

**A PlantSize fenotipizáló program alkalmazása az abiotikus
stressztoleranciát biztosító *SPQ* gének funkcionális jellemzésére**

Ph.D. értekezés

Faragó Dóra

Témavezetők: Dr. Szabados László, Dr. Zsigmond Laura

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet
Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport

SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szeged, 2019.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1 Környezeti stressz.....	9
2.2 Szárazságstressz.....	10
2.2.1 Ozmotikus stresszreakciók	11
2.2.2 Abszcizinsav szerepe	13
2.2.2.1 Abszcizinsav anyagcsere folyamatai	14
2.2.2.2 Abszcizinsav transzportja	14
2.2.2.3 Abszcizinsav jelátviteli mechanizmusa	15
2.3 Oxidatív stressz.....	18
2.3.1 Paraquat hatásmechanizmusa	20
2.3.2 Paraquat rezisztencia mechanizmusa.....	22
2.4 Kis peptidek jelentősége	24
2.5 Glikofita és halofita növényfajok	25
2.6 Fenomikai fejlesztések.....	27
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	31
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
4.1 A PlantSize program fejlesztése	32
4.1.1 Növényi anyagok és nevelési körülmények.....	32
4.1.2 Alkalmazott stresszkezelések	32
4.1.3 Klorofill tartalom meghatározása	32
4.1.4 Antocián tartalom meghatározása.....	33
4.1.5 A rendszer kalibrálása.....	33
4.1.6 Képkalkotás	34
4.1.7 Képfeldolgozás és képelemzés	34
4.1.8 PlantSize paraméterei	37
4.2 <i>Lepidium</i> és <i>Arabidopsis SPQ</i> jellemzése	38
4.2.1 Növényi anyagok, sejtkultúrák és nevelési körülmények.....	38
4.2.2 <i>Lepidium SPQ</i> azonosítása.....	38
4.2.3 Plazmid konstrukciók és transzformálás.....	39
4.2.3.1 Plazmid konstrukciók	39
4.2.3.2 Növényi és sejtkultúra transzformáció	40

4.2.4 RNS tisztítás és kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)	41
4.2.5 Sejtorganellumok frakcionálása és Western immunoblot analízis	41
4.2.6 Növekedési és csírázási vizsgálatok	42
4.2.7 Sztómazáródási vizsgálat	42
4.2.8 Szárazságstressz kivitelezése	43
4.2.9 Lipid-peroxidáció mérése	43
4.2.10 Klorofill és antocián tartalom mérése	44
4.2.11 Mikroszkópos módszerek	44
4.2.12 Bioinformatikai analízisek	44
5. EREDMÉNYEK.....	46
5.1 Matlab alapú fenotipizáló program fejlesztése	46
5.1.1 A rozetta méret kalibrációja.....	47
5.1.2 Klorofill tartalom meghatározása	50
5.1.3 Antocián tartalom meghatározása.....	52
5.1.4 A PlantSize alkalmazása a morfológiai változások jellemzésére	54
5.2 <i>Lepidium crassifolium</i> cDNS túltermelő vonalak jellemzése.....	55
5.2.1 Paraquat rezisztencia a PL372PQ01 vonalban	56
5.2.2 A PL372PQ01 cDNS inszert azonosítása és ellenőrzése.....	57
5.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> SPQ gén jellemzése.....	60
5.3.1 <i>AtSPQ in silico</i> azonosítása	60
5.3.2 <i>AtSPQ</i> gén expressziós vizsgálata	62
5.3.3 <i>AtSPQ</i> fehérje túltermeltetése <i>Arabidopsisban</i>	64
5.3.4 <i>Arabidopsis SPQ</i> T-DNS inszerciós mutánsok azonosítása.....	65
5.3.5 Az <i>spq1</i> mutáns növények jellemzése	67
5.4 <i>LcSPQ</i> és <i>AtSPQ</i> gének túltermeltetésének összehasonlítása.....	69
5.4.1 Paraquat által okozott oxidatív stressz élettani hatásai	69
5.4.2 SPQ fehérjék lokalizációja.....	74
5.4.2.1 Fuzionált génkonstrukciók előállítása	74
5.4.2.2 Az SPQ-GFP lokalizációjának vizsgálata növényi sejtszuszpenzióban	74
5.5 A SPQ fehérjék és a poliaminok metabolizmusa.....	76
5.6 Az SPQ és az ABS érzékenység	77
5.6.1 A SPQ befolyásolja az ABS érzékenységet.....	77
5.6.2 Csírázási képesség vizsgálata	78
5.6.3 A SPQ befolyásolja a sztóma nyitottságot.....	79
5.7 Az SPQ fehérjék túltermeltetése és a szárazságtolerancia.....	80

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	85
6.1 Kis paraquat rezisztens (SPQ) fehérje azonosítása.....	85
6.2 Az SPQ fehérjék szerepe a hormon és oxidatív stresszválasz szabályozásában	86
6.3 Az SPQ fehérjét túltermelő transzgénikus növények szárazságtoleranciája	88
6.4 PlantSize képelemző program fejlesztése	89
7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	91
8. IRODALOMJEGYZÉK	92
9. ÖSSZEFOGLALÁS	109
10. SUMMARY	110
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	111
12. FÜGGELÉK	112

Rövidítések jegyzéke

18S rRNS	18S riboszómális ribonukleinsav
ABS	abszcizinsav
ABRE	abszcizinsav-szabályozott génekben a DNS-kötő fehérjék felismerő helye (<u>A</u> BA <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement)
AP2	APETALA2 DNS-kötő hely (<u>A</u> PETALA <u>2</u> DNA binding domain)
APX	aszorbát-peroxidáz
ATP	adenozin-trifoszfát
bZIP	bázikus leucin cipzár transzkripció faktor
CAT	kataláz
COS	feltételhez kötött cDNS-t túltermelő rendszer (<u>C</u> ontitional <u>c</u> DNA <u>O</u> verexpression <u>S</u> ystem)
CRT	ozmotikus stressz-szabályozott génekben a DNS-kötő fehérjék felismerő helye (<u>C</u> -repeat)
CYP707A	citokróm P450 monooxygenázok
DRE	szárazságstressz szabályozott génekben a DNS-kötő fehérjék felismerő helye (<u>D</u> ehydration- <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement)
ER	endoplazmatikus retikulum
ETR	PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebessége
Fm	maximális fluoreszcencia szint (sötétadaptált állapot)
Fv	változó fluoreszcencia szint (sötétadaptált állapot)
Fv/Fm	PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfoka (sötétadaptált állapot)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GPX	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	glutation

H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
Hue	színárnyalat
MDA	malondialdehid
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
¹ O ₂	szinglet oxigén
O ₂ ^{•-}	szuperoxid gyökanion
OH [•]	hidroxil gyök
ORF	nyílt leolvasási keret (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame)
PAM	pulzus-amplitúdó moduláció (<u>P</u> ulse <u>A</u> mplitude <u>M</u> odulated)
PCR	polimeráz láncreakció
PSI	I. fotokémiai rendszer
PSII	II. fotokémiai rendszer
ROS	reaktív oxigénformák
siRNS	kis interferáló ribonukleinsav
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TF	transzkripció faktor
ΦPSII	működő PSII fotokémiai kvantumhatásfoka (fényadaptált állapot)

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a globális éghajlatváltozás tekinthető a világot leginkább fenyegető környezeti problémának. Az éghajlat változása és instabilitása miatt kialakuló elsivatagosodás és szárazság átfogó szinten a szárazföld (54 millió km²) mintegy 40 %-át érinti (Jarraud, 2005), egyre nagyobb mértékű terjedése a termőterületek folyamatos leromlását eredményezi, ami a mezőgazdasági haszonnövények termőképességének a romlásához és élelmezésügyi problémákhoz vezethet (Bates és mtsai., 2008).

A növények alkalmazkodását a szélsőséges környezeti körülményekhez molekuláris szinten számos tényező koordinálja, a különböző stresszmechanizmusok hátterében álló szabályozó hálózatok, metabolikus útvonalak feltérképezése fontos célpontja a növénybiológiai alap kutatásoknak. Az *Arabidopsis thaliana* modell növényen végzett kutatások révén számos olyan gént azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a stresszhatások érzékelésében és kivédésében, viszont extrém körülmények között a stresszérzékenysége végett ez a növény nem tanulmányozható. Erre a problémára nyújt megoldást a szárazság- és sótűrő extremofil növények alkalmazása, melyek közül a halofiták fontos génforrásként szolgálhatnak a mezőgazdasági növényfajok stressztűrésének fokozásában (Ahuja és mtsai., 2010; Mishra és Tanna, 2017).

A növények fenotípusát a környezet és a genetikai állományuk széleskörűen befolyásolják, hatást gyakorolnak a növekedésükre és fejlődésükre, illetve fiziológiai és molekuláris tulajdonságaikra is. Ennek következtében a növények szerkezeti és fiziológiai tulajdonságainak a precíz leírására és megfigyelésére van szükség a fenotípusuk jellemzése során. Az alapvetően pontos és megbízható klasszikus módszerek révén mindez megvalósítható, de sok esetben a növények megsemmisítésével és számos hosszadalmas analitikai lépéssel és méréssel járnak, ezért a nagy számú kísérletek végrehajtása sokszor bonyodalmas vagy épp lehetetlen. A nagy egyedszámú kísérletek elvégzése nem csak időigényes folyamat, de számos hibalehetőséggel járhat. A nem invazív képelemző módszerek fejlesztése és alkalmazása megoldást nyújt ezekre a problémákra, mivel a képalapú technológiák által lehetőség nyílt számos morfológiai és fiziológiai paraméter valós idejű és nagyszámú mérésére, elemzésére (Furber és Tester, 2011; Dhondt és mtsai., 2013; Rungrat és mtsai., 2016). A legtöbb képelemző program és automata fenotipizáló rendszer komoly programozói hátteret és anyagi forrást igényel, ami nem minden laboratórium számára adott.

A csoportunkban fejlesztett PlantSize *in vitro* fenotipizáló program segítségével alkalmunk nyílt a megváltozott stressztoleranciát mutató transzgénikus vonalak és mutánsok valós idejű, gyors és költséghatékony jellemzése. Segítségével sikeresen azonosítottuk a környezeti stresszel szemben ellenálló *Lepidium crassifolium* SPQ (Small Paraquat resistance) gént, alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy nem csak az *Arabidopsis thaliana* megfelelőjének, de mindkét SPQ fehérjének fontos szerepe van a hormon- és egyéb növényi stresszválasz szabályozásában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Környezeti stressz

Napjainkban az egyre szélsőségesebb környezeti hatásoknak köszönhetően a növények növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges optimális feltételek nem mindig, néhány esetben csak nagyon ritkán és rövid ideig adóttak, így igen gyakran találkoznak különböző gátló körülményekkel, stresszfaktorokkal. A stressz fogalmát először Selye János határozta meg, elképzelése szerint a specifikus impulzusokra az emberi szervezet nem specifikus módon, egy általános adaptációs szindrómával reagál (Selye, 1936). A későbbiekben ez a stresszelmélet kiegészítésre került és megállapították, hogy a stresszreakciók a növényekben is megfigyelhetők, sőt a növényi stresszel kapcsolatban azóta számos értelmezés és vélemény kialakult. Az egyik legfrissebb szemlélet, ahol a termodinamika főtételeit és a J-K-B: környezet-hardver-viselkedés rendszert (Strasser 1988; Tsimilli és mtsai., 1996) alapul véve, úgy tekintenek a stresszre, mint az optimális termodinamikai egyensúly felborulására, mely révén a növények és környezet közötti harmónia megszűnik, hiszen normál körülmények között ('nem-stressz' állapot), az entrópia mértéke a minimális szinten van. Ha a stressz fogalmát élettani szempontból tárgyaljuk, akkor kijelenthető, hogy a stresszreakciók kialakulásának a háttérében különböző extrém környezeti tényezők, stresszorok állnak. Ezek lehetnek biotikus és abiotikus tényezők (Levitt, 1972). Míg a biotikus stresszt más organizmusok generálják (pl. gombák, vírusok, patogén faktorok), addig az abiotikus stressztényezők közé a környezet által kiváltott olyan fizikai és kémiai hatásokat soroljuk, melyek hiánya vagy többlete vezet az előnytelen következmények kialakulásához. Ilyen lehet a vízhiány miatt keletkező szárazságstressz vagy szikesedés következtében kialakuló sóstressz, és hőmérsékleti stressz, illetve az ezeket kísérő oxidatív stressz (Ahanger és mtsai., 2017). Mindezek széleskörű növényi válaszreakciókat indítanak be, mint például a génkifejeződési mintázat és a sejtszintű metabolizmus átalakítása, a növekedés korlátozása és a terméshozam csökkenése. A környezeti stresszre adott növényi válaszokat nagymértékben befolyásolja maga a növény genotípusa és fejlődési állapota, továbbá a kiváltó környezeti hatás erőssége, időtartama, a stresszhatások egymás utáni száma és más stresszorok egyidejű jelenléte.

A növények számára helyhez kötött életmódjuk következtében az egyetlen túlélési lehetőséget az alkalmazkodás jelenti, melynek háttérében kétféle stratégia állhat. Ez lehet közvetlenül egy adott morfológiai és/vagy fiziológiai változás, ami az időszakos kedvezőtlen környezeti hatásokra adott visszafordítható folyamat, más néven akklimatizációs stratégia (Lichtenthaler, 1998; Kranner és mtsai., 2010). Ennek eredményeképp a növény érzékeli a kedvezőtlen változást, de különböző folyamatok révén képes azt enyhíteni vagy kijavítani, életképességét megőrizni. A környezeti tényezők negatív hatásának az ilyen mértékű elviselését toleranciának nevezzük. Adaptációnak hívjuk a sok generáción át, hosszútávú környezeti nyomás révén bekövetkező genetikai változással járó stratégiát. Ennek révén a növény nem észleli, kitér a stressz elől, ily módon semmilyen károsodás nem éri. Ezt az örökletes evolúciós alkalmazkodási mechanizmust nevezzük rezisztenciának, melyre a legjobb példa a xenobiotikumokkal (paraquat, glifozát) szemben kialakuló rezisztencia (Szigeti, 2018).

2.2 Szárazságstressz

Mezőgazdasági és növényfiziológiai szempontból alapvetően akkor beszélünk szárazságról, amikor a növények számára a talajból felvehető vízmennyiség, például annak alacsony nedvességtartalmának következtében, egy bizonyos időszakra lecsökken. Másrészt a vízhiány akkor jön létre, amikor a levelek felületi kipárologtatása intenzívebb, mint a gyökerek általi vízfelvétel. A kialakuló egyensúlyhiány a vízfelvétel és növények vízvesztése között elsősorban akkor következik be, amikor a talaj vízpotenciálja alacsonyabb, mint a gyökerek vízpotenciálja (Salehi-Lisar és Bakhshayeshan-Agdam, 2016). A szárazság jóformán az összes éghajlati övezetet érinti. Kialakulhat olyan kontinentális éghajlaton is, ahol az éves csapadékmennyiség eléri a megszokott szintet, de a magas hőmérséklet következtében hosszabb időre kiterjedő szárazság, vagyis aszály áll be. Ezzel ellentétben vannak olyan vidékek, ahol mindig alacsony a csapadékmennyiség, ezáltal folyamatos a száraz klíma, illetve a sivatagi övezetek, ahol nagyon ritka az esőzések száma (Mishra és mtsai., 2010). Számos sivatagi növény különböző stratégiákat (vízpazarló, vízgyűjtő, vízmentő) alakított ki, ezáltal képesek adaptálódni vagy akklimatizálódni az ilyen környezeti körülményekhez, ide sorolhatók az extrém szárazságtűrő xerofiták (Salehi-Lisar és Bakhshayeshan-Agdam, 2016).

A vízstressz mértékét, vagyis a növények és a talaj hidratáltsági állapotát azok relatív víztartalmával (RWC) vagy vízpotenciál (Ψ) értékeivel is jellemezhetjük. Ha a talaj vízpotenciál értéke csökken, az még nehezebbé teszi a növények számára, hogy vizet vegyenek fel, ami széleskörű válaszreakciókat indukál annak következtében, hogy elkerüljék a vízhiányt, illetve lehetővé váljon a vízfelvétel alacsony vízpotenciál mellett. Az elsődleges védekezési mechanizmus ezen állapot elkerülésére a vízpotenciál magasán tartása, ami a vízfelvétel növelésével és a vízveszteség csökkentésével oldható meg, amihez rövidtávon a sztómazáródásra, hosszú távon például a gyökér/hajtás arányának, vagy a szövetek vízraktározó képességének megváltoztatására, fokozására van szükség. Fontos megemlíteni, hogy növények vízhiányos állapota nem csak szárazság esetén alakul ki, hanem sóstressz és hidegstressz következtében is (Kramer és Boyer. 1995; Verslues és mtsai., 2006; Zivcak és mtsai., 2016).

2.2.1 Ozmotikus stresszreakciók

A megfelelő vízpotenciál fenntartása érdekében a növények különböző biokémiai és élettani stratégiákat alakítottak ki, ezek közé sorolható a dehidráció eltűrésével (metabolikus és hormonális változások, reaktív gyökök semlegesítése) kapcsolatos válaszreakciók vagy az elkerülési stratégia közé sorolható ozmotikus adaptáció mechanizmusa. Az alkalmazkodással a növények eléri, hogy a sejt ozmotikus potenciálja és ezen keresztül a vízpotenciálja is csökkenjen, és a vízfelvétel továbbra is megoldható legyen. Ebben a folyamatban meghatározó szerepük van az ozmolit anyagoknak (prolin, glicin-betain, mannitol) és az aquaporin típusú transzportereknek is. Az ozmotikus stressz irreverzibilis hatással van ezen oldott anyagok szintézisére, mivel megváltoztatja az egyensúlyt az előállításuk és lebontásuk között (Szabados és mtsai., 2011). A dehidráció következtében létrejövő prolin felhalmozódást már számos növényben kimutatták, mennyisége összefüggést mutathat a növények szárazságtűrő képességével. A prolin ozmoprotektáns szerepén kívül egy többfunkciós aminosavnak számít, szerepet játszik a mitokondriális folyamatok modulálásában, hatással van a sejtosztódásra és a sejthalálra, illetve a génexpresszió szabályozásában is részt vesz, így fontos szerepe van a növényi regenerálódási folyamatokban stresszt követően (Verslues és mtsai., 2006; Szabados és Saviouré, 2010). A prolin és más ozmolitok mint például szorbitol, mannitol, mio-inozitol ozmotikus adaptációtól független szerepét, vagyis antioxidáns funkciójukat, mint szabad gyök kioltók már korán felismerték (Smirnoff és Cumbes, 1989).

Másik lehetséges mechanizmus az ozmotikus potenciál egyensúlyban tartására a plazmamembrán vízáteresztő képességének a szabályozása, ami a vízcsatornák vezérlésével érhető el. *Arabidopsisban* 35 aquaporin gén található, melyek közül 13 a PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein) családba tartozik, amelyekről átíródó mRNS mennyisége jellegzetes változást mutat szárazság hatására. Abszcizinsav (ABS) hatására mind a 13 aquaporin gén eltérően reagált, ebből arra következtettek, hogy az *PIP* gének kifejeződése ABS-függő és független útvonalon át is szabályozódik (Jang és mtsai., 2004). 10 esetben azonosítottak tonoplaszt lokalizált aquaporinokat (TIP), melyek a tonoplaszt permeabilitását szabályozzák és különböző szerv- szövet- és sejtspecifitással rendelkeznek, és különböző mértékben reagálnak a stresszre, illetve az abszcizinsavra (Finkelstein, 2013). A halofita *Thellungiella salsuginea*-ban a *TIP1;2* géneknek meghatározó szerepük lehet az extrém környezethez történő adaptáció kialakulásában. Wang és munkatársai (2014) megfigyelték, hogy a *TsTIP1;2* túltermeltetése a transzgénikus *Arabidopsis* növényekben csökkentette a vízvesztés mértékét szárazság alatt, valamint szabályozta a hidrogén-peroxid (H_2O_2) transzportját és vakuólumba történő kiválasztását és eliminálását, ezáltal elősegítette a paraquattal szembeni oxidatív stressz tolerancia kialakulását is. Továbbá sóstressz hatására fokozta a Na^+ vakuólumba történő szekvesztrálását. Az aquaporinok harmadik alcsaládjába tartozó NIP-ek (Nodulin26-like Intrinsic membrane Proteins) 9 homológját azonosították eddig *Arabidopsisban*, melyek a vízzel együtt a tápanyagok (bór, szilícium, karbamid) felvételét és transzportját szabályozzák. Az ER (endoplazmatikus retikulum) lokalizált három SIP (Small Basic Intrinsic Proteins) ismeretlen funkciót tölt be (Maurel és mtsai., 2008).

A szárazság esetén fellépő ozmotikus nyomás változását elsősorban az AtHK1 hisztidin kináz érzékeli. cDNS-ét dehidratált *Arabidopsis* növényből izolálták és megállapították, hogy strukturális hasonlóságot mutat az élesztő SLN1 (Synthetic Lethal of N-end rule 1) ozmoszenzorhoz. Emellett az AtHK1 szerepét az is alátámasztja, hogy cDNS-ét túltermeltetve nem csak az *sln1* élesztő mutánsban sikerült komplementálni annak hőmérséklet-érzékeny fenotípusát, de az *sln1sho1* (SHO1-Synthetic, High Osmolarity-sensitive 1) dupla mutáns sóérzékenységét is helyreállította (Urao és mtsai., 1999). Transzkript analízisek során megállapították, hogy szerepet játszik több ABS által indukált gén és transzkripciósfaktor (*AREB1*, *ANAC*, *DREB2A*) kifejeződésének a szabályozásában, melyek között egyaránt található ABS-függő és -független indukciót mutató faktorok, így ez a szenzor mindkét jelátviteli út szabályozásában szerepet játszik (Tran és mtsai., 2007).

Újabb tanulmányok felvetették a kérdést, hogy vajon az AtHK1 tényleg egy közvetlen ozmoszenzor vagy a szárazságtolerancia kialakulásában játszik szerepet, mint pozitív szabályozó elem, mivel az *athk1* mutáns sztómazáró sejtjeinek megnövekedett száma miatt bekövetkező turgor veszteség nem járt az ABS, illetve a prolin akkumulációjával (Wohlbach és mtsai., 2008). Mindez arra utal, hogy az *Arabidopsis* hisztidin kináz 1-nek szerepe lehet az alacsony vízpotenciál érzékelésében, de nem az egyetlen ozmoszenzor (Kumar és mtsai., 2013). A nemrég azonosított OSCA1 (Hyperosmolality-gated Ca^{2+} permeable channel 1) ismeretlen plazmamembrán Ca^{2+} csatorna fehérjéről bebizonyosodott, hogy hiperozmolaritás hatására aktiválódik és hasonlóságot mutat a TRPV4 (Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 4) állati ozmoszenzor fehérjével (Yuan és mtsai., 2014). Az MCA1 és MCA2 (MID1-Complementing Activity1, 2) fehérjék feltételezhetően a Ca^{2+} áramlását segítik hiperozmotikus sokk és mechanikus behatás következtében (Haswell és Verslues, 2015). A citoszol szabad Ca^{2+} koncentrációjának oszcillációja az előbb említett és más abiotikus és biotikus környezeti jelekre jellemző információt kódolnak, ily módon Ca^{2+} -függő proteinek aktiválása révén (pl. kalmodulin, receptor-szerű kinázok) különböző válaszreakciókat váltanak ki (Dodd és mtsai., 2010). A jeltovábbító rendszerek szintjén nem csak a Ca^{2+} játszik fontos szerepet, mint másodlagos hírvivő, hanem bizonyos hormonoknak is meghatározott funkciójuk van benne.

2.2.2 Abszcizinsav szerepe

Az ABS hormon a növények növekedése és fejlődése során számos fiziológiai folyamat szabályozásában közrejátszik (embriófejlődés késői szakaszában, mag érése, csírázás, virágzás és gyökér fejlődése). Az egyik legfontosabb funkcióját, mint stresszhormon tölti be, mivel részt vesz a káros környezeti hatások elleni védekezés irányításában. Fő funkciója ezáltal az abiotikus (és részben biotikus) stressz válaszok szabályozásában van, elengedhetetlen komponense az ozmotikus stressz (szárazság és sótűrés) által kiváltott jelátviteli rendszernek. Indukálja a sztómazáródást, génexpressziós változások kialakulásában, továbbá a dehidrációval kapcsolatos folyamatok irányításában is részt vesz (Finkelstein, 2013). Hatását a növényi szövetekben koncentrációja függvényében fejt ki, ami szintézise, inaktiválódása (konjugáció glükózzal vagy aminosavakkal, oxidatív degradáció révén) és transzport folyamatainak keresztül szabályozott (Daszkowska-Golec, 2016).

2.2.2.1 Abszcizinsav anyagcsere folyamatai

Az ABS bioszintézisének útvonalát elsősorban abszcizinsav hiányos mutánsok (*aba*) segítségével tárták fel *Arabidopsisban* (Milborrow, 2001). A bioszintézis az izopentenil-difoszfátból indul és több lépésen keresztül a karotinoidok bioszintézisének útját követi. Az első lépések a kloroplasztisban zajlanak, a továbbiak pedig a citoplazmában (xantoxin oxidációja). Kulcs enzimjeit kódoló gének, mint például a zeaxantin-epoxidáz vagy a xanthoxin előállításáért felelős 9-cis-epoxikarotenoid-dioxigenáz enzimeket kódoló *AtZEP* és *AtNCED3* szárazság által indukáltak (Park és mtsai., 2008; Iuchi és mtsai, 2001). Az ABS lebontása hidroxilációs (7, 8-as és 9-es szénatomon) reakció révén megy végbe, melyek közül ABS 8'-hidroxilációs útvonal tekinthető dominánsnak, amit a citokróm-kötött P450 monooxigenázok katalizálnak (*CYP707A1*, *CYP707A2*, *CYP707A3*). A *CYP707A* géncsalád tagjainak transzkripciós szintje abiotikus stressz, szárítás és exogén ABS hatására indukálódik (Okamoto és mtsai., 2006). Az abszcizinsavnak számos konjugátuma és azok metabolitja is ismert, ezek közül a legelterjedtebb a glükóz észtere, ami a vakuólumban és feltételezhetően az ER-ben raktározódik el, majd szárazság és só stressz hatására az ER és vakuoláris β -glükozidázok általi dekonjugáció révén újra aktív formába kerül. Az ABS glükóz-észter importját és ezáltal vakuoláris szekretálását az ABC (ATP (adenozin-trifoszfát) -Binding Cassette) transzporterek végzik (Burla és mtsai., 2013). A β -glükozidáz családba tartozó BGLU10 (Beta Glucosidase 10) túltermeltetése megnövelte a transzgénikus *Arabidopsis* növények szárazságtűrését, köszönhetően a magasabb β -glükozidáz aktivitásuk eredményeként megnövekedett ABS szintnek, illetve az ABS által kiváltott alacsonyabb vízvesztésnek (Wang és mtsai., 2011).

2.2.2.2 Abszcizinsav transzportja

Számos ABS fiziológiai hatásaival és biofizikai tulajdonságaival foglalkozó tanulmányban leírták, hogy a gyökér és levél közötti áramlása kétirányú (xilém és floém szállítószövetekben) diffúziója révén következik be. A folyamat magyarázatára állították fel az 'ionikus csapda modell'-t, mivel az abszcizinsav protonált gyenge savként képes átdiffundálni a lipid kettősrétegen, viszont anion formája már nem (Boursiac és mtsai., 2013; Finkelstein, 2013). Az ABS szintézise és érzékelése szinte minden sejttípusban (pl. szállítószövet, zárósejtek, endospermium és embrió szövetek) megfigyelhető és a közöttük lévő kapcsolat nem minden esetben magyarázható a hormon diffúzív transzportjával, ami specifikus transzporterek közreműködésére enged következtetni.

