kwizda, Kwizda Agro Hungary Kft.), hogy a tápanyaghiányból eredő



hatásokat kiküszöböljük. A kezeletlen és a paraquáttal kezelt növényeket az 1g/l-es csapvízben feloldott műtrágyával öntöztük. A paraquátot 20 $\mu$ M-os koncentrációban alkalmaztuk, csapvízben feloldva és kiegészítésként 0,01%Silwet L-77 detergenst használva, így biztosítva a szer jobb megtapadását a levélfelületen. A növényeket hetente egyszer permeteztük.

#### **4.6 Prolin tartalom meghatározása**

100mg növényi anyagot folyékony nitrogénbe gyűjtöttünk és 10 $\mu$ l/mg friss tömegnyi 20%-os etanolban eldörzsöltük. A mintákat szobahőmérsékleten 5 percig maximális sebességgel centrifugáltuk, majd a felülúszót átszedtük új csövekbe. A prolin meghatározáshoz izatint (1H-indole-2,3-dione) használtunk (Ábrahám és mtsai., 2010). Közvetlenül a kísérlet előtt 1g izatint és 2,5 ml ecetsavat tartalmazó metanolban Whatman papírt áztattunk, majd levegőn szárítottuk 1 órát. Az így elkészült teszt papírra mintánként 10  $\mu$ l-t cseppentettünk ki az etanolos kivonatokból és 30 percig hagytuk száradni, majd 90° C-on inkubáltuk a papírt 20 percig. A kvantifikáláshoz ismert koncentrációjú L-prolin oldatokat készítettünk, 20%-os etanolban oldva. A kapott kék színreakcióból következtettünk a minták prolin tartalmára.

#### **4.7 Génkifejeződési szintek vizsgálata**

Az izolált cDNS-eket RD29A vagy CaMV35S promóterekkel fejeztük ki *Arabidopsis thaliana* növényekben. Az RD29A promóter kiszáradásra, sóra, hidegre és abszcizin savra indukálódik a szekvencián található két ABRE (ABA responsive element) elemnek köszönhetően. Az általunk használt promóter fragmentum az RD29A (At5g52310) gén start kodonja előtti 923 nukleotidot tartalmazza. A konstrukciókkal előállított transzgenikus növényekben Northern blot analízissel megvizsgáltuk a génkifejeződési szinteket. Az össz-RNS-t RNeasy Plant Mini kittel (Qiagen) izoláltuk. A Northern blot hibridizáláshoz minden mintából 20 $\mu$ g-RNS-t választottunk el formaldehides 1%-os agaróz gélen, majd nylon hibridizáló membránra (Amersham, Hybond) vittük át az RNS-eket. Az eljárás során Sambrook és munkatársai (2001) módszerét követtük. Radioaktív  $\alpha$ -dCTP-vel jelölt próbának cDNS fragmentumot használtunk amit DecaLabel DNA Labeling kittel (Thermo Scientific) jelöltünk meg, a gyártó utasításait követve.

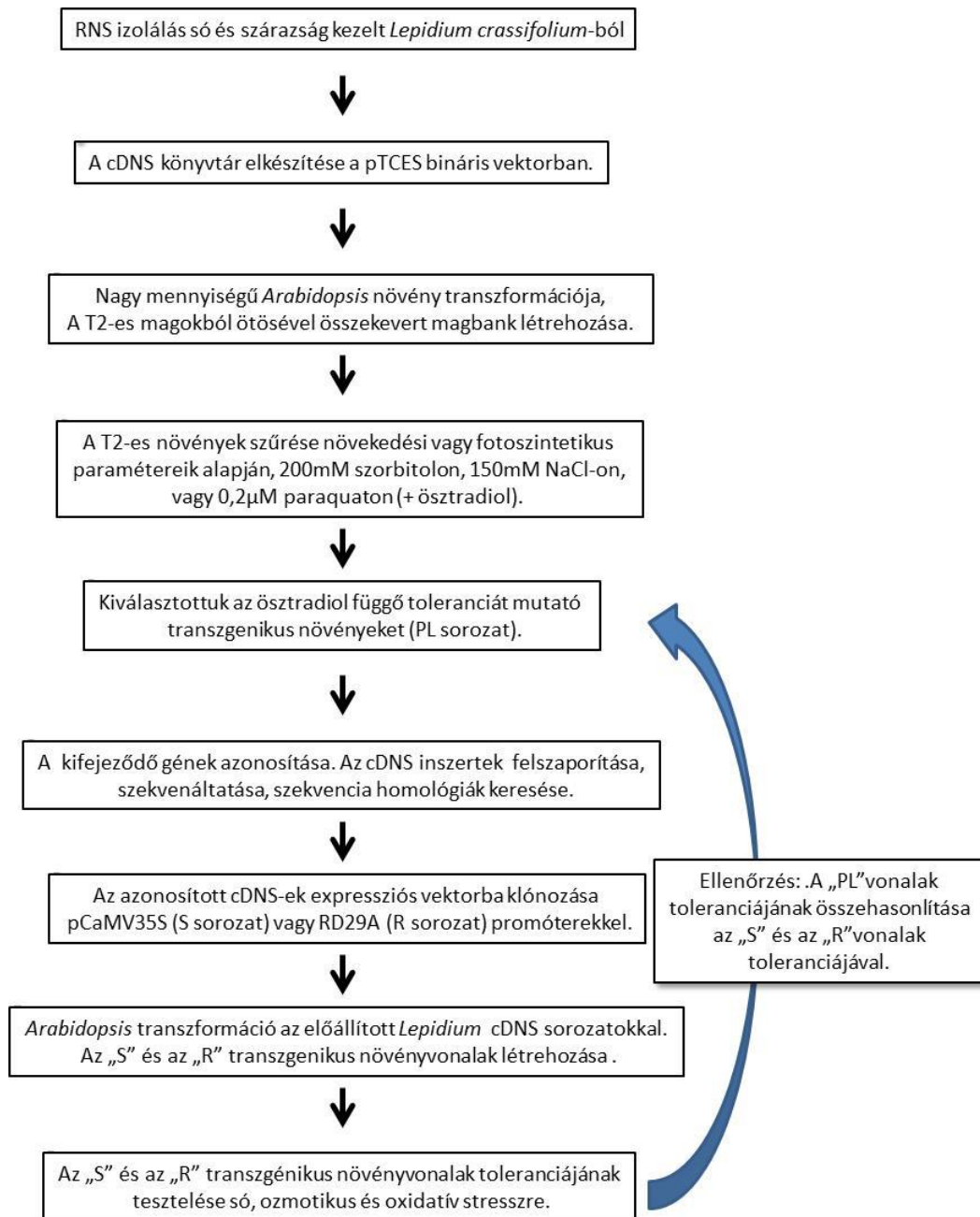
#### **4.8 TAIL PCR technika ismertetése**

A beépült T-DNS-ek helyét TAIL PCR-al (Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) határoztuk meg (Singer és Burke, 2003). A kapott szekvenciák beazonosításához az NCBI Blast szekvencia homológia kereső szolgáltatását használtuk (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), így határoztuk meg a T-DNS feltételezhető beépülésének helyét.

## 5. EREDMÉNYEK

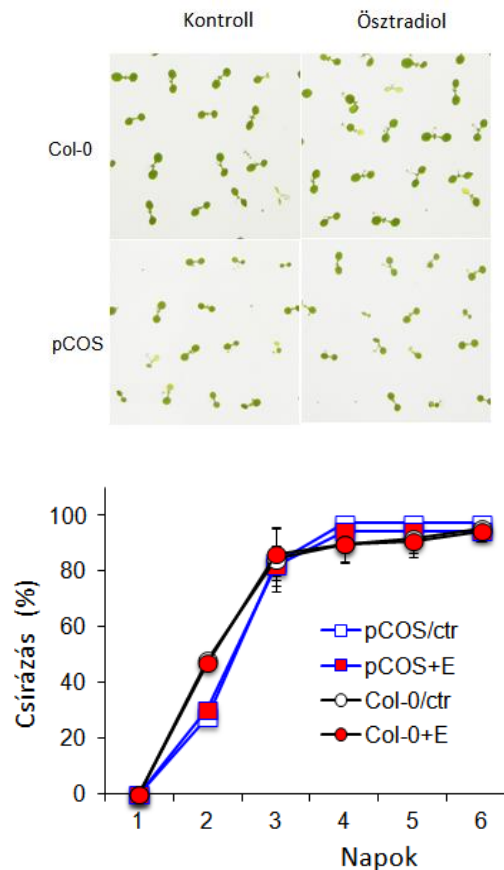
### 5.1 Stressztolerancia alapú szűrési rendszer kidolgozása és használata

Ahhoz, hogy megtaláljuk azokat a *L. crassifolium* géneket, amelyek stressztoleranciát biztosítanak és ez a hatásuk *Arabidopsis* növényekben is működik, egy többlépcsős szűrési és ellenőrzési folyamatot terveztünk, melyet a 3. ábra szemléltet.



3. ábra A fajok közötti géntranszferhez átalakított COS (Conditional cDNA Overexpression System) folyamatábrája, a cDNS könyvtár készítésétől az ellenőrzési lépésig ábrázolva.

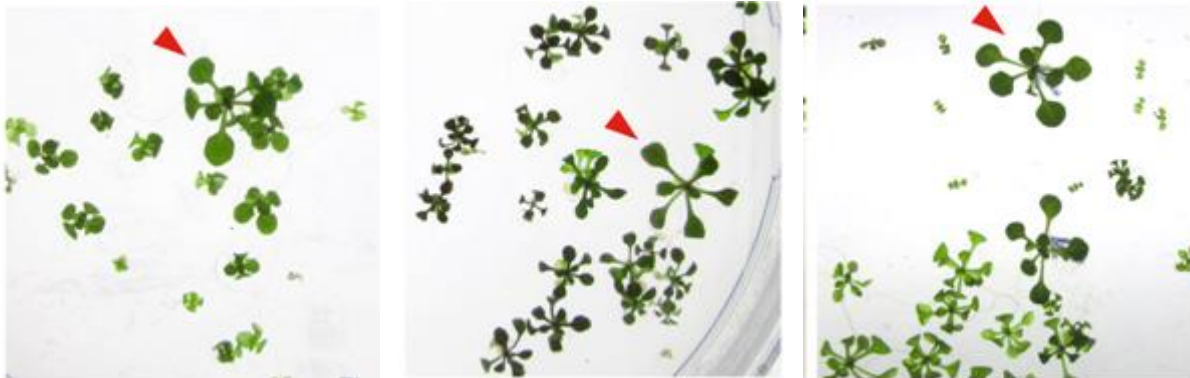
A transzformációs munka eredményeként 40 ezer transzgenikus *Arabidopsis* növényt állítottunk elő, mely körülbelül 60 ezer véletlenszerűen beépült T-DNS-nek, (Szabados és mtsai., 2002) felel meg. Feltételeztük, hogy mindegyik beépült T-DNS különböző *L. crassifolium* cDNS-t kódolt. A T1-es növények magjait ötösével gyűjtöttük be és 5 db 5-ös magkeverékből készítettünk egy-egy 25-ös magkeveréket. Ezeket vetettük ki a szűrésekhez, előtte pedig csírázási tesztet végeztünk (4. ábra), igazolandó, hogy a magok csírázási képességében nincs jelentősebb eltérés.



4. ábra A Col-0 vad típusú és COS transzformált *Arabidopsis* magok (pCOS) csírázása. A) 5 napos, vad típusú és transzgenikus *Arabidopsis*\_csíranövények kontroll (1/2MS) és ösztadiolt (1/2MS +5 $\mu$ M) tartalmazó lemezek. B) A magok csírázási százaléka kontroll és ösztadiol tartalmú lemezek. A diagramon az egyes mérési pontoknál az átlagtól való eltéréseket jelöltük.

A szűrés során közel 100 magot csíráztattunk egy-egy 13 cm átmérőjű Petri csészében amelyek a sóstresszhez 150mM NaCl-t, az oxidatív stresszhez 0,2 $\mu$ M paraquatot, az ozmotikus stressz szűréshez 200mM szorbitolt tartalmaztak. A táptalaj mindig tartalmazott 5 $\mu$ M ösztadiolt is, ami a XVE rendszer aktiválásához szükséges. A szűrések során

alkalmazott stresszkezelésekkel 1040 olyan csíranövényt találtunk, amely az átlagosnál nagyobb rozettaméretet, mutatott (5. ábra).



**150mM NaCl**

**0,2µM paraquat**

**200mM szorbitol**

5. ábra A különböző stresszkezelések mellett nagyobb rozetta méretet mutató növények kiválasztása a szűrés során,. Három hetes, 1/2MS+5 µM ösztradiol tartalmú táptalajon nőtt növények. A táptalajok az ábra alatt feltüntetett további kiegészítéseket is tartalmazták. A nyilak a nagyobb méretű növényeket mutatják.

## 5.2 A fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrési rendszer kidolgozása

A toleráns növények szűrésére kidolgoztunk egy új, nem destruktív módszert is, amely a klorofill fluoreszcencia mérésen alapszik és alkalmas Petri csészében nőtt növények ozmotikus stressztűrésének vizsgálatára. Az Imaging PAM készülék használatával láthatóvá válnak a növény fotoszintetikus paraméterei és a bekövetkező változások időben és térben követhetőek (Oxborough, 2004). Ezt a mérési technikát eddig csak üvegházi és szabadföldi növények mérésére használták, mi fejlesztettünk ki egy olyan *in vitro* rendszert, amely nagy számú növény nem invazív szűrését tette lehetővé, úgy, hogy a stresszkezelés után a növényeket tovább is tudtuk nevelni, magfogás céljából.

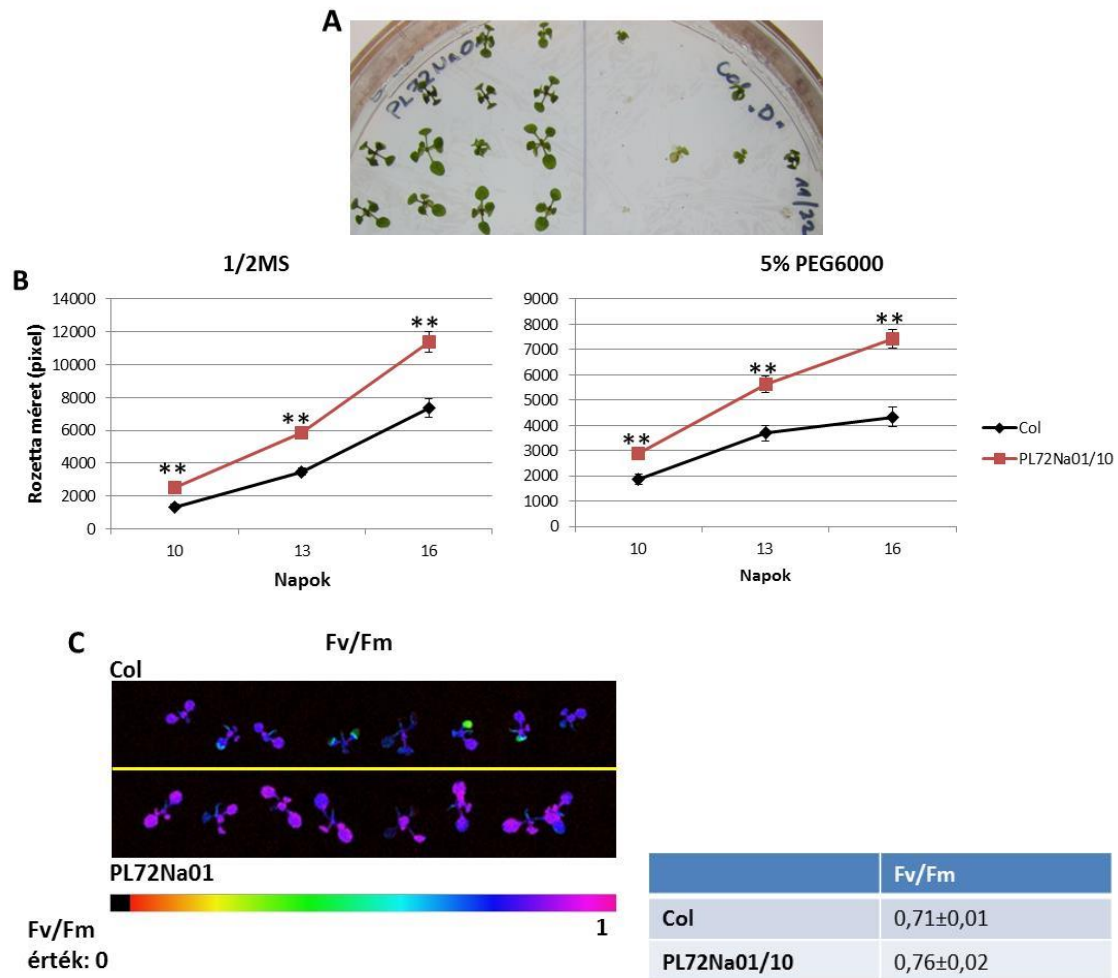
A teljes mérési rendszer kidolgozása során az alábbi paramétereket vizsgáltuk:

- A növények megfelelő korát: 7, 10, 12,18 és 20 napos.
- A táptalaj agar koncentrációját: 0.5-0,8%.
- Különböző stresszkezeléseket: paraquat (1-5-10-25µM), szorbitol (100, 200,300, 600mM), NaCl (100, 125, 150, 200, 250mM) és PEG (15%, 30%).
- A stresszkezelések időtartamát: 24h, 48h, 3-5 nap.

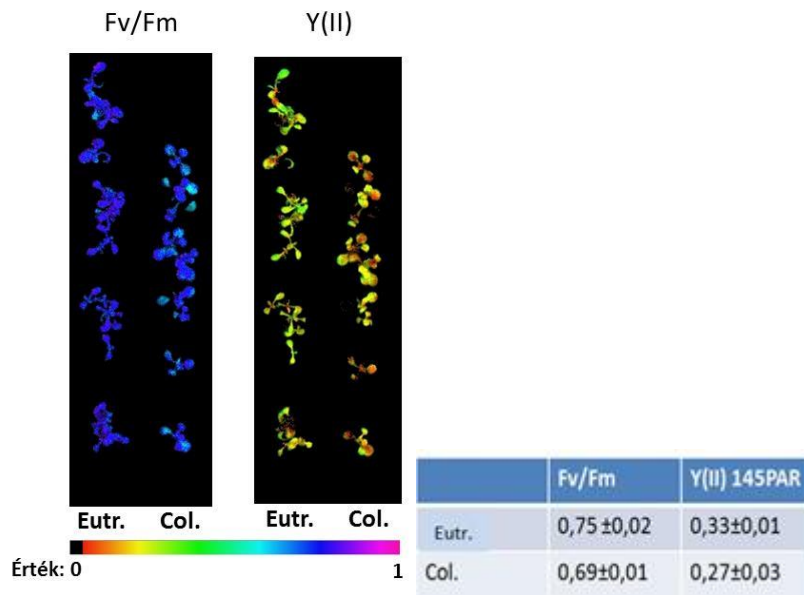
- A fotszintetikus paramétereiket: Fv/Fm, Y (II), qN, NPQ, Y(NO).

- A fluoreszcencia mérés helyét: sziklevel, rozetta közepe vagy teljes növény.

A rendszer kidolgozása során a növekedési szűrésből kapott PL72Na01-es, ozmotikus stresszre toleráns vonalat (6. ábra.) és a *Eutrema salsugineum*-ot használtuk pozitív kontrollként a vad típusú növények mellett (7. ábra.).



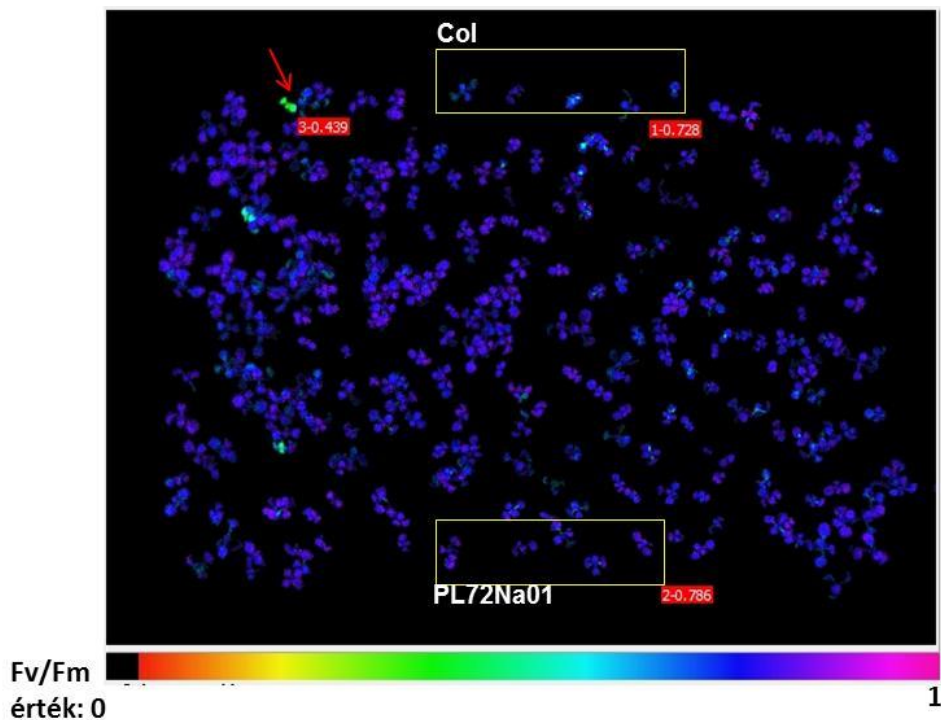
6. ábra A PL72Na01-s vonal stressztűrési vizsgálatai. A) A PL72Na01-es vonal 150mM NaCl-t tartalmazó 1/2MS táptalajon, 21 napos korban nagyobb rozettával rendelkezik mint a vad típusú *Columbia* növények B) A PL72Na01-es vonal egyedeinek növekedési rátája 1/2MS kontroll és 5% PEG6000 kiegészítést tartalmazó táptalajon. C) A PL72Na01-es vonal magasabb Fv/Fm értékeket mutat 2nap 600mM szorbitol kezelés után mint a vad típusú *Arabidopsis* növények. \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jelöltük ha az eltérések szignifikánsak voltak (Student *t*-teszt).



7. ábra Imaging MAXI PAM kép 10 napos Petri csészében nőtt *Arabidopsis Col-0* vad típusú és *Eutrema* növényekről, melyek 2 napos 600mM szorbitol kezelést kaptak. A PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) és a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ). látható a hamis színes ábrán. A növények színét összevetve az alsó skálával látható, hogy a *Eutrema* növények  $F_v/F_m$  és  $\Phi_{PSII}$  értékei magasabbak, mint a *Col-0* egyedeké. A növények  $F_v/F_m$  és  $\Phi_{PSII}$  átlag értékei a táblázatban láthatóak.

Kísérleteim során arra következtetésre jutottam, hogy magas ozmotikus stresszkezelést alkalmazva (600mM szorbitol) 10 napos növényeken, 0,8%-os agart tartalmazó cukormentes 1/2MS táptalajon, a teljes növényt mérve a klorofill fluoreszcencia különböző paraméterei 2 nap után mérhető és ismételhető változást mutattak a PSII maximális hatásfokában ( $F_v/F_m$ ) és a PSII fotokémiájának relatív hatásfokában ( $\Phi_{PSII}$ ), amelyet PAM Image vizsgálattal követni tudtunk. A további kísérleteink során ezt a szűrési módszert alkalmaztuk.

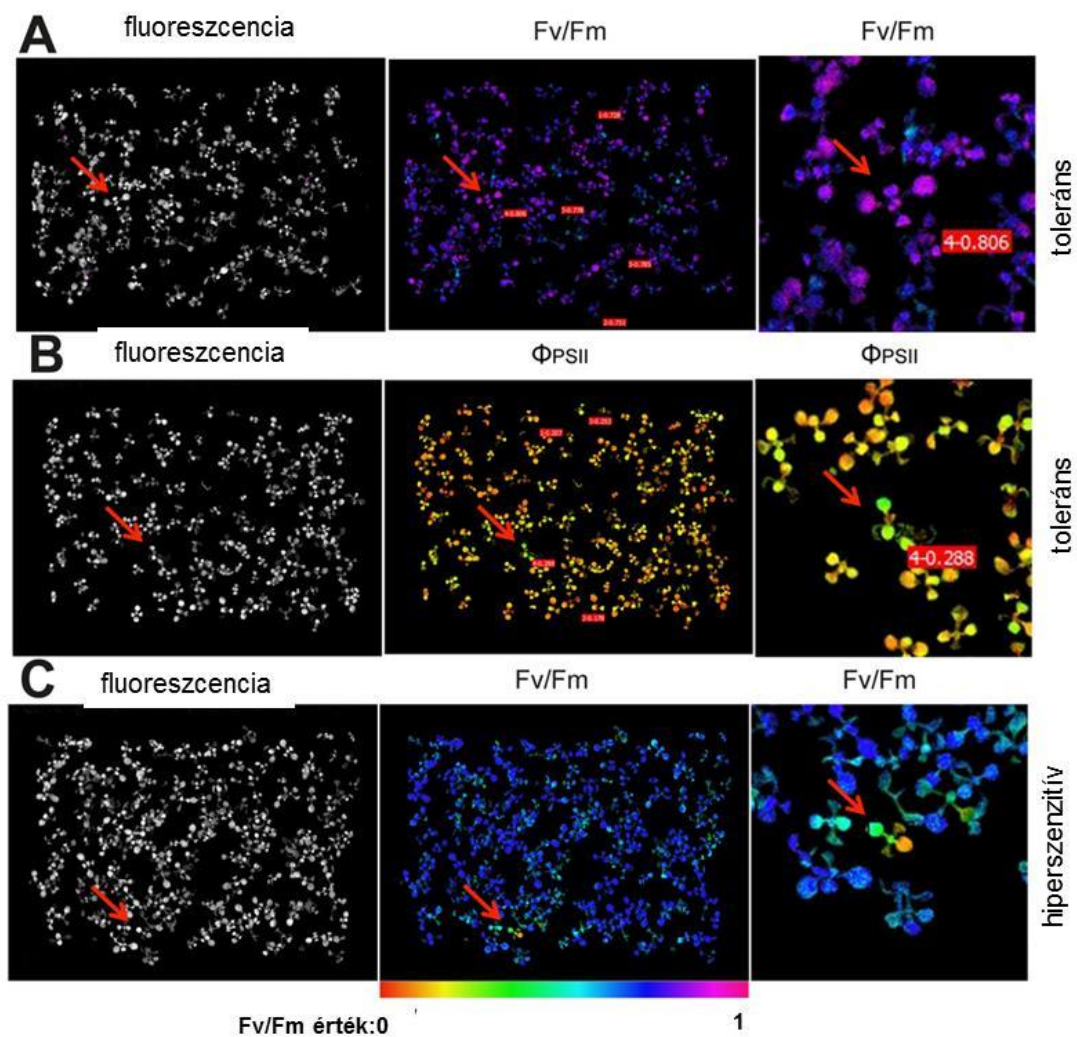
A rendszer másik lényeges pontja volt, hogy, hogy az Imaging PAM készülékben rövid idő alatt nagy számú, de jól elkülöníthető és kezelhető mennyiségű növényt tudjunk mérni egyszerre. A 8-as ábrán látható elrendezést alkalmazva Petri csészénként 250-280 növényt mértünk le és minden csészében 5 *Col-0* vad típusú növényt és 5 PL72Na01 növényt is elhelyeztünk kontrollnak. Petri csészénként egy-egy 5 vonalat tartalmazó, T2-es magkeveréket csíráztattunk ki.



8. ábra Imaging MAXI PAM kép 10 napos Petri csészében nőtt Arabidopsis növényekről, melyek 2 napos 600mM szorbitol kezelést kaptak 5 $\mu$ M ösztradiolos kiegészítéssel. A PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) látható a hamis színes ábrán. Sárga kerettel jelölve az 5-5 kontroll növény (Col-0, PL72Na01). A nyíl egy hyperszenzitív növényt jelöl melynek  $F_v/F_m$  értéke alacsonyabb.

A PAM alapú szűrési rendszerünkkel 10500 db T2-es generációjú vonalat vizsgáltunk meg, és a különböző visszaellenőrzési kísérletek után végül 42 olyan növényt választottunk ki, amelyeknél ismételt módon növekedett vagy csökkent a PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) vagy a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ). A következő, 9. ábrán a jellegzetes kísérleti elrendezések és az abból kapott eredmények láthatóak.





9. ábra Imaging MAXI PAM kép 14 napos *Arabidopsis* növényekről, melyek 2 napos 600mM szorbitol kezelést kaptak. A nyilak azokat a növényeket mutatják, amelyek esetében megváltozott a PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) vagy a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ). Az A) ábrán magasabb  $F_v/F_m$  értékkel rendelkező növény, a B) ábrán magasabb  $\Phi_{PSII}$  -vel rendelkező növény látható. A C) ábrán látható növény esetében alacsonyabb az  $F_v/F_m$  érték az átlagnál, a növény hiperszenzitív a szorbitol kezelésre.

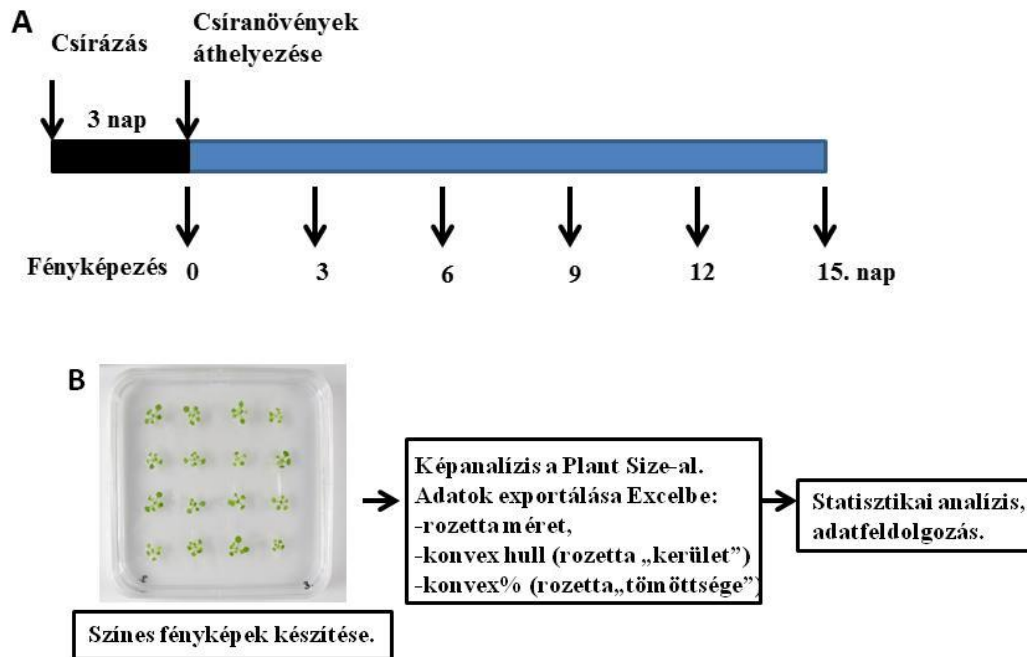
A kiválasztott növényeket, 1/2MS táptalajra helyeztük át, hogy a hajtás- és gyökérbérbézéshez optimális környezetet biztosítsunk. A szűrés során kiválasztott és továbbnevelt növények többsége életben maradt, üvegházban virágot hozott és magot is érlelt.

### 5.3 PlantSize szoftver kifejlesztése, a növények rozetta méretének monitorozása

A szűrési módszerünk kidolgozásakor problémát jelentett számunkra, hogy több száz növény rozettaméretének változását időben követni tudjuk, megfelelően dokumentáljuk és a növekedés számszerű jellemzőit regisztráljuk. Felmerült az igény egy egyszerű, gyors, nagy

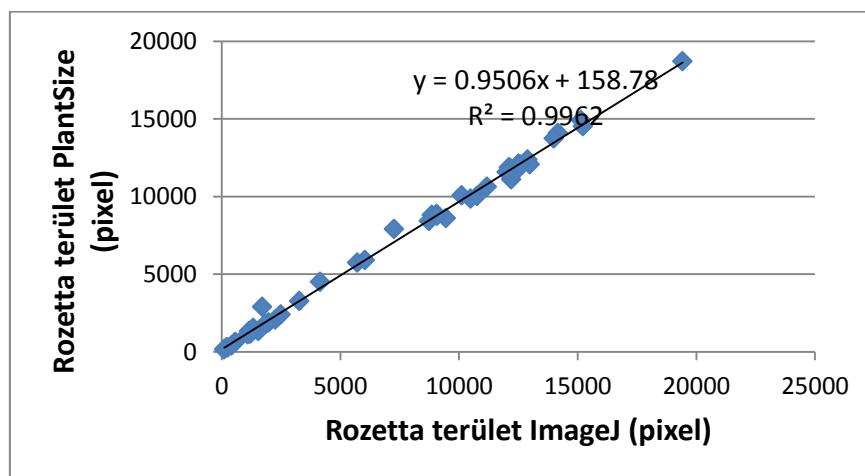
átersztő képességű, nem invazív, félautomata módszer kifejlesztésére, amellyel a Petri csészében növő, stresszkezelés alatt álló növényeink rozettaméretét monitorozni tudjuk. A Sass Lászlóval és Faragó Dórával együtt kidolgozott rendszer alapja az, hogy meghatározott időközönként nagy felbontású színes képeket készítettünk a Petri csészékről, amelyben maximálisan 36 darab növényt neveltünk. Ezeket a fényképeket a Sass László által írt MatLab alapú szoftverrel, a PlantSize-al értékeltük ki, amely pixelszámban meg tudta adni a növények rozettaméretét és azt MS Excel fájlban numerikusan exportálni. A szoftver segítségével jellemeztük a szűrés során a megnövekedett toleranciájú növények növekedését. A szoftver legújabb verziója képes információt szolgáltatni a rozetták morfológiai paramétereiről (konvex terület és százalék) illetve a növények pigment tartalmáról is (Faragó és mtsai., 2018). Dolgozatomban a PlantSize szoftver kifejlesztésének a rozetta nagyság méréséhez kapcsolódó részét ismertetem.

Kísérleteink során, a fényképek készítéshez, 16-36 növényt neveltünk egy-egy négyszögletes Petri csészében A 10. ábra B paneljén lévő elrendezés szerint. Az elkészült képeket a PlantSize szoftverbe importáltuk és a kapott numerikus értékeket, melyek leírják a növények rozetta méretét, használtuk a további munkáink során. Egy kísérlet során 6 párhuzamos Petri csészével dolgoztunk kezelésként, a növényeket 5 különböző időpontban fotóztuk, így közel 500 növény fotóját elemeztük kezelésként, a PlantSize programmal. A szoftver lehetővé tette számunkra a növények méretének meghatározását és a növekedési ütem mértékének nyomon követését. A program kalibrációjához vad típusú Col-0 ökotípusú, *Arabidopsis* növényeket neveltünk 1/2 MS táptalajon és meghatározott időközönként fényképeket készítettünk róluk (10. ábra).



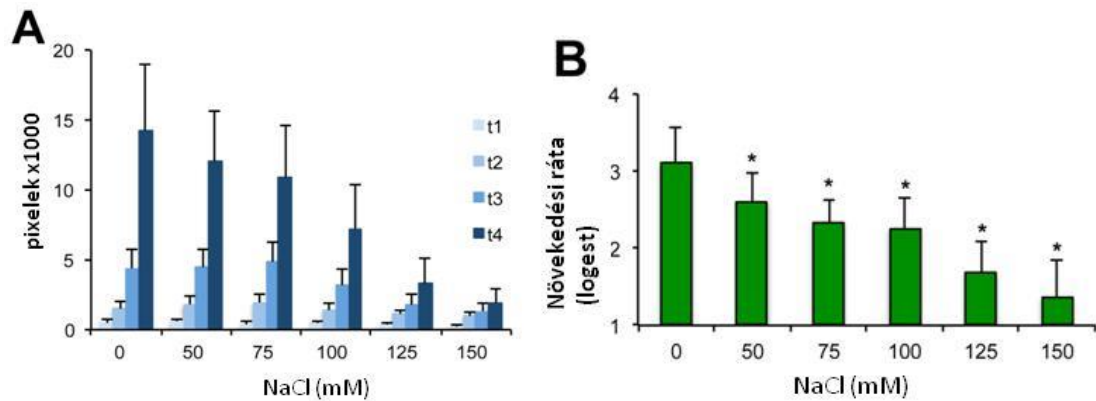
10. ábra A PlantSize szoftver kalibrációjához használt kísérleti rendszer. A) A kísérletek lefolyásának időbeli sémája. B) A kísérletek folyamatábrája.

A programunk pontosságának bizonyítására összehasonlítást végeztünk a PlantSize és az ImageJ (Schindelin et al., 2015) szoftverek-felhasználásával, ugyanazon növényeken mért rozetta méret adatokban. Az ImageJ programot gyakran használják képanalízishez, többek között különböző objektumok területének meghatározásához. Hátránya, hogy az alapszoftver nem automatizált, manuálisan kell kijelölni a lemérendő területet, emiatt lassú és nehézkes. A két különböző szoftver által mért adatok összevetésekor magas korrelációt találtunk, amely mutatja, hogy a két program által kapott adatok megfeleltethetők egymással (11. ábra).



11. ábra Regresszió analízis a PlantSize-al és ImageJ-vel mért rozetta terület értékeken, Columbia vad típusú növények esetében

A PlantSize program segítségével megvizsgáltuk a különböző só koncentrációk (0-150mM) hatását a növények növekedésére, amit a rozetták nagyságának mérésével tudunk megbízhatóan dokumentálni (12. ábra). A rozetta méret növekedési rátája szignifikánsan csökkent a só koncentráció emelkedésével. Azt tapasztaltuk, hogy a rozettaméret a sóstresszre érzékeny paraméter az *Arabidopsis* esetében és a PlantSize szoftverrel a redukció jól detektálható volt.



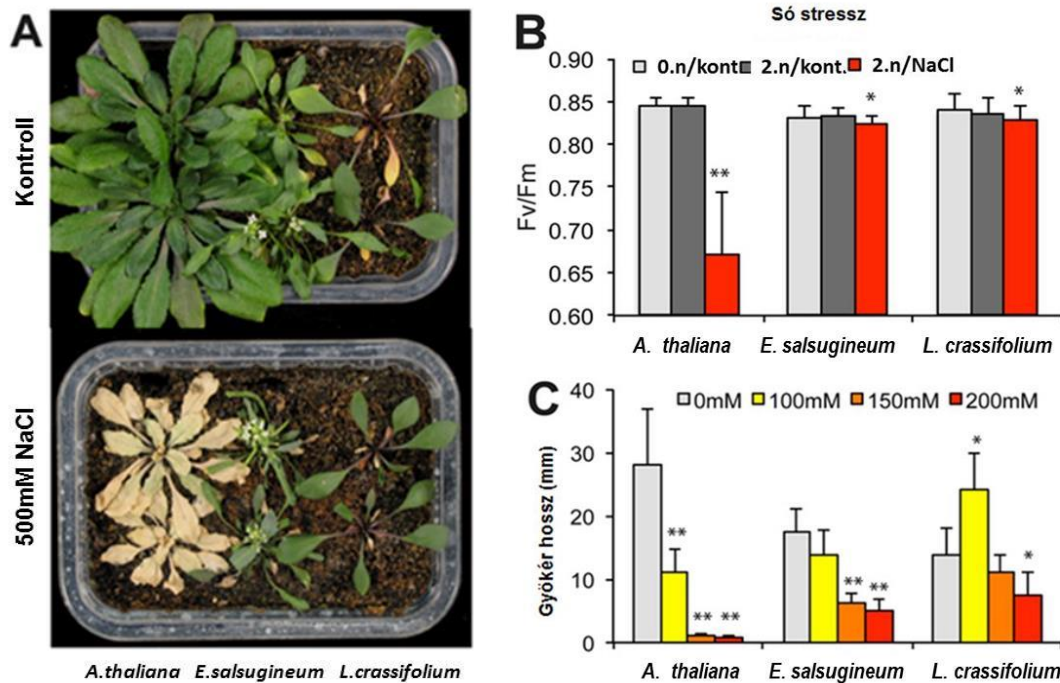
12. ábra Az *Arabidopsis* vad típusú *Columbia* vad típusú növények növekedési ütemének csökkenése a növekvő só koncentráció függvényében. 5 napos csíranövényeket helyeztünk át a különböző NaCl tartalmú táptalajokra és 3 naponta, négy alkalommal (t1-t4) fényképet készítettünk a növényekről. A) A PlantSize-al mért rozetta méretek. B) A növények növekedési rátájának átlaga az Excel „Logest” funkciójával számolva. A hibasávok a diagramokon a szórást ábrázolják, \* az eltérések szignifikanciáját mutatják, a nem kezelt kontroll és a kezelések átlag értékei között  $*p \leq 0.05$ , egy utas ANOVA és Tukey teszttel számolva.

A kalibrációt követően a PlantSize szoftver alkalmassá vált arra, hogy a szűrésünk során kiválasztott vonalak növekedési ütemét is összehasonlítsuk és ezáltal fontos információt kaphatunk a jellemzett vonalak stressztoleranciájának mértékéről.