Az abszcizinsav ATP függő exportjáért a vakuoláris szövetekben az *AtABCG25* gén felelős, és bizonyítottan szerepe van a sztómazáródás szabályozásában (Kuromori és mtsai., 2010). A PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12 (PDR12/ABCG40) a hormon plazmamembránon keresztüli felvételéért felelős, hiánymutánsainak a sztómái lassabban csukódtak be ABS kezelés hatására. A *pdr12* mutánsok szárazságra is érzékenyebben reagáltak, mint a vad típusú növények (Kang és mtsai., 2009; Kang és mtsai., 2011). Nemrégiben azonosították az NPF (NRT1/PTR Family) fehérjék szerepét az ABS transzport folyamatokban. Az SLC15 családba tartozó PTR (Peptid Transporter) fehérjék di- vagy tripeptidek és peptid-szerű drogok szállítását végzik, mint például a β -laktám antibiotikumok. A család első tagját, a nitrát transzporter NTR1.1-et, növényekben azonosították először. Több tagját is jellemezték, melyek a hisztidin, auxin, glükózínolát és az abszcizinsav szállításáért felelősek (Boursiac és mtsai., 2013). *Arabidopsisban* azonosított 53 NPF közül az NPF4.6, NPF4.1, és NPF4.5 – és további 7– bizonyítottan szerepet játszanak az ABS transzportjában, melyek közül a vakuólumban expresszáldó NPF 4.6 null mutánsa nyitottabb sztómái következtében alacsonyabb felületi hőmérséklettel rendelkezett, mint a vad típusú növények (Corratgé-Faillie és Lacombe, 2017).

2.2.2.3 Abszcizinsav jelátviteli mechanizmusa

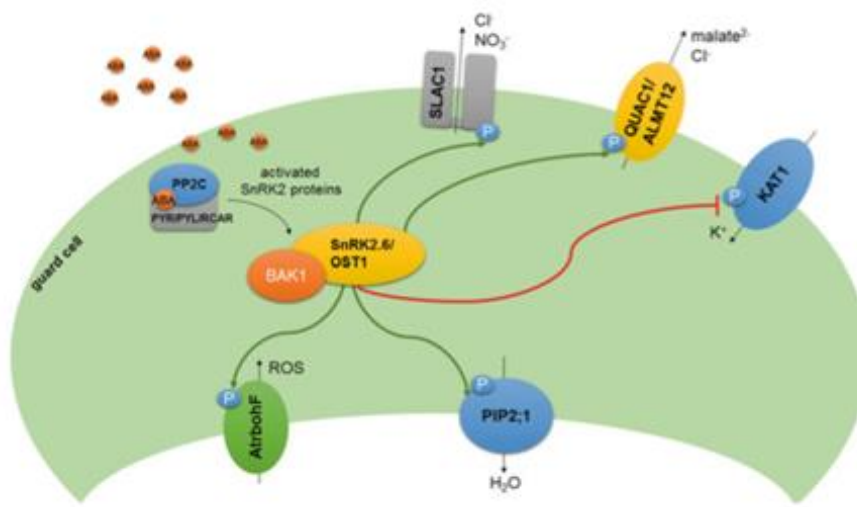
A microarray és RNS-szekvenálás technológiák, mint modern analitikai módszerek lehetővé teszik az egész genomra jellemző transzkript profilok azonosítását. *Arabidopsisban* közel 2000 szárazságra indukálódó gént azonosítottak, amelyek nagy része ABS kezelés hatására is aktiválódott, viszont átfedést találtak más hormonokkal (jázmonsav, auxinok, citokininek, etilén, brassinoszteroidok és gibberellinek) és más környezeti faktorokkal (fény, biotikus stressz) is (Huang és mtsai., 2008). A száraz vagy szikes környezethez való alkalmazkodást számos gén szabályozza, melyek két nagy csoportra oszthatók. Az egyik az abiotikus stressztoleranciával kapcsolatos végrehajtó, védő funkciójú fehérjék, mint például a chaperonok, LEA fehérjék, ozmotinok, RNS-kötő fehérjék illetve az ozmolit bioszintézis kulcs enzimjei, mint például a vízcsatorna fehérjék, cukor- és prolin transzporterek, detoxifikációs enzimek és számos proteáz stb. A másik csoport a szabályozásban résztvevő szenzor fehérjék, protein kinázok és foszfatázok, foszfolipid metabolizmus enzimjei és transzkripció faktorok (Ramanjulu és Bartels, 2002; Yamaguchi és Shinozaki, 2006).

A génexpressziós szabályozásban a transzkripciós faktoroknak (TF) van az egyik legfontosabb szerepük, amik a cél gének promóterének specifikus *cisz*-ható elemeit felismerve számos gén expresszióját befolyásolhatják. Vízhiánykor kifejeződő gének indukciója végbe mehet ABS-függő és ABS-független útvonalon. A *cisz*-szabályozó elemek vizsgálata rávilágított arra, hogy az ABS-függő gének promóter régiója tartalmaz egy konzervált ABRE (ABA Responsive Element, PyACGTGG/TC) szabályozó motívumot, amelyeket bázikus leucin cipzár (bZIP) csoportba tartozó transzkripciós faktorok, AREB (ABRE-Binding Proteins) vagy ABF (ABRE-Binding Factors) ismernek fel. Alcsaládjukba tartozó AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 és ABF3 mind pozitív szabályozó elemei a szárazságstressz hatására működésbe lépő ABS jelátviteli utaknak (Narusaka és mtsai., 2003; Fujita és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2018).

Az ozmotikus stressz során a felhalmozódott abszcizinsav komplexet képez a PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin-Resistance 1/ Pyrabactin-Resistance Like/Regulatory Component of ABA Receptor) receptor fehérjékkel, ahol alloszterikus ligandként viselkedve konformációs változást hoz létre, ezáltal aktiválva a működésüket. A receptor-ABS komplex köti a PP2C (Protein Phosphatases type-2C) fehérjét, ami az SnRK2 (Snf1 (Sucrose-Non-Fermentation 1) -Related Kinases Subfamily 2) felszabadulásához vezet (Zhang és mtsai., 2015; Daszkowska-Golec, 2016). A gátlás alól felszabadult SnRK2 kinázok a hosszabb jelátviteli út során képesek a szubsztrát fehérjéket, mint például az AREB/ABF transzkripciós faktorokat foszforilálni és ezáltal a cél gének transzkripcióját aktiválni. (Narusaka és mtsai., 2003; Fujita és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2018). A rövid jelátviteli út alatt az SnRK2.6 kináz a sztómasejtek ioncsatornáinak foszforilációján és a plazmamembrán depolarizációján keresztül szabályozza a sztómák záródását (Zhang és mtsai., 2015; Daszkowska-Golec, 2016), ahol a PP2C foszfatázok közé tartozó, ABI1 (ABA Insensitive 1), ABI2 (ABA Insensitive 2), és a HAB1 (Hypersensitive To ABA1) tehát negatív szabályozó elemként funkcionálnak (Ma és mtsai., 2009; Park és mtsai., 2009). Az SnRK2.6/OST1 (Open Stoma 1) kináz (1. ábra) a vízhiányos állapotokra aktiválódva foszforilálja a sztóma felületén lévő SLAC1 (Slow Anion Channel Associated 1) és QUAC/ALMT12 (Quick Anion Channel 1/Aluminum Activated Anion Channel 12) fehérjéket. A SLAC1 egy plazmamembrán S-típusú (Slow-Activating Sustained 1) anioncsatorna fehérje, működését az ABS, CO₂, Ca²⁺, NO és H₂O₂ serkenti. A QUAC1/ALMT12 fehérje pedig a gyors anion áramlást szabályozza a zárósejtekben. Az SnRK2.6/OST1 a KAT1 (Potassium Channel in Arabidopsis thaliana 1) kation csatornákat is foszforilálja így gátolja a kálium ionok transzportját, ami a sztómák zárva tartásához szükséges (Daszkowska-Golec, 2016).

A BAK1 (BRI1 Associated Receptor Kinase1) szintén komplexet képez az SnRK2.6/OST1-el és pozitív irányítója a szárazságstressz hatására bekövetkező sztómazáródásnak. A SnRK2 kináz komplex a PIP típusú aquaporinok, pl. a PIP2;1 foszforilációjában is részt vesz. A PIP2;1-nek nélkülözhetetlen szerepe van a zárósejtekben az ABS hatására keletkező ROS-ok felhalmozódásában. A *pip2;1* mutáns ABS kezelés hatására képtelen felhalmozni elegendő ROS-t és ezért nem tudja bezárni a sztómáit (Daszkowska-Golec, 2016).

ABS által indukált sztómazáródást a másodlagos jelátvitelt biztosító reaktív oxigénformák is pozitívan szabályozzák. A plazmamembrán lokalizált AtrbohD és AtrbohF NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) oxidázokat szintén az SnRK2.6/OST1 foszforilálja és ezáltal aktiválja őket, ami H₂O₂ felszabadulással jár. A képződő ROS további jelátviteli reakciókat indíthat be, amik sztómazáródáshoz vezetnek, illetve specifikus génkifejeződési változásokkal járnak. Wang és munkatársai (2013) a *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* receptor mutáns vizsgálatával bebizonyították, hogy a receptor-ABS komplex által szabályozott folyamatoknak a kezdő lépése a Ca²⁺ csatornák H₂O₂ általi aktivációja.



1. ábra: SnRK2.6/OST1 szabályozó szerepe szárazságstressz alatt. Az ABS-függő sztómazáródáshoz szükséges jelátviteli folyamatok (Daszkowska-Golec, 2016).

Az ozmotikus stresszválaszt az ABS hormontól független szabályozási rendszerek is ellenőrzik. Az ilyen jelátvitelt közvetítő legfontosabb TF család az AP2 (APETALA2) DNS kötő doménnel rendelkező DREB1/CBF, illetve a DREB2 típusú fehérjék, amelyek DRE (Dehydration-Responsive Element, A/GCCGAC) vagy CRT (C-Repeat) cisz-szabályozó elemekhez kapcsolódnak.

Fontos megemlíteni még a MYB/MYC és WRKY, továbbá a NAC transzkripciós faktorokat, mint a szárazság ABS-független szabályozóit (Narusaka és mtsai., 2003; Fujita és mtsai., 2013). Újabb tanulmányok felvetették ABS-függő és ABS-független útvonalak közötti kölcsönhatás lehetőségét, mivel az SnRK2 kinázok nem csak az *AREB/ABF* gének, hanem a *DREB2A*, *DREB1A* és *DREB2C*-et is szabályozzák. Számos ABS-indukált gén (pl. *RDA29A*) promóterében DRE/CRT elemet is azonosítottak, ami bizonyítja azok kombinált ABS-függő és független aktivációját is, tehát az egyes jelátviteli utak között a transzkripciós szinten fellépő kölcsönhatást (Liu és mtsai., 2018).

2.3 Oxidatív stressz

Számos környezeti stressz következtében megváltozik a növények sejten belüli redox állapota és emiatt különböző reaktív oxigénformák szabadulhatnak fel a kloroplasztisban, a mitokondriumban és a peroxisómában. Nagyszámú metabolikus reakció melléktermékeként a képződésük folyamatos. Optimális és/vagy állandó fiziológiai körülmények között termelődésük és semlegesítésük egyensúlyban van, amiért az enzimatis (szuperoxid-dizmutáz - SOD, aszkorbát-peroxidáz - APX, glutation-reduktáz - GR, kataláz – CAT, stb.) és nem enzimatis (aszorbinsav, glutation - GSH, karotinoidok, stb.) antioxidánsok felelősek. Káros környezeti hatások következtében, mint például a vízhiány, ez az egyensúly felborul, ezáltal oxidatív stressz éri a növényeket. Az oxidatív stressz herbicidek (pl. paraquat) hatására másodlagos válaszreakcióként is bekövetkezhet. A leggyakoribb ROS a szuperoxid gyökkanion ($O_2^{\cdot-}$) és a hidroxil gyök (OH^{\cdot}), amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek továbbá a hidrogén-peroxid (H_2O_2). Mindezek a reakcióik során szabad gyököket képeznek vagy a rendkívül reakcióképes szinglet oxigént (1O_2). Képződésük a molekuláris oxigénből folyamatos gerjesztés (1O_2) illetve redukció ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) révén megy végbe (2. ábra).

Ha a környezetből nagy mennyiségben jutnak be a sejtekbe elektronátvételle képes anyagok, például nehézfémek vagy herbicidek, akkor a képződött hidrogén-peroxid molekulák a Haber-Weiss reakcióban hidroxil gyököket hoznak létre. A folyamat szabad Fe^{3+} és Cu^{2+} ionok redukációjával a Fenton-reakció során további reaktív gyökök kialakulásához vezet (Vile és mtsai., 1987). Ezek az agresszív oxidációs reakciók károsíthatják a sejt szerkezetét, a membránokat, fehérjéket, nukleinsavakat, gátolhatják az enzimek és gének működését (Apel és Hirt, 2004; Mittler, 2016).

Alapvetően elmondható, hogy minden sejtkompartmentumra eltérő ROS mintázat jellemző, amelyek különböző jelátviteli utakat és ezáltal ROS-függő géneket aktiválnak. Az adott sejtalkotó ROS mintázata a sejt típusának, fejlődési állapotának vagy a stressz szintjének és stressz kombinációk függvényében változhat (Choudhury és mtsai., 2017). A ROS közül a hidrogén-peroxid ilyen jelátvivő molekulaként is funkcionál, fontos szerepe van a növények egyedfejlődése során a különböző életfolyamatok szabályozásában, elsősorban a stresszhatások elleni védekezésben (Suzuki és mtsai., 2012).

A MAP (Mitogen-activated protein) kinázok erősen konzervált jelátviteli modult alkotnak az összes eukarióta organizmusban, a MAP3K (MAPKKK/MEKK), a MAP2K (MAPKK/MEK) és a MAPK (MPK), egymást láncszerűen, specifikusan foszforilálva aktiválódnak, ezáltal számos TF-t, foszfolipázt, citoszkeleton- és mikrotubulus-kötő fehérjét hoznak működésbe, illetve stresszhatásra válaszoló gének expresszióját indítják el. Az *Arabidopsis* genom 80 *MAP3K*, 10 *MAP2K*, és 20 *MAPK* gént tartalmaz, melyek közül a ROS és ABS jelátvitelben részt vevő *MPK3*, *MPK4* és *MPK6* a legismertebbek. Szabályozó funkciójukat az ABS jelátvitelben (pl. sztómazáródás) H₂O₂-al kezelt *MAPK3* antiszenz és mutáns növényekkel is bizonyították (De Zelicourt és mtsai., 2016). A ROS jelátvitel és az ABS közötti kapcsolatot paraquat kezelt növényekben is tanulmányozták. Úgy tűnik, hogy az ABS által az apoplastban és a kloroplastisban kiváltott H₂O₂ felhalmozódás javítja a paradicsom növények paraquattal szembeni toleranciáját is (Zhou és mtsai., 2014), és mindebben meghatározó szerepe van a MPK1/2 által közvetített válaszreakcióknak (Zhou és mtsai., 2013). Az abszcizinsav csökkentheti a paraquat oxidatív károsító hatását, amiben MAPK kaszkádok is részt vehetnek (Ding és mtsai., 2009).

2.3.1. Paraquat hatásmechanizmusa

A paraquat (1,1-dimetil-4,4-bipiridílium-diklorid) az egymással összekapcsolt két piridin gyűrűt tartalmazó szerves vegyületek csoportjába tartozik (viologén, bipiridílium). Hatásmechanizmusát tekintve a szélesspektrumú nem szelektív gyomirtószer közé sorolható, ezáltal minden nem-fás növény ellen hatásos. Használata számos növénykultúrában jelen van, kezdve a haszonnövényektől (búza, kukorica, rizs) egészen a gyümölcsökig (alma, narancs, banán). A molekula pozitív töltésének köszönhetően a talajszemcsékhez erősen kötődik, biológiailag semlegesítődig (<https://www.paraquat.com>). Lebomlása akár 20 évig is eltarthat, a talajvízbe csak igen kis mértékben mosódik ki (Watts, 2011).

Fitotoxikus hatását, mint alternatív elektron akceptor, az I. fotokémiai rendszerének (PSI) redukáló oldalán fejt ki az elektronok eltérítése által, és így gátolja a ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktáz működését, valamint a NADPH előállítását. A paraquat az eltérített elektronokat felvéve paraquat kation gyökké alakul, ami a molekuláris oxigénnel kölcsönhatva szuperoxid anion gyököket és más reaktív oxigénformákat (pl. hidroxil gyökök és hidrogén-peroxid) generál. A redox egyensúly kibillenése oxidatív stresszt gerjeszt, ami a lipidek peroxidációjához, végső soron pedig a növényi sejtek károsodásához vezet (Lascano és mtsai., 2012; Hawkes, 2014). A paraquat nem csak a fotoszintézist gátolja, de a mitokondriális elektrontranszportlánc működését is befolyásolja (Cochemé és Murphy, 2008). Az említett folyamatok során a ROS-képző adottságának következtében gyakran alkalmazzák az oxidatív stressz által kiváltott fiziológiás változások, illetve azok következményeinek kísérletes tanulmányozására. A folyamat során jelentkező aktív oxigénformák nem csak a fotoszintetikus pigmenteket, hanem a lipideket is károsítják, megbontják a lipid tartalmú membránokat. Ennek köszönhetően növelik a membránok átjárhatóságát, ami a turgornyomás csökkenéséhez és végezetül a növény elszáradásához vezet (Lascano és mtsai, 2012).

A szer hosszabb ideig tartó és ismétlődő alkalmazásának következtében az elmúlt évtizedek során több mint 22 növényfaj esetében paraquattal szembeni tolerancia, illetve rezisztencia alakult ki (Gressel, 1984; Yu és mtsai., 2007; Watts, 2016). A rezisztencia mechanizmusa és annak mértéke mind fajonként és földrajzi elhelyezkedésenként is változó, vagyis a rezisztencia kialakulása különböző sejtszintű és fiziológia tényezők közreműködésének tudható be (Shaaltier, 1988; Preston és mtsai., 1991; Szigeti és mtsai., 2001). A mechanizmus hátterében állhat a herbicid akadályozott felvétele, a kloroplasztiszból és más sejtorganellumokból a vakuólumba történő elkülönítése, vagy a keletkező ROS semlegesítése (Szigeti és mtsai., 2001; Jóri, 2007; Hawkes, 2014). Néhány esetben a paraquat rezisztencia más oxidatív ágensekkel és ROS generáló környezeti tényezőkkel szembeni tolerancia kialakulásával is jár. Keresztrezisztencia volt megfigyelhető a SO₂, számos gyomirtószer (atrazin, acifluorfen) és az ózon (Shaaltier és mtsai., 1988; Cummins és mtsai., 1999) és nehézfémek (Chiang és mtsai., 2006) között. Antioxidáns enzimek működésének a fokozása, mint például aszcorbát-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz és dehidroaszcorbát-reduktáz, számos esetben segítette a paraquattal szembeni rezisztenciát (Lee és mtsai., 2007; Murgia és mtsai. 2004).

2.3.2 Paraquat rezisztencia mechanizmusa

A prokarióta és eukarióta szervezetekben az ATP kötő doménnel rendelkező (ABC, ATP-Binding Cassette) transzporterek a legismertebb multidrog rezisztenciát (MDR, Multi Drug Resistance) okozó rendszerek. Növényekben ezek a transzporterek részt vehetnek a xenobiotikumok detoxifikációs folyamataiban, illetve a toxikus anyagok ATP-függő vakuoláris transzportjában (Kang és mtsai., 2011). A PDR11 (Pleiotropic Drug Resistance 11) a plazmamembránon lokalizált ABC transzporterek közé tartozik és szabályozza a paraquat felvételét a növényi sejtbe. A *pdr11* knock-out mutánsokban megfigyelt paraquat rezisztencia hatása a növényekben az 50%-al csökkent herbicid felvételének volt köszönhető (Xi és mtsai., 2012).

A paraquatot kapcsolatba hozták a vele hasonló szerkezetű és töltéseloszlású poliaminokkal (pl. putreszcin, kadaverin, spermin) is. A diamin, putreszcin és kadaverin kompetitíven gátolják a paraquat kukorica gyökérsajtjeibe történő felvételét (Hart és mtsai., 1992). Az *Arabidopsis* RMV1 (Resistant to Methyl Viologen 1) mutációjának következtében csökkent a paraquat és a poliaminok felvétele, ami egy bizonyos fokú poliamin tolerancia kialakulását eredményezte. A *RMV1* túlműködtetése a transzgenikus növényekben pedig paraquattal és a poliaminokkal szemben is túlzott érzékenységet váltott ki (Fujita és mtsai., 2012). A *LAT* (L-type Amino Acid Transporter) transzporterek a poliaminok citoszolikus és organellek közötti szállításáért felelősek. Az ezen transzporter családba tartozó és Golgi lokalizációt mutató *PAR1* (Paraquat Resistant 1) génről kiderült, hogy a paraquat kloroplasztiszba történő transzportját is elvégzi. Mutációja az *Arabidopsisban* és a rizsben is jelentős paraquat rezisztenciát eredményezett (Li és mtsai., 2013). A laskatökből (*Cucurbita ficifolia*) klónozott spermidin-szintáz túltermelő *Arabidopsis* növények fokozott poliamin tartalmuknak köszönhetően megnövekedett toleranciát mutattak számos abiotikus stressztényezővel szemben, melyek között a paraquat is szerepelt (Kasukabe és mtsai., 2004).

A kukorica növények intracelluláris paraquat transzportját és effluxját vizsgálva felismerték, hogy lassan a citoplazmából a vakuólumba szekvesztrálódik, illetve részben a gyökerek felől a hajtások irányába transzlokálódik (Di Tomaso és mtsai., 1993). A kompartmentációs folyamat szerepét, mint a herbicid rezisztencia egyik alternatív mechanizmusát, a betyárkóró herbicid rezisztens biotípusaiban már korán felismerték (Norman, 1993).

Azáltal, hogy a paraquat nem képes szétterjedni a sejt azon alkotórészeibe, ahol hatását kifejtheti, több növényfajban is rezisztenciát eredményezett (Lasat és mtsai., 1997; Szigeti és mtsai., 2001; Yu és mtsai., 2010). Ezt a kompartmentációs folyamatot a tonoplaszt-lokalizált *Arabidopsis* CAT4-el homológ aminosav transzporter végzi (Jóri és mtsai., 2007). Mindezek alapján elmondható, hogy a paraquat felvételét és a sejten belüli szállítását számos transzportfehérje szabályozhatja, amiknek sok esetben szerepe van a rezisztencia kialakulásában.

Paraquat rezisztencia jóvoltából csökken a növényeket ért oxidatív károsodás, ami a reaktív oxigénformák enzimatis és nem enzimatis úton történő hatástalanításával is elérhető. Az antioxidáns tartalom fokozásával nem csak a paraquat, de más abiotikus stresszek, só, szárazság, hideg és magas fényintenzitás által okozott oxidatív sérülés is csökkenthető (Badawi és mtsai., 2004; Lee és mtsai., 2007; Murgia és mtsai., 2004; Yoshimura és mtsai., 2004). A Foyer-Halliwell-Asada ciklus megemelkedett enzimaktivitása a gyomnövények esetében bizonyos herbicidek és oxidatív ágensek elleni toleranciához vezetett (Shaaltier, 1988). Az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimek működésének serkentése a kloroplasztiszban javította a *tAPX* túltermelő lúdfű növények só, magas fényintenzitás és nehézfém elleni stressztűrő képességét, illetve a *Chl-APX* transzgénikus dohány só (Na_2SO_3), polietilén-glikol (PEG) és szárazságtoleranciáját, mindezek mellett a transzgénikus növények paraquat okozta oxidatív károsodás mértékét is csökkentette (Badawi és mtsai., 2004; Murgia és mtsai., 2004). Transzgénikus növényekben az antioxidáns védőrendszer több komponensének (pl. SOD és APX) együttes indukálásával fokozottabb védelem érhető el a paraquat toxicitásával szemben (Kwon és mtsai., 2002). A kloroplasztisz Cu/ZnSOD, APX enzimeket túltermelő transzgénikus dohányban megnövekedett oxidatív stressz és só toleranciához vezetett a dehidroaszkorbát-reduktáz enzim aktivitásának a növelése is (Lee és mtsai., 2007). A citoszolikus és kloroplasztisz glutation-peroxidáz enzimek szintjének emelkedése a transzgénikus dohány növényekben (*TcGPX*, *TpGPX*) szintén nem csak paraquat toleranciához vezetett, hanem a növények fagy- és sótűrését is segítette (Yoshimura és mtsai., 2004).

2.4 Kis peptidek jelentősége

A fehérjék általánosan polipeptid alegységként 50 – 1000 aminosav egységet (AA) tartalmaznak. Azok a polipeptidek, amelyek kevesebb mint 100 AA-ból épülnek fel a kis fehérjék, peptidek (SPs – Small Proteins) csoportjába tartoznak. A legtöbbjük úgy van számoltartva, mint hipotetikus vagy ismeretlen funkciót ellátó fehérje. A már azonosított SPs-nek meghatározó szerepe van a prokarióta és eukarióta szervezetekben, mint működési, információátviteli és feldolgozó egységek, részt vesznek a sejtszintű folyamatok, jelátviteli utak és anyagcsere folyamatok szabályozásában (Su és mtsai., 2013). Szerkezetüket tekintve általában egy meghatározott konzervált doménnel rendelkeznek, ami révén azonos funkciót látnak el. Az eddig jellemzett SPs a patogének elleni védelemben, illetve a sejtközi kommunikációban (ligand-receptor) vesznek részt. Ezeknek az N-terminális szignál szekvenciával rendelkező szekretált peptideknek két fő csoportja van, az egyik a poszt-transzlációban módosított kis peptidek (PTMPs - Small Post-Translationally Modified Peptides), a másik a ciszteinben gazdag peptidek (CRPs - Cysteine-Rich Peptides), melyeket úgy azonosítottak, mint védelmi molekulák. A PTMP-k közé sorolhatók a növény-patogén kölcsönhatást szabályozó PSK (Phytosulfokines), CLE/CLV3, IDA/IDL, vagy a PSY fehérje család (Gully és mtsai., 2019). Friss tanulmány szerint a CLE25 (CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGIONRELATED 25) peptid – BAM (BARELY ANY MERISTEM) receptor egység felelős a vízhiány következtében kialakuló szövetspecifikus jel továbbításáért. A CLE25 peptid a BAM receptor jelenlétében szárazság hatására indukálódik a gyökér vakuoláris szöveteiben, majd onnan a levelekbe jutva aktiválja az ABS-függő sztómazáródást (Takahashi és mtsai., 2018). Egyes szekretált peptideket a növények immunitásáért felelős DAMP (Damage/danger-Associated Molecular Patterns) osztályba sorolták úgy, mint a virágos növényben konzervált Peps (Plant Elicitor Peptides) peptidek családja, melynek tagjai a PEPR (PEP-RECEPTOR) receptorokkal komplexet alkotva szabályozzák a baktériumok, gombák és herbivorok elleni védelmi jelátviteli utakat (Bartels és Boller, 2015). A PEPR transzmembrán receptorok a leucinban gazdag (LRR – Leucine-Rich Repeat) receptor szerű kinázok csoportjába tartoznak (RLKs - Receptor-Like Kinases), melyek nem csak a CLE peptidek (Cock és McCormick, 2001; Bartels és Boller, 2015), de lehetséges, hogy a xenobiotikumok érzékeléséért is felelősek (Ramel és mtsai., 2012; Fu és mtsai., 2014).

2.5. Glikofita és halofita növényfajok

A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó kétszikű, önbeporzó növény. Rövid életsiklusának (kb. 8-10 hét) és kis genomjának köszönhetően, mely mindössze 5 kromoszómából áll, a növénybiológiai alap kutatás elsődleges és legfontosabb modellnövénye. A fejlődésbiológiai és genetikai kutatásokban történő elterjedése nagyrészt Friedrich Laibach és Rédei György nevéhez fűződik. Az első olyan növény, melynek a teljes genomját megszekvenálták (AGI – Arabidopsis Genom Initiative, 1996), és amelynek az elemzésére azóta több intézetet és adatbázist hoztak létre (ABRC, NASC, TIGR, SALK) (Meinke és mtsai., 1998). Segítségével számos olyan gént azonosítottak, melyeknek fontos szerepe van a stresszhatások érzékelésében és a válaszként fellépő anyagcsere folyamatok változásaiban, illetve a növényi fejlődés szabályozásában (Ahuja és mtsai., 2010; Cramer és mtsai., 2011). Az egyetlen hátránya, hogy glikofita (sóérzékeny) növényfaj, ezért 100 mM NaCl koncentráció mellett már nem képes befejezni az életsiklusát, ezáltal a stresszérzékenysége következtében az extrém környezeti körülményekre adott növényi mechanizmusok vizsgálata korlátozott. Az extremofil növények képesek olyan sivatagi (xerofiták, pl. *Zygophyllum xanthoxylum*, *Craterostigma plantagineum*) vagy magas sótartalmú (halofiták, pl. *Thellungiella parvula*, *Eutrema salsugineum*) körülményekhez adaptálódni, melyek más növények számára már letálisnak számítanak (Flowers és Colmer, 2008; Salehi-Lisar és Bakhshayeshan-Agdam, 2016; Bechtold, 2018).

A halofita növényeknek a megemelkedett stressztűrő képessége a toxikus anyagok megváltozott felvételében (Na^+ , Cl^-) és raktározásában, vízfelvétel optimalizálásában, sztómák szabályozásában, ozmoprotektáns anyagok fokozott szintézisében és antioxidáns védőrendszerükben rejlik (Flowers és Colmer, 2008; Surówka és mtsai., 2016). A *Lepidium crassifolium* (3. ábra), magyar nevén sziki zsázsa, a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó és hazánkban őshonos halofita faj, az elsők között Kitaibel Pál (1799) írta le, azóta több szinonimával is illették: *Thlaspi cartilagineum* (1786), *Lepidium crenatifolium* (1859), *Lepidium cartilagineum* (1906) (Bona, 2014). Elterjedését tekintve Közép-Európa és Ázsia szikes, szoloncsákos vidékein található meg, ahol a szélsőséges környezeti körülményekhez tökéletesen adaptálódott (Murakeozy és mtsai. 2003; Mile és mtsai., 2008).



3. ábra: *Lepidium crassifolium* (Kitabel Pál, 1799-1802).

Nyilvánosan hozzáférhető adatbázisban mindössze 5 darab *Lepidium cartilagineum* nukleotid szekvencia érhető el (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), köszönhetően Mummenhoff és munkatársai (2008) azon tanulmányának, ahol a *Lepidium* nemzetséget, mint modell rendszert alkalmazták annak érdekében, hogy a virágzat fejlődése mögött álló evolúciós hátteret feltárják a *Brassicaceae* családban. Grigore és Oprica (2015) a halofita növények antioxidáns tartalmának a vizsgálata során megállapította, hogy a *Lepidium crassifolium* figyelemreméltóan magasabb polifenol (6.73 ± 0.29 mg galluszsav (GAE)/g szárazanyag (DW)) tartalommal rendelkezik, mint flavonoid (2.37 ± 0.55 mg katechin (CE)/g szárazanyag (DW)). Mivel a halofiták adaptációs mechanizmusa mögött álló genetikai háttér egyedülálló és feltárása az *Arabidopsisban* nem megoldható, ezért több esetben is alkalmazták őket, mint kísérleti növény. A sótűrő növények genetikai vizsgálatának a fontosságára a *Mesembryanthemum crystallinum* és *Arabidopsis thaliana* közötti genomikai eltérések is rávilágítottak. Az *Arabidopsis*sal közeli rokon *Lepidium crassifolium* só-, ozmotikus- és oxidatív stressz toleranciájára akkor derült fény, amikor véletlenszerű génátvitelt hajtottak végre a két rokon faj között (Mishra és Tanna, 2017). A stressztolerancia alapú szűrések során a független *Lepidium* cDNS-t túltermelő transzgenikus vonalak közül azonosítottak egy só toleranciát mutató feltételezhetően *Lepidium* GDSL lipáz/észteráz fehérje család egyik tagját (PL542Na1), amelynek AT5G54030 *Arabidopsis* homológja egy GDSL-szerű lipáz/acilhidroláz családba tartozó MVP1/GOLD36/ERMO3 fehérjét kódol és meghatározó szerepe van az ER-hez kapcsolódó védekező reakciókban és a fehérje transzportokban (Jancowski és mtsai., 2014; Marti és mtsai., 2010; Nakano és mtsai., 2012).

Továbbá azonosítottak egy ozmotikus stresszhatás alatt kiemelkedő fotoszintetikus paraméterekkel rendelkező kis acil-koenzim-A kötő fehérjét (PL127P04), mely az *Arabidopsis* ACBP6-al mutatott nagyfokú hasonlóságot. Az ACBP doménnel rendelkező fehérjék magas konzerváltságot mutatnak az eukarióta szervezeteken belül, fontos szerepük van a lipidek metabolizmusa, transzportja során és a jelátviteli utak szabályozásában. Valószínűleg a stresszhatások utáni helyreállító folyamatokban is részt vesznek (Xiao és Chye, 2011; Li-Beisson és mtsai., 2013). A transzgenikus vonalak vizsgálata során egy paraquat rezisztenciát mutató ismeretlen fehérjét (PL372PQ01) is identifikáltak (Rigó és mtsai., 2016).

2.6 Fenomikai fejlesztések

A fenomika a növénybiológiai kutatás fenotipizálással foglalkozó tudományága, melynek alkalmazása napjainkban már nélkülözhetetlen a genetikai háttér által meghatározott morfológiai és fiziológiai eltérések feltárására. A fenomikai fejlesztések közé tartozik a növények képfeldolgozó és képelemző módszerekkel történő jellemzése, ahol a képalkotást (pl. digitális fotográfia, fluoreszcencia- és termikus) a színes fényképek számítógépes feldolgozása követi. Ekkor a lényeges információt elválasztjuk a lényegtelenről (pl. szegmentálás), vagyis a készült digitális képek alapján a növények különböző részeihez tartozó pixelek háttérelvonása megtörténik. Az így kapott képpontok számszerű adatokként történő jellemzését, statisztikai elemzését hívjuk képelemzésnek (Furbank és Tester, 2011; Dhondt és mtsai., 2013; Spalding és Miller, 2013; Sozzani és mtsai., 2014).

Az utóbbi években a modell illetve a mezőgazdasági haszonnövények legkülönbözőbb részeinek a mérésére és elemzésére számos képfeldolgozó és képelemző programot fejlesztettek (<http://www.plant-image-analysis.org/>). A nyárfélék leveleinek a vizsgálata a JAVA alapú LAMINA (Leaf shape determination) programmal (Bylesjo és mtsai., 2008) vagy a többféle növényfajnál használható, de hasonló funkcióval rendelkező LeafAnalyzer-el (Weight és mtsai., 2008) végezhető el. Kukorica és más perjefélék szárának anatómiai felépítése egy Matlab alapú szoftverrel vizsgálható (Heckwolf és mtsai., 2015).

Az *Arabidopsis thaliana* modellnövény egyes részeinek és paramétereinek karakterizálása *in vitro* vagy üvegházi körülmények között is megoldható. Tomé és munkatársai (2017) a mutáns csíranövények *in vitro* növekedésében (ozmotikus stressz hatására) bekövetkező változások jellemzésére egy R programnyelven írt csomagot (package) hoztak létre. De létezik a hipokotil jellemzésére testreszabott alkalmazás is, mint például a HYPOTrace (Wang és mtsai., 2009). Brooks és munkatársai (2010) a gyökerekről készült fényképek feldolgozását és elemzését a Matlab programrendszer segítségével végezték el. A cserepes *Arabidopsis* és dohány csíranövények növekedésének megfigyelésére alkalmas GROWSCREEN az elsők között szerepelt a modellnövényre is használható félautomata berendezések között (Walter és mtsai., 2007). A későbbiekben, hogy figyelemmel kísérjék az *Arabidopsis* növények változásait szárazságstressz hatása alatt, a zöldsötveg megfigyelésére irányuló képelemző berendezést már pulzus amplitúdó modulált (PAM) méréséssel is kiegészítették (Jansen és mtsai., 2009).

Az automatizált platformok fejlesztése lehetővé tette a számtalan növényi egyed növekedésének és fiziológiai állapotának a valós idejű megfigyelését, melynek során egyszerre többféle paraméterről nagy mennyiségű adatok generálása is megvalósítható (Dhondt és mtsai., 2013; Feher-Juhász és mtsai., 2014; Junker és mtsai., 2014; Mutka és Bart, 2014; Awlia és mtsai., 2016). A fenotipizáló rendszereket eleinte a haszonnövények vizsgálatára tervezték, viszont az alapkutatásoknak köszönhetően megjelentek olyan fejlesztések is, melyekkel az *Arabidopsis* növények jellemzése is megoldható (Arvidsson és mtsai., 2011; Dhondt és mtsai., 2014; Apel és mtsai., 2015; Awlia és mtsai., 2016). Az automatizált fenotipizálási szerkezetek iránti igényt felismerve, olyan kereskedelmi cégek, mint a LemnaTec (<https://www.lemnatec.com>), PhotonSystemsInstruments (PSI, <http://www.psi.cz>) és a WIWAM (<https://www.wiwam.be>) átfogó platformok újításába kezdtek bele. Viszont ezeknél a rendszereknél az adatok tárolása és feldolgozása már speciálisan kifejlesztett programokkal történik.

A növények növekedésének és fejlődésének a vizsgálatára a homogén és szabályozott körülmények az ideálisak. A Petri-csészében nevelt *Arabidopsis* növények lapos rozettája a digitális fényképeken kétdimenziós szerkezettel rendelkezik, levelei csak ritkán mutatnak átfedést. Ezáltal *in vitro* képelemzésre az egyik legalkalmasabb növényfaj, mely többféle paraméter segítségével jellemezhető úgy, mint a terület, konvex burok, kerület, zömökség. stb. (Vanhaeren és mtsai., 2015). A JAVA alapú ImageJ (ImageJ1, ImageJ2, Schindelin és mtsai., 2015) nyílt forráskódú multiplatform lehetővé teszi a két- és három-dimenziós képfeldolgozást. Az ImageJ platformra épülő kiterjesztését, a FIJI-t (Schindelin és mtsai., 2012) elsősorban az élettudományok területén belül használják, mivel a szkriptek (adott programnyelven íródott parancssor) és a beépülő modulok (plug-in) segítségével már specifikus képfeldolgozó művelet (pl. mikroszkópia stb.) is végrehajtható az eddigi alapfunkciók (pl. zajgenerálás, szűrők, háttérelvonás) mellett. Egy nemrégiben fejlesztett automatizált fenotipizáló platform (IGIS – *In vitro Growth Imaging System*) az *in vitro* körülmények között nevelt növények hasonló adatainak a generálására képes (Dhondt és mtsai., 2014).

Stressztűréssel foglalkozó kutatások révén megjelentek olyan képelemző módszerek és programok, melyekkel a növények olyan fiziológiai tulajdonságairól kaphatunk információt, mint például a klorofill tartalmuk (Majer és mtsai., 2010; Liang és mtsai., 2017) vagy a klorofill fluoreszcenciájuk (Jansen és mtsai., 2009; Awlia és mtsai., 2016; Rungrat és mtsai., 2016). A klorofill tartalom meghatározása régebben csakis laboratóriumi körülmények között a növényi szövetek elroncsolásával és kémiai extrakcióját követő spektrofotometriás méréssel volt megoldható (Lichtenthaler és Buschmann, 2001). A Rosette Tracker egy olyan ImageJ plug-in, ami a cserépben nevelt *Arabidopsis* növények rozettáiról készült két-dimenziós képek elemzésére szolgál, ezáltal információt biztosít a rozetták különböző paramétereiről (terület, átmérő, tömörittség, relatív növekedés (RGR – Relative Growth Rate)). Az ImageJ-be beépülő szegmentációs módszerét fluoreszcencia- és termikus leképezéssel kapott képeken alkalmazva a rozetták fotoszintetikus és transzspirációs rátája is megbecsülhető (De Vylder és mtsai., 2012).

A SPAD (Soil Plant Analysis Development) alapú nem destruktív mérőkészülékek a levelek relatív klorofill tartalmát vörös (650 nm) fénytartományban mért abszorpciójuk alapján határozza meg, amihez referenciaként infravörös fényt használ (940 nm). A módszer hátránya, hogy a kézi készülékkel nagy egyedszámú méréseket kell végrehajtani, mivel a mért mérési felület mindössze pár négyzetcentiméter (Markwell és mtsai., 1995; Adamsen és mtsai., 1999; Uddling és mtsai., 2007; Ling és mtsai., 2011) A klorofill tartalom a növények optikai tulajdonsága végett a spektrális reflektancia értékéből kiindulva (Gitelson és mtsai., 2003) is megállapítható.

A növények pigment tartalmának a becslése a piros, zöld, kék színsatornák (RGB) szétválasztásával is történhet (Riccardi és mtsai., 2014; Awlia és mtsai., 2016; Liang és mtsai., 2017). Majer és munkatársai (2010) ezt tovább gondolva a dohány és szőlőlevelek RGB értékeit HSV (Hue, Saturation, Value) értékekre konvertálták át, a képfeldolgozás során a Hue (színárnyalat) és a levélkorongok mért klorofill tartalma közt felfedezett korreláció alapján megállapították, hogy a digitális képek Hue értékei alkalmazhatóak a pigmenttartalom megállapítására. Itt fontos megjegyezni, hogy a különböző növényfajták és levélformák esetében a precíz kalibráció elengedhetetlen része minden új módszer kidolgozása során (Richardson és mtsai., 2002).

3. CÉLKITŰZÉSEK

PhD tanulmányaim kezdetekor (2014) a *Lepidium crassifolium* stressztoleranciáját biztosító gének azonosítására irányuló alkalmazott kutatási projektbe csatlakoztam, ahol a feladatom néhány, kiválasztott *Lepidium* gént expresszázó *Arabidopsis* vonal részletes analízise volt. A stressztolerancia javítását célzó kutatási programok napjainkban nagy áteresztőképességű és költséges rendszereket igényelnek, viszont az alkalmazásuk hatékonyabbá és pontosabbá teheti a génazonosításhoz elengedhetetlen fenotipizálási folyamatot. A stressztűrésben szerepet játszó gének azonosítása és jellemzése a jövőben segítheti a mezőgazdasági haszonnövények genetikai állományának javítását. Ezek alapján célul tűztük ki:

1. Költséghatékony és felhasználóbarát fenomikai program fejlesztését;
2. A képelemző módszerek gyakorlati alkalmazását a megváltozott stressztoleranciát mutató transzgénikus vonalak és mutánsok jellemzése során;
3. A halofita *Lepidium crassifolium*ból izolált és környezeti stresszel szemben toleranciát okozó gének tesztelését, egy kiválasztott gén részletes jellemzését;
4. A paraquat rezisztenciáért felelős *Lepidium crassifolium* és *Arabidopsis thaliana* Small Paraquat resistance (*SPQ*) gén leírását és ezek összehasonlítását;
5. Az SPQ fehérje hormon és egyéb stresszválasz szabályozásában betöltött szerepének a felderítését;
6. Az SPQ fehérjét túltermelő transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növények vízhiányhoz történő alkalmazkodásának a megfigyelését.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A PlantSize program fejlesztése

4.1.1 Növényi anyagok és nevelési körülmények

A kalibrációs munkák során minden esetben, mint teszt és kontroll növény, az *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípusát (Col-0) használtuk. A program használhatóságának a visszaigazolására a *phyB-9* mutánst vettük igénybe, melyet Dr. Nagy Ferenc bocsájtott a rendelkezésünkre. A növényeket 12 óra fény és 12 óra sötét periódusban (22°C/18°C), ~120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fényben Petri-csészéken neveltük steril körülmények között. A magokat 70%-os etanollal 1 percre, majd 4%-os Domestossal 10-15 percre sterilizáltuk, majd több alkalommal desztillált vízzel öblítettük. A magokat 5 napig $\frac{1}{2}$ MS táptalajon csíráztattuk, majd a csíranövényeket új táptalajra áthelyezve, a négyszögletes Petri-csészékben meghatározott mátrix szerint helyeztük el. (4 x 4, 4 x 5, 5 x 5, 5 x 6, 6 x 6) (Faragó és mtsai., 2018).

4.1.2 Alkalmazott stresszkezelések

A stresszkezelésekhez kétféle növekedési tesztet dolgoztunk ki. A növényeket 0,8%-os phytoagar tartalmú ($\frac{1}{2}$ MS) táptalajon (Szabados és mtsai, 2002.) csíráztattuk, majd 5 napos korukban áthelyeztük őket 100 mM NaCl-dal vagy 0,2 μM paraquat-tal kiegészített táptalajra. Erősebb kezelések céljából 14 napos növényekkel dolgoztunk, ebben az esetben a táptalaj szilárdságát 0,4% phytoagar alkalmazásával lazítottuk és a következő vegyszerekkel egészítettük ki: 150 mM és 200 mM NaCl, 0,1 mM CdCl_2 és 3 mM H_2O_2 . A permetezések során 1 μM , 3 μM , 5 μM paraquatot és 10 mM, 20 mM H_2O_2 -t alkalmaztunk, amit 0,01 %-os Silwet L-77 detergenssel egészítettünk ki.

4.1.3 Klorofill tartalom meghatározása

A mérésekhez különböző színárnyalatú egyedi növényeket választottunk ki és mértük le a friss tömegüket, majd a növényi szöveteket extrakciós pufferben (95 % etanol + 5 % desztillált víz) 4 °C-on egy éjszakát inkubáltuk. A klorofill-tartalom meghatározása során a Lichtenthaler és Buschmann, (2001) által leírtak szerint jártunk el. A minták abszorbanciáját 470 nm; 648,6 nm és 664,1 nm hullámhosszon a Multiskan GO spektrofotométerrel (Thermo Scientific) mértük meg.

A növények pigmenttartalmát az alábbi számolások alapján határoztuk meg:

$$\text{Klorofill-a tartalom (Chla; } \mu\text{g/mL)} = 13,36 \times A_{664,1} - 5,19 \times A_{648,6}$$

$$\text{Klorofill-b tartalom (Chlb; } \mu\text{g/mL)} = 27,43 \times A_{648,6} - 8,12 \times A_{664,1}$$

$$\text{Karotinoidok tartalma (} \mu\text{g/mL)} = (1000 \times A_{470} - 2,13 \times \text{Chla} - 97,64 \times \text{Chlb})/209$$

$$\text{Teljes klorofill tartalom (} \mu\text{g/mL)} = \text{Chla} + \text{Chlb}$$

A klorofill koncentrációt a növények friss tömegére (mg FW) normalizálva állapítottuk meg.

4.1.4 Antocián tartalom meghatározása

A különböző színárnyalatú egyedi növények friss tömegének a mérését követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, porrá dörzsöltük és 200 μL desztillált vizet adtunk hozzá, majd 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk (13000 rpm) a mintákat. A mérést a felülúszókat felhasználva Giusti és Wrolstad (2001) által leírt pH megkülönböztetésen alapuló módszerrel végeztük el, ami a következőképpen történt: a mintákat 100-100 μL -re elosztottuk és 400 μL 0,025 M KCl-HCl (pH 1,0) és 0,4 M Na-acetát-HCl (pH 4,5) pufferekkel pH 1,0 -re ill. pH 4,5 -re állítottuk be a kémhatásukat. Ezt követően 15 perc jégen történő inkubáció után a mintákat Multiskan GO spektrofotométerrel (Thermo Scientific) 520 és 700 nm hullámhosszon mértük meg. Az abszorbancia értékek (A) közti különbséget, $A_{\text{kül}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$ alapján számoltuk ki, ahol a monomer antocián koncentrációt a következő képlettel határoztuk meg, $A_{\text{kül}} \times 83,5$ (mg/liter), az így kapott értékeket pedig a növények friss tömegével normalizáltuk (mg HueFW).

4.1.5 A rendszer kalibrálása

A növények méretének a meghatározására irányuló kalibrációhoz 10-12 napos *Arabidopsis* növényeket fényképeztünk le, majd egyesével lemértük a friss tömegüket, illetve 24 órás 80 °C-on történő dehidratálást követően a száraz súlyukat is megállapítottuk. A kalibráció alatt 250 darab egyedi növény rozetta méretét (pixel) hasonlítottuk össze azok friss és száraz tömegével.

A pigmenttartalom kalibrációjához olyan egyedi növények klorofill és antocián tartalmát mértük, melyek a zöld és a lila színeknek a lehető legtöbb színárnyalatát reprezentálták. Ehhez 4 hetes, *in vitro* növények táptalaját a következő anyagokkal egészítettük ki: 0,1 mM CdCl₂, 3 mM H₂O₂; 0,2 vagy 0,5 M szacharóz.

A kezelések hatására a megváltozott színárnyalatú egyedeket a klorofill és antocián tartalom meghatározása előtt lefényképeztük, majd a színes fényképek alapján mért növények Hue (színárnyalat) értékeit összehasonlítottuk az általunk meghatározott pigment értékekkel. A kalibrációhoz 300 darab egyedi növény Hue, klorofill, illetve antocián értékeit dolgoztuk fel. Amennyiben a képelemző programot eltérő nevelési körülmények között tartott növények elemzésére szeretnék felhasználni, mindenképpen meg kell ismételni a kalibrációt, mivel az eltérő körülmények (fény) befolyásolják a növények Hue értékeit, amire a klorofill és antocián tartalom meghatározása épül.

4.1.6 Képalkotás

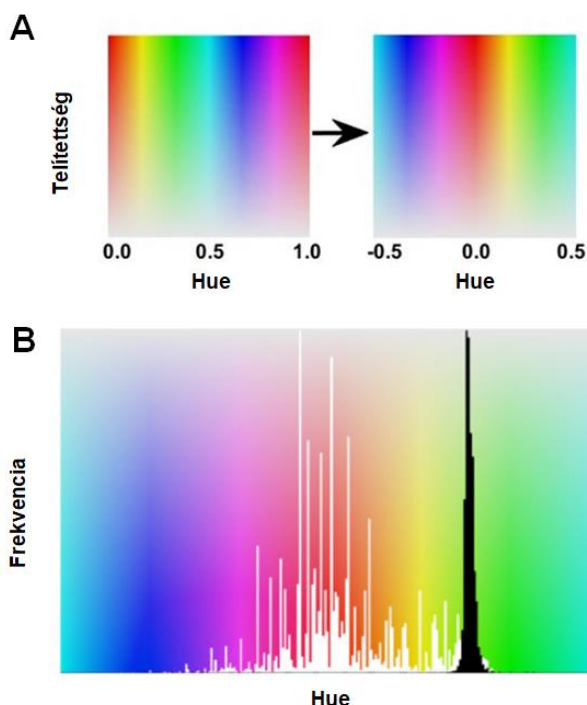
A növények növekedési ütemének folyamatos megfigyelése céljából 3 naponta színes fotót készítettünk a négyszögletes horizontális elhelyezkedésű Petri-csészékről. Azért, hogy az egyedi növények elkülöníthetők legyenek, egymástól megegyező távolságban és meghatározott mátrix alapján helyeztük el őket. Minden esetben homogén fehér háttérnél és egyenletes fényviszonyok között ugyanazzal a beállítással és ugyanolyan távolságról végeztük a fényképek elkészítését (Canon PowerShot SX20 digitális kamera). A PlantSize jelen verziójával csakis 3000×4000 pixel felbontású RGB képek elemzése lehetséges. Az általunk alkalmazott további beállítások: ISO: 100, zársebesség: 1/30 s, rekesz: F/5.6, manuális fókuszt és makró mód. A képalkotás során mindig ügyeltünk arra, hogy ne keletkezzen semmilyen visszatükröződés, mivel az a képelemzés során hibás eredmények keletkezéséhez vezethet.

4.1.7 Képfeldolgozás és képelemzés

A PlantSize-t a MATLAB (2016b verzió) programrendszer specifikus képfeldolgozó programcsomag (Image Processing Toolbox™) segítségével fejlesztettük (The MathWorks Inc., Natick, MA, United States). A program telepítéséhez a következő rendszerkövetelményeknek kell megfelelni: 4 GB RAM (ajánlott), Windows 64 bit (Windows 7 vagy Windows 10), képernyő felbontása: 1920×1080 pixel. MATLAB Runtime R2016b verziója (<http://www.mathworks.com/products/compiler/mcr/index.html>). Internetes segítség a <http://www.mathworks.com/help> oldalon elérhető. A program ingyenesen hozzáférhető a <http://www.brc.hu/pub/psize/index.html> oldalon.

A Matlab Image Processing Toolbox™ programcsomag segítségével az alábbi főbb képfeldolgozást hajtottuk végre:

1. Színtér módosítása: A zöld-piros-kék (RGB) színtérből átkonvertáltuk a képeket a színárnyalat-telítettség-fényintenzitás (HSV) színtérbe (Majer és mtsai., 2010; Sass és mtsai., 2012).
2. Szegmentálás (háttér elválasztása): A színtér módosítása révén, és mivel egyenletes fehér háttérnél fotóztuk le a Petri-csészéket, el tudtuk választani azokat a pixeleket a háttértől, melyek nagyobb szaturációs és kisebb intenzitás értékkel rendelkeztek. Ami a program kezelői felületén a szaturációs ('Green', 0-255) és intenzitás ('Gray', 0-255) csúszkákkal ill. a 'ROI' funkcióval manuálisan is elvégezhető.
3. Az egyes rozetták friss tömegét a pixel számok alapján a következő képlet segítségével határoztuk meg:
Friss tömeg (Weight) = $5,929e-4 \times \text{pixel szám}$ (Fehér-Juhász és mtsai., 2014).
4. A kiválasztott pixelekhez tartozó Hue értékeket módosítottuk, mivel kék színű pixel nem volt a mintákban. A speciális színteret úgy állítottuk elő, hogy a türkiztől vörösre tartó tartományt (0,5-től 1,0-ig) a vörös alá toltuk, a 4. ábrának megfelelően. Ezután kiszámoltuk a kiválasztott pixelek átlagos Hue értékét.



4. ábra: **Módosított színtér hisztogramja.** A) A türkiztől vörösre terjedő tartományt (0,5-től 1,0-ig) eltolása a vörös tartomány alá. B) Az antocián tartalmú minták Hue értékeinek az eloszlása: fekete rész jelzi az egészséges zöld növények, fehér rész a kezelt antociánban gazdag növények hisztogramját. X tengely: Hue, Y tengely: az eloszlás maximumára normált.

5. A klorofill tartalom meghatározását a Hue érték és a pixelszámok közötti korreláció alapján a következő képlet alkalmazásával kalibráltuk a programba:

$$\text{Klorofill (Chl./pixel)} = 17,98 \times \text{átlag Hue} - 3,33 \text{ (Majer és mtsai., 2010).}$$
6. Hasonlóan jártunk el az antocián tartalom meghatározásakor, amit a következő képlettel határoztunk meg:

$$\text{Antocián (Anth./pixel)} = -1,035 \times \text{átlag Hue} + 0,2359.$$
7. Ezután kiszámoltuk a pixelek által kijelölt terület és a konvex burok által meghatározott terület százalékos arányát.