#### 5.4 A *Lepidium crassifolium* stressztoleranciájának jellemzése

A sziki zsázsa (*Lepidium crassifolium*) egyike a szoloncsák (a felszín közelében magas nátriumion-koncentrációjú) talajokon élő sótűrő növényeknek. Az *Arabidopsis thaliana*-hoz hasonlóan a keresztesvirágúak családjához tartozik, az egyedek kissé pozsgásak, szürkés zöldek, alacsonyak, virágzatuk terebélyes és fehér színű virágokat tartalmaz. (Simon és Seregélyes, 2012). Ezt az extrém sótűrő fajt választottuk ki, mint génforrást és kísérleteinkben a só, szárazság és oxidatív stresszre adott válaszait hasonlítottuk össze glikofita (*Arabidopsis thaliana*) és halofita (*Eutrema salsaugineum*) fajokkal a *Brassicaceae* családból, laboratóriumi

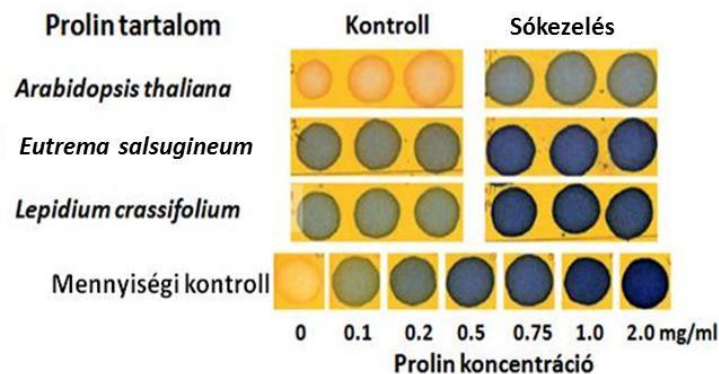
körülmények között. A stressznek kitett növények növekedését, túlélését, a gyökér növekedés ütemét és a klorofill fluoreszcenciáját mértük (13-17. ábra). Az *Arabidopsis*-hoz viszonyítva mindkét halofita faj (*E. salsugineum*, *L. crassifolium*) magasabb só toleranciát mutatott mind üvegházi, mind *in vitro* körülmények között (13 ábra).



13. ábra Az *A. thaliana*, a *E. salsugineum* és a *L. crassifolium* só toleranciájának összehasonlítása. A) A három faj egyedét üvegházban neveltük és vízzel vagy 500mM-os nátrium klorid oldattal öntöttük. Az ábra a három faj növekedését és túlélését mutatja 5 hetes só kezelés után. B) A három faj klorofill fluoreszcenciájának (a PSII maximális hatásfoka Fv/Fm) változása 2 napos, 400mM só kezelés hatására. C) A három faj gyökér növekedésének összehasonlítása (10 napos növények) 1/2MS agaros táptalajon, amely 100, 150 vagy 200mM NaCl-ot tartalmazott. Az oszlopdiagramokon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. A \* ( $p < 0,05$ ) és \*\* ( $p < 0,005$ ) jelölik, ha az *Arabidopsis*-hoz képest az eltérések szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

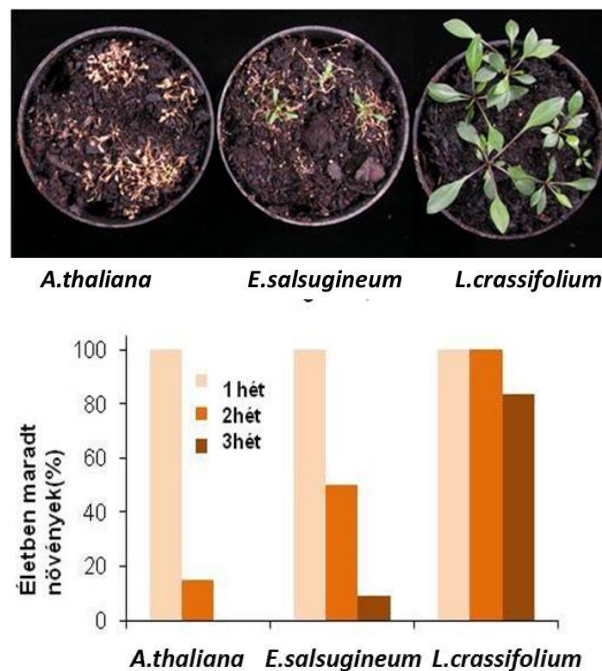
A növények prolin tartalma összefüggést mutathat azok szárazság és sótűrő képességével (Szabados és Saviouré, 2010). A prolin ozmolitként növelheti a növények toleranciáját és só illetve szárazságstressz hatására egyes fajokban megnőhet a mennyisége. Megvizsgáltuk, hogy az általunk jellemzett három fajban, milyen mennyiségben van jelen a prolin és stresszkezelés hatására változik-e (14. ábra). 3 hetes üvegházi növények esetében 20 mg/g friss tömeg mennyiségű prolint mértek *Arabidopsis*-ban (Székely és mtsai., 2007) de más módszert használtak a meghatározáshoz (Bates, 1973). Az *Arabidopsis*-hoz viszonyítva kontroll körülmények között is magasabb prolin szinteket detektáltunk, mind az *Eutrema*,

mind a *Lepidium* esetében. Só kezelés hatására az *Arabidopsis*-ban és a két halofita fajban is megnőtt a prolin mennyisége, a kontroll növényekhez képest.



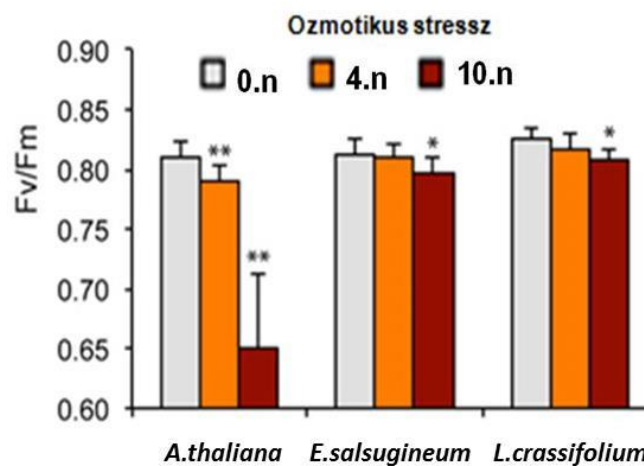
14. ábra Az *A.thaliana*, az *E. salsugineum* és a *L. crassifolium* prolin tartalmának összehasonlítása. Négy hetes, üvegházi növényeket kezdtünk el csapvízzel (kontroll) vagy 500mM-os NaCl oldattal öntözni. A levél mintákat 1 héttel a kezelések megkezdése után gyűjtöttük be. A prolin meghatározást izatinos módszerrel végeztük.

Amikor öntözésmegvonást alkalmaztunk a *L. crassifolium* szárazságtoleranciája magasabb volt, mint az *E. salsugineum*-é vagy az *A. thaliana*-é (15. ábra).



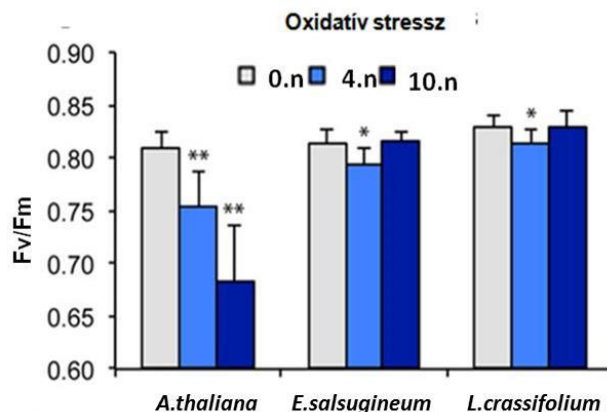
15. ábra A három faj szárazságtoleranciája. Az öntözést 1, 2 vagy 3 hétre megvontuk, majd újraöntöttük a növényeket. A képet 10 nappal az újraöntözések kezdete után készítettük. Az oszlopdiagramon a szárazságkezelést túlélő növények számát adjuk meg, a kontrollhoz (végig öntözött) viszonyítva, százalékban.

A klorofill fluoreszcencia különböző formái és az abból számolt paraméterek érzékenyen követik a növény fotoszintetikus apparátusának reakcióit a különböző stresszkezelések alatt. A PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ), melyet a változó ( $F_v$ ) és a maximális ( $F_m$ ) fluoreszcencia hányadosaként számolunk, a PSII fénybegyűjtő komplexének állapotáról és az abszorbeált energia mennyiségéről nyújt információt (Baker, 2008). Az ozmotikus és az oxidatív stresszkezelés mellett a klorofill fluoreszcencia értékek magasabbak voltak a *Lepidium* és az *Eutrema* esetében, mint az *Arabidopsis*-nál, amely arra utal, hogy a PSII fénybegyűjtő komplexe, e két faj esetében, kevésbé károsodott az ozmotikus stresszkezelés következtében (16. és 17. ábra).



16. ábra A klorofill fluoreszcencia (a PSII maximális hatásfoka:  $F_v/F_m$ ) változása PEG kezeléssel kiváltott ozmotikus stressz hatására, a három faj esetében. A négy hetes, üvegházi növényeket PEG6000 10%-os oldatával öntöttük 3-4 naponta. A fotoszintetikus aktivitásméréseket pedig az első kezelés napján (0n), 4 nappal (4n) és 10 nappal (10n) később végeztük el. Az oszlopdiagramokon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. \*-al ( $p < 0,05$ ) és \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jelöltük ha az eltérések az *Arabidopsis*-hoz képest szignifikánsak voltak (Student *t*-teszt).

Az oxidatív stressz a káros környezeti hatások, mint például a szárazság vagy só kezelés során keletkező reaktív oxigén formák (ROS) hatásaként lép fel. A fehérjék és lipidek oxidációja révén az oxidatív stressz másodlagos károsodást okoz. Az oxidatív stresszel szembeni ellenálló képesség a szárazság és sótűrés fontos aspektusa. Ezért a ROS generáló paraquat segítségével teszteltük a vizsgált halofita növények oxidatív stresszel szembeni ellenálló képességét is.



17. ábra A klorofill fluoreszcencia változása (a PSII maximális hatásfoka:  $F_v/F_m$ ) oxidatív stressz hatására, amit  $20\mu\text{M}$  paraquat permetezéssel idéztünk elő, üvegházi növényeken. A permetezéseket 3-4 naponta végeztük. Az oszlopdigramokon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. \*-al ( $p < 0,05$ ) és \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jelöltük ha az eltérések az *Arabidopsis*-hoz képest szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

Kísérleteink alapján elmondható, hogy a *Lepidium crassifolium* az *E. salsugineum*-hoz hasonló, só és szárazságtűrő faj.

### 5.5 A *Lepidium* cDNS könyvtárát tartalmazó *Arabidopsis* növények létrehozása

A *L. crassifolium* stressztoleranciáját biztosító gének azonosítása céljából elkészítettünk egy *Lepidium crassifolium* cDNS könyvtárát. A könyvtár tesztelésekor meghatároztuk 50, véletlenszerűen kiálasztott cDNS klón 5' végeinek bázis sorrendjét. Az inszertek átlagos mérete 1.0 kb volt és 82%-uk teljes hosszúságú cDNS-t tartalmazott. A kapott szekvenciák összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a prediktált *Lepidium* fehérjék aminosav szekvenciái 84%-os azonosságot mutattak az *A. thaliana* és az *A. lyrata* fehérjékkel. A magasfokú szekvencia rokonság megerősítette a *L. crassifolium* és az *Arabidopsis* nemzetség közeli rokonságát.

### 5.6 Stressztoleranciát biztosító gének azonosítása és klónozása

Az ösztradiol indukálható expressziós rendszer egyik előnye, hogy a kifejeztetett gén által okozott fenotípusos változás feltételhez kötött (indukáló szer jelenléte), és így egyszerűen és megbízhatóan igazolható, hogy a változásért a cDNS inszert túltermelése a felelős (Papdi és mtsai., 2008). A növekedési tesztekben 40000 vonalat vizsgáltunk meg, a klorofill fluoreszcencián alapuló szűrési rendszerünkben pedig 10500-at (2. táblázat). A kiválasztott növények utódait újratesteltük és azokat a vonalakat vizsgáltuk tovább, amelyek



ösztradioltól függő toleranciát mutattak egy, vagy több stressz körülménnyel szemben. Kísérleteink során 12 növényvonalat azonosítottuk, a fent leírt kritériumok alapján. A PAM alapú szűrésnél 6 vonalnál indukálható és magasabb, egy vonal esetében pedig indukálható és alacsonyabb klorofill fluoreszcencián alapuló paramétereket kaptunk (3. táblázat).

2. táblázat Az elvégzett szűrések adatainak számszerű összefoglalása.

Szűrési módszer	Letesztelt vonalak száma (db)	Kiválasztott növények (db)	Ösztadiol függő eltérést mutató vonalak (db)	Mutások (ösztadiol független vonalak) (db)
Növekedés (150mM NaCl)	40 000	974	5	5
Növekedés (0,2 µM paraquat)	40 000	334	5	4
Növekedés (200mM szorbitol)	40 000	480	2	1
Klorofill fluoreszcencia (2 nap 600mM szorbitolon)	10 500	205	7	9

3. táblázat Megváltozott stressztűrő képességgel rendelkező transzgenikus Arabidopsis vonalak. Magyarázat: Vonal neve: a transzgenikus vonal azonosításához használt kód. Szűrés: A szűrési módszer amivel a vonalat azonosítottuk. A cDNS inszert által kódolt fehérje: a prediktált aminosav szekvencia alapján talált leghasonlóbb fehérje neve. Ellenőrzés: a tolerancia ellenőrzése független, újraklonozott vonalakkal pCaMV35S (S sorozat) vagy pRD29A (R sorozat).

Vonal neve	Szűrés	A cDNS inszert által kódolt fehérje	Ellenőrzés
PL1210Na2	NaCl, növekedés	-	
PL542Na1	NaCl, növekedés	GDSL szerű lipáz/acetil hidroláz fehérje	<b>S12, R12</b>
PL072Na01	NaCl, növekedés	-	
PL749Na4	NaCl, növekedés	S19e riboszómális fehérje	
PL900Na1	NaCl, növekedés	gamma-glutamil hidroláz 2, GGH2	
PL051PQ2	paraquat, növekedés	-	
PL1012PQ2	paraquat, növekedés	ismeretlen fehérje	
PL1265PQ1	paraquat, növekedés	-	
PL1400PQ1	paraquat, növekedés	-	
PL372PQ1	paraquat, növekedés	ismeretlen fehérje	<b>S10, R10</b>
PL1225So1	szorbitol, növekedés	-	

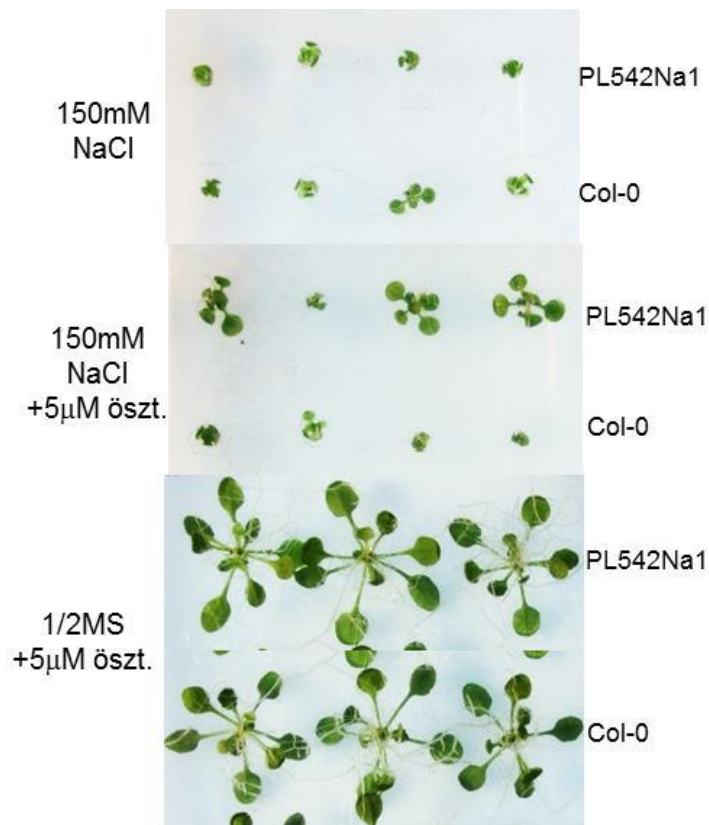
PL226So1	szorbitol, növekedés	hipotetikus fehérje (DUF814 domén)	
PL037P4	szorbitol, PAM	ismeretlen fehérje (DUF581 domén)	
PL039P4	szorbitol, PAM	L2 riboszómális fehérje, embrió defektív 2296	
PL120P4	szorbitol, PAM	L10 riboszómális fehérje,	
PL127P4	szorbitol, PAM	Acetil-koenzim A kötő fehérje 6, ACBP6	<b>S16, R16</b>
PL142P6	szorbitol, PAM	glutation-S-transzferáz phi8, GST6, GSTF8	
PL142P7	szorbitol, PAM	RNS polimeráz II mediátor komplex alegysége	
PL151P6	szorbitol, PAM	transzlációsán kontrollált tumor fehérje, TCTP	
PL181P3	szorbitol, PAM	-	

A többi vonal esetében a megváltozott tulajdonságok nem mutattak ösztadiol függőséget vagy nem volt egyértelműen követhető az indukció, amire magyarázat lehet, hogy a beintegrálódott T-DNS törést szenvedett, vagy nagymértékű genomi átrendeződést okozott és T-DNS inszerciós mutánsokat izoláltunk.

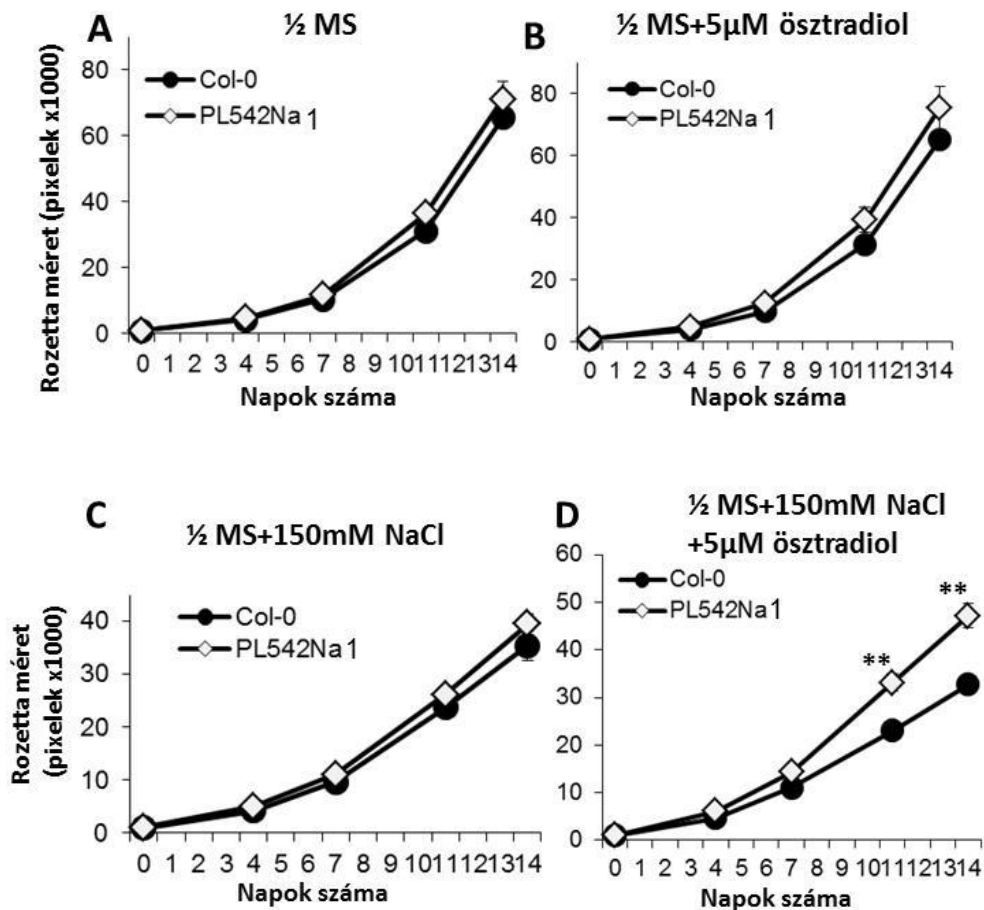
A *L. crassifolium* cDNS inszertek PCR-el (Polymerase Chain Reaction) történő felszaporítása és az inszertek nukleotid szekvenciáinak meghatározása, lehetővé tette számunkra, hogy a nukleinsav szekvenciák homológiái alapján, meghatározzuk a cDNS-ek által kódolt fehérjéket (Blast keresések). A beépült cDNS-ek 82%-a teljes hosszúságú volt, teljes ORF-el (nyílt leolvasási kerettel), míg 18% esetében hiányzott a cDNS 5' vége. A kiválasztott vonalokból a klónozott cDNS inszerteket a konstitutív (pCaMV35S) illetve stresszindukált (pRD29A) promóterekkel rendelkező vektorokba építettük és transzgenikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre. Az új transzgenikus vonalakban a cDNS klónokat pCaMV35S promóter (S sorozat) illetve pRD29A promóter (R sorozat) segítségével túltermeltettük (3. ábra). A transzgenikus vonalak stressztűrését a korábban ismertetett módszerek segítségével teszteltük, azzal a különbséggel, hogy az alkalmazott konstitutív és stressz indukált promóterek miatt nem volt szükség ösztadiol kezelésre. Két példával illusztrálok a génazonosítási és jellemzési kísérleteket.