A képelemzés főbb lépései (Függelék 1. ábra):

- (1) A PlantSize elindítása után az 'OK' gombra kattintva megjelenik a felhasználói felület.
- (2) A fénykép betöltése (.JPEG): 'File > Menü > LOAD' lépésekkel, majd a fénykép kiválasztása.
- (3) 'Project's name': a kísérlet elnevezése.
- (4) 'Date': a dátum megadása.
- (5) 'Name': az adott fénykép megnevezése.
- (6) A növények elhelyezkedése (pl. 4 x 4 vagy 6 x 6) szerint, be kell állítani az oszlopok (Divisior X) és a sorok (Divisior Y) számát.
- (7) 'Row 1-10': a sorok elnevezése.
- (8) A 'Select the area' gombra kattintva a növények kijelölése két kattintással. A kijelölt terület a sor és oszlop beállításai alapján (6. lépés) felosztva jelenik meg.
- (9) A háttér elválasztása a 'Green' és 'Grey' csúszkák állításával történik. A 'Green' csúszkával állítható a kijelölt részek telítettsége, a 'Grey' csúszkával az intenzitása.
- (11) A 'Magnify' ablakban a 'ROI' gombbal lehetséges az egyedi növények kijelölésének a finomítása, ami az 'OK' gombra duplán kattintva véglegesíthető.
- (12) Az 'OK' gombra újból kattintva a program újra számolja az értékeket.
- (13) 'Show values' használatával a növényekhez tartozó értékek megjelennek.
- (14) Az elemzett képhez tartozó értékek mentése: 'File Menu > Save'. Az adatok exportálása .xls formátumban történik és a korábban megadott névvel (3. lépés) ugyanabban a mappába tárolódik el, ahonnan a forrás képet megnyitottuk. Az Excel fájlban belül a munkalapok neve a fényképnek adott név (5. pont) alapján jelenik meg.
- (15) Több fénykép elemzéséhez nem szükséges a 3-7 lépések megismétlése, ezáltal a további adatok ugyan abba az Excel fájlba fognak exportálódni.

Részletesebb útmutatás és információ elérhető a Faragó és munkatársai. (2018) publikációban.

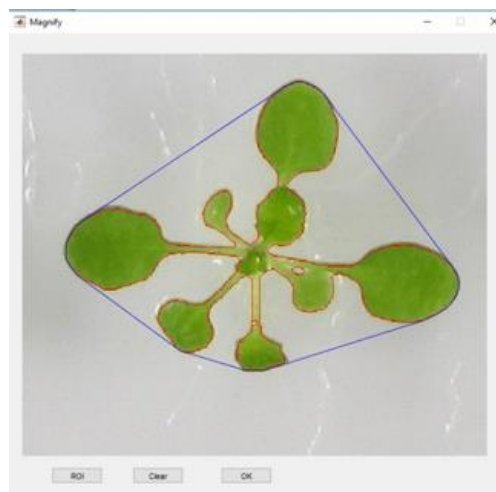
4.1.8 PlantSize paraméterei

A PlantSize használatával a mi kísérleti rendszerünket alkalmazva 36 növény értékelhető ki fényképenként. Az elemezhető növények számát befolyásolja azok mérete, illetve egymástól való távolsága. Abban az esetben, ha a különálló növények levelei összeérnek, akkor megoldható a különálló kijelölésük a 'Magnify' ablakban, de ez a képelemzés folyamatát lassíthatja. A képelemzés végeztével az egyedi növényekhez tartozó numerikus adatok Excel formátumban tárolhatók el későbbi statisztikai elemzés céljából.

A PlantSize az egyedi növények rozettájához tartozó morfológiai és fiziológia paramétereit számolja ki. A rozetta méretét meghatározó paraméterek:

- Terület (Pixel area), a növények által lefedett terület pixelben;
- friss tömeg (Weight);
- konvex terület (Convex area), a rozettát körülölelő burkon belüli pixelhalmaz;
- konvex százalék (Convex %), a konvex burkon belül elhelyezkedő növényi pixelhalmaz százalékos aránya a teljes pixelhalmazhoz viszonyítva (5. ábra).

A növények fiziológia állapotát a klorofill ($\mu\text{g Chl./pixel}$) és antocián (ng Anth./pixel) értékekkel jellemzi, melyek meghatározása a növényekhez tartozó Hue (színárnyalat) értékeit alapján történt (Sass és mtsai., 2012).



5. ábra: A PlantSize által felismert *Arabidopsis* rozetta. Ahol a rozetta területe a piros vonalon belüli pixelek, a konvex terület a kék vonalon (konvex burok) belül elhelyezkedő pixelek összege. A konvex % a rozetta és a konvex terület egymáshoz viszonyított százalékos aránya.

A PlantSize-al végzett teszt kísérletek kiértékelését az MS Excel-ben végeztük, az adatok szignifikanciájára az egyszempontos ANOVA elemzést (Tukey-teszt) alkalmaztuk, ahol a p-érték $< 0,05$ volt.

4.2 *Lepidium* és *Arabidopsis SPQ* jellemzése

4.2.1 Növényi anyagok, sejtkultúrák és nevelési körülmények

A kísérletek során kontrollként az *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípust (Col-0) használtuk és a vizsgált transzgenikus és mutáns vonalak, illetve sejtkultúrák is ebben a háttérben találhatóak. A T-DNS inszerciós mutánsok (SALK-014243, SALK-008417) a Salk gyűjteményből származnak (Alonso és mtsai., 2003). *In vitro* növényeket hasonló módon tartottuk fent, mint ahogy az a 4.1.1 pontban megtalálható. A növénynevelő kamrában végzett száritásos kísérletek alatt a növények rövid nappalon 8 óra fény és 16 óra sötét periódusban (22 °C/ 18 °C), $\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fényben, üvegházi kísérletek során hosszú nappalon és természetes fényviszonyok mellett neveltük.

Az *Arabidopsis* gyökér eredetű sejtkultúrákat olyan MS tápoldatban tartottuk fent, amit 3% szacharózzal; 0,24 mg/l 2,4D-vel (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és 0,014 mg/l kinetinnel egészítettünk ki. A sejtszuszpenziós kultúrákat 22 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában 8 óra fény és 16 óra sötét körülmények között és 125 fordulat/perc sebességű vízszintes rázógépen tartottuk. A sejtszuszpenziókon a táptalajt hetente 5: 45 arányban frissítettük (Fülöp és mtsai., 2005).

4.2.2 *Lepidium SPQ* azonosítása

A fenotípus megváltozásának nyomon követésére alkalmazott eljárásokat Rigó és munkatársai (2016) által kidolgozott módszer alapján végeztük el. A *Lepidium SPQ* gén jellemzése érdekében az alábbiak szerint jártunk el: a már előzetesen azonosított (Rigó és mtsai, 2016) PL372PQ01-es, S10 és S14-es vonalak növekedésének a megfigyelésére a négyszögletes Petri-csészékben nevelt növényeket kontroll $\frac{1}{2}$ MS és $\frac{1}{2}$ MS + 0,2 μM paraquattal (Sigma-Aldrich) kiegészített táptalajokon csíráztattuk ki és neveltük, a génexpresszió indukálására egyes Petri-csészék 5 μM β -ösztadiolt (Sigma-Aldrich) is tartalmaztak. Mivel az alkalmazott COS (feltételhez kötött cDNS-t túltermelő rendszer) pTCES vektora XVE optimalizált kodonnal rendelkezik, amelynek a transzaktiváló hatása ösztadiol-függő, és a P35S2 Cab22L konstitutív promóter által szabályozott. A nevelési körülmények hasonlóak voltak, mint ahogy a 4.1.1 pontban megtalálható. A növekedésüket 21 napig figyelemmel kísértük és a Petri-csészékről 3-4 naponta digitális képeket készítettünk, amiket a PlantSize programmal értékeltünk ki. A program akkori verziója 3264×2448 pixel felbontású RGB képek alapján a rozetták méretéről adott információt a kijelölt területek pixelszáma alapján, ahol az egységes zöld színárnylattal rendelkező pixeleket ismerte fel.

Az üvegházi növények paraquat rezisztenciájának az ellenőrzése céljából 6 darab növényt csíráztattunk és neveltünk egy nevelőtálcán belül (2 – 2 db vad típusú Col-0, S10/32 és S10/36), amelyek 1:1 arányban tartalmaztak föld és homok keveréket (Terracult International GmbH., Siegburg, Németország). A 3 hetes növényeket 12 napon keresztül minden 4. nap lepermeteztük 20 μ M paraquat koncentrációjú oldattal, amihez 0,01% Silwet L-77 detergenst adtunk hozzá, ezáltal biztosítva a szer jobb megtapadását és felszívódását a növényekbe. A permetezés után 24 órával a kontroll és kezelt nevelőtálcákat 1 g/L Voldünger Linz komplex műtrágyát (Kwizda, Kwizda Agro Hungary Kft.) tartalmazó csapvízzel öntöztük meg. A sötétadaptált (20 perc) növények PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfokát ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) 24 órával a kezelést követően Imaging PAM M-Series, Maxi version (Heinz Walz GmbH., Effeltrich, Németország) használatával mértük meg, az alkalmazott szaturációs pulzus intenzitása 3000 μ E volt. Kísérletet több alkalommal is megismételtük és minden esetben minimum 16 növényi egyed vizsgáltunk vonalanként és minden növényen 2 mérési pontot határoztunk meg az egyforma korú leveleken.

4.2.3 Plazmid konstrukciók és transzformálás

A molekuláris biológiai technikák, plazmid DNS izolálás, DNS minták gélelektroforézissel történő méret szerinti elválasztása során Sambrook és munkatársai (1989) útmutatásait követtük. A plazmid DNS-ek módosításakor (restrikciós endonukleáz emésztése, ligálása, klonáz enzimek reakciók) minden esetben a gyártó előírásai szerint jártunk el.

4.2.3.1 Plazmid konstrukciók

A teljes hosszúságú *AT3G52105 (AtSPQ)* gén kódoló szakaszát 5' és 3' UTR régióival együtt specifikus restrikciós hasítóhelyeket tartalmazó primerek (Függelék, 1. táblázat) segítségével szaporítottuk fel Phusion Taq polimeráz felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Az így kapott DNS fragmentet pBSK(+) vektorba klónoztuk, ahol a nyitott leolvasási keret (ORF) pontosságát szekvenálást követően ellenőriztük. Majd a következő lépésben ligáz enzimek reakció által pENTR-2B (Gateway) EcoRV és SalI hasító helyeire építettük be. Végezetül pedig egy LR klónáz II (Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Lithuania) reakciót végrehajtva pTCO27235S bináris vektorba (Rigó és mtsai., 2016) transzformáltuk (Függelék, 2. ábra).

GFP fúziós konstrukciók előállítására a *Lepidium SPQ* (*LcSPQ*) és *Arabidopsis SPQ* (*AtSPQ*) gének kódoló szakaszát helyspecifikus rekombinációt elősegítő *attB* (*attachment site*) szekvenciákat tartalmazó primerekkel felszaporítva (Függelék, 1. táblázat), módosítottuk a stop kodonokat (a nagy betűs rész: *LcSPQ* 3' vége, **módosított stop kodon**, CTCTTCACGTCCTCTCGCTT**ca**gctttctgtacaaagtgg, amit kis betűs *attB* régió követ. *AtSPQ* 3' primer szekvencia: TCACGTCCTCTCTTCTT**ca**gctttctgtacaaagtgg). Az *AtSPQ*/pBSK(+) és PI372PQ01/pDONR (Rigó és mtsai., 2016) templátokból felamplifikált *SPQ* szekvencia régiókat BP klónáz II enzim (Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Lithuania) segítségével pENTR207 Gateway vektorba klónoztuk. Következő lépésben az LR Clonase™ II (Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Lithuania) enzimreakciókkal az *SPQ*-pENTR207 klónok és a pGWB5 desztinációs vektor (Nakagawa és mtsai., 2007) között szekvencia átrendeződést hajtottunk végre (Függelék 3-4. ábra).

4.2.3.2 Növényi és sejtkultúra transzformáció

A vad típusú Col-0 növényeken *Agrobacterium*-közvetített transzformáció végrehajtása előtt az összes konstrukció pontosságát szekvencia szinten ellenőriztük. Az *Arabidopsis* növények infiltrálását Clough és Bent (1998) leírása alapján végeztük el az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 törzssel. Az *AtSPQ* gént pTCO27235S bináris vektorba klónoztuk (35S::*AtSPQ*), ami tartalmaz egy BASTA rezisztencia marker gént is. Ezért a növényi transzformáció sikerességét, a transzgenikus vonalak szelektálását a BASTA herbiciddel végeztük el (BAYER AG, Leverkusen, Germany), ami 300 mg/L glufozinát-ammóniumot tartalmaz. Az üvegházban csíráztatott növényeket 3 alkalommal lepermeteztük a herbiciddel és a túlélő egyedekkel dolgoztunk tovább.

A módosított stop kodonnal rendelkező *LcSPQ* és *AtSPQ* géneket pGWB5 bináris vektorba klónoztuk (35S::*LcSPQ*-GFP, 35S::*AtSPQ*-GFP), ami tartalmaz egy *hpt* (higromicin foszfortranszferáz) szelektációs marker gént is. Ezért a fúziós fehérjéket túltermelő transzgenikus növényeket ½MS táptalajon 20 mg/mL higromicin jelenlétében csíráztattuk ki. A túlélő növényekből felszaporított (T2) vonalak közül sztereo mikroszkóppal választottuk ki a további vizsgálatra alkalmas, erős GFP jelet mutató egyedeket.

A sejtszuspenziós kultúrák *Agrobacterium*-közvetített transzformációja során a Ferrando és munkatársai (2000) által leírt módon jártunk el.

4.2.4 RNS tisztítás és kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

Az RNS kivonást 2 hetes *in vitro* vagy 4-6 hetes üvegházi növényekből végeztük el TRI-reagenst használva (Chomczynski és Mackey, 1995). A szükséges cDNS templátok előállításához 5 µg RNS DNáz kezelést (TURBO DNA-free™ Kit, Thermo Fisher Scientific) követően 1 µg RNS-t használtunk kiindulásként, amelyet a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével írtunk át a gyártó ajánlása szerint. Kvantitatív valós idejű PCR-hoz a SYBR® Green qPCR (Thermo Scientific) reakcióelegyet használtunk a gyártó ajánlása szerint. A qRT-PCR méréseket az ABI 7900 Fast Real Time System (Applied Biosystems) készüléken végeztük az alábbi programot használva: denaturáció 95 °C 10 perc, 40 ciklus: 95 °C 15 másodperc 60 °C 60 másodperc. A kapott adatokat az ABI 7900HT SDS 2.3 szoftverével értékeltük ki. A reakciók során felhasznált primerek listáját a Függelék, 1. táblázata tartalmazza.

4.2.5 Sejtorganelumok frakcionálása és Western immunoblot analízis

A különböző sejtorganelumok differenciál centrifugálással történő elválasztását az LcSPQ-GFP-t és AtSPQ-GFP-t túltermelő *Arabidopsis* sejtszuspenziós kultúrákat, illetve növényi vonalakat felhasználva végeztük el Baba és munkatársai (2018) által leírt módon. A kivonatok fehérjetartalmát Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) reagens segítségével határoztuk meg (Bradford, 1976). Egységesen minden mintából 25 µg-nyi fehérjét 10 % SDS-PAGE gélen méret szerint elválasztottunk (Laemmli, 1970), majd elektroblotolással Immobilon PVDF (Millipore) membránra vittük át. A membránt 1 órán keresztül 1 x TBST telítő oldatban (50 mM Tris-HCl [pH:8.0], 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5% sovány tejpor) inkubáltuk, majd anti-GFP ellenanyaggal (Roche, 1:2000) kezeltük 1,5 órán át. Miután 3 alkalommal 1 x TBST oldattal 10 percig mostuk a membránokat, anti-egér másodlagos ellenanyaggal kiegészített (Pierce, 1:5000) telítő oldatban tartottuk 1 órát. A reakciót követően a membránt ismét 3 x 10 percig 1 x TBST oldattal mostuk majd a gyártó útmutatásait követve Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) reagenst használtunk az ellenanyaggal reagáló 35S::LcSPQ-GFP és 35S::AtSPQ-GFP fúziós fehérjék detektálására.

4.2.6 Növekedési és csírázási vizsgálatok

A rozetta levelek növekedésének megfigyelésére 5-7 napos csíranövényeket helyeztünk át 0,1 μM és 0,3 μM paraquattal, illetve 1 μM ; 2,5 μM , 5 μM , 10 μM és 20 μM ABS-sel kiegészített $\frac{1}{2}$ MS táptalajokra. 3 naponta digitális fényképeket készítettünk a növényekről, a képek elemzését a PlantSize-al végeztük el.

Gyökérnövekedés megfigyelésére 5-7 napos növényeket helyeztünk át a később vertikálisan elhelyezett Petri-csészékre, és ebben az esetben a következő kezeléseket alkalmaztuk: 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,3 μM paraquat. A növényekről 3 naponta digitális fotót készítettünk, amiket a FIJI program segítségével dolgoztunk fel (<https://imagej.net/Fiji>).

Hipokotil megnyúlás vizsgálatára a magokat 0,1 μM és 0,2 μM paraquat tartalmú táptalajon csíráztattuk sötétben 6 napig. A kísérlet végén készített fényképeket a FIJI képfeldolgozó program segítségével elemeztük ki.

Csírázási tesztekhez a magokat a 4.1.1 pontban leírtak szerint sterilizáltuk, majd 2 napig 4 °C-on tároltuk, ezután azokat egyesével különböző koncentrációjú ABS táptalajokon (0 μM ; 0,3 μM ; 1 μM ; 3 μM) helyeztük el. A kísérlet során kicsírázottak a sziklevelek teljesen nyitott állapotát tekintettük.

4.2.7 Sztómazáródási vizsgálat

A gázcsere nyílások vizsgálatát 4 - 6 hetes, előzőleg 3 órán keresztül sötétben tartott növényekről gyűjtött leveleken végeztük el (Leymarie és mtsai., 1998). A levelekről epidermisz nyúzatokat készítettünk és 25 mM KCl, 10 mM MES-Tris [pH 6.15] oldatba helyeztük és megvilágítás mellett 1 órát áztattuk. Ezután az oldatot 1 μM , 10 μM , 50 μM ABS-sel egészítettük ki és további 3 órát inkubáltuk. A nyúzatok kipreparálása után Nikon ECLIPSE TE300 mikroszkóphoz kötött SPOT-RT II. kamerával felvételeket készítettünk. Az elkészült képeket FIJI program segítségével elemeztük ki.

4.2.8 Szárazságstressz kivitelezése

Az LcSPQ (S10, S14) és AtSPQ (AT1, AT3) túltermelő vonalak szárazságtoleranciáját vizsgáló kísérletek során 2 hetes, szaporítótálcában nevelt növényeket ültettünk át 110 g szárazsúlyú 6 vagy 12 lyukú nevelőtálcákba. A 3-4 hetes növények locsolását 11 - 12 (növénynevelő kamra) és 14 - 16 (üvegház) napon keresztül felfüggesztettük és a növények dehidrációja során többféle vizsgálatot is végrehajtottunk. A vízvesztés mértékét a cserepek relatív tömegének és a növények relatív víztartalmának (RWC) a méréseivel jellemeztük 5 alkalommal egy kísérlet során (Barr, 1962). A növények visszalocsolása után 4-6 nappal az életképességük kiértékelése a vonalak túlélési aránya alapján történt. A kísérletet ötször ismételtük meg, minden alkalommal genotípusonként és kezelésként 50-120 darab növényt vizsgáltunk meg.

Az ellenőrzött körülmények között végzett kísérletek során a modulált fluoreszcencia kioltásának az analízise céljából 10 nap vízmegvonás után impulzus amplitúdó moduláció elvén működő (Imaging-PAM, M-Series, Maxi version, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) fluorométer készülékkel megmértük a szárított és jól öntözött transzgenikus és a vad típusú Col-0 növények PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebességét (ETR). A 20 perc sötét adaptációt követő fényválasz görbék mérése során a leveleket egyre magasabb foton flux denzitású (PPFD) fényel világítottuk meg (0, 56, 111, 186, 281, 336 és 396 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás). Az eredmények kiértékelése során genotípusonként 20 darab növény mért értékeit dolgoztuk fel, ahol növényenként 2 azonos méretű és korú levélen 1-1 mérési pontot jelöltünk ki. A kísérletet 4 alkalommal ismételtük meg.

4.2.9 Lipid-peroxidáció mérése

A lipid-peroxidációs méréseket 14 napos *in vitro* növényeken végzett 7 μM paraquat kezelést követően 24 és 48 óra elteltével, illetve a szárazságtolerancia megfigyelése során 10 nap dehidráció után végeztük el. A lipid-peroxidáció mértékének a megállapítására a folyamat végtermékeként keletkező malondialdehid tartalom meghatározásán alapuló Heath és Parker (1968) féle módszert alkalmaztuk. 100 mg növényt 1 mL (1 mL/100 mg) 0,1 %-os triklórecetsavban és 0,4 %-os butilált-hidroxitoluolban homogenizáltuk, majd centrifugálás után (20 perc, maximum fordulat) 250 μL felülúszót 1 mL 20 %-os TCA-ban oldott 0.5% tiobarbitursav oldattal elegyítettük, és 30 percig 95°C-os vízfürdőben inkubáltuk.

Az abszorbanciát 532 nm és 600 nm-en Multiskan GO microplate reader (Thermo Scientific) spektrofotométerrel mértük meg, az így kapott értékeket a Lambert-Beer segítségével számoltuk ki, az MDA (malondialdehid) extrinkciós koeficiense $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A végeredményt MDA (μmol)/g FW ábráztuk.

4.2.10 Klorofill és antocián tartalom mérése

Az *in vitro* csíranövények pigment tartalmának a meghatározására a PlantSize fenotipizáló programot használtuk.

4.2.11 Mikroszkópos módszerek

A GFP-vel jelölt LcSPQ és AtSPQ fehérjék lokalizációjának a vizsgálatához függőleges Petri-csészéken csíráztatott 6-9 napos 35S::LcSPQ-GFP és 35S::AtSPQ-GFP fehérjekonstrukciókat kifejező növényvonalakat használtunk fel. A kísérletek során Visitron spinning disk konfokális mikroszkóp Yokogawa CSU-W1 spinning disk egységét (átmérő 50 μm), Andor Zyla 4.2 Plus kamerát és az Olympus IX83 mikroszkópot (Visitron systems GmbH, Germany) használtuk. A gerjesztési hullámhossz 488 nm volt, és a GFP fluoreszcenciáját 500-550 között észleltük, 100x (oil, N.A. 1.3) objektívet alkalmazva. A mikroszkópos képfeldolgozást az Adobe Photoshop és Corel Draw X7 programokkal végeztük el.

4.2.12 Bioinformatikai analízisek

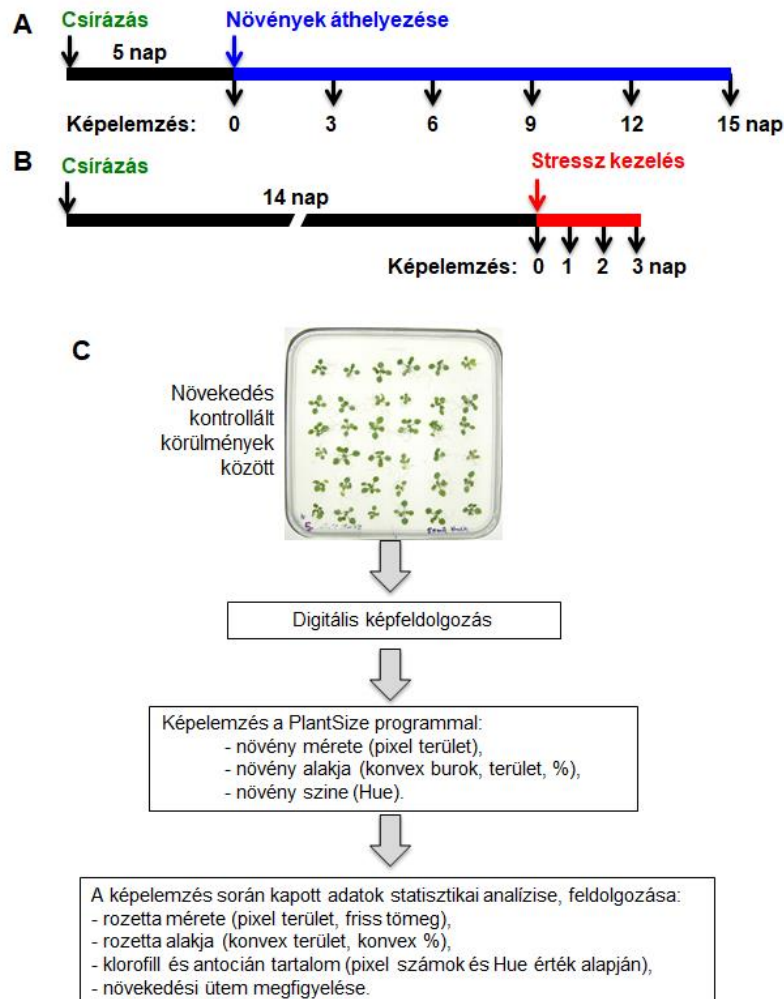
A felhasznált *Arabidopsis thaliana* szekvenciák a Phytozome adatbázisból származnak (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). A szekvenciák többszörös illesztését a Clustal Omega internetes applikáció segítségével végeztük el (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), amely a Gonnet féle PAM 250 (Point accepted mutation, szelekció által jóváhagyott mutáció) pontozási mátrixot alkalmazza (Sievers és mtsai., 2011). Ezáltal az aminosavszekvenciák közötti azonosság azok evolúciós mutációs gyakorisága alapján értékelhető, ahol a kezdetben két azonos szekvencia között 1 PAM idő alatt 1% eltérést okozó pontmutáció történik. A PAM 250 evolúciós távolság mértékegysége tehát a 250-szer annyi idő alatt kb. 80%-nyi eltérést okozó pontmutációt jelenti (Schwartz és Dayhoff, 1978). Ezt a pontozási rendszert Gonnet (1992) úgy módosította, hogy a távoli rokon fajok szekvencia összerendezésére is alkalmas legyen. A fehérjék közötti szekvencia homológiák vizsgálatához az NCBI BLAST szolgálatát (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) használtuk.

A transzmembránba épülő α -hélix szerkezet jellemzésére és az intracelluláris lokalizáció meghatározására az Aramennont alkalmaztuk (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>). Génexpressziós adatokat a GeneVestigator adatbázisból nyertük ki (<https://genevestigator.com/gv/>). T-DNS inszerciós mutáns allélokot a <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> oldalon kerestük meg, majd a genotipizáláshoz a primereket az iSect tool-al (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) terveztük. A DNS szerkesztéséhez, plazmid konstrukciók és PCR primerek tervezéséhez a CLC Main Genomics Workbench (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/>) programcsomagot és a Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) weboldalt használtuk.