## 5.7 A PL542Na1-es sótoleráns vonal jellemzése

A PL542Na1-es vonal egy olyan növényből származott, amely 150mM sótartalmú táptalajon jobban növekedett (18. ábra). A PL542Na1 növény utódainak sótoleranciáját a szűrőssel megegyező körülmények között teszteltük. A PL542Na1 növények ösztradiol jelenlétében magasabb sótoleranciát mutattak, mint a Col-0 növények, míg ösztradiol nélkül a vad típushoz hasonlóak voltak (18-19. ábra). Az ösztradiol önmagában nem befolyásolta a PL542Na1-es növények növekedését.



18. ábra A PL542Na1 vonal sótűrése. A növények 5 napos korukig 1/2MS táptalajon nőttek, ekkor áthelyeztük őket 150mM NaCl vagy NaCl+5µM ösztradiol vagy csak ösztradiol kiegészítést tartalmazó táptalajokra. 21 napos, tipikus PL542Na1 és Col-0 növények. Az ábra heterozigóta PL542Na1 növénypopuláció tesztjét mutatja, ezért a sótoleráns növények mellett érzékenyek is előfordulnak.



19. ábra A PL542Na1 vonal sötétürése. A Col-0 vad típusú és a PL542Na1 vonal relatív rozetta mérete 150mM NaCl és 150mM NaCl+5 $\mu$ M ösztadiol tartalmú 1/2MS táptalajon. A) PlantSize által mért rozetta méret a kontroll táptalajon nőtt növények esetében. B) Rozetta méret 5 $\mu$ M ösztadiollal kiegészített kontroll táptalajon. C) 150mM NaCl kiegészítést tartalmazó táptalajon mért rozettaméret. D) 5 $\mu$ M ösztadiolt és 150mM NaCl-ot tartalmazó táptalajon a PL542Na1 vonal rozetta nagysága szignifikánsan nagyobb a 10. napot követően. \*-al ( $p < 0,05$ ) és \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jelöltük ha az eltérések, a vad típushoz képest, szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

Az 1,6 kilobázis hosszú cDNS inszert egy 1179 bp ORF-et tartalmazott, az ez alapján prediktált fehérje pedig 392 aminosav hosszúságú volt (Függelék 2. ábra). A *L. crassifolium* fehérje aminosav szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot egy a GDSL lipáz/acetil hidroláz fehérjecsaládba tartozó MVP1/GOLD36/ERMO3 fehérjével mutatott, amelyet az AT1G54030-as *Arabidopsis* gén kódol. A *Lepidium* fehérjét LcMVP1-nek neveztük el (20 ábra).

```

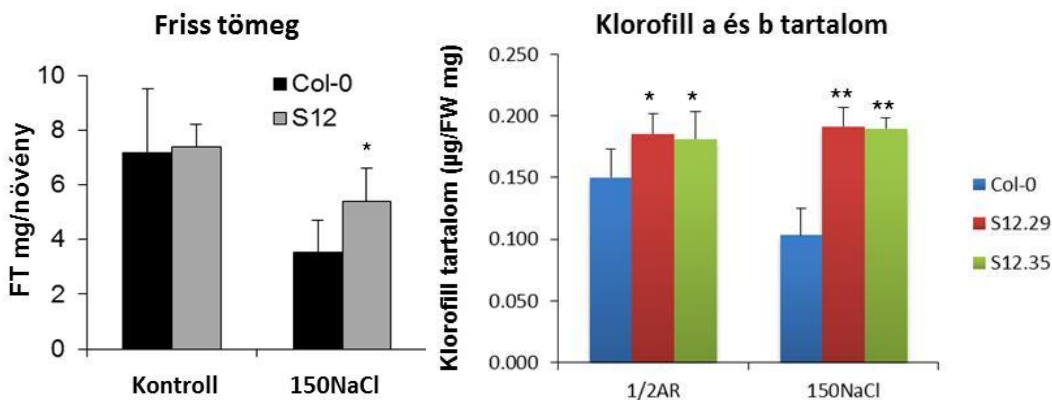
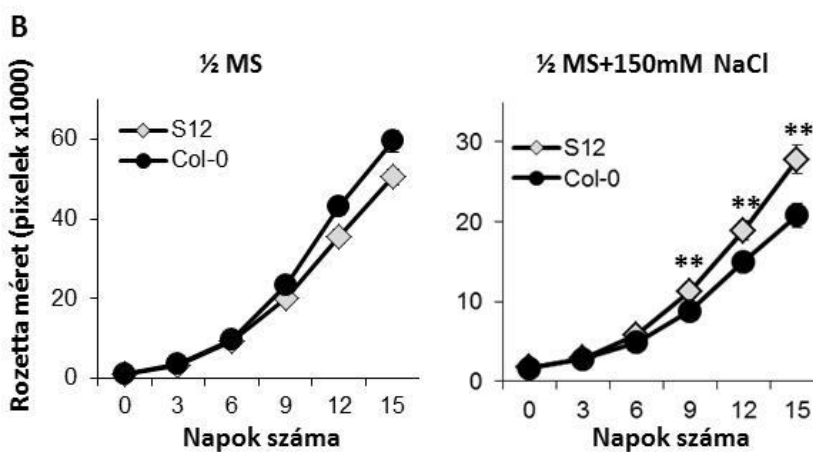
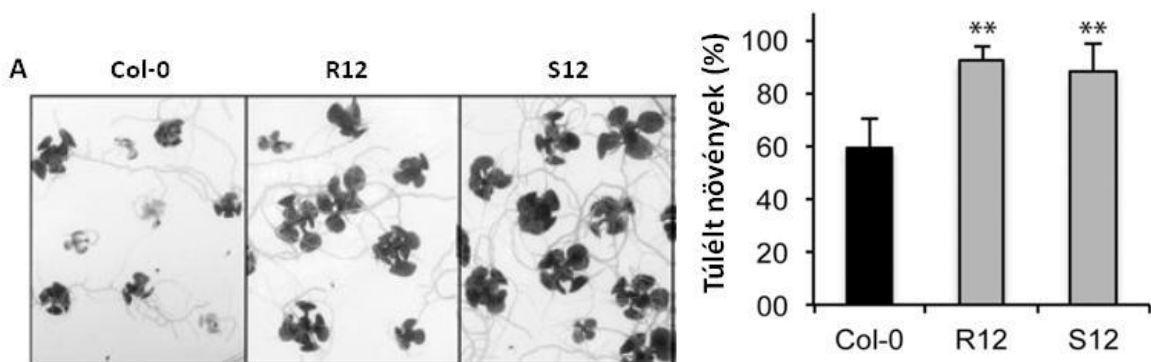
LcMVP1 MVTSRSHFFLLFTTLLLLLPTVSFAQSLFVFGDGLYDVGNKQFLSENVRVDADFPPYGVTL
AtMVP1 MAILKSHFFLLFPLLLLHFHTVSEFAQTLEFVFGDGLYDAGNKQFLSQNRVDASFPPYGVTV
*.:***** ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
LcMVP1 GHPTGRWSDGLIVPDYLAIFMGIQPIQPFLLATANF'SHGANFAIANATV'LGSPL'ETMTLS
AtMVP1 QOATGRWSDGSIVPDYLAKFMGIPKISPI'LVTTAD'F'SHGANFAIADATV'LGSPP'ETMTLS
*:***** ***:***** ***:*.:*:*.:*:*****:***** *****
LcMVP1 QQVMKFFGNKKNKWTNQTLSEAIYLINIGSDDYLN'YAKNNPSPSDN'QKQAFVAQVIT'TIEA
AtMVP1 QQVKKFSENKKNKWTNQTRSEAIYLIYIGSDDYLSYAKSNLSPSDN'QKQAFVDQVIT'TIKA
*** ** ***** ***** ***** *****.*.* ***** *****.*
LcMVP1 ELKVYVGAGGRKFAFQNLAPL'GCLPAVKQANGNVQECVKLPSELAALHNKLLQ'LLVELS
AtMVP1 EIKVYVGS'GGRKFAFQNLAPL'GCLPAVKQASGNVEECVKLPSEMAALHNKLLQ'LLVELS
*:*****:*****:*****.*.*:*****:*****:*****
LcMVP1 QQLSGFQYSFYDFFSSIQNRVIKPKTYTFETGTAACCGTGSVNGSYCSVNNVCAKPEEYI
AtMVP1 RELNGFQYSFYDFFSSIQNRVIKSKTYTFETGNAACCGTGSINGSDCSAKNVCAKPEEYI
:*.***** *****.******:*** **.:*****
LcMVP1 FFDGKHLTQEANLQVGHLMW'GADPEVIGPNNLRELMVLPD'LT'VILGDMQ'EAMAAMRPRQ
AtMVP1 FFDGKHLTQEANLQVGHLMW'GADPEVIGPNNIRELMVLPD'IT'VILAGIQ'EAMAAMRPRQ
*****:*****:***. :*****
LcMVP1 RKIESLYDIKKMESEMENQWLYQVDRAMS'FMI
AtMVP1 SNIESLYDIKKMESEMDNHWLYQVDKAI'SFMI
:*****:*.*****:*.*****

```

A fehérje szekvencián meghatározott domének: **szignál peptid**, **GDSL lipáz domén**

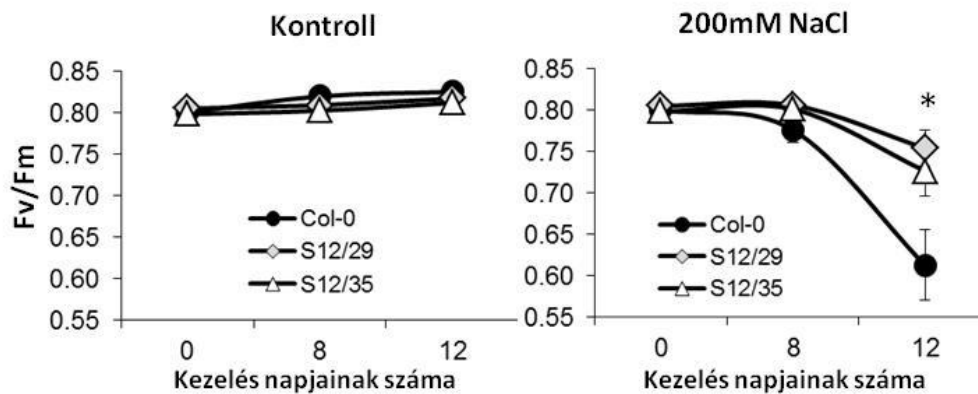
20. ábra A PL542Na1-es növényben azonosított inszert szekvencia elemzése. Az LcMVP1 és az Arabidopsis MVP1/GOLD36/ERMO3(AtMVP1) fehérjék szekvenciáinak összehasonlítása ClustalW program segítségével. Piros kiemeléssel jelöltük a prediktált szignál peptidet kódoló és kék kiemeléssel a GDSL lipáz (IPR001087) domént kódoló szakaszt.

A cDNS-t konstitutív (S12-es sorozat) vagy stresszindukálható (R12-es sorozat) promóterrel kapcsoltuk össze és vad típusú Arabidopsis növénybe transzformáltuk.. A független transzformáns vonalakban, a beépült cDNS expressziós szintjét Northern blottal vizsgáltuk (Rigó Gábor munkája) (Függelék 5. ábra). Ez alapján választottuk ki a későbbiekben vizsgálataink tárgyát képező növényvonalakat. Magas sótartalmú táptalajon, az S12 és R12 sorozat növény egyedeinek növekedési üteme, túlélési képessége és klorofill tartalma is magasabb volt a vad típusú növényekhez képest (21. ábra).



21. ábra Az S12-es és R12-es vonalak sótűrése. A növények 5 napos korukig 1/2MS táptalajon nőttek, ekkor áthelyeztük őket 1/2MS vagy 150mM NaCl-t is tartalmazó 1/2MS táptalajokra. 21 napos, tipikus S12-es és R12-es és Col-0 növények. A) Az S12, R12 és vad típusú növények túlélési tesztje. 15 nap után, 150mM NaCl tartalmú táptalajon vizsgáltuk a túlélő növények számát. Az oszlopdiagramon a túlélő, zöld növények százalékos arányát ábrázoltuk. B) Col-0 és S12-es növények rozetta méretének változása kontroll (1/2MS) és 150mM NaCl tartalmú táptalajokon. C) A Col-0 és S12-es növények friss tömegének valamint klorofill tartalmának változása sókezelés hatására. Az oszlopdiagramokon az átlagtól való eltéréseket jelöltük (szórás). \*-al ( $p < 0,05$ ) és \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jeleztük ha az eltérések a vad típusúhoz képest szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

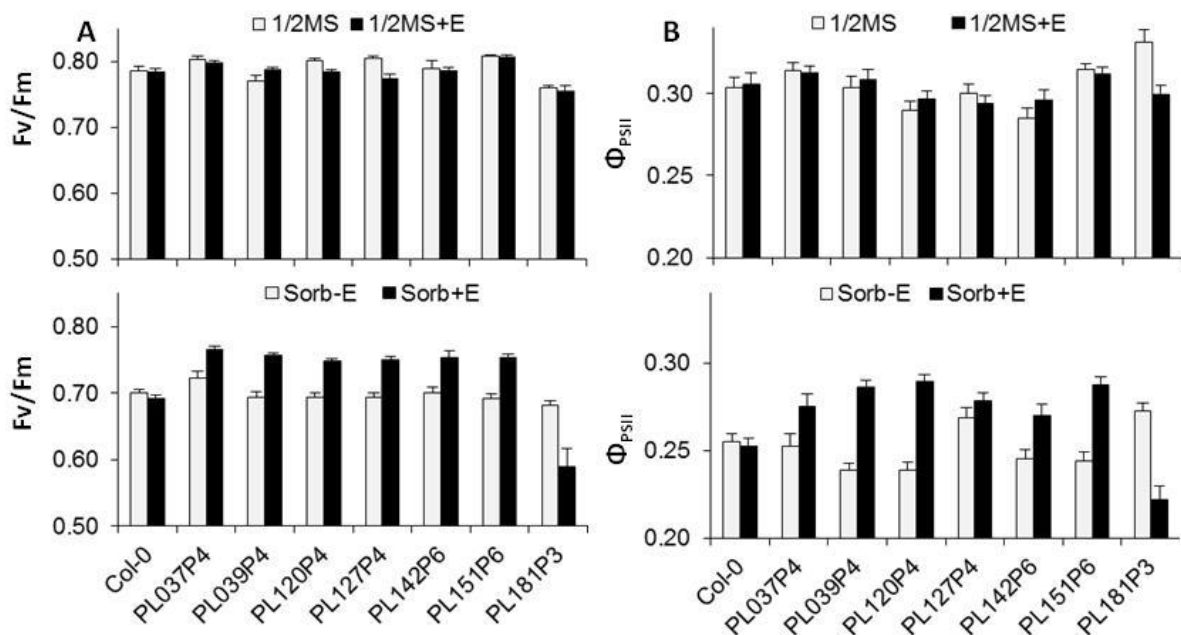
Megvizsgáltuk az LcVMP1 túltermelő növények fotoszintetikus paramétereit is. Üvegházban nevelt növényeken sókezelést alkalmaztunk és az eredmények azt mutatták, hogy a PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) kevésbé csökkent az S12-es vonalak esetében (22. ábra). Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az LcVMP1 felelős lehet a növények megnövekedett sótoleranciájáért.



22. ábra Üvegházban nevelt, kezeletlen és sókezelt, 3 hetes Col-0 és S12-es növények PSII maximális hatásfokát ( $F_v/F_m$ ) mértük a sókezelés 0., 8. és 12. napján. A só kezeléseket 3 naponta végeztük. A kezeletlen növényeket csapvízzel, a kezeltet pedig 200mM-os NaCl oldattal öntöztük. A pontdiagramon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. \*-al ( $p < 0,05$ ) és \*\* -al ( $p < 0,005$ ) jeleztük ha az eltérések a vad típushoz képest szignifikánsak voltak (Student *t*-teszt).

### 5.8 Az ozmotikus-stressztoleráns PL127P04-es vonal jellemzése

A PAM mérésekkel kiválasztott növények klorofill fluoreszcenciáját a következő generáción újratesteltük és az ösztradiol függő változásokat hét vonal esetében tudtuk az utódokon is detektálni. Hat vonal megemelkedett  $F_v/F_m$  és/vagy  $\Phi_{PSII}$  értékeket mutatott, egy vonal esetében pedig csökkent értéket mutattak ezek a paraméterek (23/A-B ábra). Kontroll körülmények között, 1/2MS táptalajon, ezek a fluoreszcencia paraméterek nem mutattak szignifikáns eltérést a vad típusú növényekhez képest, és ezt az ösztradiol jelenléte sem befolyásolta (23/A-B ábra).



23. ábra A PAM méréssel azonosított transzgenikus növények klorofill fluoreszcenciája, kontroll (1/2MS +/- 5  $\mu$ M ösztradiol) és magas szorbitol (600mM +/- 5  $\mu$ M ösztradiol) tartalmú táptalajon. A mért fotoszintetikus paraméterek, A) PSII maximális hatásfoka (Fv/Fm) és B) a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ) volt.

A PL127P4-es vonal növényei magas koncentrációjú szorbitolt tartalmazó táptalajon, ösztradiol jelenlétében magasabb Fv/Fm értékeket mutattak, mint a vad típusú növények, (23/A ábra). A növényekből izolált cDNS 800 bázispár hosszúságú volt, 270 bázispáros ORF-el (Függelék 3. ábra). A kódolt fehérje magas fokú hasonlóságot mutatott egy *Arabidopsis* acetil-koenzim A kötő fehérjével az ACBP6-al (*ATIG31812*) (24 ábra), ezért LcACBP-nek neveztük el. A fehérjén található egy konzervált ACBP domén (Függelék 3. ábra), amely 90%-os egyezést mutat az *A. thaliana* és *A. lyrata* ACBP6 fehérjén megtalálható doménnel.

```

LcACBP  MGLKEEFEEHAEKIKTLTESPSNEDLLILYGLFKQAKFGPVDTPARPGMFSPKERAKWDAW
AtACBP6 MGLKEEFEEHAEKVNTLTELPSNEDLLILYGLYKQAKFGPVDTSRPGMFMSKERAKWDAW
*****:*****:*****:*****:*****
LcACBP  KAVEGKSTEEAMNDYITKVKQLMEAAAST----
AtACBP6 KAVEGKSSEEAMNDYITKVKQLLEVAASKASTS
*****:*****:*.***.

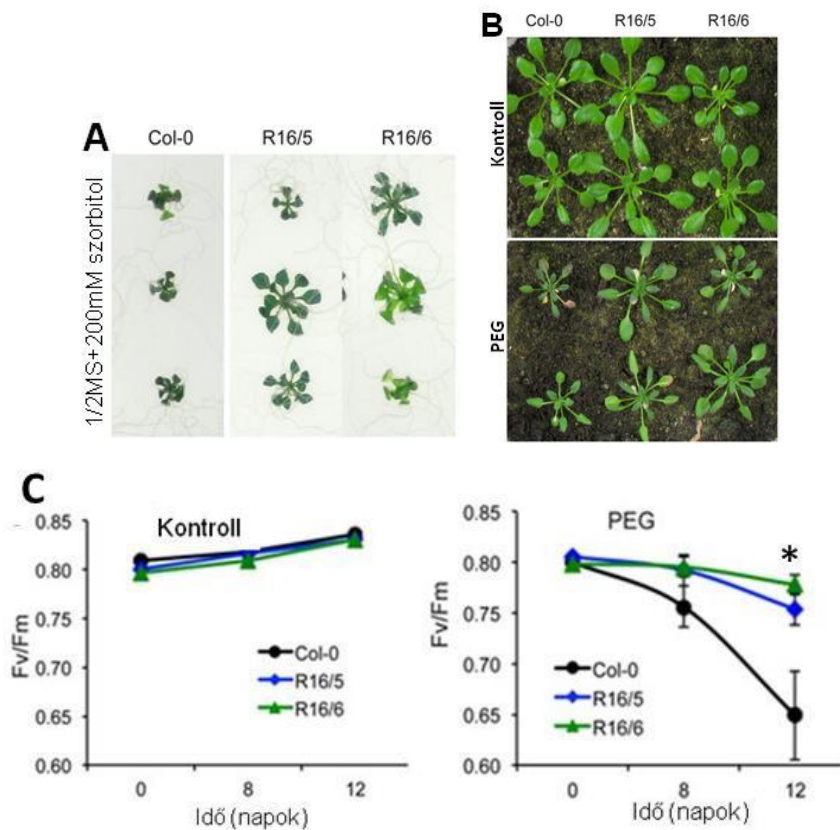
```

24. ábra A PL127P4-es vonal inszertjének szekvencia analízise. A prediktált PL127P4 aminosav szekvencia és az AtACBP6 fehérje aminosav szekvenciájának összehasonlítása ClustalW program segítségével. Az ACBP domént piros kiemeléssel jelöltük.