5. EREDMÉNYEK

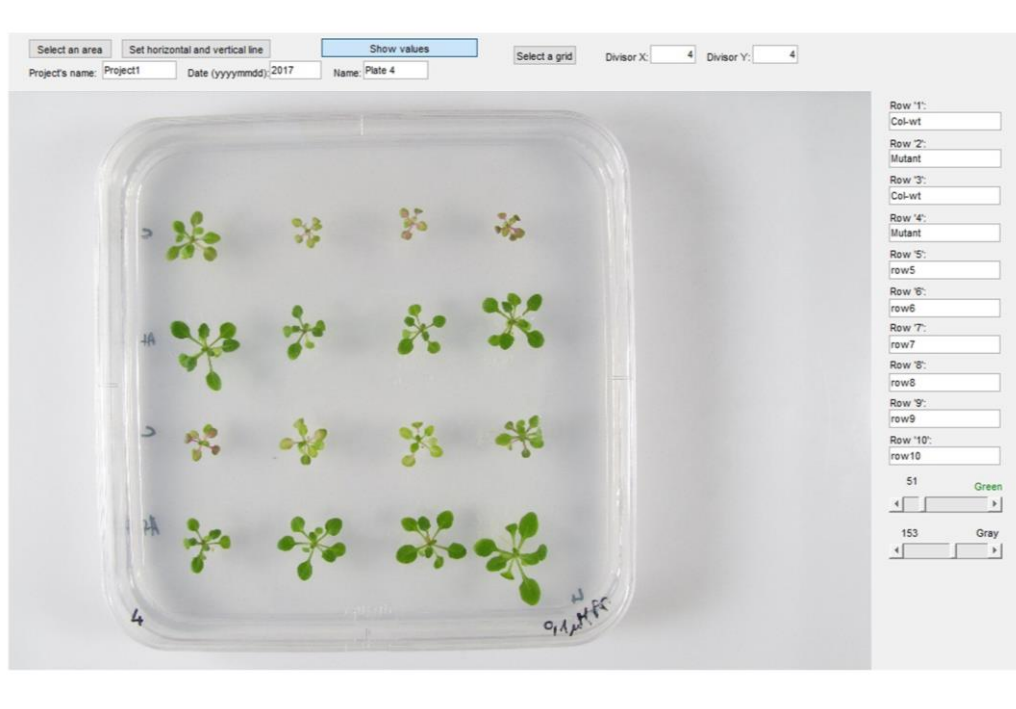
5.1 Matlab alapú fenotipizáló program fejlesztése

A munkánk során az *Arabidopsis* növények növekedésének a gyors és hatékony kiértékelése kulcsfontosságú szempont volt, ezért munkatársaimmal kidolgoztunk egy Matlab alapú képelemző szoftvert (PlantSize) és az alkalmazáson alapuló fenotipizáló módszert. A rozetta méretének, alakjának és a színének a valós idejű megfigyelésével lehetőségünk nyílt a növekedési ütemük számszerű kiértékelésére, a konvex területükkel és százaléktérükkel a morfológiai különbségek feltárására, klorofill és antocián tartalmukkal a fiziológiai állapotról nyerhettünk információt. A különböző stresszkezelések hatására bekövetkező változások megfigyelésére kétféle kísérleti rendszert alkalmaztunk (6. ábra).



6. ábra: A növények nem destruktív megfigyelése, növekedési és fiziológiai tulajdonságainak a jellemzése a PlantSize képelemző programmal. A-B) A kétféle kísérleti beállítás időbeli sémája. C) A képelemzés folyamatábrája.

A képelemzés során a négyszögletes Petri-csészékbe az analízis céljától függően 16-36 darab 5 vagy 14 napos növényt helyeztünk el, és hosszabb (15 nap) vagy rövidebb (3 nap) ideig kezeltük a növényeket, ezalatt meghatározott időközönként digitális fényképeket készítettünk a Petri-csészékről. A PlantSize-al végzett képelemzés végeredményeként számszerű adatokat kaptunk a növények méretéről, alakjáról és színéről (7. ábra). Egy tipikus kísérlet 4 féle kezelésből, 6 ismétlésből állt, a 24 Petri-csészét 5 időpontban fotóztuk le. A 120 fénykép képelemzése során összesen 4320 darab növény morfológiai és fiziológiai jellemzőiről kaptunk tájékoztatást.

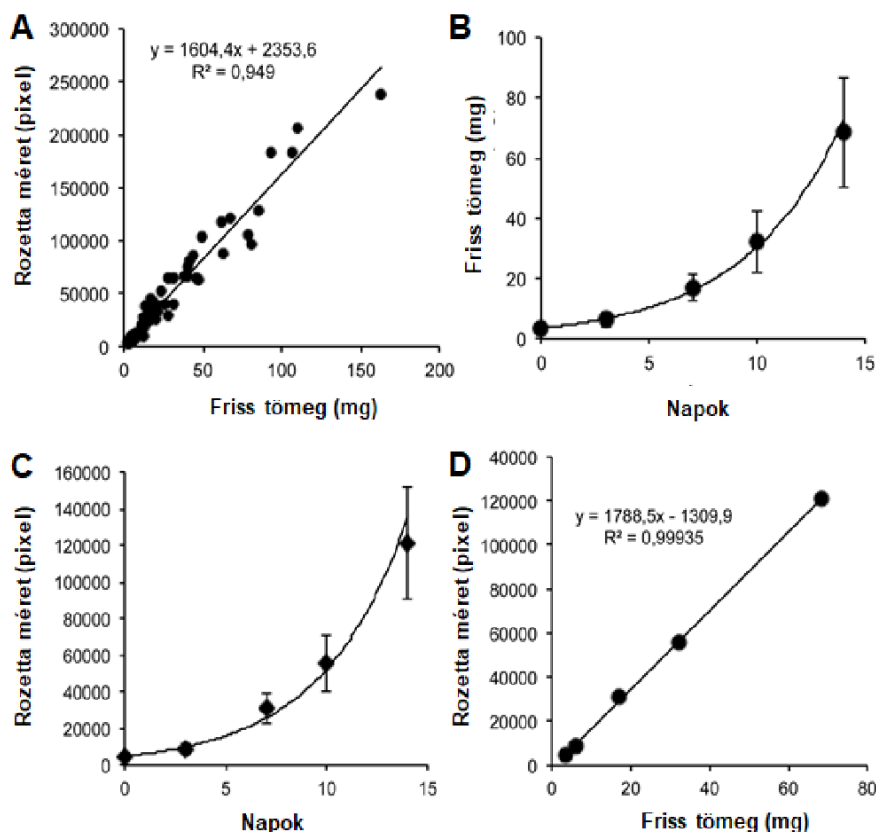


7. ábra: A PlantSize használata *Arabidopsis* növények elemzésére. A kezelői felületen vad típusú (Col-0) és transzgenikus növények láthatók több napos paraquat kezelést követően.

5.1.1 A rozetta méret kalibrációja

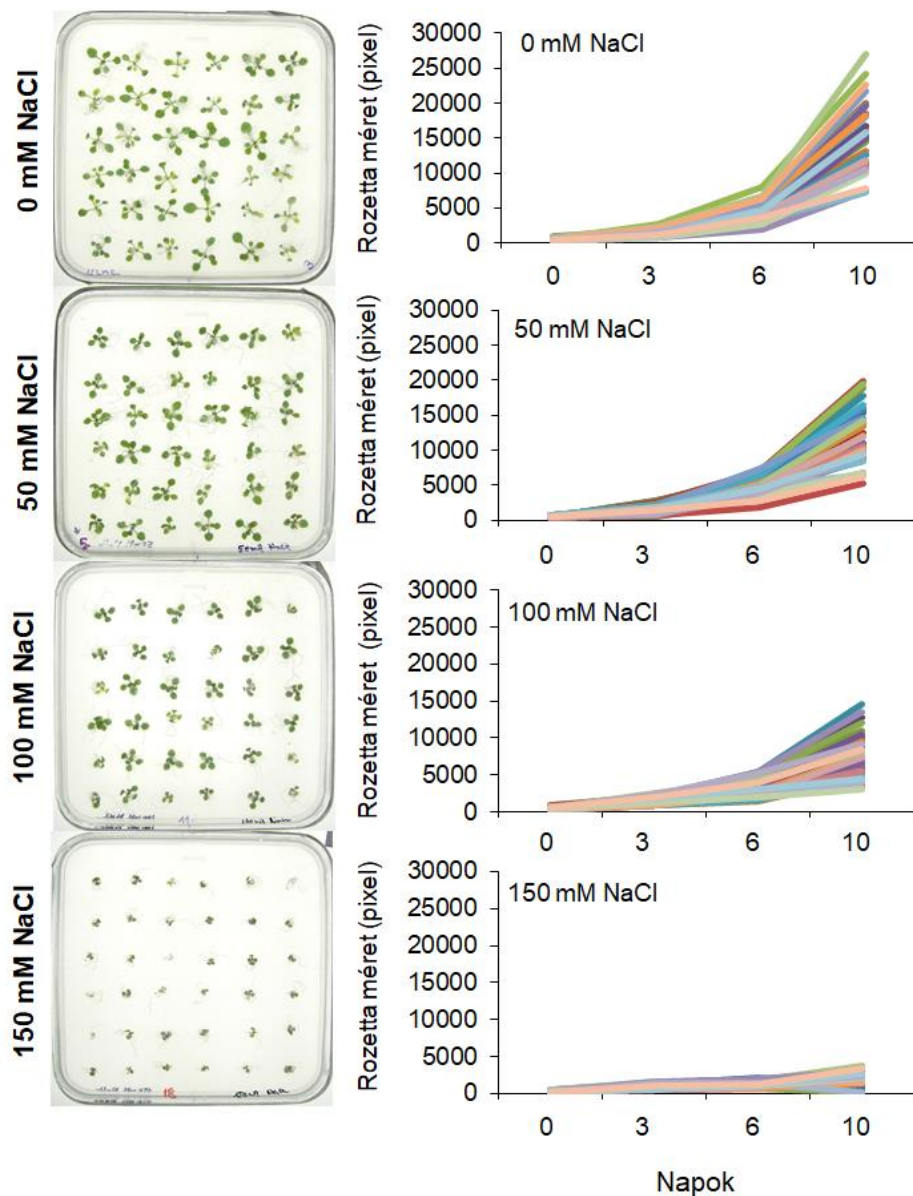
A képelemzés során lehetőségünk van a növények méretének és növekedési ütemének a megállapítására. Ahhoz, hogy megbízható adatokhoz jussunk elengedhetetlen volt a rendszer kalibrálása. Az *Arabidopsis* rozetta méretének a meghatározására, a hitelesítési mérésekhez kontroll ($\frac{1}{2}$ MS) táptalajon vad típusú (Col-0) növényeket neveltünk és a fejlődésük eltérő fázisaiban megmértük az egyedi növények friss tömegét (FW), amiket a PlantSize által pixelben mért rozetta területükhöz hasonlítottunk.

A rozetta friss tömeg és a pixelben kapott méret között lineáris összefüggést tudtunk megállapítani ($R^2 = 0,949$, 8. ábra, A). A növények növekedése során a friss tömeg és a rozetta méret átlaga időben hasonló tendenciával rendelkezett (8. ábra, B-C). Az átlagok változása lineáris összefüggést mutatott ($R^2 = 0,99$, 8. ábra, D).



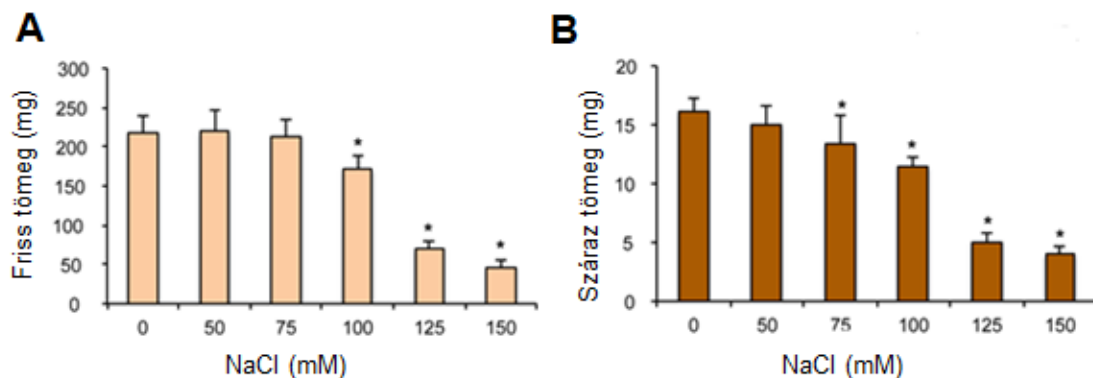
8. ábra: **A rozetta méretének a kalibrációja.** A) A kontroll táptalajon nevelt vad típusú növények rozettájának friss tömege és mérete közötti lineáris korreláció ($R^2 = 0,949$). Az ábrázolt adatok egy növényhez tartozó értéket mutatják. B) A növények átlagos friss tömegének és C) átlagos rozetta méretének a változása 14 napon keresztül nyomon követve. D) A PlantSize-al mért átlagolt értékek (B, C) közötti lineáris korreláció ($R^2 = 0,99935$).

A fenotipizálások során a növények méretbeli változásait sokszor különböző környezeti tényezők befolyásoló hatása alatt vizsgálják. Ezért a PlantSize segítségével meghatároztuk a só kezelésnek kitett *Arabidopsis* (Col-0) növények rozettájának a növekedését. A kísérlet során 5 napos csíranövényeket helyeztünk át 0-150 mM NaCl-t tartalmazó $\frac{1}{2}$ MS táptalajokra, majd 10 napon keresztül meghatározott időközönként digitális fényképet készítettünk és azok alapján számszerűsítettük a rozetták méretét és a növények növekedési ütemét. A kísérlet végén megmértük a növények friss és száraz tömegét. A méréseket összevetve meghatároztuk a só kezelések növekedés gátló hatását. (9. ábra). A rendszer segítségével nem invazív módszerrel regisztráltuk az egyes növények növekedését, fejlődését, ami biztosítja az időbeli változások pontos, kvantitatív jellemzését.



9. ábra: Az *in vitro* *Arabidopsis* csíranövények növekedési üteme növekvő só koncentrációk hatása alatt. A vizsgálatokhoz 5 napos *Arabidopsis* (Col-0) csíranövényeket helyeztünk át különböző só koncentrációjú (0 mM, 50 mM, 100 mM és 150 mM NaCl) táptalajokra ($\frac{1}{2}$ MS) és 10 napon keresztül 4 időpontban a PlantSize alkalmazásával meghatároztuk a rozetták méretét (pixel). Az ábrán a képelemzéshez felhasznált fényképek és a hozzájuk tartozó növekedési görbék láthatók.

Amíg a PlantSize-al kiértékelt növények növekedési rátája már közepes só stressz hatása alatt szignifikáns csökkenést mutatott addig a friss és száraz tömeg értékeinél ez a tendencia csak 100 mM NaCl vagy annál nagyobb koncentráció esetén volt megfigyelhető (10. ábra).

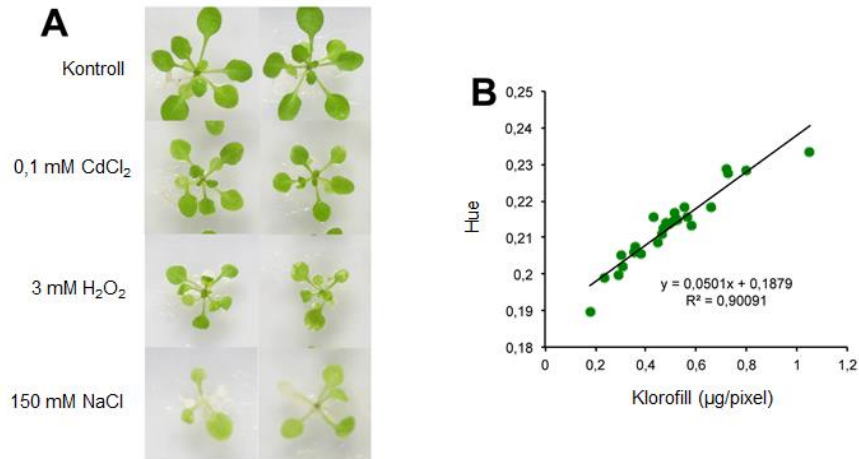


10. ábra: **A rosetták tömegének csökkenése eltérő só koncentrációjú kezelések függvényében.** Az *Arabidopsis* (Col-0) rosettájának átlagos A) friss és B) száraz tömege 0-150 mM NaCl kezelések következtében. Sd. * $p < 0,05$ egyszempontos ANOVA elemzés (Tukey-teszt), $n = 250$.

Az *Arabidopsis* növények só stresszre érzékeny paramétereinek (rosetta méret, növekedési ütem, tömeg) az összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a levelek tulajdonságainak a jellemzésére a PlantSize nem destruktív módszere pontosabb és megbízhatóbb értékeket eredményezett, mint amit a friss és száraz tömeg egy időpontban végzett mérései biztosítottak.

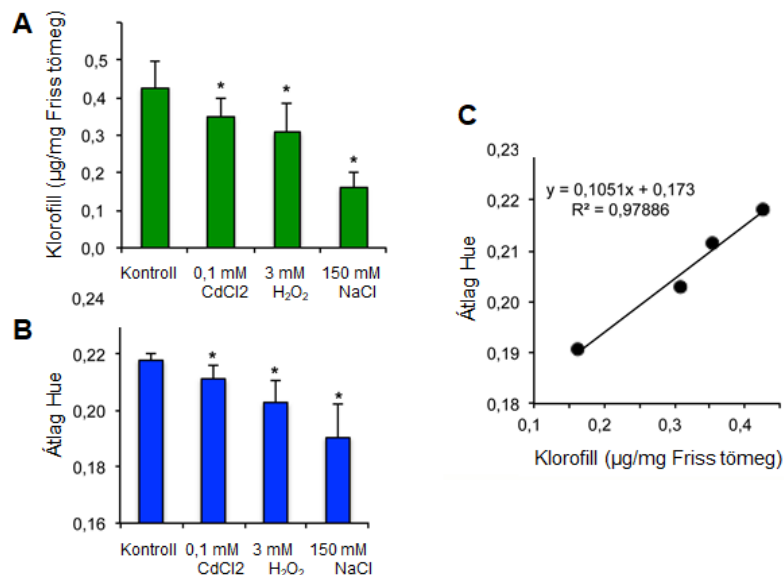
5.1.2 Klorofill tartalom meghatározása

A színes digitális képek elemzésével meghatározható a színtartományok komponenseinek a telítettsége és intenzitása, ami alapján a növények pigmenttartalma is megbecsülhető. A klorofill és antocián tartalom megbecsüléséhez az *Arabidopsis* növényeket olyan kezeléseknél tettük ki, amelyekről tudtuk, hogy a klorofill pigmentek degradációjával járnak (CdCl_2 , H_2O_2 , NaCl). Sass és munkatársai (2012) a színes fényképek színárnyalatának (Hue) értékei alapján határozták meg a növények klorofill tartalmát, mivel a zöld szín különböző árnyalatai megegyeztek a 0,15 – 0,25 közötti tartományban lévő értékekkel. Ezért a stressz kezeléseket követően az egyedi növények klorofill tartalmát összevetettük azok Hue értékeivel. A növények klorofill tartalmának a pixel alapú értékei 0,2 – 1 $\mu\text{gChl}/\text{pixel}$ koncentráció tartományában lineáris korrelációt mutattak a hozzájuk tartozó Hue értékekkel (11. ábra). A magasabb klorofill koncentráció arányosan magasabb pixelre vonatkoztatott Hue értékkel párosult.



11. ábra: **A klorofill tartalom és a Hue értékek közötti viszony.** A 14 napos vad típusú (Col-0) növények 3 napig tartó 0,1 mM CdCl₂, 3 mM H₂O₂, 150 mM NaCl kezeléseit követően megmértük a klorofill tartalmukat. A növényi színárnyalatok (Hue) értékeinek a megállapítására a PlantSize programot használtuk. A) Az *Arabidopsis* növények rozettái. B) Az egyedi növények Hue értéke és klorofill tartalma közötti lineáris korreláció ($R^2 = 0,90091$) a pixel számok alapján.

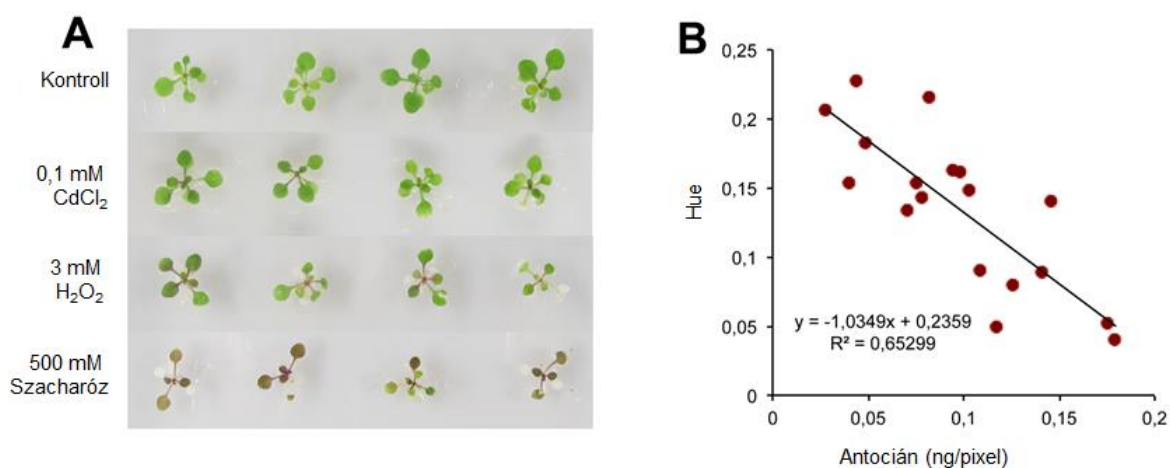
A nehézfém, hidrogén-peroxid és só kezelések mind csökkentették a levelek Hue értékeit (4.1.7-es fejezet, 4. ábra). Amikor 20 növény átlag értékeit hasonlítottuk össze, a kezelések eredményeként kapott alacsonyabb klorofill tartalom alacsony Hue értékekkel járt együtt (12. ábra). Adataink alapján elmondható, hogy a PlantSize segítségével stabilan megbecsülhető az *Arabidopsis* növények klorofill tartalma.



12. ábra: **A nehézfém, hidrogén-peroxid és só kezelések hatására csökkenő klorofill tartalom és Hue értékek.** A) A növények átlag klorofill tartalma és B) Hue értékei. C) Az átlag Hue és klorofill tartalom közötti pozitív korreláció ($R^2 = 0,97886$). Sd. * $p < 0,05$ egyszempontos ANOVA elemzés (Tukey-teszt), $n = 300$.

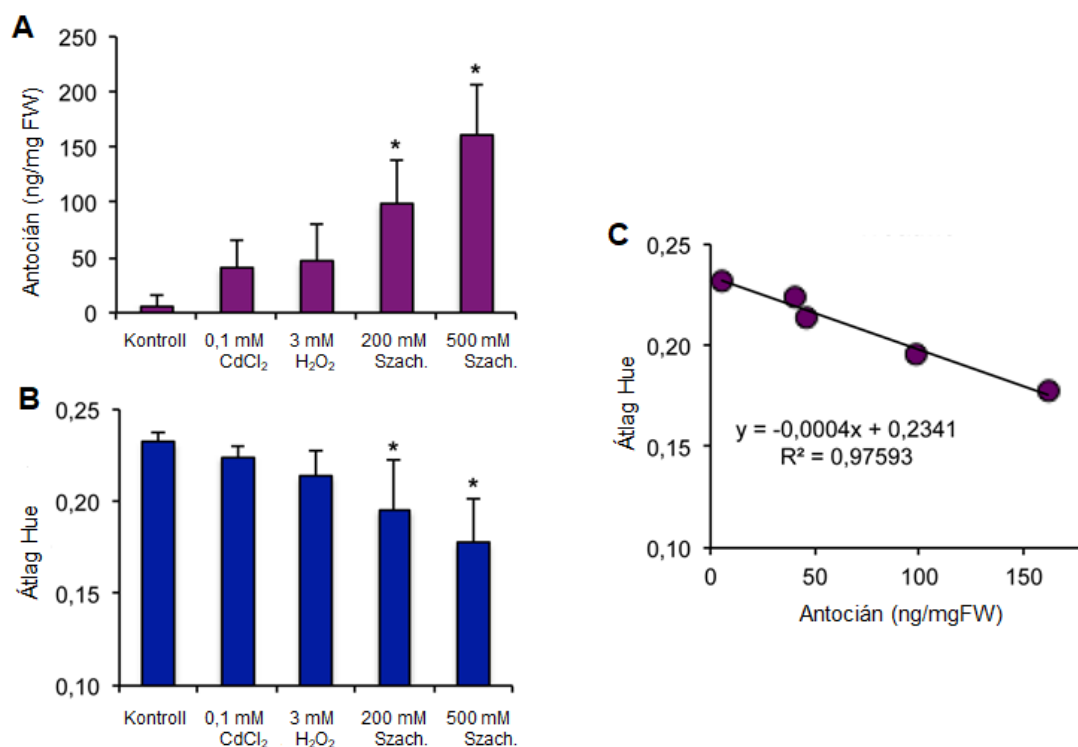
5.1.3 Antocián tartalom meghatározása

A növényekben az antociánok felhalmozódása az extrém környezeti hatásokra adott válaszreakciónak tekinthető (Tanaka és mtsai., 2008). A stresszhatások következményeinek tesztelése során fontos lehet az antocián tartalom nem invazív módon történő meghatározása. A magasabb antocián tartalom vöröses-lilás elszíneződéssel jár, ami a digitális fotókon a színárnyalat (Hue) vörös felé történő elmozdulását eredményezi. Annak érdekében, hogy a PlantSize alkalmas legyen a növények antocián tartalmának a becslésére, kalibrációs méréseket hajtottunk végre. Ehhez 2 hetes növényeket olyan kezeléseknek (nehézfém, oxidatív stressz, magas cukor stb.) tettük ki, amelyekről tudtuk, hogy az antocián akkumulációjához vezetnek. A növények pigment tartalmának meghatározása után a kapott koncentrációkat összehasonlítottuk a program által detektált színárnyalatok értékeivel (Hue). A kalibráció során az értékek között fordított lineáris összefüggést fedeztünk fel, habár a korreláció nem volt olyan mértékű, mint a klorofill meghatározás esetében (13. ábra).



13. ábra: **Az antocián felhalmozódás mértékének a becslése.** A 14 napos vad típusú (Col-0) *Arabidopsis* növényeken az antocián akkumulációját kiváltó kezeléseket (0,1 mM CdCl₂, 3 mM H₂O₂, 200 mM és 500 mM szacharóz) hajtottuk végre, majd a manuálisan mért pigment tartalmukat összehasonlítottuk a PlantSize-al mért Hue értékekkel. A) Az *Arabidopsis* növények rozettái. B) Az egyedi növények Hue értékei és antocián tartalma közötti fordított korreláció ($R^2 = 0,65299$) a pixel számok alapján.

Amíg a különböző stresszkezelések hatására a növények megnövekedett antocián tartalommal rendelkeztek, addig a Hue értékük csökkendő tendenciát mutatott. A növények átlag antocián tartalma és átlag Hue értéke között fordított lineáris korreláció volt megfigyelhető (14. ábra).