Az LcACBP cDNS-t stresszindukálható RD29A és konstitutív CaMV35S promóterrel, fejeztettük ki vad típusú *Arabidopsis* növényekben. A beépült cDNS kifejeződési szintjét



Northern blot analízissal (Függelék 6 ábra) vizsgáltuk. A kísérlethez heterozigóta, T2-es generációjú növényeket használtunk. Az általunk vizsgált valamennyi vonalban ki tudtuk mutatni az LcACBP mRNS-t. A stresszindukálható RD29A promóterrel kifejeztetett LcACBP cDNS-t tartalmazó vonalak erősebb növekedést mutattak magas ozmotikumot tartalmazó táptalajon (25/A. ábra). Üvegházban nevelt R16-os növények esetében pedig a kísérleteink azt mutatták, hogy a PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) és a növekedési ráta a vad típusú növényeknél kevésbé csökkent ozmotikus stressz hatására (25/B-C. ábra). Az üvegházi kísérletek során PEG6000 10%-os oldatával öntöztük a növényeket, így reprodukáltuk a vízhiányos állapotot (Verslues és mtsai., 2006), ugyanis a PEG a talajban gátolja a növények vízfelvételét, így a stresszkezelést egységesen és jól kontrollálható módon tudtuk kivitelezni.



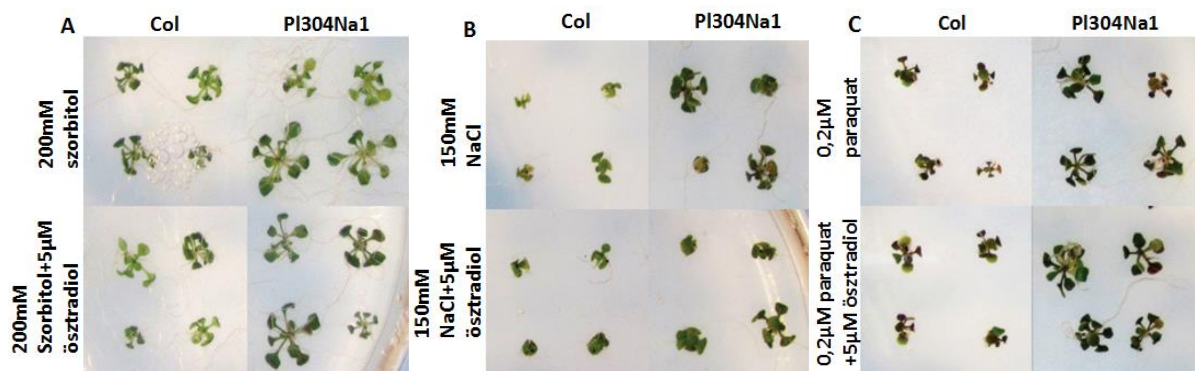
25. ábra A PAM szűrővel azonosított LcACBP gént tartalmazó növényvonalak ozmotikus stressztoleranciája és klorofill fluoreszcenciája. A) Col vad típusú és két független transzgenikus vonal (R16) 200mM szorbitol tartalmú táptalajon. B) 4 hetes üvegházban nevelt Col és R16 vonalak csapvízzel (kontroll) vagy 10%-os PEG6000(PEG) oldattal öntözve. C) A klorofill fluoreszcencia (a PSII maximális hatásfoka:  $F_v/F_m$ ) változása PEG 6000 kezelés hatására üvegházi Col és R16 vonalak esetében. A növényeket csapvízzel vagy PEG6000 10%-os oldatával öntöztük 3-4 naponta. A pontdiagramon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. \*-al ( $p < 0,05$ ) jeleztük ha az eltérések szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az LcACBP túltermelése képes a növények ozmotikus stresszel szembeni tűrőképességét növelni.

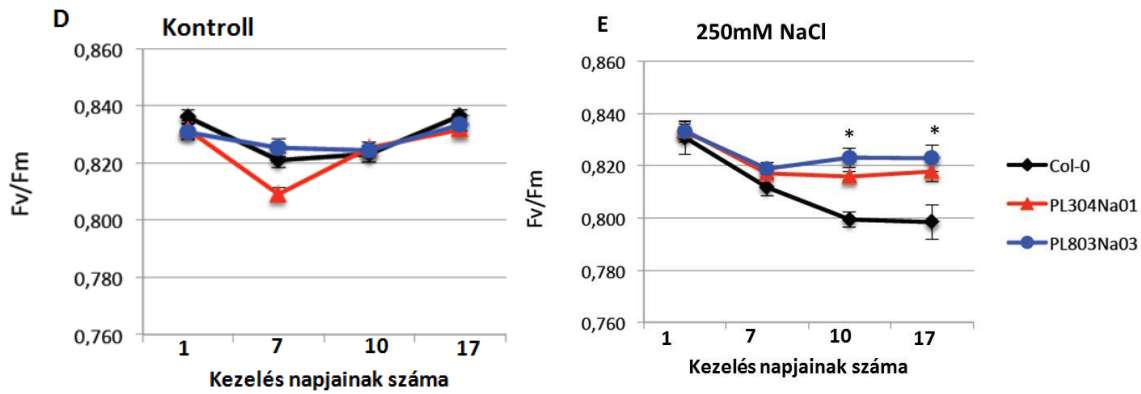
### 5.9 Ösztadiol független stressztoleráns vonalak azonosítása és jellemzése

A növekedési szűrésből és a fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrésből is azonosítottunk több, ösztadiol független, toleranciát mutató növényt. Mivel a laboratóriumunkban korábban használt genetikai szűrésekkel ellentétben mi nem a T1-es, hanem a T2-es populációt használtuk, ezért a rendszerünk alkalmassá vált T-DNS inszerciós mutánsok azonosítására is. Ezeknél azt feltételeztük, hogy a T-DNS beépülése által okozott mutáció állhat a fenotípusos eltérések hátterében. Az inszerciós vonalak részletesebb vizsgálatára (koszegregáció, érintett gének kifejeződése, komplementáció) nem volt lehetőségünk, ezért a bemutatott eredmények egy előzetes, a rendszerben rejlő lehetséges alkalmazást igyekeznek bemutatni. Az inszerciók feltételezett beépülési helyét TAIL-PCR technikával határoztuk meg.

A PL304Na01-es vonal esetében erőteljesebb növekedést figyeltünk meg 150mM nátrium klorid tartalmú táptalajon. Tovább vizsgálva a növényeket megállapítottuk, hogy szorbitol és paraquat jelenlétében is jobb növekedési rátával rendelkeztek és üvegházi körülmények között is, só kezelés hatására, kevésbé romlottak a vonal növény egyedeinek fotoszintetikus paraméterei (26-27. ábra).



26. ábra A PL304Na01-es vonal stressztoleranciája. A PL304Na01-es vonal, ösztadiol indukciótól függetlenül, nagyobb rozettával rendelkezik A) 200mM szorbitol, B) 150mM NaCl és C) 0,2µM paraquat tartalmú táptalajon növekedve. A növények 3 hétig ½ MS táptalajon növekedtek a jelzett kiegészítésekkel.



27. ábra Üvegházban nevelt növények PSII maximális hatásfok ( $F_v/F_m$ ) átlagértékei D) kontroll és E) 250mM NaCl kezelés mellett. A kísérleteket 4 hetes növényeken végeztük. A pontdiagramon az átlagtól való eltéréseket jelöltük. \*-al ( $p < 0,05$ ) jeleztük ha az eltérések a vadtypushoz képest szignifikánsak voltak (Student t-teszt).

A TAIL-PCR során kapott DNS fragmentumok bázis sorrendjét szekvenálással meghatároztuk, majd szekvencia homológia kereséssel próbáltuk azonosítani a T-DNS lehetséges beépülési helyét az *Arabidopsis thaliana* genomban. A PL304Na01-es vonal esetében egy fragmentumot kaptunk és megállapítottuk, hogy a T-DNS az At1g31830-as gén 5'UTR régiójába épült be 135 bázispárral az ATG előtt. Az At1g31830 a PUT2-t (Polyamine uptake transporter 2) kódolja, amely egy aminosav szállító fehérje család tagja.

A PL803Na03-as vonalnál erőteljesebb növekedést figyeltünk meg 150mM NaCl tartalmú táptalajon, és a kapott különbségek ösztradiol függetlennek bizonyultak. Üvegházban elvégzett sótűrési teszt során a fotoszintetikus paraméterekben, különösen a PSII maximális hatásfokban, (27.ábra/D és E) bizonyos fokú toleranciát figyeltünk meg. A Col-0 növények  $F_v/F_m$  értékei határozott csökkenést mutattak só kezelés hatására, míg a PL803Na03 vonal egyedei kevésbé. A T-DNS beépülési helyeként az At2g39010 gén 3' régióját határoztuk meg, 392 bázispárra a STOP kodon után. Az At2g39010 lókuszt a PIP2E (Plasma membrane intrinsic protein 2E és AtPIP2,6) fehérjét kódolja, mely ismert, mint a víz csatornák szerkezeti eleme (Prado és mtsai., 2013). Az, hogy a T-DNS a STOP kodon után épült be bizonytalaná teszi a feltételezést, hogy valóban ez az inszerció a felelős a növények fenotípusos elváltozásáért.

## 6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A halofitákat mint értékes génforrásokat azonosították a stressztoleranciához kapcsolódó kutatásokban (Nevo és Chen, 2010). A multigénes háttérű toleranciát biztosító tulajdonságok komoly kihívások elé állítják a nemesítőket. Ilyen esetekben elkerülhetetlen a mennyiségi tulajdonságok kialakításában szerepet játszó kromoszóma régiók részletes térképezése (QTL mapping) és a lókuszokhoz kapcsolt molekuláris markerek azonosítása (Arraouadi és mtsai., 2010, Chankaew és mtsai., 2014, Pandit és mtsai., 2010). Ezenfelül, az inkompatibilitás is komoly korlátozó körülmény, amely akadályozza a fajok közötti géntranszfert. Ezen problémák kiküszöbölésére adaptáltuk a COS rendszert (Papdi és mtsai., 2008, Rigó és mtsai., 2012), amelyet úgy módosítottunk, hogy alkalmassá váljon erre a feladatra. Az *Arabidopsis thaliana* közeli rokonát a *Lepidium crassifolium*-ot használtuk génforrásként, amelynek só és szárazságtűrő képességét részletesen vizsgáltuk és jellemeztük. A kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sikerült azonosítani olyan géneket egy halofita fajból, melyek képesek megnövelni egy érzékeny faj adott típusú stressztoleranciáját.

Az általunk előállított *Lepidium crassifolium* COS gyűjteményünk, amely 40 000 független transzgenikus *Arabidopsis* növény vonal magját tartalmazza, sokféle szűrési eljárásban használható. Ellentétben a korábban leírt *Eutrema salsugineum* cDNS könyvtárral, amely konstitutívan fejeztethető ki (Du és mtsai., 2008), a COS rendszer egy kémiai indukáló szer segítségével lehetővé teszi, hogy időben irányítható módon fejeztessük ki a cDNS inszertet. A COS rendszerben a fenotípusok dominánsan és feltételhez kötötten (indukáló szer) jelentkeznek és ez lehetővé teszi, hogy a fenotípus-gén kapcsolatok egyértelműen azonosíthatóak legyenek (Papdi és mtsai., 2008, Joseph és mtsai., 2014). További előnye a COS rendszernek, hogy az azonosítás és klónozás egy egyszerű folyamat. Az inszert felszaporítása PCR-el és újraklónozása a Gateway rekombinációs helyek segítségével könnyen kivitelezhető (Rigó és mtsai., 2012). Az általunk vizsgált inszertek nagy részét sikeresen felszaporítottuk a kiválasztott vonalokból és azonosítottuk őket a szekvencia homológia keresések segítségével. A laboratóriumunkban korábban is használt COS rendszeren számos módosítást, újítást végeztünk. A rendszer alapját képező expressziós vektor kodonjait az *Arabidopsis*-nak megfelelően optimalizáltuk és a növényi rezisztencia markert higromicinről foszfinotricinre (glufozinát vagy Basta) cseréltük a transzgenikus növények szelekciójának könnyebbé tétele miatt. A korábbi kísérleti rendszerektől nagy mértékben eltérő, más típusú stresszkezeléseket használtunk kísérleteink során. A rövid távú, erős stresszkezelések helyett mi hosszabb távú (3 hét) és moderált kezeléseket alkalmaztunk

amely minimális növekedési lehetőséget biztosított a vad típusú *Arabidopsis* növények számára is. A szűrések során a transzgenikus növények T2-es generációját használtuk (korábbi szűrésekben a T1-es generációval dolgoztak). Ez a módosítás lehetővé tette, hogy ugyanazt a magpopulációt többféle szűrésben is vizsgáljuk, a kiválogatott növény vonalaknál bármikor visszatérhessünk a korábbi generációhoz illetve, hogy T-DNS inszerciós mutánsokat is azonosíthassunk.

A *Lepidium* COS gyűjteményünk, ozmotikus, só és oxidatív stresszre kidolgozott, nagy mintaszámú szűréstechnikájával 19 olyan vonalat azonosítottunk, amely kiemelkedő növekedést, vagy megváltozott klorofill fluoreszcenciát mutatott az, ellenőrzött stressz körülmények között. A nem invazív PAM Imaging mérési technológiával kidolgoztunk egy szűrési rendszert, amellyel eltéréseket detektálhatunk, többek között, a PSII maximális hatásfokában (Fv/Fm) vagy a PSII fotokémiájának relatív hatásfokában ( $\Phi_{PSII}$ ) (Oxborough, 2004), ozmotikus stressz alatt álló növények esetében. A klorofill fluoreszcencia mérése már korábban is vizsgált és használt módszer volt arra, hogy olyan mutánsokat illetve genotípusokat azonosítsanak, melyek megváltozott fotoszintetikus aktivitást mutattak, szárazság vagy hideg kezelések hatására (Mishra és mtsai., 2014; Niyogi és mtsai., 1998; Woo és mtsai., 2008), de nagyrészt üvegházi vagy szabadföldi növények esetében. Mi dolgoztuk ki az első klorofill fluoreszcencia alapú, *in vitro*, nem invazív, nagy áteresztő képességű, fluoreszcencia alapú szűrési módszert. A PAM alapú módszer kombinálása COS rendszerünkkel új lehetőségeket teremtett a génazonosítás terén.

A génazonosítási rendszerünk működőképességének bizonyításához, kiválasztottunk több olyan vonalat, melyek toleranciáját részletesen jellemeztük és független transzgenikus növényekkel igazoltuk. A PL542Na1-es vonal sótoleranciáját a GDSL-lipáz/észteráz fehérje családhoz tartozó gén túltermelése okozta. Ez a *Lepidium* fehérje közeli rokonságot mutatott az *Arabidopsis* MVP1/GOLD36/ERMO3 fehérjével, amely az endoplazmatikus retikulum (ER) integritásának fenntartásában, a fehérje transzportokban és az ER-hez kapcsolt védekező reakciókban vesz részt (Jancowski és mtsai., 2014; Marti és mtsai., 2010; Nakano és mtsai., 2012). Az MVP1 kölcsönhat a PYK10 nagy fehérje komplexszel, amely az ER-hez kapcsolható védekező rendszer része (Nakano és mtsai., 2012). Feltételezhetjük, hogy a fehérje különböző védekező reakciókban vesz részt, mivel az *ATIG54030*-as gén expressziója megemelkedik szárazság, ozmotikus stressz, UV-B, sebzés és különböző patogének hatására (eFP Browser, <http://bbc.botany.utoronto.ca>).

A PL127P4 megemelkedett fotoszintetikus paraméter értékeket biztosított az ozmotikus stressz alatt álló növényeknek. A teljes hosszúságú cDNS egy kicsi acetil-koenzim A kötő fehérjét kódolt (LcACBP), amely a legnagyobb hasonlóságot az *Arabidopsis* ACBP6-al mutatta. A kis ACBP fehérjék erősen konzerváltak minden eukarióta fajban, hosszú láncú acetil-koenzim A észtereket kötnek és a növények zsírsav metabolizmusában, az ehhez kapcsolódó jelátviteli utakban és transzport folyamatokban is fontos szerepet játszanak. Egyes ACBP fehérjék befolyásolják a növények stresszválaszait és fejlődését (Li-Beisson és mtsai., 2013; Xiao és Chye, 2011). Az *Arabidopsis* ACBP6-ról bizonyították, hogy szabályozza a foszfatidil-kolin és a foszforsav szintjét és növeli a faggyal szembeni toleranciát (Chen és mtsai., 2008; Liao és mtsai., 2014). Az ACBP6 az ACBP4-el és az ACBP5-el együtt a foszfolipáz D enzimet is szabályozza és ezen keresztül befolyással van a növények ABA érzékenységre a mag fejlődése és csírázása során (Hsiao és mtsai., 2014). Jelenlegi ismereteink szerint, a kis acetil-koenzim A kötő fehérjék növelik az ozmotikus stresszel szembeni toleranciát a foszfatidil-kolin és a foszforsav anyagcserén keresztül (Gao és mtsai., 2010). Az ACBP típusú fehérjék rizsben hatással vannak a növények fejlődésére is. A korai embriógenézisben, a levelek öregedésében, a nehézfém mérgezések által okozott károsodásokkal szembeni ellenálló képességben, az oxidatív stressz folyamatokban, a patogénekkal szembeni rezisztenciában és a fagytűrő képesség kialakításában fontosak (Meng és mtsai., 2011). Az *Arabidopsis* ACBP1-ről bebizonyították, hogy hatással van a foszfolipáz D gén kifejeződésére, a foszfatid savak felhalmozódására és ezen keresztül befolyásolja a növények hidegtűrését (Du és mtsai., 2010). Az *Arabidopsis* ACBP2-t túltermelő növények ellenállóbbak lettek a nehézfém kezelésekkel szemben és a nehézfémek által kiváltott lipid peroxidációs folyamatokra az ACBP2 is hatással volt. Feltételezték, hogy az ACBP-k a növényekben a stresszhatások utáni helyreállító folyamatokban vehetnek részt (Gao és mtsai., 2008).

A szűrés során kiválasztott megnövekedett toleranciát mutató növények között olyan vonalakat is azonosítottunk, melyek toleranciája indukáló szertől független volt. Ezeknél a növényeknél azonosítottuk a T-DNS beépülésének helyeit, feltételezve, hogy az inszerció következtében fellépő mutáció a felelős a fenotípusos változásokért. A PL304Na01-es vonal esetében a T-DNS az *At1g31830* gént kódoló szakaszába épült be, mely a PARAQUAT RESISTANT 1 (PAR1) fehérjét kódolja. A gén által kódolt fehérje a paraquat transzportjában játszik szerepet. A *par1* mutáns növények érzékenysége csökkent paraquatra, a PAR1 túltermelőké pedig megnőtt (Li és mtsai., 2013). A PL304Na01-es vonal esetében szintén

sérülhetett a paraquat transzportja a T-DNS beépülés következtében és ez okozhatta a növények megemelkedett tűrőképességét. A szorbitol és só kezeléssel szemben megemelkedett tolerancia azt sugallhatja, hogy ennek a génnek más szerepe is lehet.

A PL803Na03 vonalnál a T-DNS a PIP2E (Plasma membrane intrinsic protein 2E) fehérjét kódoló lókuszban inszertálódott be. A tudományos irodalom szerint a PIP gének kifejeződési szintjei, a levelek víztartalmával összefüggésben, változást mutatnak (Alexandersson és mtsai., 2009). A rizs PIP2,6 gén kifejeződési szintje erős emelkedést mutatott toxikus bór koncentrációra és az OsPIP2,6-ot túltermelő *Arabidopsis* növények megemelkedett bór toleranciát mutattak. Akvaporin gátló szerekkel ez a megemelkedett tűrőképesség visszafordítható volt (Mosa és mtsai., 2016).