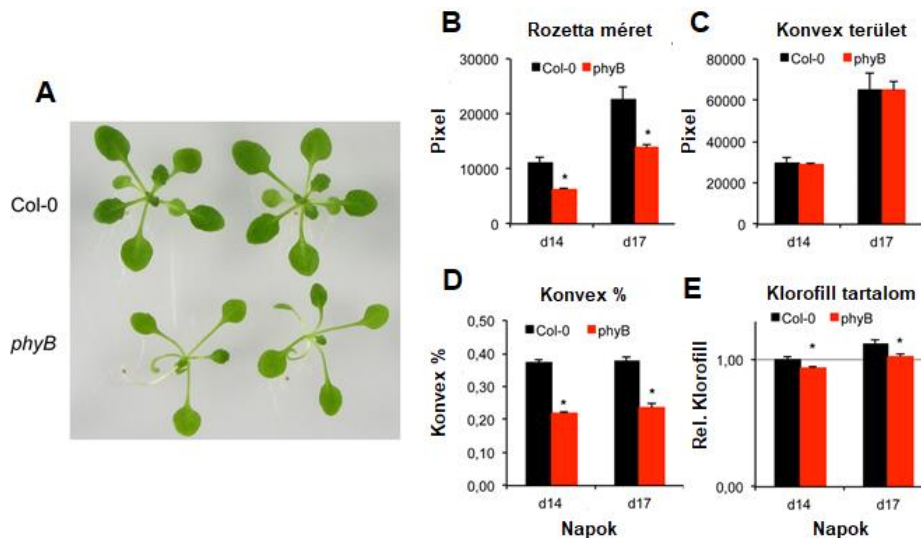


14. ábra: **A nehézfém, hidrogén-peroxid és szacharóz hatására növekvő antocián tartalom és Hue értékek összehasonlítása.** A) A növények átlag antocián tartalma és B) Hue értékei. C) Az átlag Hue és klorofill tartalom közötti fordított korreláció ($R^2 = 0,97593$). Sd. * $p < 0,05$ egyszempontos ANOVA elemzés (Tukey-teszt), $n = 300$.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az *Arabidopsis* növények antocián tartalma a rozetták színárnyalata a módosított szintér alapján elég pontosan megbecsülhető. A levelek Hue értékeinek az eltolódása megbízható információt tud adni a klorofill tartalom (Hue ~0,15 – 0,25) és antocián koncentráció (Hue -0,02 – 0,24) változásairól.

5.1.4 A PlantSize alkalmazása a morfológiai változások jellemzésére

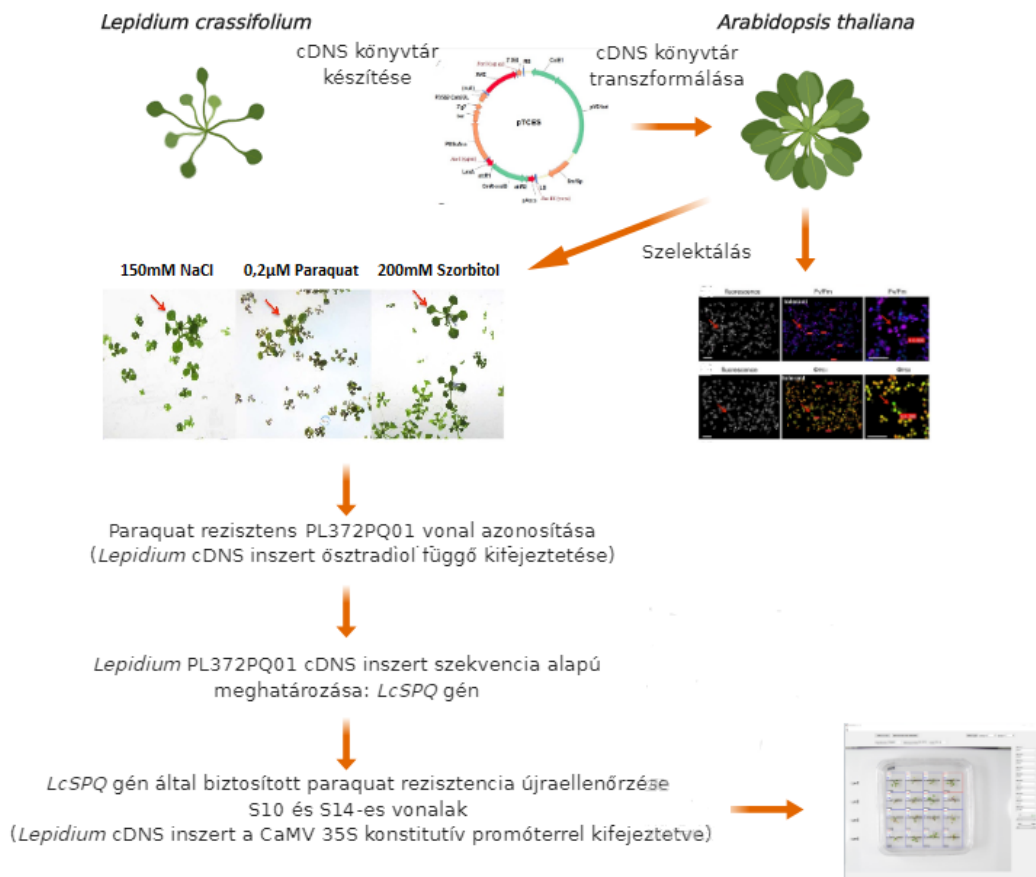
A PlantSize alapú kép analízis lehetőséget nyújt bizonyos morfológiai változások tesztelésére is. A *phyB-9* mutáns jellegzetes, a fotomorfogenezis szabályozásához köthető fenotípust mutat, mint például a meghosszabbodott hipokotil és levélnyel, enyhén csökkent klorofill tartalom és korai virágzás (Reed és mtsai., 1993; Reed és mtsai., 2000). Ezért a program érzékenységének a tesztelésére és validálására a funkcióvesztéses *phyB-9* mutánst választottuk ki. A standard körülmények (½ MS) között nevelt *phyB-9* mutánsok rozetta mérete, hosszabb levélnyele és keskenyebb levele miatt, 40%-al kisebb volt a vad típusú növényekhez képest (15. ábra, A-B). A vad típusú és mutáns növények konvex területe megegyezett, viszont a mutáns növények konvex %-a 40 %-kal kisebb volt, ami a *phyB-9* mutáns és vad típusú (Col-0) növények alakja közti különbséget jelzi (15. ábra, C-D). A képelemző program a *phyB-9* mutánsban 10-15 %-kal alacsonyabb klorofill tartalmat észlelt, mint a vad típusúban (15. ábra, E). Adatataink alapján elmondható, hogy a PlantSize fenotipizáló program alkalmas a növények fejlődése során a rozetták alakjának és színének a legapróbb változásainak különösebb beavatkozást mellőző, nem invazív a megfigyelésére.



15. ábra: A *phyB-9* mutáns és a vad típusú *Arabidopsis* növények fenotípusa. A vad típusú (Col-0) és *phyB-9* mutáns növényeket hagyományos ½ MS táptalajon csíráztattuk ki, majd a 14. és 17. napon fényképet készítettünk a Petri-csészékről. A) A 17 napos Col-0 és *phyB-9* növényekről készült digitális fénykép, a rozetták alakja és színe közötti különbség egyértelműen látszik. B – E) A PlantSize képelemzés által kinyert adatok. B) A rozetták mérete, C) konvex területe pixelben és D) konvex %-ban megadva. E) A Hue értékek alapján megállapított klorofill tartalom, melynek relatív értéke a 14 napos Col-0 növények klorofill tartalmával volt normalizálva. A kísérletet 3 alkalommal ismételtük meg, sd. * $p < 0,05$ egyszempontos ANOVA elemzés (Tukey-teszt), $n = 108$.

5.2 *Lepidium crassifolium* cDNS túltermelő vonalak jellemzése

A csoportunkban korábban kifejlesztett stressztolerancia alapú szűrési rendszer (Conditional cDNA Overexpression System, COS) segítségével több olyan *Lepidium crassifolium* gént sikerült korábban azonosítani, melyek megnövelték a transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növények stressz toleranciáját (só, ozmotikus, oxidatív) (16. ábra; Papdi és mtsai., 2008; Rigó és mtsai., 2012; Rigó és mtsai., 2016).



16. ábra: A *Lepidium crassifolium* (*LcSPQ*) gén azonosításának főbb lépései.

A Ph.D. programom feladata néhány, már korábban kiválasztott, előzetesen jellemzett vonal tesztelése, illetve *Lepidium* gén analízise volt (1. táblázat). A genetikai szűrés során azonosított „PL” sorozatú *Arabidopsis* vonalból izolált cDNS fragmenteket olyan expressziós vektorokba klónoztuk, amelyek konstitutív pCaMV 35S promóterrel („S” sorozat) vagy stressz indukált RD29A promóterrel („R” sorozat) rendelkeznek. A vektorokkal transzgenikus *Arabidopsis* vonalakat állítottunk elő, amelyekkel ellenőriztük az adott cDNS stressz toleranciát javító tulajdonságát (1. táblázat; Rigó és mtsai., 2016). A só, ozmotikus és oxidatív stressz tűrést *in vitro* rendszerben, a „PL” vonalokhoz hasonló körülmények között végeztük.

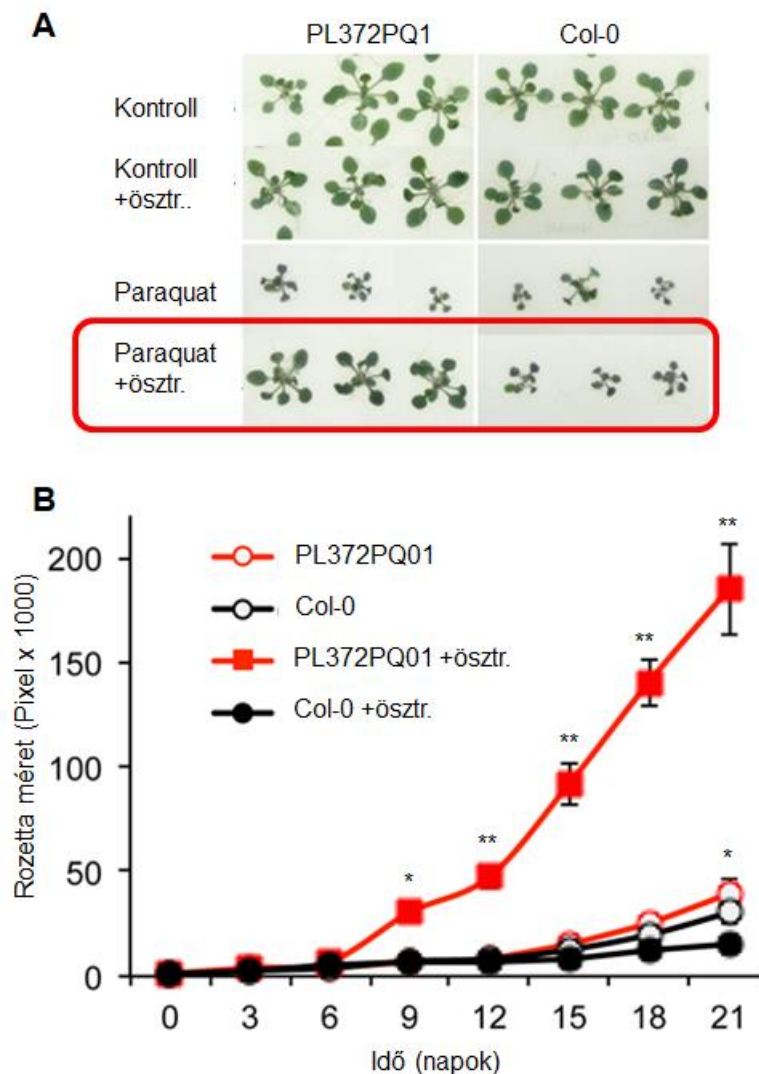
1. táblázat. A COS szűrési program során további jellemzésre kiválasztott vonalak.

Azonosított vonal	cDNS	Kódolt protein	<i>Arabidopsis</i> gén	Tolerancia	Ellenőrző vonalak
PL035P08	1,1kb	Homeodomain (MYB) protein	AT3G12730	ozmotikus (PAM)	S15, R15
PL127P04	0,76kb	acyl-CoA-binding protein 6	AT1G31812	ozmotikus (PAM)	S16, R16
PL151P06	1,1kb	translationally controlled tumor protein	AT3G16640	ozmotikus (PAM)	S19, R19
PL372PQ01	0,5kb	hypotetical protein	AT3G52105	paraquat	S10, R10
PL542Na01	1,6kb	GDSL-type Lipase/Acylhydrolase, ERMO3	AT1G54030	NaCl	S12, R12
PL1012PQ02	0,6kb	hypotetical protein	AT3G52105	paraquat	S14, R14

Az „S” és „R” sorozatú vonalak tesztelése során eltérő szintű stressz toleranciát találtunk. A tesztelt vonalak közül a S10 és S14 vonalak paraquat rezisztenciája volt a legkiemelkedőbb és legjobban reprodukálható. Ezért ezeket a vonalakat választottuk ki a részletes vizsgálatokra.

5.2.1 Paraquat rezisztencia a PL372PQ01 vonalban

A PL372PQ01 és vad típusú növények növekedési különbségeinek pontos meghatározása céljából a transzgenikus növényeket $\frac{1}{2}$ MS (kontroll), $\frac{1}{2}$ MS + 5 μ M ösztradiol, 0,2 μ M paraquat vagy 0,2 μ M paraquat és 5 μ M ösztradiol tartalmú táptalajon csíráztattuk és a rozetta méret változását a PlantSize szoftver (Faragó és mtsai., 2018) segítségével 21 napon keresztül analizáltuk. Az indukáló szerrel kiegészített kontroll táptalajon ($\frac{1}{2}$ MS + 5 μ M ösztradiol) növekedett növények rozetta mérete hasonló volt a kontroll ($\frac{1}{2}$ MS) körülmények között neveltekkel. Tehát az ösztradiol önmagában nem befolyásolta a növekedésüket. A paraquat az indukálószer hiányában a PL372PQ01 növények növekedését a Col-0 vad típusú növényekhez hasonló mértékben gátolta. Amikor a kezelést ösztradiollal kiegészítettük és ezáltal indukáltuk a *Lepidium* cDNS transzkripcióját, a transzgenikus növények növekedését a paraquat kezelés kevésbé gátolta, mint a vad típusúét (17. ábra).



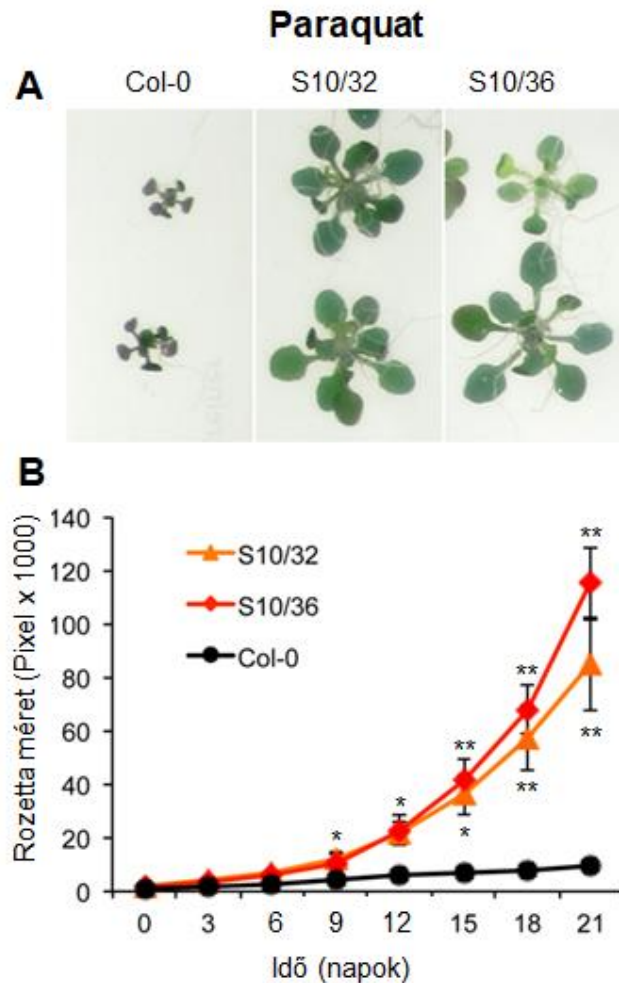
17. ábra: **A növekedési tesztek során azonosított PL372PQ01 vonal paraquat rezisztenciája.**

A) 21 napos PL372PQ01 és a vad típusú Col-0 növények kontroll ($\frac{1}{2}$ MS), kontroll + ösztradiol ($\frac{1}{2}$ MS + 5 μ M ösztradiol), paraquat (0,2 μ M) és paraquat + ösztradiol (0,2 μ M paraquat + 5 μ M ösztradiol) kezeléseik jelenlétében. B) PL372PQ01 és Col-0 vad típusú vonalak növekedésének az ábrázolása az idő függvényében. (sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba), n = 108).

5.2.2 A PL372PQ01 cDNS inszert azonosítása és ellenőrzése

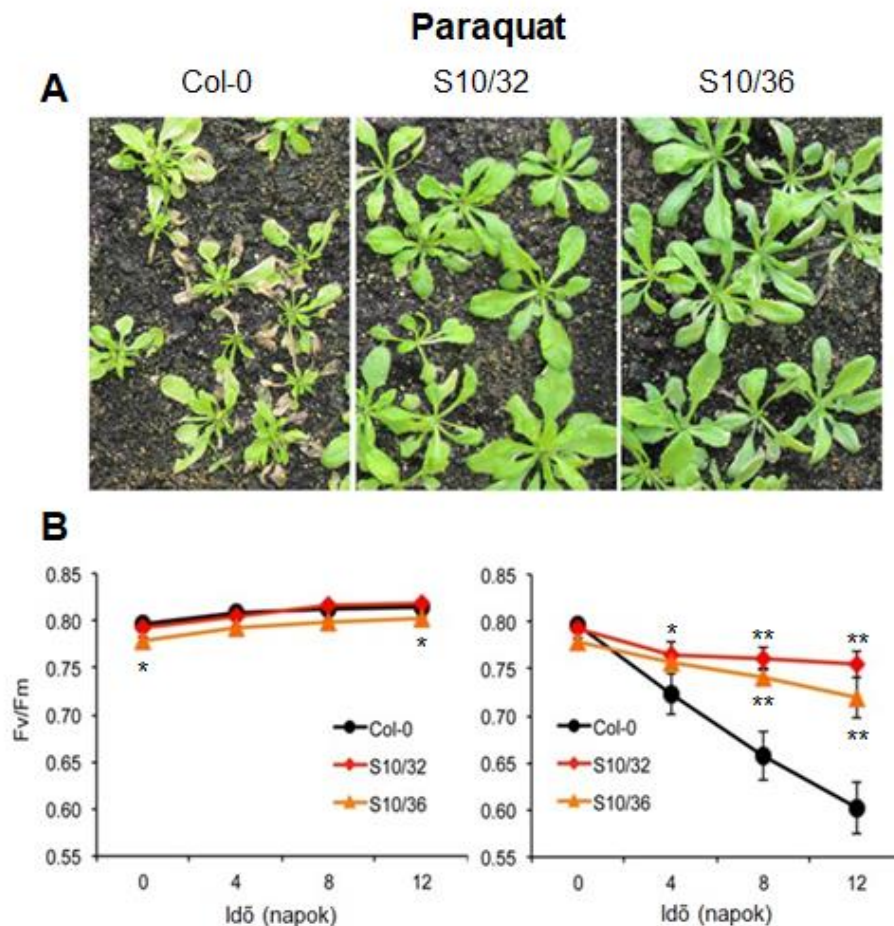
A PL372PQ01 vonalból egy 600 bázispár hosszúságú cDNS inszertet klónoztunk, ami egy 210 nukleotid hosszú kódoló szakasszal (ORF) rendelkezik. Az ORF egy mindössze 69 aminosavból álló prediktált fehérjét kódol. (Függelék 5. ábra). Ezért az általunk újonnan azonosított *Lepidium* génnek az *LcSPQ* (*Lepidium crassifolium* Small Paraquat Resistance) nevet adtuk. Ezután egy új, növényi transzformációra alkalmas vektor konstrukciót hoztunk létre, melyben a teljes hosszúságú *LcSPQ* cDNS-t pCaMV 35S konstitutív promóterrel kapcsoltuk össze és vad típusú *Arabidopsis* növényekben fejeztettük ki.

A beültetett gén expressziójának szintjét T2 generációs növényeken (S10/32, S10/36) határoztuk meg, a független transzformáns vonalakban termelődő LcSPQ RNS szintjét Northern hibridizálás segítségével ellenőriztük (Függelék 6. ábra). A túltermelő *Arabidopsis* vonalakon a már előzőekben említett, *in vitro* kísérleti rendszert alkalmazva (18. ábra) sikeresen igazoltuk, hogy a PL372PQ01 vonalból azonosított *LcSPQ* cDNS túltermeltetése paraquat rezisztenciához vezet.



18. ábra: A pCaMV 35S promóterrel összekapcsolt *LcSPQ* cDNS-t túltermelő S10 növényvonalak paraquat rezisztenciája. A) 21 napos Col-0 (vad típusú), S10/32-es és S10/36-os növények rozetta mérete paraquat (0,2 μ M) kezelés hatására. B) Col-0 és S10-es növények 21 napig megfigyelt növekedési üteme paraquat (0,2 μ M) kezelés hatására (sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba), $n = 108$).

Az *LcSPQ* cDNS túltermeltetéséből fakadó paraquat rezisztenciát üvegházi körülmények között is megvizsgáltuk. Erre a célra 3 hetes, üvegházban nevelt S10/32, S10/36 transzformánsokat és a Col-0 vad típusú növényeket 20 μ M paraquat és 0,01 % Silwet oldattal (paraquat kezelés) illetve 0,01%-os Silwet oldattal (kontroll kezelés) permeteztük. A kezelést három alkalommal ismételtük meg. A transzgénikus vonalak túléltek a paraquat kezeléseket, míg a vad típusú (Col-0) növények kifehéredtek, majd elpusztultak (19. ábra, A). A paraquat kezeléseket követően 24 óra elteltével drasztikusan csökkent a Col-0 vad típusú növények fotoszintetikus hatékonyságot tükröző PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfokának (Fv/Fm) értéke, míg az S10-es vonalak esetében csak csekély mértékű változás volt megfigyelhető (19. ábra, B).

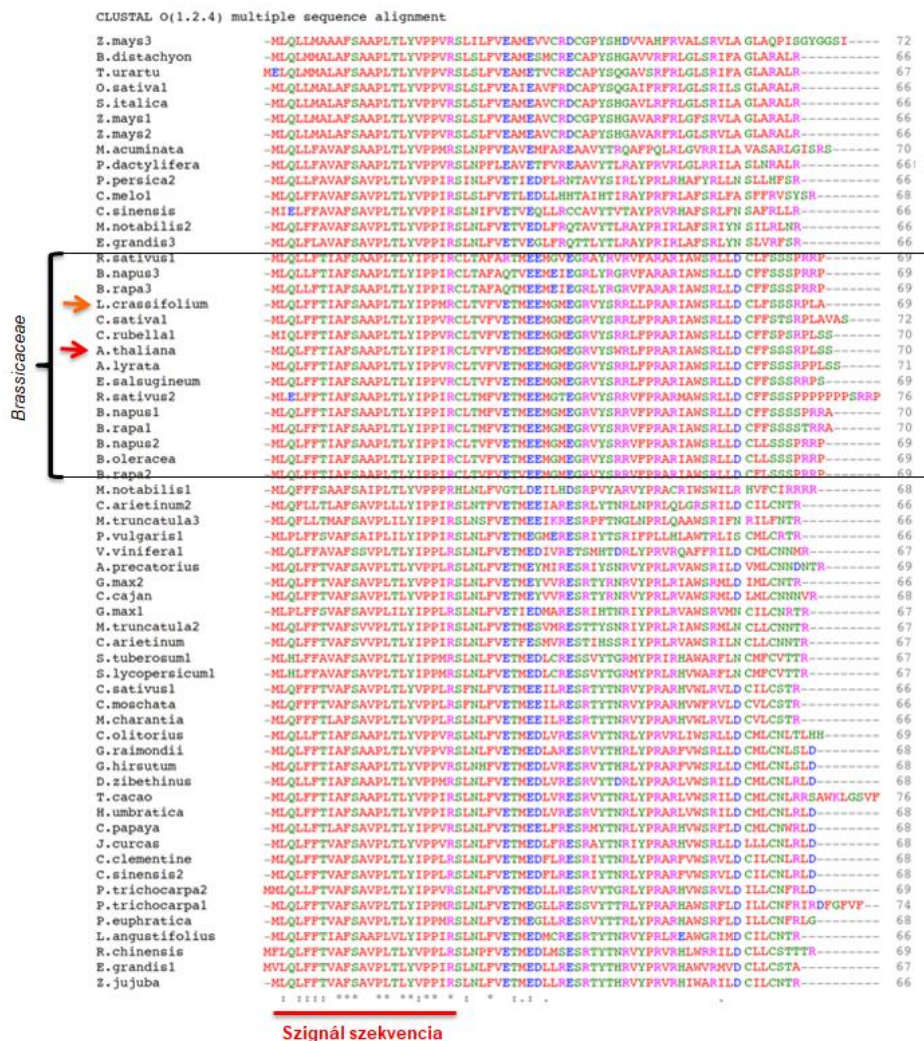


19. ábra: Az *LcSPQ* túltermelő S10-es növények paraquat rezisztenciája. A) Cserépben nevelt vad típusú (Col-0) és S10 növények 8 nappal az első paraquat (20 μ M paraquat és 0,01% Silwet) kezelés után. B) A cserépben nevelt növények (Col-0, S10/32 és S10/36) klorofill fluoreszcencia értékei (Fv/Fm: PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfoka) 0, 4, 8 és 12 nappal a paraquat kezeléseket követően (20 μ M paraquat és 0,01% Silwet). (sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba), $n = 16$).

5.3 *Arabidopsis thaliana* SPQ gén jellemzése

5.3.1 AtSPQ *in silico* azonosítása

Szekvencia alapú homológia keresés során megállapítottuk, hogy az SPQ –hoz hasonló gének a magasabb rendű növények genomjában egy, illetve két kópiában vannak jelen, és 66-76 aminosav hosszúságú fehérjéket kódolnak. A fehérje szekvenciák többszörös illesztése és elemzése alapján elmondható, hogy a fehérjék N-terminális végén található hidrofób szignál szekvenciája magasfokú konzerváltságot mutat mind a 62 darab SPQ fehérje esetében (20. ábra).



20. ábra: A növényekben található 62 SPQ peptid szekvenciáinak összehasonlítása. A bekeretezett szekvenciák a Brassicaceae családot jelölik. Az *Arabidopsis* és *Lepidium* szekvenciákat nyíl mutatja. A domén szerkezete az alábbi szinkód alapján van jelölve: Kicsi (kicsi + hidrofób (aromásokkal együtt -Tirozin)), Savas, Bázikus –Hisztidin, Hidroxil + szulfhidril + amin + Glicin, Konzervált szekvencia részek jelölése: (*) Teljes mértékű; (:) arányuk > 0,5; (.) arányuk ≤ 0,5 és > 0 a PAM 250 (Point accepted mutation) pontozási mátrix rendszerben. Aláhúzott rész: feltételezett szignál szekvencia. Forrás: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Madeira és mtsai., 2019).

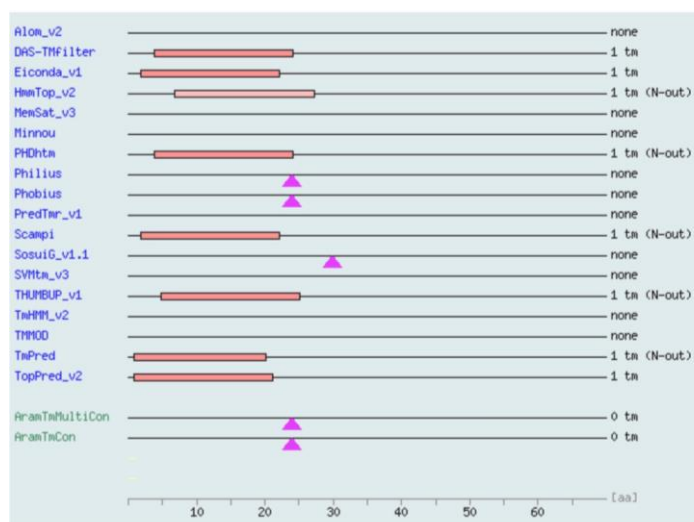
Ez a konzerváltság a káposztafélék családjába (*Brassicaceae*) tartozó fajokban található SPQ típusú fehérjék esetében a legmagasabb (21. ábra). A 90%-nál nagyobb a szekvencia azonosság alapján valószínű, hogy az SPQ fehérje funkciója ezekben a fajokban konzervált.