Jelen munkánkban bemutattuk, hogy a megfelelően megtervezett COS rendszerünk alkalmas arra, hogy stressztoleranciában szerepet játszó géneket azonosítsunk, ismeretlen genetikai potenciállal rendelkező vad növényfajokban, és a fajok közötti géntranszfert alkalmazva a kutatásaink során jobban megismerjük a szárazság és sóstressz molekuláris hátterét. További kutatásokat végzünk jelenleg is, hogy jobban megismerjük az általunk azonosított gének molekuláris és biológiai funkcióit, illetve jellemezzük a stresszválaszokban betöltött szerepüket. Az azonosított gének pedig később felhasználhatóak molekuláris eszközként arra, hogy mezőgazdaságilag fontos fajok stressztoleranciáját javítsák.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Növénybiológiai Intézetében, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport tagjaként végeztem. Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik ez alatt a hosszú időszak alatt segítettek munkámat. Elsősorban témavezetőimnek a szakmai iránymutatást és támogatást, Dr. Szabados Lászlónak, aki az Arabidopsis Molekuláris Genetikai csoport vezetője is egyben, és Dr. Rigó Gábornak, aki szakmai tudásával és eredeti ötleteivel sok akadályon átsegített. A Bayer CropSciencenek (Ghent, Belgium) az anyagi forrás biztosítását, Dr. Matthew Hannahnak a szakmai támogatást. Sass Lászlónak és Faragó Dórának a PlantSize szoftver fejlesztésénél a teljes erőbedobással végzett munkát és Dórának, hogy tovább dolgozik a szűrés során kapott ígéretes génekkel. Az Arabidopsis Molekuláris Genetikai csoport korábbi és jelenlegi tagjainak, Barkóczyiné Kiss Edinának, Dr. Cséplő Ágnesnek, Dr. Zsigmond Laurának, Boros Bogátának, Király Anna Máriának, Kovács Hajnalkának, Dobó Mihálynak és Dr. Mary Joseph Prathibának a közös munkát, a jó tanácsokat és a sok bátorítást. Szeretném továbbá a Növényi Foto- és Kronobiológiai Csoport jelenlegi és korábbi tagjainak, Dr. Ádám Évának, Dr. Nagy Ferencnek, Dr. Viczián Andrásnak, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak, Sándor Györgyinek, Dr. Fejes Erzsébetnek, Dr. Páy Anikónak és Koósné Majzik Hedvignek megköszönni, hogy elindítottak a pályán és, hogy tanulhattam tőlük. Szeretnék köszönetet mondani jelenlegi főnökömnek, Dr. Fehér Attilának, többek között megértéséért és türelméért és hogy biztosított számomra lehetőséget és időt a fokozat megszerzéséhez. Köszönettel tartozom továbbá a Kutatóközpont korábbi és jelenlegi főigazgatóinak, Dr. Dudits Dénesnek, Dr. Ormos Pálnak, Dr. Nagy Ferencnek, és Dr. Vass Imrének, a Növénybiológia Intézet igazgatójának, hogy munkámat támogatták. A dolgozat létrejöttét a GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázat tette lehetővé.

Köszönöm továbbá családom támogatását és türelmét, elsősorban férjemnek, Dr. Mader Baláznak, gyermekeimnek Annának és Andrásnak és szüleimnek.



## 8. IRODALOMJEGYZÉK

**AGI** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815

**Ahuja I., de Vos R.C., Bones A.M. Hall R.D.** (2010) Plant molecular stress responses face climate change. Trends in Plant Science 15, 664–674.

**Akashi, K., Yoshida, Y., Kuwano, M., Kajikawa, M., Yoshimura, K., Hoshiyasu, S., Inagaki, N., Yokota, A.** (2011) Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. Planta 233:947–960.

**Akashi, K., Yoshimura, K., Nanasato, Y., Takahara, K., Munekage, Y., Yokota, A.**(2008) Wild plant resources for studying molecular mechanisms of drought/strong light stress tolerance. Plant Biotechnol.;25:257–263.

**Alexandersson, E., Danielson, J. Å.H., Råde, J., Moparthi, V. K., Kjellbom, M. F. P., Johanson, U.** (2010) Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. The Plant Journal Volume 61, Issue 4, Pages 650-660.

**Amtmann A.** (2009) Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. Molecular Plant 2, 3–12.

**An, J., Shen, X., Ma, Q., Yang, C., Liu, S., Chen, Y.** (2014) Transcriptome profiling to discover putative genes associated with paraquat resistance in goosegrass (*Eleusine indica* L.). PLoS ONE 9e99940.

**Apel, K., Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55:373–99.

**Arraouadi, S., Badri, M., Abdelly, C., Huguet, T., Aouani, M.E.** (2012) QTL mapping of physiological traits associated with salt tolerance in *Medicago truncatula* Recombinant Inbred Lines. *Genomics* 99, 118–125.

**Asselbergh, B., De Vieesschauwer D., Hofte M.** (2008) Global switches and fine-tuning ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact* 21:709–719.

**Ábrahám E., Hourton-Cabassa C., Erdei L., Szabados L.** (2010) Methods for determination of proline in plants. *Methods Mol Biol.*;639:317-31. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0\_20.

**Baker, N. R.** (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113.

**Baker, N.R., Rosenqvist, E.,** (2004) Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55, 1607–1621.

**Bartels, D. and Sunkar, R.** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24:23–58.

**Bartels, D. and Salamini, F.** (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiol.* 127: 1346–1353.

**Bates, L.S.** (1973) Rapid determination of free proline content for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205–207.

**Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J., Nekrasov, V.**(2015) Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32:76–84.

**Ben-Saad, R., Meynard, D., Ben-Romdhane, W., Mieulet, D., Verdeil, J.L., Al-Doss, A., Guiderdoni, E., Hassairi, A.** (2015) The promoter of the ALSAP gene from the halophyte grass *Aeluropus litoralis* directs a stress-inducible expression pattern in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.* Oct; 34(10):1791-806.

**Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D.** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Ann Rev Plant Biol* 59:21–39.

**Bratek Z., Fodor F., Király I., Nyitrai P., Parádi I., Rácz I., Rudnóy Sz., Solti Á., Szigeti Z. Tamás L.** (2013) A növényi anyagcsere élettana Eötvös Loránd Tudományegyetem <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ANovenyiAnyagcsere/ch10.html#d0e28045>.

**Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J.** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* care dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J* 45:113–122.

**Brocard-Gifford, I., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B., Finkelstein, R.R.** (2004) The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* 16:406–421.

**Bohnert, H.J. and Cushman, J.C.** (2000) The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 19: 334–346.

**Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.** (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Wiley and Blackwell. ISBN: 978-0-470-71421-8

**Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., Ibañez, C., Serrano, R., Rodriguez, P. L.** (2014) The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *The Plant Journal*. Volume 80, Issue 6.

**Chankaew, S., Isemura, T., Naito, K., Ogiso-Tanaka, E., Tomooka, N., Somta, P, ... Srinives P.** (2014) QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. *Theoretical and Applied Genetics* 127, 691–702.

**Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C.** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551–560.

**Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C.** (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth *Ann. Bot.*;89:907–916.

**Chen, T.H.H. and Murata, N.** (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 250–257.

**Chen, Q.F., Xiao, S., Chye, M.L.** (2008) Overexpression of the *Arabidopsis* 10-kilodalton acyl-coenzyme A-binding protein ACBP6 enhances freezing tolerance. *Plant Physiology* 148, 304–315.

**Chen, R., Sun, S., Wang, C., Li, Y., Liang, Y., An, F., ... Zuo, J.** (2009) The *Arabidopsis* paraquat RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* 19, 1377–1387.

**Clough S.J., Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735–743.

**Colcombet, J., Hirt, H.** (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413:217–226.

**Colom, M.R., Vazzana, C.** (2003) Photosynthesis and PSII functionality of drought—resistant and drought—sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental Experimental Botany* 49, 135–144.

**Conde, A., Chaves, M.M., Gerós, H.** (2011) Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* Sep;52(9):1583-602.

**Cornelissen, M., Vandewiele, M.** (1989) Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid psbA promoter. *Nucleic Acids Research* 17, 19–29.

**Devoto, A., Turner, J.G.** (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot* 92:329–337.

**Ding, F., Cui, P., Wang, Z., Zhang, S., Ali, S., Xiong, L.** (2014) Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in *Arabidopsis*. *BMC Genomics*. 2014 Jun 4;15:431. doi: 10.1186/1471-2164-15-431.

**Du, J., Huang, Y.P., Xi, J., Cao, M.J., Ni, W.S., Chen, X., Xiang, C.B.** (2008) Functional gene-mining for salt-tolerance genes with the power of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 56, 653–664.

**Du, Z.Y., Xiao, S., Chen, Q.F., Chye, M.L.** (2010) Depletion of the membrane-associated acylcoenzyme A-binding protein ACBP1 enhances the ability of cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152: 1585-1597.

**Faragó D., Sass L., Valkai I., Andrási N., Szabados L.** (2018) PlantSize offers an affordable, non-destructive method to measure plant size and color in vitro. *Frontiers in Plant Science*, 2018. Jan. 22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00219>

**Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D.** (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6: 269–279.

**Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Bota, J., Galme's, J., Henkle, M., Martínez-Canellas, S., Medrano, H.** (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist* 172: 73–82.

**Flowers, T.J., Colmer, T.D.** (2008), Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179: 945–963. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture (SOLAW)—Managing Systems at Risk*; Earthscan: New York, NY, UK, 2011.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Status of the World's Soil Resources. Main report (2015) <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>.

**Foyer, C.H., Noctor, G.**, (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146, 359–388.

**Franklin, K.A., Quail, P.H.** (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* 61: 11-24

**Fujibe, T., Saji, H., Arakawa, K., Yabe, N., Takeuchi, Y., Yamamoto, K.T.** (2004) A methyl viologen-resistant mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive *red1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiology* 134, 275–285.

**Fujii, H., Zhu, JK.** (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Nat Acad Sci USA* May 19, 2009 Vol. 106 no. 20.

**Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., ... Shinozaki, K.** (2012) Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6343–6347.

**Galme's, J., Medrano, H., Flexas, J.** (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* 175: 81–93.

**Gao, W., Li, H.Y., Xiao, S. and Chye, M.L.** (2010) Acyl-CoA-binding protein 2 binds lysophospholipase 2 and lysoPC to promote tolerance to cadmium-induced oxidative stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.*, 19, 989-1003.

**Gao, W., Xiao, S., Li, H.Y., Tsao, S.W., Chye, M.L.** (2009) *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. *New Phytol* 181: 89-102

**Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J.** (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Reg.* 37:263-285.

**Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R.** (1988) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87–92.

**Genty, B., Meyer, S., Piel, C., Badeck, F., Liozon, R.** (1998) CO<sub>2</sub> diffusion inside leaf mesophyll of ligneous plants. In: Garab Ged. *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 3961–3967.

**Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N.** (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks *Frontiers in Plant Science* Apr 22;5:151 DOI=10.3389/fpls.2014.00151

**Gregory, P.J., Ingram, J.S., Brklacich, M.** (2005) Climate change and food security. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360, 2139–2148.

**Grigore, M.-N., Toma, C.** (2010). A proposal for a new halophytes classification, based on integrative anatomy observations. *Oltenia Stud. Comun. Științele Nat. (Oltenia J. Stud. Nat. Sci.)* 26, 45–50. Elérhető online: [http://biozoojournals.ro/oscsn/cont/26\\_1/B08-Grigore.pdf](http://biozoojournals.ro/oscsn/cont/26_1/B08-Grigore.pdf).

**Gonzalez, C.V., Ibarra, S.E., Piccoli, P.N., Botto, J.F., Bocalandro, H.E.**(2012) Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 35: 1958-1968

**Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J. K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3 *PNAS* 97 (7) 3735-3740; doi:10.1073/pnas.97.7.3735.

**Han, S., Tang, R., Anderson, L.K., Woerner, T.E., Pei, Z.M.** (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in guard cells. *Nature* 425:196–200.

**Hanin, M., Ebel,C., Mariama Ngom, M., Laplaze, L., Masmoudi, K.** (2016)New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding *Front. Plant Sci.* 7:1787. doi: 10.3389/fpls.2016.01787.

**Haswell, E.S., Verslues, P.E.** (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *The Journal of General Physiology* May, 145 (5) 389-394; DOI: 10.1085/jgp.201411295

**Hayashi, K., Kinoshita, T.** (2014) Plant signaling: Abscisic acid receptor hole-in-one. *Nature Chemical Biology* 10:414-415.

**Hirota, A., Tanaka, T., Ono, H., Sakata, Y., Hayashi, T., Taji, T..** (2015). CSP41b, a protein identified via FOX hunting using *Eutrema salsugineum* cDNAs, improves heat and salinity stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications.* 106(1) doi:. 10.1016/j.bbrc.2015.06.151.

**Hsiao, A.S., Haslam, R.P., Michaelson, L.V., Liao, P.,Chen, Q.F., Sooriyaarachchi, S., ... Chye, M.L.** (2014) *Arabidopsis* cytosolic acyl-CoA-binding proteinsACBP4, ACBP5 and ACBP6 have overlapping but distinct roles in seed development. *Bioscience Reports* 34e00165. doi: 10.1042/BSR20140139



**Huan, D., Wu, W., Abrams, S.R., Cutler, A.J.** (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors J. Exp. Bot. 59 (11): 2991-3007.

**Hwa, C.M., Yang, X.C.** (2008) The AtMKK3 pathway mediates ABA and salt signaling in *Arabidopsis*. Acta Physiol Plantarum 30:277–286.

**James, R.A., Rivelli, A.R., Munns, R., von Caemmerer, S.** (2002) Factors affecting CO<sub>2</sub> assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. Funct. Plant Biol. 29:1393–403.

**Jancowski, S., Catching, A., Pighin, J., Kudo, T., Foissner, I., Wasteneys, G.O.** (2014) Trafficking of the myrosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. Plant Journal 77, 497–510.

**Jarraud, M.** (2005) Climate and land degradation. World Meteorological Organization.

**Joseph, M.P., Papdi Cs., Kozma-Bognár L., Nagy I., Lopez-Carbonell, M., Rigó G., Koncz Cs.& Szabados L.** (2014) The *Arabidopsis* zinc finger PROTEIN3 interferes with abscisic acid and light signaling in seed germination and plant development. Plant Physiology 165, 1203–1220.

**Kaldenhoff, R., Grote, K., Zhu, J.-J., Zimmermann, U.** (1998), Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 14: 121–128. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00111.x.

**Karimi, M., Inze, D., Depicker, A.** (2002) Gateway vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. Trends in Plant Science 7, 193–195.

**Kaushik, D. és Aryadeep, R.** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci., 02 December 2014 | <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

**Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., Knight, M. R.** (2000), Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal*, 23: 267–278. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00786.x.

**Kim, H.J., Kim, Y.K., Park, J.Y., Kim, J.** (2002) Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the Crepeat/ dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29: 693-704.

**Kim, J. M., To, T. K., [...] Seki, M.** (2017) Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants* 3, Article number: 17097 doi:10.1038/nplants.2017.97.

**Kintisch, E.** (2009) Global warming: projections of climate change go from bad to worse, scientists report. *Science* 323, 1546–1547.

**Knetsch, M., Wang, M., Snaar-Jagalska, B.E., Heimovaara-Dijkstra, S.** (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8:1061–1067.

**Koiwa, H., Bressan, RA., Hasegawa, PM.** (2006) Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens. *J Exp Bot* 57: 1119-1128.

**Koncz Cs., Martini, N., Szabados L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J.** (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In P.M.B. Manual (ed. Gelvin S.B.), pp. 53–74. Kluwer Academic Publishers.

**Koncz Cs., Németh K., Rédei GP., Schell, J.** (1992) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 20: 963-976.

**Kronzucker, H.J., Britto, D.T.** (2011) Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytol. Jan*; 189(1):54-81.

**Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:2940–2945.

**Kulik, A., Wawer I., Krzywińska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G.** (2011) SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. December, 15(12): 859-872. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0091>

**Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., Iida, H.** (2013) Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends Plant Sci.* 18:227–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.002>

**Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D., Schroeder, J.I.** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22:2623–2633.

**Lawlor, D.W., Cornic, G.** (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 275–294.

**Lee, K., Song, E.H., Kim, H.S., Yoo, J.H., Han, H.J., Jung, M.S., Lee, S.M., Kim, K.E., Kim, M.C., Cho, M.J., Chung, W.S.** (2008) Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283:23581–23588.

**Levitt, J.** (1980) Responses of plants to environmental stresses. Vol. II, Water, radiation, salt, and other stresses. New York, NY: Academic Press.

**Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., ... Ohlrogge, J.** (2013) Acyl-lipid metabolism. In *Arabidopsis Book*, Vol. 11 e0161.

**Li, C., Chen, Q., Gao, X., Qi, B., Chen, N., Xu, S., Chen, J., Wang, X.** (2005) AtHsfA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Sci China C Life Sci* 48: 540– 550.

**Li, J., Mu, J., Bai, J., Fu, F., Zou, T., An, F., Zuo, J.** (2013) Paraquat Resistant1, a Golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of paraquat. *Plant Physiology* 162, 470–483.

**Liao, P., Chen, Q.F., Chye, M.L.** (2014) Transgenic *Arabidopsis* flowers overexpressing acyl-CoA-binding protein ACBP6 are freezing tolerant. *Plant Cell Physiology* 55, 1055–1071.

**Lichtenthaler, H. K.** (1998), The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Ann. NY Acad. Sci.* 851:187–198.

**Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Knapp, M.** (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{Fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. *PHOTOSYNTHETICA* 43 (3): 379-393.

**Lim, G.-H., Zhang, X., Chung, M.-S., Lee, D. J., Woo, Y.-M., Cheong, H.-S., Kim, C. S.** (2010) A putative novel transcription factor, AtSKIP, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 185: 103–113. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03032.x.

**Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S., & Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3730–3734.

**Liu, J., Zhang, F., Zhou, J., Chen, F., Wang, B., Xie, X.**(2012) Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 78: 289-300

**Lu, C., Shao, Y., Li, L., Chen, A., Xu, W., Wu, K., Luo, Y., Zhu, B.** (2011) Overexpression of SIERF1 tomato gene encoding an ERF-type transcription activator enhances salt tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 58, 118–125.

**Lu, C., Zhang, J.** (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 50, 1199–1206.

**Luo, L., Zhang, P., Zhu, R., Fu J., Su, J., Zheng, J., Wang Z., Wang, D., Gong, Q.** (2017) Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in *Arabidopsis* Front Plant Sci. 2017; 8: 1459. doi: 10.3389/fpls.2017.01459.

**Marques da Silva, J.** (2016) Monitoring Photosynthesis by In Vivo Chlorophyll Fluorescence: Application to High-Throughput Plant Phenotyping. Applied Photosynthesis - New Progress, Chapter 1. <http://dx.doi.org/10.5772/62391>.

**Marti, L., Stefano, G., Tamura, K., Hawes, C., Renna, L., Held, M.A., Brandizzi, F.** (2010) A missense mutation in the vacuolar protein GOLD36 causes organizational defects in the ER and aberrant protein trafficking in the plant secretory pathway. The Plant Journal 63, 901–913.

**Martinez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M., Quintero, F.J.** (2007) Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiol 143: 1001-1012.

**Meng, W., Su, Y.C., Saunders, R.M., Chye, M.L.** (2011) The rice acyl-CoA-binding protein gene family: phylogeny, expression and functional analysis. New Phytol 189: 1170-1184.

**Mishra, A., Heyer, A.G., Mishra, K.B.** (2014) Chlorophyll fluorescence emission can screen cold tolerance of cold acclimated *Arabidopsis thaliana* accessions. Plant Methods 10, 38.

**Mishra, K. B., Iannacone, R., Petrozza, A., Mishra, A., Armentano, N., Vecchia, G. L., Trtílek, M., Cellini, F., Nedbal, L.** (2012). Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. Plant Science, 182, 79–86.

**Mishra, K.B., Mishra, A., Klem, K., Govindjee.** (2016) Plant phenotyping: a perspective. Ind J Plant Physiol. DOI 10.1007/s40502-016-0271-y.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490–498.
- Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tanokura, M.** (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci.* 18(5):259-66.
- Mosa, K. A., Kumar, K., Chhikara, S., Musante, C., White, J. C., Dhankher, O. P.** (2016). Enhanced Boron Tolerance in Plants Mediated by Bidirectional Transport Through Plasma Membrane Intrinsic Proteins. *Scientific Reports*, 6, 21640. <http://doi.org/10.1038/srep21640>
- Munns, R., James, R.A., Läuchli, A.** (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025–1043.
- Munns, R., és Tester, M.** (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651–81.
- Nakano, R.T., Matsushima, R., Nagano, A.J., Fukao, Y., Fujiwara, M., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.** (2012) ERMO3/MVP1/GOLD36 is involved in a cell type-specific mechanism for maintaining ER morphology in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7e49103. doi: 10.1371/journal.pone.0049103
- Nakashima, K., Ito, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009) Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology* Vol. 149, pp. 88–95.
- Nayyar, H., Gupta, D.** (2006) Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany* 58, 106–113.
- Nevo, E., Chen, G.** (2010) Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment* 33, 670–685.

**Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N.,** (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 742–749.

**Nishiyama, Y. és Murata, N.** (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 8777. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6020-0>

**Niyogi, K.K., Grossman, A.R., Bjorkman, O.** (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell* 10, 1121–1134.

**Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T., Hayakawa, T.**(2002) Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* Dec 18; 532(3):279-82.

**Oxborough K.** (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55, 1195–1205.

**Pandit, A., Rai, V., Bal, S., Sinha, S., Kumar, V., Chauhan, M.,...Singh, N.K.** (2010) Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.) *Molecular Genetics and Genomics* 284, 121–136.

**Papdi Cs., Abraham E., Joseph, M.P., Popescu, C., Koncz Cs., Szabados L.** (2008) Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiology* 147, 528–542.

**Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert, Govindjee.** (eds.), (2010) *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, pp.33–73.

**Parvaiz, A.** (2014) *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*

pp183-200.

**Pérez-Salamó, I., Papdi Cs, Rigó G, Zsigmond L, Vilela, B., Lumbreras, V., Nagy I., Horváth B., Domoki M., Darula Zs., Medzihradzky K., Bögre L., Koncz Cs., Szabados L.** (2014) The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* May;165(1):319-34.

**Pietrini, F., Iannelli, M.A., Massacci, A.** (2002) Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 25, 1251–1259.

**Prado, K., Boursiac, Y., Tournaire-Roux, C., Monneuse, J.M., Postaire, O., Da Ines, O., Schaffner, A.R., Hem, S., Santoni, V., Maurel, C.** (2013) Regulation of *Arabidopsis* leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins. *Plant Cell* 25: 1029-1039.

**Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis P., Costantino, P., Bones, A. M., Nielsen H. B., Mundy, J.**(2013) Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* Apr, 161 (4) 1783-1794; DOI: 10.1104/pp.112.210773.

**Reynolds, J.F., Smith, D.M., Lambin, E.F., Turner, B.L., Mortimore, M., Batterbury, S.P., Walker, B.** (2007) Global desertification: building a science for dryland development. *Science* 316, 847–851.

**Rigó G., Papdi Cs., Szabados L.** (2012) Transformation using controlled cDNA overexpression system. *Methods in Molecular Biology* 913, 277–290.

**Rigó G., Valkai I., Faragó D., Kiss E., Van Houdt, S., Van de Steene, N., Hannah, M., Szabados L.** (2016). Gene mining in halophytes: functional identification of stress tolerance genes in *Lepidium crassifolium*. *Plant Cell Environ.* 39, 2074–2084. 10.1111/pce.12768.



**Ruban, A.V.** (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology*, 170(4), 1903–1916.

**Rueden, C. T.; Schindelin, J., Hiner, M. C. DeZonia, B.E., Walter, A. E., Arena, E.T., Eliceiri K. W.** (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data", *BMC Bioinformatics* 18:529, doi:10.1186/s12859-017-1934-z.

**Saab I.N., Sharp R.E., Pritchard J., Voetberg G.S.** (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93:1329–1336

**Sambrook, J., MacCallum, P., Russel, D.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (vol. Third Edition). (3rd edn.). Cold Spring Harbor's Laboratory Press.

**Samuel, M.A., Mudgil, Y., Salt, J.N., Delmas, F., Ramachandran, S., Chilelli, A., Goring, D.R.** (2008) Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147:2084–2095.

**Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Eliceiri, K.W.** (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 555 82, 518-529.

**Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., (...) Shinozaki, K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31:279–92.

**Shangguan, Z., Shao, M., Dyckmans, J.,** (1999) Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. *Journal of Plant Physiology* 154, 753–758.

**Sharkey T.D.** (1990) Water stress effects on photosynthesis. *Photosynthetica* 24: 651–656.

**Singer, T., Burke E.** (2003) High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. *Methods Mol Biol.* 236:241-72.

**Soma, F., Junro, J., Yoshida, T., Abekura, M., Takahashi, F., Kidokoro, S., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017) ABA-unresponsive SnRK2 protein kinases regulate mRNA decay under osmotic stress in plants. *Nature Plants* 3, Article number: 16204 doi:10.1038/nplants.2016.204.

**Song, L., Huang, S.S.C., Wise, A., Castanon, R. Nery, J. R., Chen, H., Watanabe, M., Thomas, J., Joseph, Z. B., Ecker, J. R.** (2016) A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science* Vol. 354, Issue 6312

**Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagôa, A.M.M.A., Silveira, J.A.G.,** (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during waterstress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51, 45–56.

**Szabados L., Kovacs I., Oberschall A., Abraham E., Kerekes I., Zsigmond L., Nagy R., Alvarado, M., Krasovskaja, I., Gal, M., Berente, A., Redei GP., Haim, AB., Koncz Cs.** (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* 32: 233-242.

**Szabados L., Savouré A.** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* Feb;15(2):89-97.

**Székely Gy., Ábrahám E., Cséplő Á., Rigó G., Zsigmond L., Csiszár Cs., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz Cs., Szabados L.** (2007) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Sept*:19.

**Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2001) Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1, 4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol* 42:214–222.

**Tang, R.H., Han, S., Zheng, H., Cook, C.W., Choi, C.S., Woerner, T.E., Jackson, R.B., Pei, Z.M.** (2007) Coupling diurnal cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations to the CAS-IP3 pathway in *Arabidopsis*. *Science*. Mar 9;315(5817):1423-6.

**Tari I, Csiszár J, Gallé Á, Bajkán Sz, Szepesi Á, Vashegyi Á.** (2003) Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Bot Közlem* 90:113-132.

**Todaka, D., Zhao, Y., Yoshida, T., Kudo, M., Kidokoro, S., Mizoi, J., Kodaira, K.-S., Takebayashi, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., Toyooka, K., Sato, M., Fernie, A. R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017), Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *Plant J*, 90: 61–78. doi:10.1111/tpj.13468.

**Taji, T., Komatsu, K., Katori, T., Kawasaki, Y., Sakata, Y., Tanaka, S., Kobayashi, M., Toyoda, A., Seki, M., Shinozaki, K.** (2010) Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an *Arabidopsis*-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol*. Nov 24; (10):261.

**Tracy, F. E., Gilliam, M., Dodd, A.N., Webb, A.A.R., Tester, M.** (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant, Cell & Environment*, 31: 1063–1073. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01817.x.

**Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K.** (1999) A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in *Arabidopsis* Functions as an Osmosensor. *The Plant Cell* 11 (9) 1743-1754

**Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*.;45:523–539.

**Wang W., Wu Y., Li Y., Xie J., Zhang Z., Deng Z., Xie Q.** (2010) A large insert *Thellungiella halophila* BIBAC library for genomics and identification of stress tolerance genes. *Plant Molecular Biology* 72, 91–99.

**Wang, X., Jing, Y., Zhang, B., Zhou, Y., Lin, R.** (2015) Glycosyltransferase-like protein ABI8/ELD1/KOB1 promotes *Arabidopsis* hypocotyl elongation through regulating cellulose biosynthesis. *Plant Cell Environ.* Mar;38(3):411-22.

**Wang, Y., Chen, Z.H., Zhang, B., Hills, A., Blatt, M.R.** (2013) PYR/PYL/RCAR Abscisic Acid Receptors Regulate K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Channels through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Ca<sup>2+</sup> Channels at the Plasma Membrane of Intact *Arabidopsis* Guard Cells *Plant Physiol.* 2013 Oct; 163(2): 566–577.

**Weigel, D., Ahn, JH., Blazquez, MA., Borevitz, JO., Christensen, SK., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, EJ., Neff, MM., Nguyen, JT., Sato, S., Wang, ZY., Xia, Y., Dixon, RA., Harrison, MJ., Lamb, CJ., Yanofsky, MF., Chory, J.** (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003-1013.

**Weigel D., Glazebrook, J.**(2002) *Arabidopsis* a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Wickens, G.E.** (1998) .Ecophysiology of economic plants in arid and semi-arid lands. Berlin: Springer.

**Woo, N.S., Badger, M.R., Pogson, B.J.** (2008) A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* 4, 27.

**Xiao, S., Chye, M.L.** (2011) New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* 50, 141–151.

**Yamada, S., Komori, T., Myers, T., Kuwata, S., Kubo, T., Imaseki, H.** (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* 38:1226–1231.

**Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants *Molecular and General Genetics MGG* January 1993, Volume 236, Issue 2, pp 331–340.

**Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10:88–94.

**Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57:781–803.

**Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N.** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214–1222.

**Zhang, X.L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J.X., Chen, Z.Z.** (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front Plant Sci.* 2015 Feb 19;6:88.

**Zhu, J. K., Liu, J., Xiong, L.** (1998) Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *The Plant Cell* Jul, 10 (7) 1181-1191;

**Zuo, J., Niu, Q.W., Chua, N.H.** (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 2000 Oct;24(2):265-73.

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az extremofil fajok értékes forrásai lehetnek a stressztoleranciában szerepet játszó géneknek, amelyek alkalmazásával a gazdaságilag fontos növényfajok stressztűrő képességét is javíthatjuk. Munkánk során úgy módosítottuk a kutatócsoportunkban korábban kidolgozott indukálható cDNS túltermelésen alapuló genetikai rendszerünket (COS), hogy a *Lepidium crassifolium* (sziki zsázsa) sótűrő növényfajból készült cDNS könyvtárunkat egy jól jellemzett modell növényben, az *Arabidopsis thaliana*-ban, fejeztethessük ki. Kutatásunk kezdetén jellemeztük a *Lepidium crassifolium* só és szárazság toleranciáját laboratóriumi körülmények között, és azt összehasonlítottuk a halofita *Eutrema salsugineum*-mal és a glikofita *Arabidopsis thaliana*-val. Vizsgáltuk a gyökérhosszúság és a fotoszintetikus paraméterek változásait, illetve a növények prolin tartalmát a talaj emelkedő sókoncentrációjának függvényében. Megállapítottuk, hogy a *L. crassifolium* szárazság és sótűrése hasonlít vagy meghaladja a már ismert *E. salsugineum* növények stressztűrő képességét.

Kutatási programunk első részében a *Lepidium* cDNS könyvtárral 40 ezer transzgenikus *Arabidopsis* vonalat állítottunk elő. A *Lepidium* cDNS-eket tartalmazó *Arabidopsis* növényeket oxidatív, só és magas ozmotikus kezelésnek vetettük alá és kiválasztottuk a megnövekedett toleranciát mutató egyedeket. A szűrést in vitro végeztük, mértük a növények növekedési ütemét és klorofill fluoreszcencia paramétereit. A gén azonosítás érdekében kidolgoztunk egy nagy áteresztő képességű, nem invazív, klorofill fluoreszcencia változáson alapuló új szűrési eljárást is. A fotoszintetikus paraméterek közül a PSII maximális hatásfoka (Fv/Fm) és a PSII fotokémiájának relatív hatásfoka ( $\Phi$ PSII) bizonyult a szűrés során alkalmazhatónak. A Petri csészés rozetta méret változásokat az általunk fejlesztett MatLab alapú PlantSize szoftverrel mértük. Összesen, a két különböző szűrési rendszerünkben, 40 ezer vonal stressztűrését vizsgáltuk és végül 20 olyan vonalat azonosítottunk, melyek emelkedett toleranciát mutattak. A kiválasztott vonalak egy részében meghatároztuk a beépült *Lepidium* cDNS szekvenciákat. A beépült cDNS-ek 82%-a teljes hosszúságú volt és teljes ORF-el (nyílt leolvasási kerettel) rendelkezett, míg 18% esetében hiányzott a cDNS 5' vége. A *Lepidium* és az *Arabidopsis* fehérjék aminosav szekvenciáinak összehasonlításakor a homológia 84% volt. A klónozott cDNS-eket pCaMV35S promóter (S sorozat) illetve pRD29A promóter (R sorozat) segítségével, független, transzgenikus *Arabidopsis* növényekben fejeztettük ki. Az így előállított vonalak só, szárazság és oxidatív

stressztűrő képességét üvegházban is vizsgáltuk. Ezzel az eljárással bizonyítottuk, hogy a halofita növényből származó gének felelősek a növények megváltozott stressztűréséért.

A teljes hosszúságú cDNS-ek között azonosítottunk egy feltételezhetően *Lepidium* GDSL lipázt, amelynek *Arabidopsis* homológja az endoplazmatikus retikulum (ER) integritásának fenntartásában, a fehérje transzportokban és az ER-hez kapcsolható védekező reakciókban vesz részt. Az ozmotikus stresszhatás alatt is kiemelkedő fotoszintetikus paraméterekkel rendelkező PL127P4-es vonalból pedig egy ACBP domént tartalmazó fehérje homológját izoláltuk. Az ACBP domént tartalmazó fehérjék jellemzően foszfatidil-kolint és acetil koenzim A-t kötnek, így védik meg azokat a degradációtól és a sejteken belül ezeknek a molekuláknak a szállításában is részt vesznek. Az ACBP-k a növényekben a stresszhatások utáni helyreállító folyamatokban is valószínűleg részt vesznek.

A növekedési és a fotoszintetikus paramétereken alapuló szűrésből is azonosítottunk több, indukáló szertől független, toleranciát mutató növényt is. A mi rendszerünkben a T2-es generáció növényeit használtuk genetikai szűrésre. Ezért feltételeztük, hogy a T-DNS beépülése által okozott mutációk hatására megjelenő fenotípusos eltérések is vizsgálhatóak és ez magyarázhatja a konstitutívan megjelenő toleranciát vagy hiperszenzitivitást.

A PL304Na01-es vonal az indukáló szertől függetlenül toleránsnak bizonyult szorbitol, paraquat és sókezelés során. Meghatároztuk a T-DNS beépülési helyét, amely az *At1g31830* gén 5'UTR régiójába esett. Ez a genom szakasz az AtPUT2 (Polyamine uptake transporter 2) fehérjét kódolja, amely egy aminosav szállító fehérje család tagja és már szerepel a tudományos irodalomban, PARAQUAT RESISTANT 1 (PAR1) néven. A PAR1 hiányos mutáns növények érzékenysége csökkent paraquatra, a túltermelőké pedig megnőtt. A PL304Na01-es vonal növényeiben szintén sérülhetett a paraquat transzportja a T-DNS beépülés következtében és ez okozhatta a növények megemelkedett paraquat tűrését.

A PL803Na03 vonalnál üvegházi só kezelés hatására a fotoszintetikus paraméterekben megfigyelhető csökkenés kisebb mértékű volt mint a vad típusú kontroll növényeké és az eltérés szintén indukáló szertől független volt.

Fontosabb eredményeink a következők:

-Jellemeztük a *Lepidium crassifolium* stressztűrő képességét.

-Kifejlesztettünk egy *in vitro*, fotoszintetikus paramétereken, és egy rozetta növekedésen alapuló szűrési rendszert.

-Kidolgoztunk egy új genetikai rendszert, amely lehetővé teszi a fajok közötti véletlenszerű génátvitelt és az ellenőrzött túltermelésen alapuló génazonosítást.

-Bizonyítottuk, hogy a rendszer segítségével lehetséges a stressztoleranciát befolyásoló gének azonosítása, izolálása, jellemzése.

-Több *Lepidium* gén esetében bizonyítottuk, hogy alkalmasak a glikofita növények stressztűrésének javítására.

A módosított szűrési rendszer segítségével azonosított gének alkalmasak lehetnek mezőgazdaságilag fontos fajok genetikai anyagának javítására. Ezen eredmények hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a szárazság és a sóstressz molekuláris hátterét jobban megismerjük. A kutatómunka a Bayer CropScience (Gent) céggel folytatott tudományos együttműködés során, egy alkalmazott kutatási projekt keretében valósult meg.



## 10. SUMMARY

Extremophile plants are valuable gene sources of tolerance traits that have different functions in stress tolerance. Through the application of these genes, we can elevate the stress tolerance of crop plants. We have employed the modified Conditional cDNA overexpression system (COS) to transfer a cDNA library from the halophyte *Lepidium crassifolium* to the glycophyte model species *Arabidopsis thaliana*. We characterized salt and drought tolerance of *Lepidium crassifolium* plants and we compared it with *Eutrema salsugineum* and *Arabidopsis thaliana*. We examined the changes in root length, in photosynthetic activity and in proline content of the plants, during different salt treatments. We found that salt and drought tolerance of *L. crassifolium* is comparable or better to *E. salsugineum*, a well-known halophytic relative of *Arabidopsis*.

The transgenic *Arabidopsis* plants, which contained and expressed *Lepidium* cDNA, were screened for tolerance to oxidative, salt and high osmotic stress, allowing the identification of individual plants with increased stress tolerance. The screens were done under in vitro conditions where growth rate and the chlorophyll fluorescence of plants were also investigated. In order to identify new genes, we developed a high throughput and non-invasive new screening system based on chlorophyll fluorescence imaging. The maximal PSII quantum yield (Fv/Fm) and the effective PSII quantum yield ( $\Phi$ PSII) were the most characteristic parameters for chlorophyll fluorescence based screening. We followed the changes in rosette size with our own developed computer application called PlantSize, a MatLab based computer software. With PlantSize it is possible to measure the fresh weight, dry weight and the color (HUE) of plants. Based on the HUE values PlantSize can estimate the chlorophyll and anthocyanin content of *Arabidopsis* rosettes. We screened all together 40000 transgenic lines with the two different screening systems, and identified 19 lines with elevated stress tolerance. We have amplified the cDNA insert from selected lines and determined the nucleotide sequences of the inserted DNA. The 82% of inserted DNA were full length with full open reading frame, and in 18% they have missed the 5' end of cDNA. Having compared the *Arabidopsis* and *Lepidium* amino acid sequences, we found that their homology was over 85%. Extensive validation was performed to confirm the tolerance characteristics associated with the identified genes. We introduced the identified cDNA sequences into plant expression vectors with promoters pCaMV35S or RD29A. We transformed wild type *Arabidopsis* plants with these constructs to confirm the capacity of the cDNA clones to elevate stress tolerance of in vitro and greenhouse grown plants.

The PL127P4 line showed elevated stress tolerance and higher Fv/Fm value during osmotic stress treatment only in the presence of estradiol. The predicted Lepidium protein has a typical ACBP domain. Such proteins are involved in phosphatidylcholine and Acyl-CoA binding, protecting acyl-CoAs from degradation by microsomal acyl-hydrolases and functioning as intracellular carriers of Acyl-CoA esters. ACBPs have been implicated in post-stress membrane repair mechanisms.

The PL542Na1 line was derived from a plant, which grew better on high salt medium. PL542Na1 plants were more tolerant to salt stress than Col-0 in the presence of estradiol, but were similar to wild type in the absence of the inducer. Based on the inserted cDNA sequence the predicted amino acid sequence showed the highest similarity to the GDSL-like lipase/acylhydrolase family protein MVP1/GOLD36/ERMO3, encoded by *AT1G54030* in Arabidopsis and were named LcMVP1. The AtMVP1 is implicated in maintenance of endoplasmatic reticulum integrity, protein trafficking and endoplasmatic reticulum-related defenses.

In several lines tolerance to the selected trait was not dependent on estradiol induction of the inserted cDNA. In such lines either T-DNA insertion or an independent mutation can be responsible for the observed phenotype. The line PL304Na01 was identified by screening for enhanced growth on high salt medium. The line showed enhanced tolerance to salt, sorbitol and paraquat under in vitro conditions. To identify the T-DNA insertion site in the Arabidopsis genome, the flanking genomic region was amplified by TAIL-PCR, sequenced and the insertion mapped by sequence homology search. Single PCR fragment was obtained, and the T-DNA insert was localized into the 1st intron of the 5' UTR region of *AT1G31830* gene, 135bp upstream from the ATG. *AT1G31830* Encodes PUT2, Polyamine uptake transporter 2, an amino acid permease family protein. Interestingly, the protein was recently described as PARAQUAT RESISTANT 1 (PAR1), which was shown to be involved in paraquat transport. Mutation of PAR1 reduced paraquat sensitivity, while overexpression has enhanced it. Chlorophyll fluorescence of salt-stressed PL803Na3 plants were less affected than wild type. While Fv/Fm values of Col-0 plants gradually decreased during salt irrigation, Fv/Fm of PL803Na3 was only slightly reduced. Mapping the T-DNA insertion by sequencing the flanking genomic region revealed that it took place in the 3' region of the gene *AT2G39010*. The gene encodes the Plasma membrane intrinsic protein 2E (PIP2E, AtPIP2,6), which has water channel activity. The fact that the T-DNA is located downstream of the gene can question the assumption that it is responsible for the salt and sorbitol tolerance in this line.

We demonstrated that the properly designed COS system is suitable to explore natural variability of wild species, facilitate interspecific gene transfer and contribute to our efforts to understand molecular bases of drought and salt tolerance. Identified genes can further be utilized as molecular tools to improve stress tolerance of crops.

This project was supported by funding from Bayer CropScience as cooperation between the company and our research team.

## 11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

**Rigó G. és Valkai I., Faragó D., Kiss E., Van Houdt, S., Van de Steene, N., Hannah, M., Szabados L.** (2016). Gene mining in halophytes: functional identification of stress tolerance genes in *Lepidium crassifolium*. *Plant Cell Environ.* 39, 2074–2084. 10.1111/pce.12768.