L. crassifolium	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPPMRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRRLPRARIAWSRLDCLFSSSRPLA--	69
A. thaliana	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPPIRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRRLFPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS-	70
A. lyrata	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPVVRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRRLFPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS	71
C. rubella	MIQLFFTTIAFSAAPLTLYIPVVRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRRLFPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS-	70
E. salsugineum	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPVVRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRRLFPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS--	69
B. napus	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPPIRCLTMFVETMEEMGMEGRVYSRRLVPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS-	70
B. rapa	MLQLFFTTIAFSAAPLTLYIPPIRCLTMFVETMEEMGMEGRVYSRRLVPRARIAWSRLDCLFSSSRPLSS-	70
consensus	*:*****:****:***** *:*****:***	

21. ábra: A *Brassicaceae* család SPQ típusú fehérjékének a szekvencia illesztése. A keret a feltételezett szignál peptidet jelzi.

Az *LcSPQ Arabidopsis* ortológja (*AT3G52105*) 213 nukleotid hosszúságú intronmentes ORF-el rendelkezik, ami egy 70 aminosav hosszúságú és eddig ismeretlen, általunk AtSPQ-nak elnevezett fehérjét kódol. Ez a fehérje nagyfokú egyezést mutat az *LcSPQ* fehérjével (92%-os szekvencia azonosság, 95%-os szekvencia hasonlóság).

Az AtSPQ esetleges transzmembrán szerkezetének a megállapítása céljából a fehérje szekvenciát az *Arabidopsis* membránfehérje adatbázis (Aramemnon; Schwacke és mtsai., 2003) segítségével elemeztük tovább, ezáltal számos szekvenciaelemző program eredményeit kaptuk meg. A szekvencia szegmensek elemzése alapján elmondható, hogy az AtSPQ fehérje hidrofób aminosavakból álló transzmembrán α -hélix szerkezetet tartalmaz, ami a fehérjék membránba történő integrálódását segítheti (22. ábra).



22. ábra: AtSPQ fehérje valószínűsített szerkezeti felépítése. α -hélix transzmembrán szerkezet predikciók 20 adatbázis alapján. 1 tm: van, : alacsony...magas hidrofóbitással.

: N-terminális szignál szekvencia levágódási helyel. 1 tm (N-out): van, N-terminális nem citoplazmatikus orientációval. None: nincs hidrofób jelleg. Forrás: <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de> (Eisenberg és mtsai., 1984; Cornette és mtsai., 1987).

Az AtSPQ sejten belüli lokalizációjának számítógépes előrejelzése elsősorban a szekréciós rendszerhez kapcsolt sejten belüli lokalizációt valószínűsíti (23. ábra; Aramennon; Schwacke és mtsai., 2003).

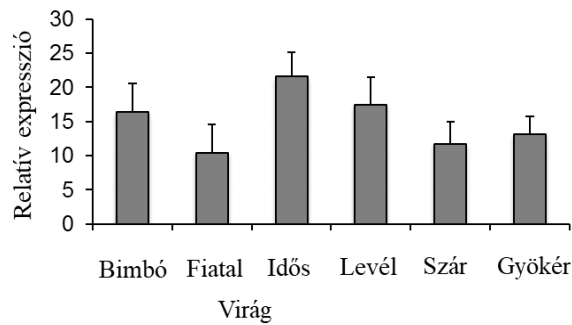


23. ábra: AtSPQ intracelluláris lokalizációja többféle predikciós adatbázis alapján.

○ : kloroplasztiszban, ● : mitokondriumban, ● : szekréciós útvonalon, ● : sejtmagban. A színek erőssége indikálja a lokalizáció valószínűségének az erősségét (alacsony...magas). Forrás: <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de> (Schwacke és mtsai., 2007).

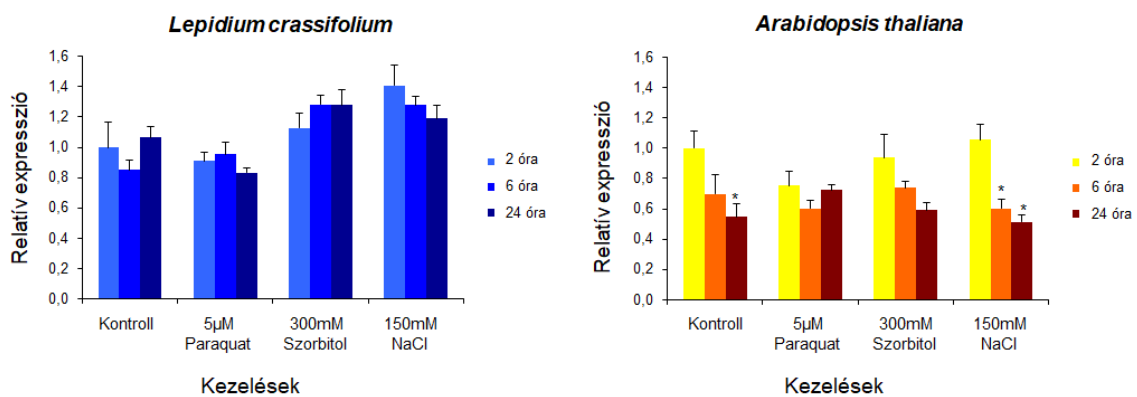
5.3.2 AtSPQ gén expressziós vizsgálata

Arabidopsis thaliana génexpressziós adatbázisokban (Genevestigator; Hruz és mtsai., 2008) megtalálható információk szerint az *AtSPQ* gén közepes szinten fejeződik ki a növény egyedfejlődésének minden egyes szakaszában (Függelék 7. ábra; GeneChip® *Arabidopsis* ATH1 Genome Arrays (Affymetrix)). Az adatbázis eredményeit figyelembe véve mi is megvizsgáltuk az *AtSPQ* expressziós mintázatát. Vad típusú (Col-0) növények különböző szerveiből származó RNS mintákon végzett valós idejű kvantitatív RT-PCR eredménye alapján elmondható, hogy a *AtSPQ* transzkript mennyisége nem mutat lényeges eltérést a referenciaként használt 18S rRNS szintjéhez képest (24. ábra).



24. ábra: Az *AtSPQ* gén kifejeződése különböző növényi szervekben és szövetekben. Relatív expresszió ($2^{-\Delta Ct}$) 18S RNS génekhez viszonyítva.

Az *LcSPQ* cDNS-t a *Lepidium* COS gyűjteményünkben izoláltuk először, ahol ozmotikus, só és oxidatív stresszre a vad típustól eltérő fenotípust mutató mutánsok szűrésére kidolgozott technikával azonosítottuk. Ezért teszteltük az *LcSPQ* és *AtSPQ* gének expressziójának változását vad típusú *Lepidium crassifolium* és *Arabidopsis thaliana* növényekben paraquat, szorbitol és só kezelések hatására (25. ábra). Mivel *Lepidium crassifolium* szekvenciák még nem elérhetőek egyetlen egy publikus adatbázisban sem, ezáltal az expressziós vizsgálatok során használatos referencia gének szekvenciája sem ismert. Így első lépésben a *Lepidium sativum*, *Lepidium meyenii* és *Lepidium campestre* aktin, ubikvitin, GAPDH2 mRNS és 18S rRNS szekvenciákra tervezett primerek (Linkies és mtsai., 2009; Sinha és mtsai., 2014) segítségével térképeztük fel a kérdéses régiókat a *Lepidium crassifolium*ban, melyek közzétételét a jövőben tervezzük. Eredményeink alapján elmondható, hogy az *SPQ* gének mRNS szintjét a különböző stresszkezelések (oxidatív, ozmotikus, só) lényegesen nem befolyásolják (25. ábra).

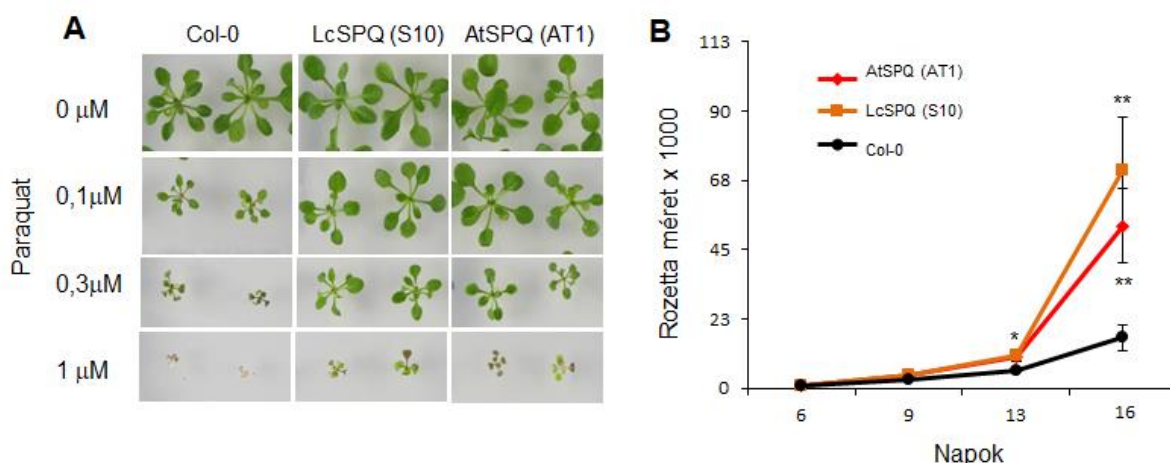


25. ábra: *AtSPQ* és *LcSPQ* gének kifejeződése. Az *SPQ* gének expressziója 2 hetes vad típusú *Arabidopsis thaliana* és *Lepidium crassifolium* növényekben, kontroll (folyékony $\frac{1}{2}$ MS) és hozzáadott 5 μ M paraquat (PQ), 300 mM szorbitol (Szorb), 150 mM NaCl (NaCl) kezelések hatására 2, 6, 24 óra elteltével. Relatív expressziójukat ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) a 18S rRNS és GAPDH2 génekhez viszonyítottuk sd, * $p < 0,05$ (t-próba).

Génexpressziós adatbázisok alapján az *AtSPQ* expressziója csak enyhe mértékben emelkedett meg ABS kezelés hatására, illetve csökkent csírázás alatt (Függelék 8. ábra; Genevestigator; Hruz és mtsai., 2008).

5.3.3 *AtSPQ* fehérje túltermeltetése *Arabidopsisban*

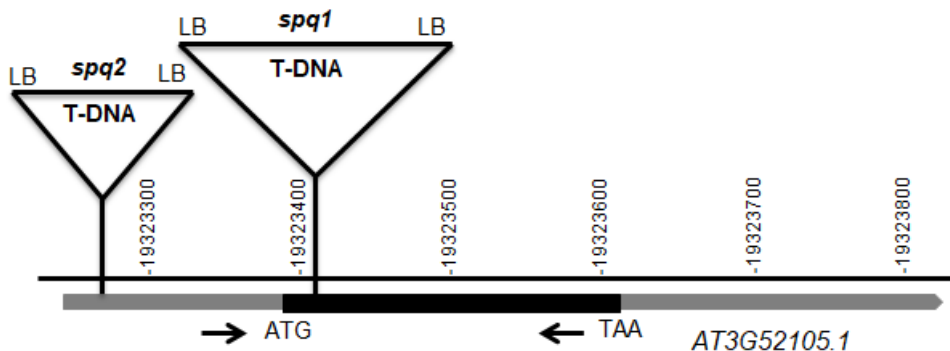
Miután *in silico* módszerekkel és expressziós adatokkal igazoltuk az SPQ jelenlétét a lúdfűben, kíváncsiak voltunk, hogy *AtSPQ* túltermeltetése a vad típusú növényekben okoz-e az *LcSPQ* túltermeltetéséhez hasonló paraquat rezisztenciát? Transzgenikus növények létrehozásához ugyanazt a bináris vektor konstrukciót alkalmaztuk, mint az *LcSPQ* cDNS túltermeltetése során (Rigó és mtsai., 2016). Az *Arabidopsis SPQ* cDNS-t konstitutív pCaMV 35S promóterrel kapcsoltuk össze, majd vad típusú *Arabidopsis* növények kromoszómáiba építettük be. A kísérletek során a 4 független vonal esetében a T2 generációjú növényekben ellenőriztük az *AtSPQ* fokozott működését valós idejű RT-PCR segítségével. Mindegyik tesztelt vonal egy vagy több nagyságrenddel magasabb *SPQ* transzkript szintet mutatott, mint a vad típusú növény. Ezt követően a szegregáló transzgenikus vonalak paraquat rezisztenciáját is ellenőriztük (Függelék 9. ábra). A továbbiakban az általunk AT1-nek nevezett vonalból szelektált homozigóta növényekkel dolgoztunk tovább, melyeknek részletes analízisét a PlantSize képelemző szoftverrel végeztük el. Megállapítottuk, hogy az *AtSPQ* túltermeltetése a vad típusú növényekhez képest az *LcSPQ* túltermeltetéshez hasonló mértékű paraquat rezisztenciához vezet (26. ábra).



26. ábra: A pCaMV 35S promóterrel összekapcsolt *LcSPQ* és *AtSPQ* cDNS-t túltermelő növényvonalak paraquat rezisztenciája. A) 21 napos Col-0 (vad típusú), *LcSPQ* (S10) és *AtSPQ* (AT1) növények rosetta mérete többféle paraquat koncentrációt alkalmazva (0 μ M; 0,1 μ M; 0,3 μ M és 1 μ M). B) Col-0, *LcSPQ* (S10) és *AtSPQ* (AT1) növények 11 napig megfigyelt növekedési üteme paraquat (0,3 μ M) kezelés hatására (sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba), n = 24).

5.3.4 *Arabidopsis SPQ* T-DNS inszerciós mutánsok azonosítása

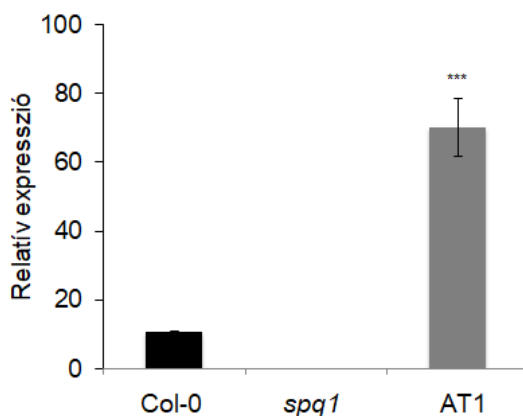
Az *AtSPQ* gén jellemzése és funkciójának feltárása céljából két független mutáns allélt vizsgáltunk, melyekhez a SALK intézeten keresztül jutottunk hozzá (Alonso és mtsai., 2003). Vektor, illetve génspecifikus primerek segítségével szaporítottuk fel a T-DNS inszert környékét és szekvenálással meghatároztuk a T-DNS *AtSPQ* génbe történt beépülések pontos helyét. Az *spq2* mutáns esetében (SALK_08417) a T-DNS inszerció a gén promóter régiójába épült be, 136 bázispárryira a start kodontól 5' irányban, és 22 bázispárry deléciót okozott. Az *spq1* (SALK_14243) mutáns allél esetében egy tandem (LB-LB) T-DNS beépülést fedeztünk fel, közvetlenül 6 bázispárryira az ATG kodon után 3' irányban, ami egy 20 bázispárry kivágódást eredményezett (27. ábra). RT-PCR analízis segítségével megállapítottuk, hogy a homozigóta *spq2* mutánsban a T-DNS inszerció a teljes hosszúságú *AtSPQ* gén átíródását nem befolyásolta, míg a *spq1* mutánsban hiányzott a *AtSPQ* transzkript. Ezért a továbbiakban csak az *spq1* mutánssal dolgoztunk.



27. ábra: A T-DNS inszerció elhelyezkedése az *spq1* és *spq2* mutánsokban. Világosszürke kiemelés jelöli az 5' és 3' át nem íródó régiókat, míg a fekete kiemelés az *AtSPQ* gén intronmentes kódoló régióját. A fekete nyilak jelzik az *spq1* genotipizálásához és a qRT-PCR teszthez használt primerek pozícióját.

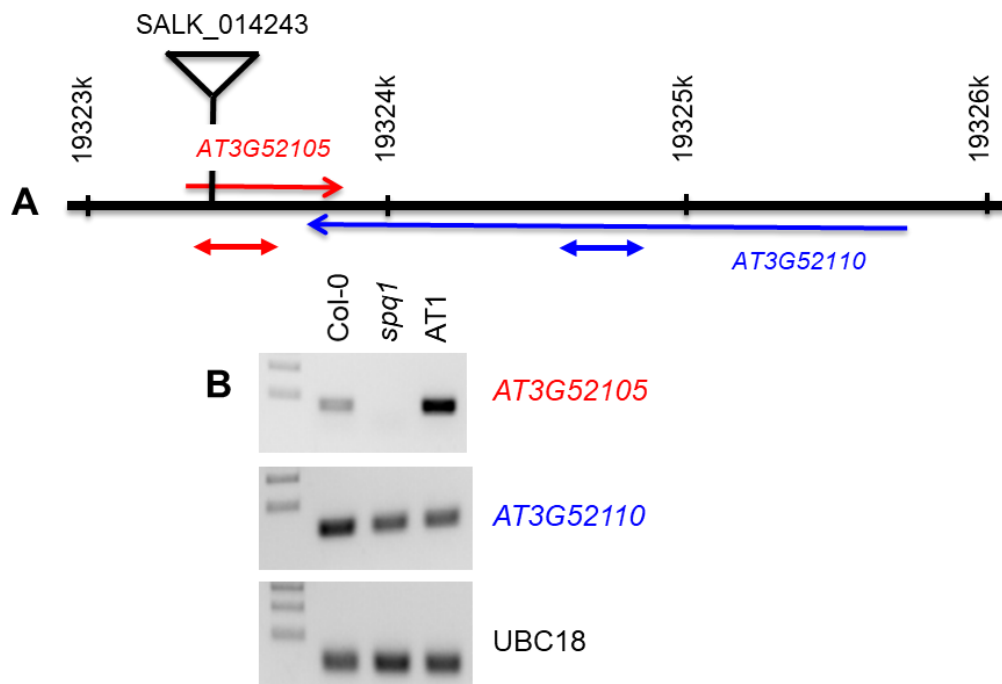
Az *AtSPQ* gén transzkript szintjét qRT-PCR módszerrel is összehasonlítottuk a vad típusú Col-0, a *spq1* mutáns és *AtSPQ* túltermelő transzgenikus növényekben (28. ábra).

Amíg az *spq1* mutánsban nem volt kimutatható az *AtSPQ* transzkript, a fehérjét túltermelő AT1 transzgenikus növényekben a Col-0 vad típusban mért *AtSPQ* mRNS szinthez képest több nagyságrenddel magasabb expressziót kaptunk (28. ábra). A transzkripció adatok alapján kijelenthetjük, hogy a T-DNS inszerció az *AtSPQ* gén funkcióvesztéses (knock-out) mutációját eredményezni az *spq1* mutánsban.



28. ábra: ***AtSPQ* gén transzkripciójának a vizsgálata.** *AtSPQ* gén vizsgálata valós idejű kvantitatív PCR-rel vad típusú (Col-0), homozigóta *spq1* mutánsban és 35S::*AtSPQ* (AT1) transzgenikus növényekben. A mért mRNS szinteket az UBC18 mRNS kontrollhoz normalizáltuk ($2^{-\Delta Ct}$). (sd, *** p < 0,001, t-próba).

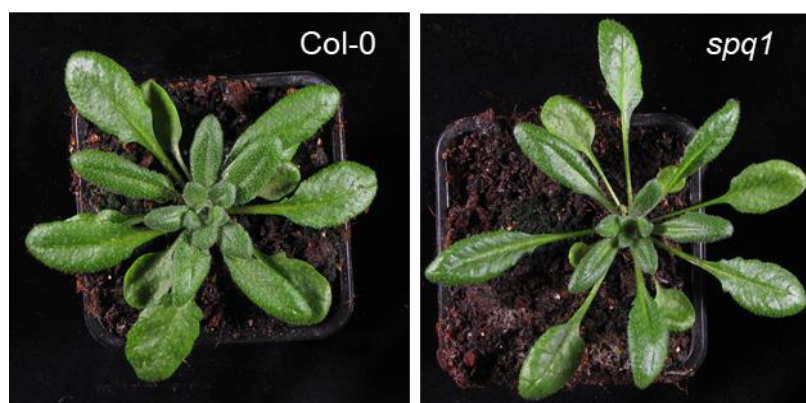
Az *Arabidopsis* genom szekvenciája szerint az *AT3G52105* gén 3' UTR régiója 150 nukleotid hosszan átfed a szomszédos reverz komplementer orientációjú *AT3G52110* gén 3'UTR régiójával. Az *AT3G52110* gén egy ismeretlen fehérjét kódol. Elképzelhető, hogy a két gén egyidejű transzkripciója a 150 bp átfedő szakasz miatt siRNS (kis interferáló ribonukleinsav) képződéshez vezet, ami az egyik vagy mindkét gén csendesítését eredményezheti. Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a *AtSPQ* túltermelő növényekben az eddig megfigyelt fenotípusos változásokért a szomszédos gén csendesítése a felelős, a *spq1* mutánsban, illetve a túltermelő AT1 növényekben teszteltük az *AT3G52110* transzkripcióját. Az *AT3G52110* transzkript hasonló szinten volt kimutatható a mutáns és túltermelő növényekben (29. ábra). Az expressziós analízis alapján valószínű, hogy az *AtSPQ* cDNS konstitutív működése által kialakult fenotípus nem RNS-interferencia révén bekövetkezett *AT3G52110* csendesítés eredménye.



29. ábra: *AT3G52105* (*AtSPQ*) és a szomszédos *AT3G52110* gének közötti feltételezett interferencia vizsgálata. A) *Arabidopsis* genomikus régió (19323-19326 Kb, 3. kromoszóma) sematikus térképe. B) *AtSPQ* és *AT3G52110* RT-PCR analízise Col-0, *spq1* és AT1 (35S::*AtSPQ*) növényekben UBC18 referencia gén mellett. Egyirányú nyilak (piros: *AtSPQ*, kék: *AT3G52110*) a gének régióját jelzik, kétirányú nyilak az alkalmazott primer párok által felszaporított régiókat.

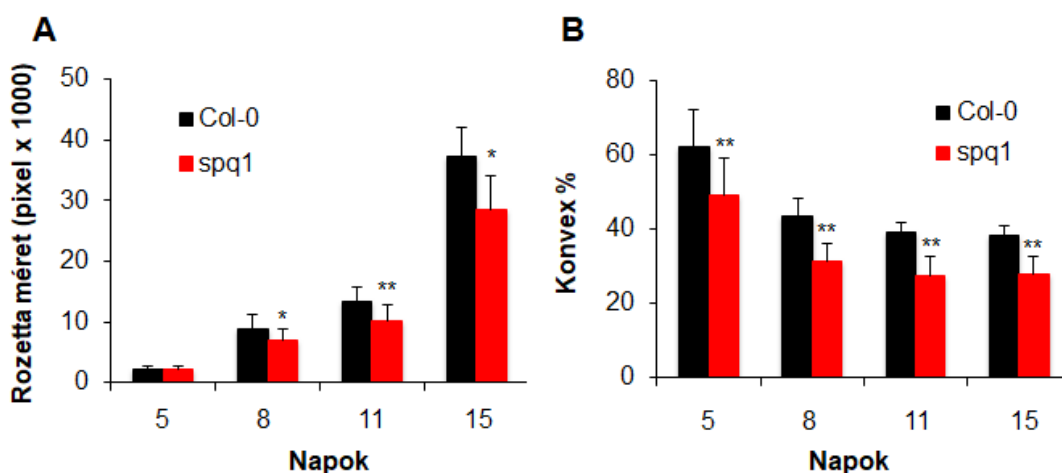
5.3.5 Az *spq1* mutáns növények jellemzése

Az *in vitro* illetve üvegházban nevelt homozigóta *spq1* növények életképesek, fertilesek voltak, de kisebb morfológiai különbséget mutattak a vad típusú növényekhez képest. A legszembetűnőbb változás a keskeny, meghosszabbodott levélnyel, amit mind az *in vitro* mind az üvegházban nevelt növényeken meg lehetett figyelni (30. ábra).



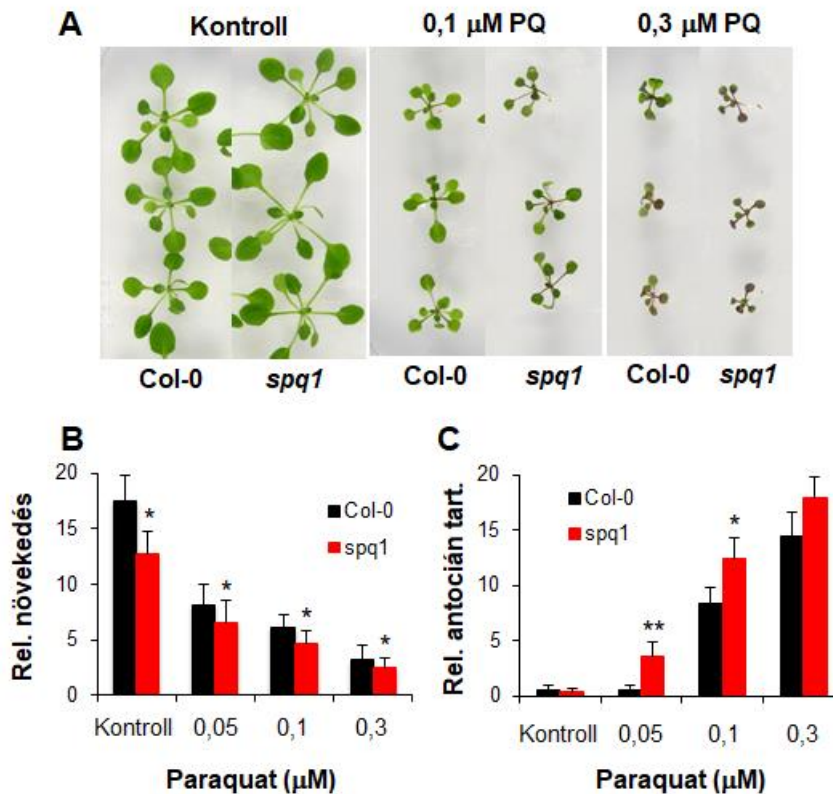
30. ábra: Üvegházban nevelt 4 hetes vad típusú és *spq1* mutáns növények rozettájának morfológiája.

Mivel az *SPQ* cDNS-ek túltermeltetése megnövelte a transzgénikus növények paraquat rezisztenciáját, ezért megvizsgáltuk a herbicid hatását a mutáns növényeken is. A kísérletben 5 napos csíranövényeket helyeztünk át különböző paraquat koncentrációjú táptalajokra és 10 napon keresztül teszteltük növekedésüket, fejlődésüket. Standard táptalajon ($\frac{1}{2}$ MS) az *spq1* mutáns növények rozettájának mérete (pixel szám) 20%-kal alacsonyabb volt (31. ábra, A), mint a vad típusú növényeké, míg a konvex területük hasonló volt. A különbségből adódó 20 %-os konvex % eltérést (konvex területen belül elhelyezkedő rozetta méretének a százalékos aránya) a mutáns keskenyebb levele és hosszabb levélnyele okozza (31. ábra, B).