MTMT: 3080577 Impakt faktor: 6,960

**Faragó D., Sass L., Valkai I., Andrási N., Szabados L.** (2018) PlantSize offers an affordable, non-destructive method to measure plant size and color in vitro. *Frontiers in Plant Science*, 2018. Jan. 22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00219>

MTMT: 3343909 Impakt faktor:4,298

Egyéb közlemények:

**Baba, A. I., Rigó G., Ayaydin F., Rehman A., Andrási, N., Zsigmond L., Valkai I., Urbancsok J., Vass I., Pasternak T., Palme K., Szabados L., Cséplő Á.** (2018) Functional analysis of the Arabidopsis thaliana CDPK-related kinase family: AtCRK1 regulates responses to continuous light. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(5), 1282; doi:10.3390/ijms19051282 (registering DOI)

Impakt faktor: 3.226

**Lajkó D.B., Valkai I., Domoki M., Ménesi D., Ferenc Gy., Ayaydin, F., Fehér A.** (2018) In silico identification and experimental validation of amino acid motifs required for the Rho-of-plants GTPase-mediated activation of receptor-like cytoplasmic kinases. *Plant Cell Rep.* 2018 Jan 16. doi: 10.1007/s00299-018-2256-y

MTMT: 3331743 Impakt faktor: 2,869

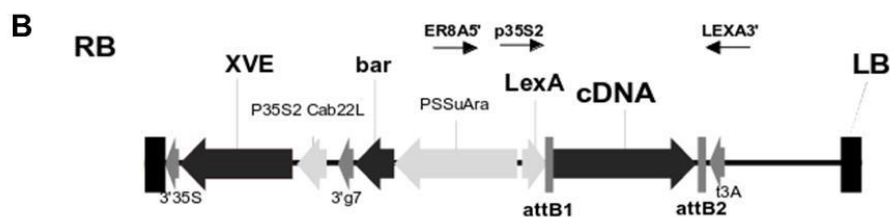
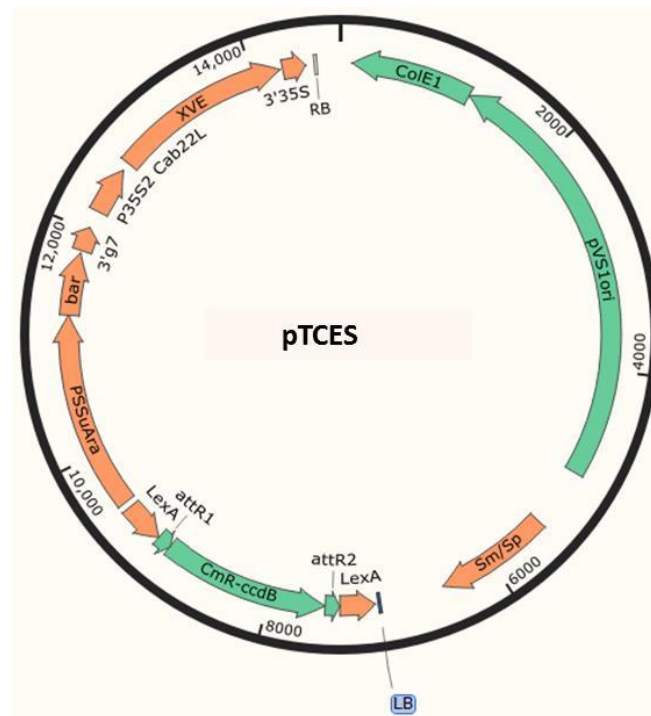
**Fernandez, A.P., Gil, P., Valkai I., Nagy F., Schafer, E.** (2005) Analysis of the function of the photoreceptors phytochrome B and phytochrome D in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46: 790-796.

MTMT: 1913955 Impakt faktor: 4,931

## 12. FÜGGELÉK

Függelék 1.táblázat. Az *Arabidopsis* transzgenikus növényekben beépült T-DNS-ek felszaporításához és azonosításához használt primerek listája.

Rrimer neve:	Primer szekvencia:
pTCRE8A5'	5'GCTTGGGCTGCAGGTCGAGGCTAA 3'
pTCLEXA3'	5' ATTAGAATGAACCGAAACCGGCG 3'
p35S	5' ACAATCCCCTATCCTTCGC-3'
RD29B5'	5'GTGAGACCCCTCCTCTGTTTTACTC 3'
pTCO35SNEW5'	5'GCAGGACGATCCGTATTTTTACAAC 3'



Függelék 1.ábra A pTCES vektor szerkezeti ábrája. A vektor tartalmazza a pSSuAra-bar-3'g7 marker gént, amely a BASTA rezisztenciát biztosítja. Tartalmaz továbbá egy kodon optimalizált XVE transzkripciósfaktort kódoló szekvenciát, amelyet a pCAMV35S promóter szabályoz. A vektoron az expressziós kazetta a LexA promóterből, a Gateway kazettából (attR1-CmR-ccdB-attR2), és a pAocs terminátor szekvenciából áll. A vektor bakteriális szelektív markere a Sm/SpR és a replikációs origói a ColE1 és a pVSI. A) A vektor sematikus ábrája. B) A T-DNS régió térképe.

## A

gcattatgattttatTTTTgactgatagtgacctgttcggttgcaacaaattgatgagcaatgctTTTTtataatgc  
caactttgtacaaaaaagttggcgccgcccctctgatcttttca **ATGGTGACTTCCAGATCTCATTCTTCTTAC**  
**TATTCACTACTTTACTACTTCTTCTTCCCCTGTCTCCTTCGCTCAATCACTCTTTGTGTTCGGTGATGGCCTTT**  
**ATGACGTCGGAAACAAGCAGTTTCTGTCTGAGAATCGAGTCGACGCTGACTTTCCTCCTTATGGTGTCACTTTAG**  
**GACATCCTACTGGACGATGGTCTGATGGTCTTATTGTTCTGATTATCTTGCTATTTTTCATGGGAATTC AACCAA**  
**TTCAGCCGTTTTCTTCTTGCTACGGCGAATTTTTCTCACGGAGCTAACTTCGCCATCGCCAACGCCACCGTTCTTG**  
**GCTCCCCTCTGGAGACGATGACTCTGTCTCAACAAGTGATGAAATTCCTTGGAAATAAAAAATAAATGGACAAATC**  
**AAACTTTCTGAAGCTATCTACTTGATTAACATTGGCTCAGATGATTATTTGAACTATGCCAAGAATAATCCAA**  
**GTCCCTCAGATAATCAGAAACAAGCTTTTGTGGCTCAAGTCATCACTACCATTGAAGCTGAATTAAGGTGGTTT**  
**ATGGAGCTGGTGGGAGGAAATTTGCTTTCCAGAATTTGGCTCCTTTAGGTTGCTTACCGGCTGTGAAACAAGCCA**  
**ACGGTAATGTTCAAGAATGCGTGAAATTCGCTTCCAGAACTGGCGGCTTTGCATAACAAGAAGCTGTTGCAGCTCT**  
**TGGTCAACTTTCAACAACACTCAGTGGTTTTCCAATACTCGTTCTATGACTTCTTCAGCTCGATCAAAAACAGAG**  
**TTATTAAGCCGAAGACTTACACATTTCGAGACAGGAACCGCTGCTTGTGTTGGAACTGGCTCTGTTAATGGTAGCT**  
**ATTGCTCAGTGAACAACGTATGCGCCAAGCCTGAAGAGTATATCTTCTTTGACGGTAAGCATTGACTCAAGAAG**  
**CAAACCTTCAGGTCGGACATTTGATGTGGGGAGCAGATCCGGAAGTGATTGGACCGAACCAACCTTAGAGAGCTTA**  
**TGGTCTTCTTTGGATCTTACAGTCATCTTAGGTGATATGCAAGAAGCTATGGCTGCTATGAGACCAAGGCAGC**  
**GAAAAATTGAGAGTCTATATGATATTAAGAAGATGGAATCAGAGATGGAGAATCAATGGCTTTATCAAGTTGATA**  
**GAGCTATGTCCTTTATGATCTAA**gattgggctatattatgatcaaaagccagaggctttaagagctactgtgaa  
aactaaaacatctttccatgTTTTgtaataaaacctacggccttcagtccactgaaatggataacgaagccgaagt  
gtattggactcttctccaattcaataaaaactacaagcccatcaatgaaggaaagcccaaatgtaagataaaaa  
aaaaaaaaaaaaagaattcacccaactttctgtacaaagttggcattataagaaagcattgcttatcaatttg  
ttgcaacgaacaggtcactatcagtcaaaaataaaatcattatttgcctcccagctgaaatccccctataatgag  
gc

## B

MVTSRSHFFLLFTLLLLLPTVSFAQSLFVFGDGLYDVGNKQFLSENRVDA DFPPYGVTLGHPTGRWSDGLIVPD  
YLAIFMGIQPIQPFLLATANF SHGANFAIANATVLGSPLETMTLSQQVMKFFGNKNKWTNQT LSEAIYLINIGSD  
DYLNYAKNNPSPSDNQKQAFVAQVIT TIEAELKV VYGAGGRKFAFQNLAPLGCLPAVKQANGNVQECVKLPSELA  
ALHNKLLQLLVELSQQLSGFQYSFYDFFSSI QNRVIKPKTYTFETGTAACCGTGSVNGSYCSVNNVCAKPEEYI  
FFDGKHLTQEANLQVGHLMWGADPEVIGPNNLRELMVLPDLTLVILGDMQEAMAAMRPRQRKIESLYDIKKMESE  
MENQWLYQVDRAMSFMI

*Függelék 2.ábra A PL542Na1-es növényben azonosított inszert szekvencia elemzése. A) A cDNS szekvencia, a nyitott leolvasási keretet (ORF) kék, nagybetűkkel jeleztük. B) Az ORF alapján prediktált aminosav szekvencia.*

## A

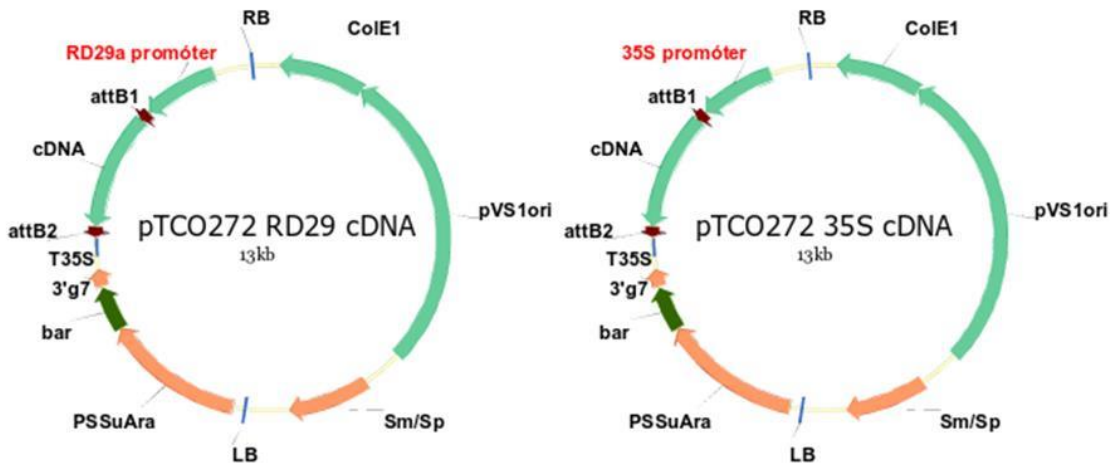
gcgggccgcttgatatacacaagtttgtacaaaaaagttggcgggccgcccgcgctcgtaactcatctatttccgtgc  
caatttcaacttctgacgtctgtcaattcwtc**ATGGGTTTGAAGGAGGAATTTGAAGAGCACGCTGAGAAAATAA**  
**AGACGCTCACCGAGAGCCCATCCAACGAGGATTTGCTCATCCTTTATGGACTCTTCAAGCAAGCCAAGTTTGGAC**  
**CAGTGGACACCGCCCGCCCTGGAATGTTTCAGCCCGAAGGAAAGAGCAAAGTGGGATGCTTGAAGGCTGTTGAAG**  
**GGAAATCAACGGAAGAAGCCATGAATGACTACATCACTAAGGTCAAGCAACTCATGGAAGCAGCGGCTTCAACC**  
**GA**tgaattaaatcaattctcctctgcagtaatttaagtgttaagcgtcaataacatagcataagacttggttct  
tgcttctggtgtgttttaatcattatgaatatttctacttctgaccttggcttgatggtttgggtcatctcttg  
tatgtgcttgataaattgggtctaaaaatgaaaaatcttagtgctaattgaaatcattagttatgtttgggtcagtcc  
atgatatgatcttgaatcggagatgaagcttattatatctacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

## B

MGL**KEEFEEHAEKIKTLTESPSNEDLLILYGLFKQAKFGPVDTPARPGMFSPKERAKWDANKAVEGKSTEEAMNDYITKVK**  
**QLME**AAAST

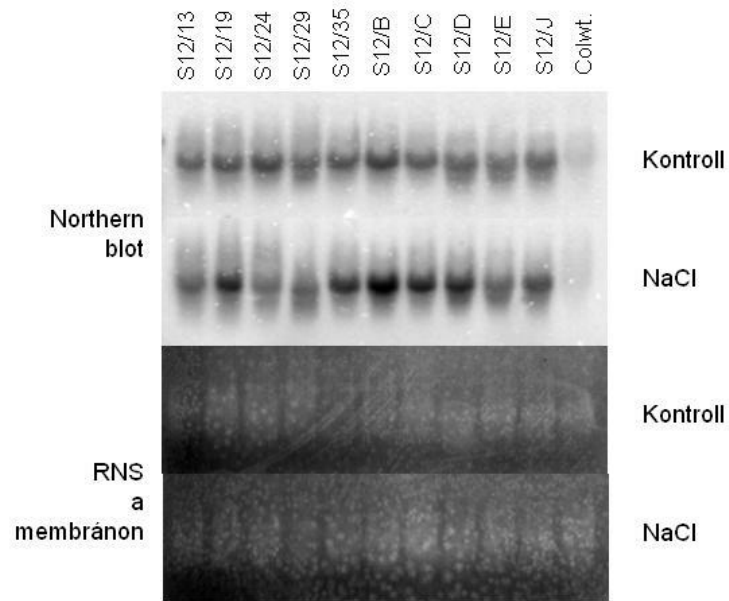
A fehérje szekvencián meghatározott domén: **ACBP**

Függelék 3.ábra A PL127P4-es vonal inszertjének szekvencia analízise. A) Az inszert nukleotid szekvenciája, az ORF-et kék nagy betűkkel emeltük ki. B) Az ORF-ről prediktált aminosav szekvencia. Az ACBP domént piros kiemeléssel jelöltük.

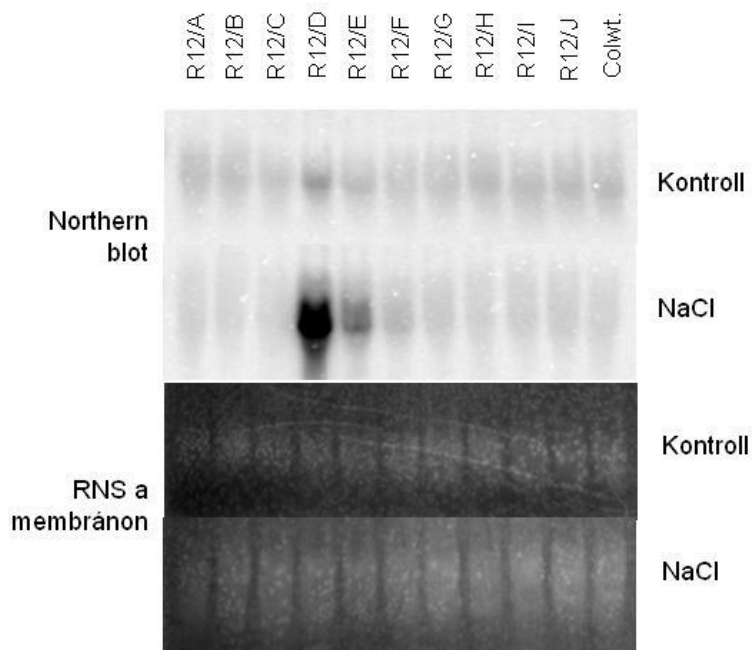


Függelék 4.ábra A pTCO272RD29 és pTCO272R35S vektorok sematikus szerkezeti ábrája.

**A** Konstitutív CaMV35S promóterrel kifejeztetett LcMVP1



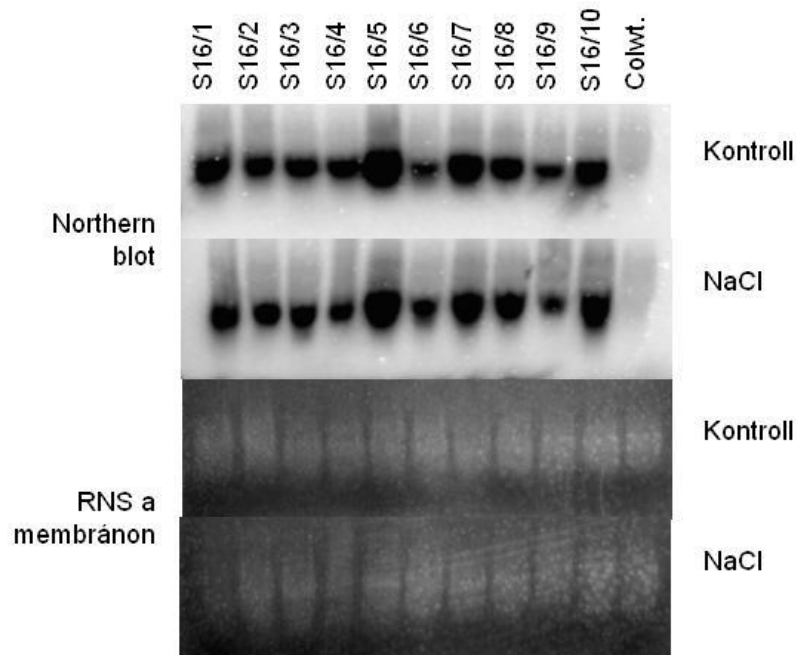
**B** Az indukálható RD29A promóterrel kifejeztetett LcMVP1



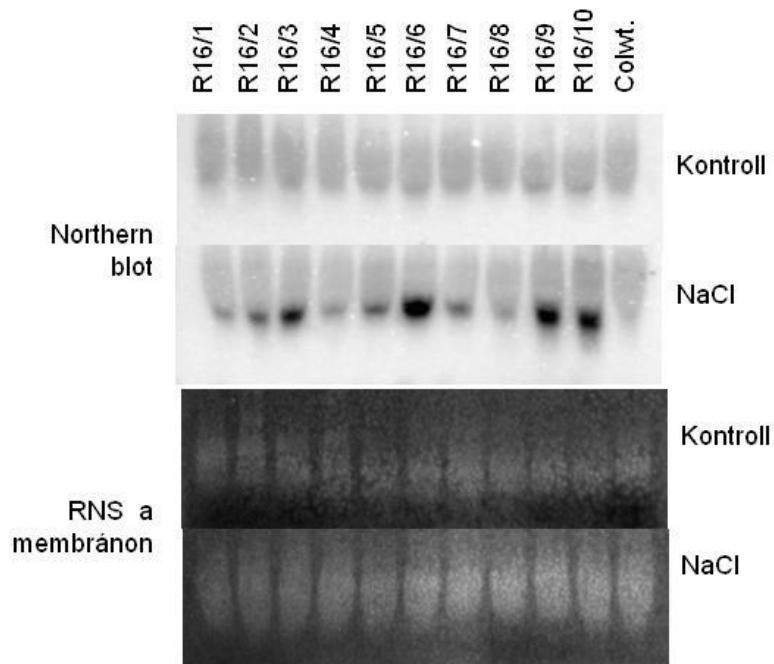
Függelék 5. ábra Az LcMVP1 cDNS expressziója transzgénikus Arabidopsis vonalakban. A transzkriptek kifejeződését Northern blot technikával vizsgáltuk. A) Az LcMVP1 transzkript az S12-es T2-es növényekben. B) Az LcMVP1 RD29A promóterrel az R12-es sorozat T2-es növényeiben. Az R12-es sorozat növényeit 150mM NaCl-al kezeltük a mintaszedés előtt. A blottolt RNS mennyiségi referenciájának a Hybound membránon etidium bromiddal festett és UV fényel megvilágított totál RNS-t vettük.



**A** Konstitutív CaMV35S promóterrel kifejeztett LcACBP.



**B** Stresszindukálható RD29a promóterrel kifejeztett LcACBP.



Függelék 6 ábra Az LcACBP cDNA kifejeződése transzgenikus *Arabidopsis* növényekben. A transzkript szinteket Northern blottal vizsgáltuk. A) Az LcACBP transzkript az S16-os vonal egyedeiben, ahol CaMV35S promóterrel fejeztettük ki. B) Az R16-os növényekben detektálható kifejeződési szintek ahol a promóter a pRD29a volt. Az R16-os növényeket a mintaszedés előtt 24 órával 150mM NaCl oldattal kezeltük az indukció érdekében. A Hybond membránra kötött totál RNS mennyiségét etidium bromidos festékkel UV fényben fényképeztük le.