31. ábra: Az *spq1* mutáns fenotípusának analízise a PlantSize program segítségével. A) *In vitro* növekedésű Col-0 és *spq1* növények rozetta mérete B) és konvex %-a. A rozetta mérete a rozetta területének felel meg, pixelek száma x 1000 -el kalkulálva. Konvex % a konvex területen belül elhelyezkedő rozetta méretének a százalékos arányát jelzi. Sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba), $n = 48$).

A paraquat kezelés hatására a rozetta növekedésének gátlása hasonló mértékű volt a mutánsban és a vad típusú növényekben. A PlantSize értékek alapján kapott antocián akkumuláció ugyanakkor magasabb volt a mutánsban, mint a Col-0 vad típusban, ami az *spq1* mutáns vonal enyhe paraquat érzékenységgel magyarázható (32. ábra).



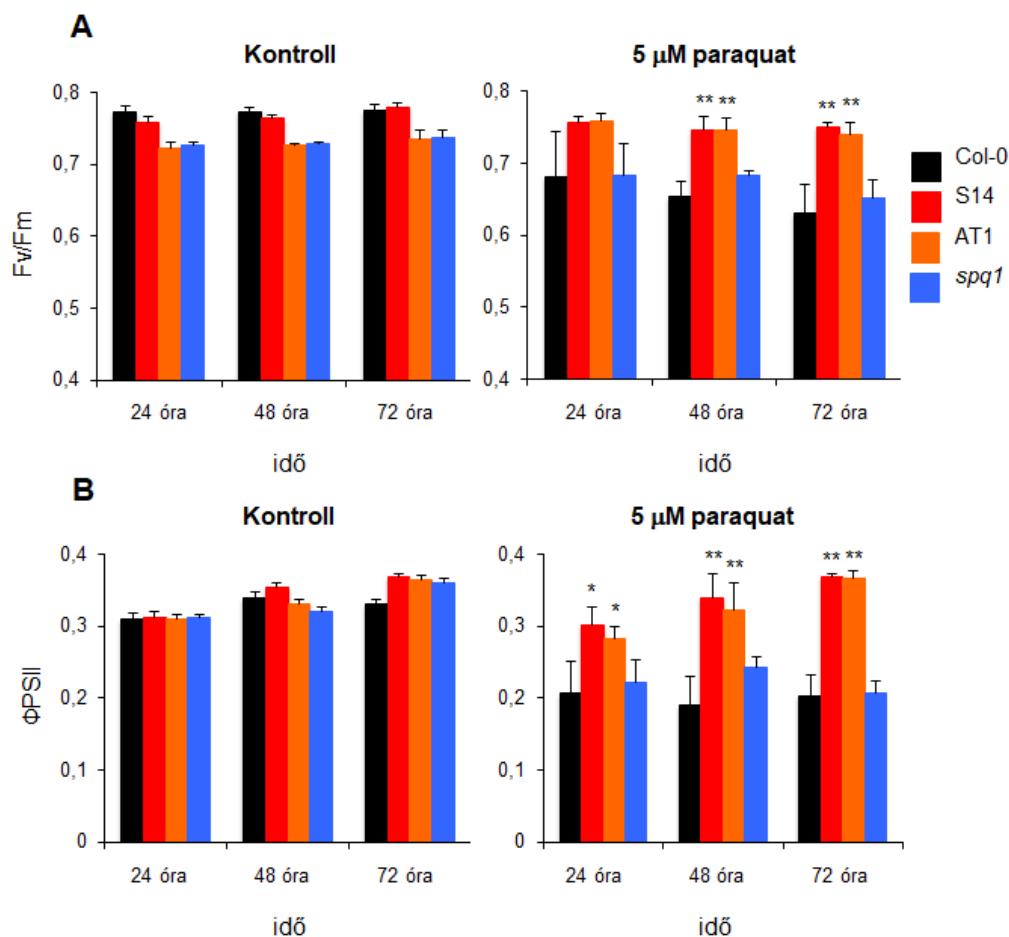
32. ábra: **Paraquat kezelés hatása az *spq1* mutánsra.** 5 napos Col-0 és *spq1* csíranövényeket helyeztünk át különböző paraquat tartalmú táptalajokra (0; 0,05; 0,1 és 0,3 μM paraquat). A-B) Növények rozettájának a mérete és C) antocián tartalma 10 nap kezelés után. Relatív növekedés a rozetták méretét mutatja a kezelési időszak végén, ahol az 1 érték a 0. napnak felel meg. Relatív antocián tartalom esetében az 1-es érték a kontroll Petri-csészéken detektált értékeket jelöli (sd, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-próba, $n = 30$)).

5.4 *LcSPQ* és *AtSPQ* gének túltermeltetésének összehasonlítása

5.4.1 Paraquat által okozott oxidatív stressz élettani hatásai

A paraquat a Hill-oxidánsok közé sorolható, mivel speciális akceptor funkciója révén megzavarja a fotoszintetikus elektrontranszportot. Az általa okozott toxicitás egyik eredménye a PSII maximális fotokémiai kvantumhatékonyságának (F_v/F_m) drasztikus csökkenése, ami a PSII herbicid elleni fotoprotekciós folyamatait tükrözi. A paraquat okozta károsodás mértéke jól jellemezhető a PSII működő fotokémiai kvantumhatékonyságával (Φ_{PSII}) is, melynek csökkenése a NADPH szint csökkenéséből is fakadhat. Ezért összehasonlítottuk a vad típusú, a *spq1* mutáns, illetve az *LcSPQ* és *AtSPQ* cDNS-t túltermelő vonalak PSII maximális és működő fotokémiai kvantumhatékonyságának változását a paraquat kezelés során.

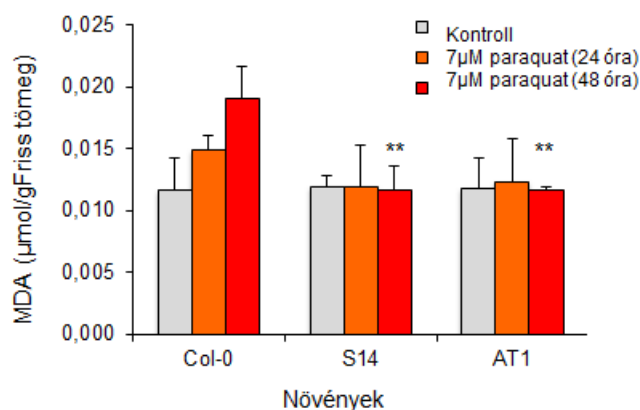
A kísérletek során 72 órán át nyomon követtük a növények klorofill fluoreszcencia indukciós paramétereinek a változását 5 μM paraquat kezelést követően. A paraquat kezelés drasztikusan csökkentette az Fv/Fm illetve ΦPSII értékeit a vad típusú és mutáns növényekben, míg az S14 (35S::LcSPQ) és AT1 (35S::AtSPQ) növényekben a csökkenés minimális volt (33. ábra).



33. ábra: Paraquat kezelt Col-0, SPQ-túltermelő és *spq1* mutáns vonalak fotoszintetikus paramétereit. 2 hetes növények klorofill fluoreszcenciájának mérése kép alapú impulzus-amplitúdó modulációs méréssel (Imaging PAM) cukor-mentes táptalajon, 5 μM paraquat kezelés után. A) Fv/Fm: PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfoka, B) ΦPSII : PSII működő kvantumhatásfoka csökkent a vad és *spq1* mutánsban, míg a SPQ-túltermelő növényekben nem mutatott redukción a vad típusához képest (sd, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-próba), $n = 32$).

A *spq1* mutánsban ezek a mutatók hasonlóak voltak a vad típusú növényekhez és paraquat kezelésre sem változtak lényegesen.

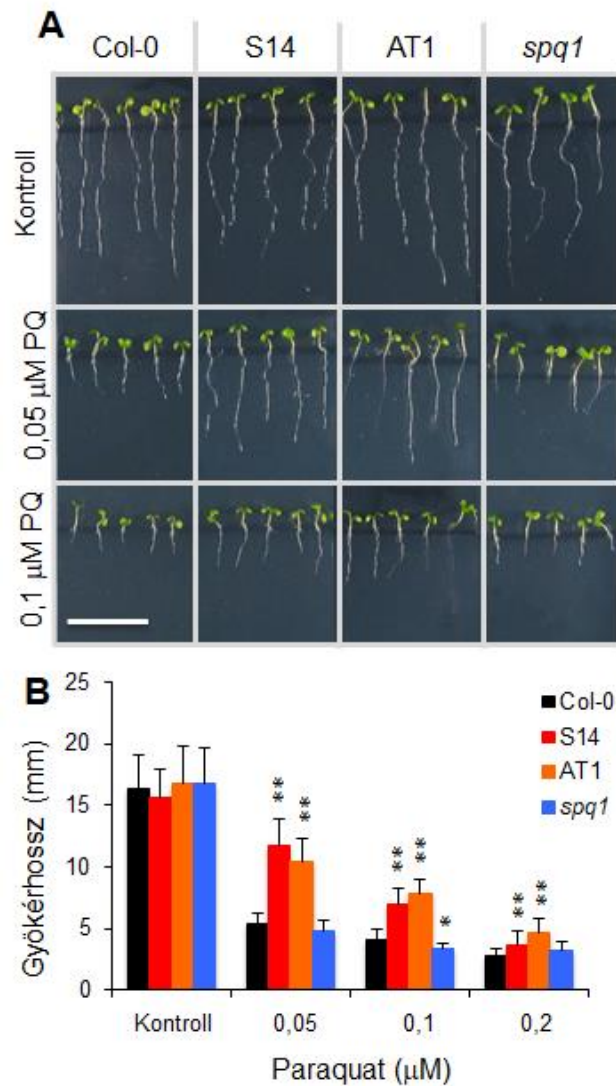
A paraquat kezelés során jelentős mennyiségű szabadgyök képződik. A felhalmozódó reaktív oxigénformák ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2) károsíthatják a fotoszintetikus pigmenteket és a lipideket is. Az oxidatív károsodás tesztelése érdekében megmértük a vad típusú és *SPQ* cDNS-t túltermelő vonalak malondialdehid (MDA) szintjét, ami a lipid-peroxidáció végterméke és megbízható marker a növényi sejteket ért oxidatív stressz mértékének a meghatározására. (34. ábra).



34. ábra: **Lipid-peroxidáció vizsgálata.** MDA szint változása a vad típusú (Col-0) és LcSPQ (S14) valamint AtSPQ (AT1) túltermelő transzgenikus növényekben kontroll, illetve 24 és 48 órán át tartó paraquat (7µM) kezelést követően. A vad típushoz viszonyítva sd, ** $p < 0,01$ (t-próba), $n = 5$.

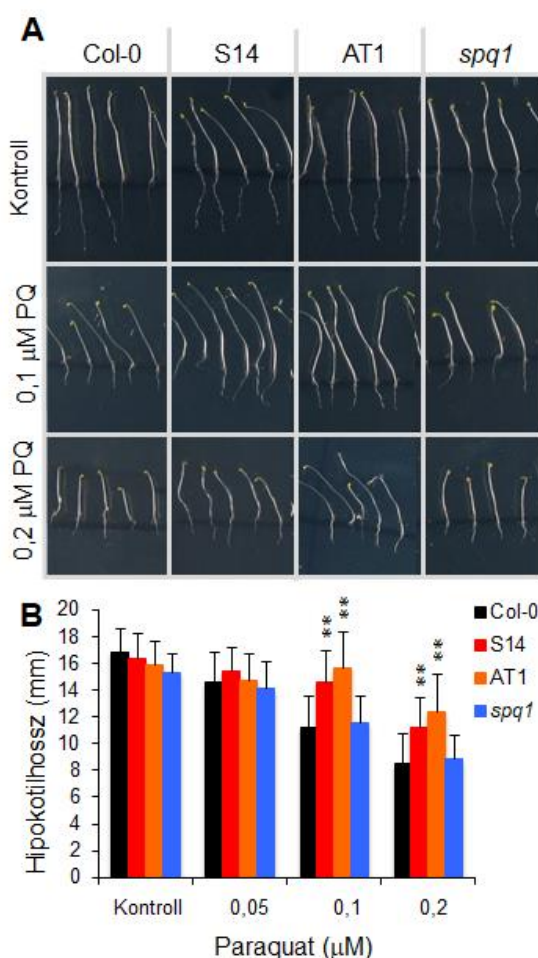
A kontroll körülmények között az összes vonal hasonló malondialdehid szinttel rendelkezett. Paraquat kezelés hatására a Col-0 növényekben 24 óra után 30%, 48 óra után 80%-al magasabb MDA koncentrációt mértünk, míg a transzgenikus növényekben a lipid-peroxidáció nem emelkedett. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a *Lepidium crassifolium* és *Arabidopsis thaliana SPQ* gének megnövekedett expressziója csökkenti a paraquat okozta oxidatív károsodást.

A paraquat ROS-képző tulajdonságát nem csak a kloroplasztiszon, de mitokondriumon keresztül is kifejtheti, ezért megvizsgáltuk a szer hatását nem fotoszintetikus szövetekben (gyökérben) illetve amikor a fotoszintetikus folyamatok inaktívak (sötétben). Először összehasonlítottuk a vad típusú növények, az SPQ-túltermelő vonalak (AT1, S14) valamint az *spq1* mutáns gyökereinek növekedését különböző paraquat tartalmú táptalajokon. Az AT1 és S14 transzgénikus vonalak gyökereinek növekedését kevésbé gátolta a paraquat mint a vad típusúét, míg a *spq1* mutáns és Col-0 gyökerek hasonló érzékenységet mutattak (35. ábra).



35. ábra: **Nem fotoszintetizáló szövetek paraquat érzékenysége.** 16 napos vad típus (Col-0), S14 (35S::LcSPQ), AT1 (35S::AtSPQ) transzgénikus és *spq1* mutáns vonalak gyökernövekedése 9 nap után. A) 0,05μM és 0,1μM és B) 0,05-0,1-0,2μM paraquat kezelés után. A vad típusúhoz viszonyítva sd, * p <0,05, ** p <0,01 (t-próba), n = 48.

Ismert, hogy a paraquat gátolja a hipokotil megnyúlást, ami különösen sötétben csíráztatott etiolált csíranövényeken szembevetendő. Azért, hogy a paraquat rezisztenciát fény hiányában is teszteljük, összehasonlítottuk a sötétben csíráztatott vad típusú, S14, AT1 transzgenikus, valamint *spq1* mutáns növények hipokotil hosszát. A paraquat egyértelműen gátolta az etiolált növények növekedését, ami szignifikánsan kisebb volt az *SPQ* cDNS-t túltermelő transzgenikus vonalaknál (S14, AT1), míg a vad típusú Col-0 és *spq1* mutáns növények hipokotil hossza hasonló mértékű csökkenést mutatott (36. ábra).



36. ábra: **Sötétben csírázó növények paraquat érzékenysége.** 6 napos etiolált csíranövények hipokotilhossza kontroll és paraquat tartalmú táptalajon. A) 0,1 μM és 0,2 μM B) 0,05-0,1-0,2 μM paraquat tartalmú táptalajon. A vad típusúhoz viszonyítva sd, * p <0,05, ** p <0,01 (t-próba), n = 48.

A sötétben történő hipokotil megnyúlás és a gyökernövekedés különbségei arra utalnak, hogy a SPQ túltermeléssel járó rezisztencia nem kizárólag a fotoszintetikus elektrontranszportoz kapcsolódik, abban szerepet játszhat a mitokondriális elektrontranszport is, vagy egy eddig ismeretlen mechanizmus, ami csökkenti a paraquat toxikus hatását.

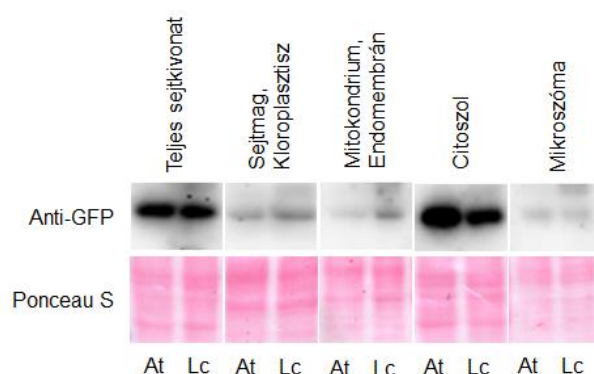
5.4.2 SPQ fehérjék lokalizációja

5.4.2.1 Fuzionált génkonstrukciók előállítása

Az *Arabidopsis* és *Lepidium* SPQ fehérjék funkcionális jellemzéséhez fontos azok sejten belüli lokalizációjának ismerete. Az LcSPQ és AtSPQ fehérjék sejten belüli lokalizációjának a vizsgálatára olyan génkonstrukciókat állítottunk elő, melyeknél a gének TAA stop kodonjait a szerint kódoló TCA kodonra cseréltük, majd a 210 bp (Lc) és 213 bp (At) hosszúságú intronmentes SPQ kódoló régiókat olyan expressziós vektorba építettük, amelyben a fuzionált SPQ és a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló DNS szekvenciák (GFP) transzkripcióját a pCaMV 35S promóter szabályozza. A létrehozott fúziós szakasz pontosságát szekvenálással ellenőriztük, majd a hibátlan konstrukciókat *Agrobacterium*-közvetített transzformáció segítségével vad típusú (Col-0) növényekbe transzformáltuk és több, független transzgenikus vonalat állítottunk elő. Egy párhuzamos kísérletben a génkonstrukciókat sejtuszuspenziókba transzformáltuk.

5.4.2.2 Az SPQ-GFP lokalizációjának vizsgálata növényi sejtuszuspenzióban

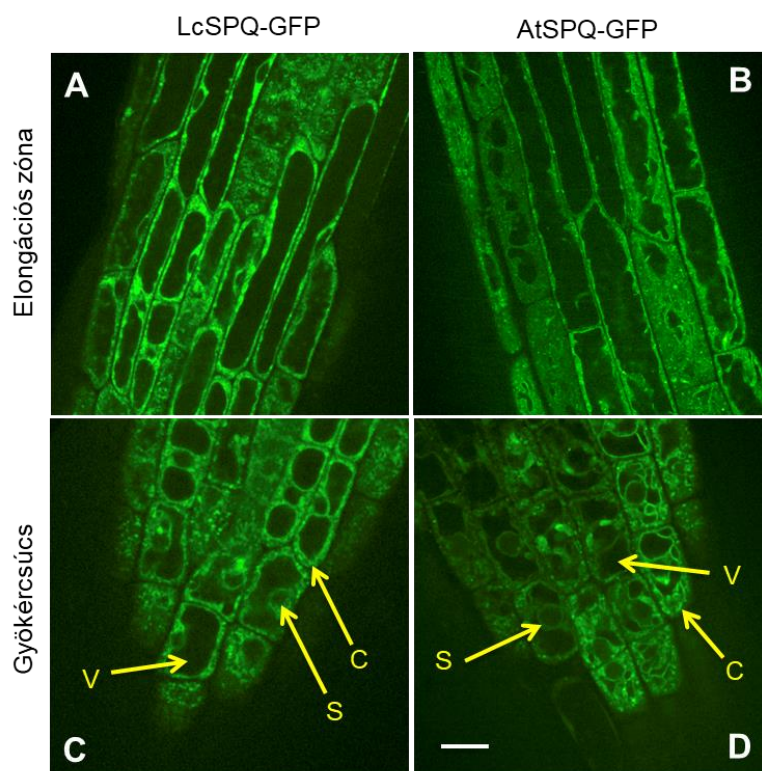
A SPQ fehérjék lokalizációját először a pár hét alatt előállított transzformált sejtuszuspenziókon vizsgáltuk. A LcSPQ-GFP és AtSPQ-GFP fúziókat expresszáló sejtuszuspenziókból származó fehérje extraktumokat differenciális centrifugálással frakcionáltuk, amivel a különböző sejt alkotórészeket, organellumokat el tudtuk különíteni. Ezt követő anti-GFP ellenanyagot alkalmazva Western blot analízissel vizsgáltuk a *Lepidium* és *Arabidopsis* SPQ-GFP fehérjék (37 kDa) mennyiségét az elválasztott sejtfrakciókban. Mindkét SPQ fehérje elsősorban a citoszolban volt kimutatható (37. ábra).



37. ábra: **Sejtuszuspenzióban termelt SPQ-GFP fúziós fehérjék Western blot analízise.** A fehérjék mennyiségének detektálása teljes sejtivonatban és a differenciál centrifugálással elválasztott sejtfrakciókban: sejtmag és kloroplasztisz, mitokondrium és endomembrán, citoszol, mikroszóma. Anti-GFP ellenanyag segítségével kimutatva, a fehérje transzfer sikerességét a membrán Ponceau S (Sigma) festésével ellenőriztük.

Az *Arabidopsis* transzgenikus sejtszuspenziók vizsgálatával párhuzamosan a LcSPQ-GFP és AtSPQ-GFP fehérjék sejten belüli lokalizációját transzgenikus *Arabidopsis* növényekben is vizsgáltuk. Spinning disk konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok során az LcSPQ-GFP, illetve az AtSPQ-GFP csíranövények leveleiben a vad típusú (Col-0) növényekhez hasonló gyenge autofloreszcencia volt csak megfigyelhető, ezért a lokalizációs vizsgálatokat elsősorban gyökereken végeztük.

Az SPQ-GFP-t expresszáló vonalak gyökerének osztódó merisztematikus sejtjeiben az SPQ-GFP által kibocsájtott erős fluoreszcens jel elsősorban a citoplazmában volt megfigyelhető, ami néha szemcsés mintázatot mutatott. A megnyúlási zóna vakuolizált sejtjeiben tonoplaszt lokalizációra utaló GFP jel is detektálható volt. Az elongációs zónán belül pedig a fehérjék szemcsés és hártyszerű vezikuláris mintázata a sejtmag kivételével mindenhol észlelhető volt (38. ábra).

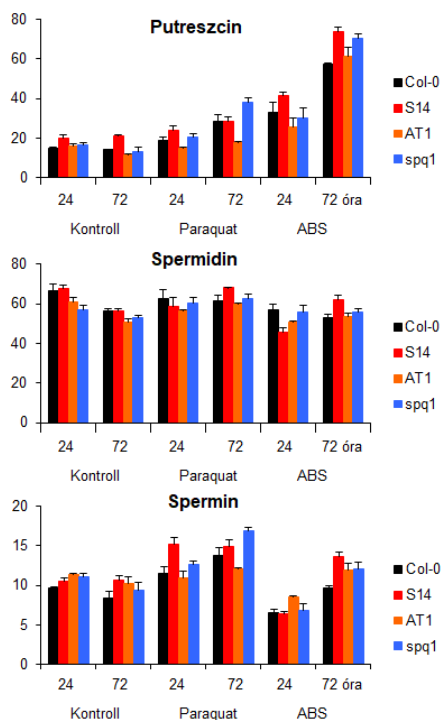


38. ábra: SPQ-GFP fehérjék sejten belüli lokalizációja a gyökér epidermisz sejtjeiben. A) LcSPQ-GFP és B) AtSPQ-GFP citoplazmatikus lokalizációja az elongációs zónában. C) LcSPQ-GFP és D) AtSPQ-GFP citoplazmatikus lokalizációja a gyökércsúcsban. Jelölések: S: sejtmag, C: citoplazma, V: vakuólum. Méretskála A-D: 25 μ m.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mind a *Lepidium*ból és mind az *Arabidopsis*ból származó SPQ fehérje a citoplazmában, valószínűleg valamilyen vezikulákhoz kapcsolódva helyezkedik el.

5.5 A SPQ fehérjék és a poliaminok metabolizmusa

A paraquat felvétele a növényi sejtekbe részben a vele analóg poliaminok transzportútvonalaán keresztül történik. A paraquat rezisztenciát több esetben poliamin transzportot károsító mutációk okozták, amik megakadályozták a paraquat felvételét is (Kurepa és mtsai., 1998; Fujita és mtsai., 2012). Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a paraquat rezisztenciát okozó SPQ fehérjék túltermelése befolyásolja-e a poliamin metabolizmust. Ezért összehasonlítottuk a paraquat, valamint abszcizinsav kezelésnek kitett vad típusú (Col-0), LcSPQ (S14) és AtSPQ (AT1) túltermelő, és a *spq1* mutáns poliamin tartalmát (a méréseket Ruben Alcazar, Universidad de Barcelona, végezte). A putreszcín, spermin és spermidin koncentrációkat 24 és 72 órás paraquat (7 μ M) illetve ABS (50 μ M) kezeléseket követően mértük. Az ABS kezelés megemelkedett putreszcín tartalommal járt, de a tesztelt vonalak poliamin tartalmában nem találtunk szignifikáns eltérést (39. ábra).



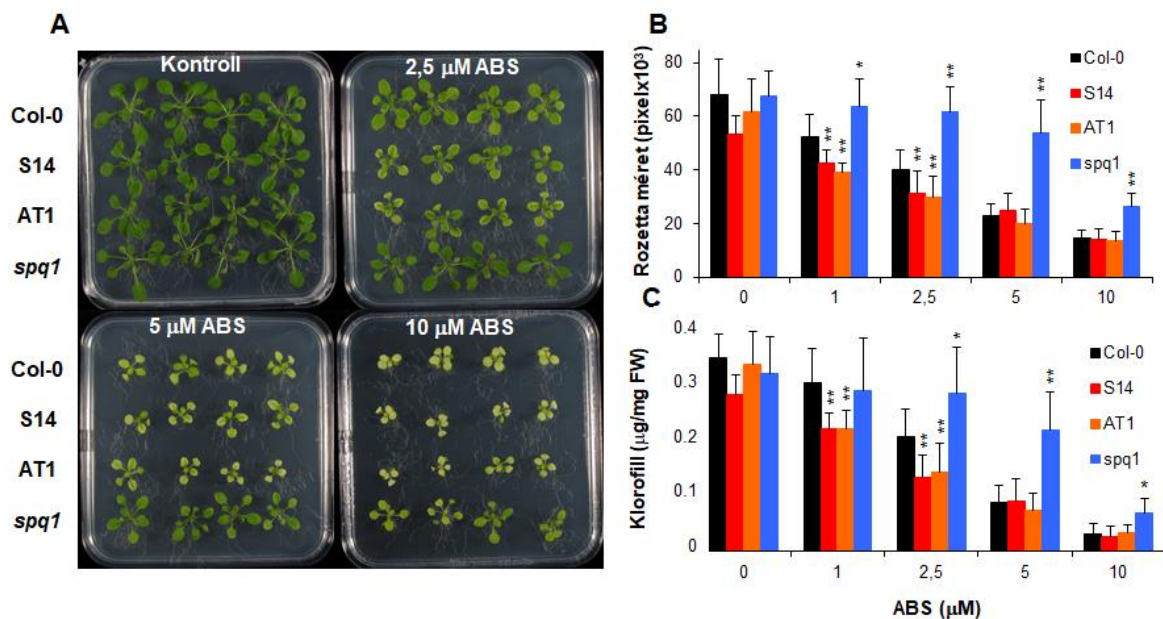
39. ábra: **Az SPQ-túltermelő és mutáns vonalak poliamin tartalma.** A putreszcín, spermid és spermin szintjét két hetes S14 (35S::LcSPQ), AT1 (35S::AtSPQ), *spq1* mutáns és Col-0 (vad típus) növényekben mértük meg 24 és 48 órás 7 μ M paraquat és 50 μ M ABS kezeléseket követően. Az adatok három biológiai ismétlés átlagát mutatják.

Eredményeink arra utalnak, hogy a SPQ fehérje által meghatározott paraquat rezisztencia nem kapcsolódik a poliamin metabolizmushoz, illetve transzporthoz. A szerek gátló hatása minden esetben megmutatkozott, de a genotípusok közötti hatásaikban ezúttal sem észleltünk különbségeket.

5.6 Az SPQ és az ABS érzékenység

5.6.1 A SPQ befolyásolja az ABS érzékenységet

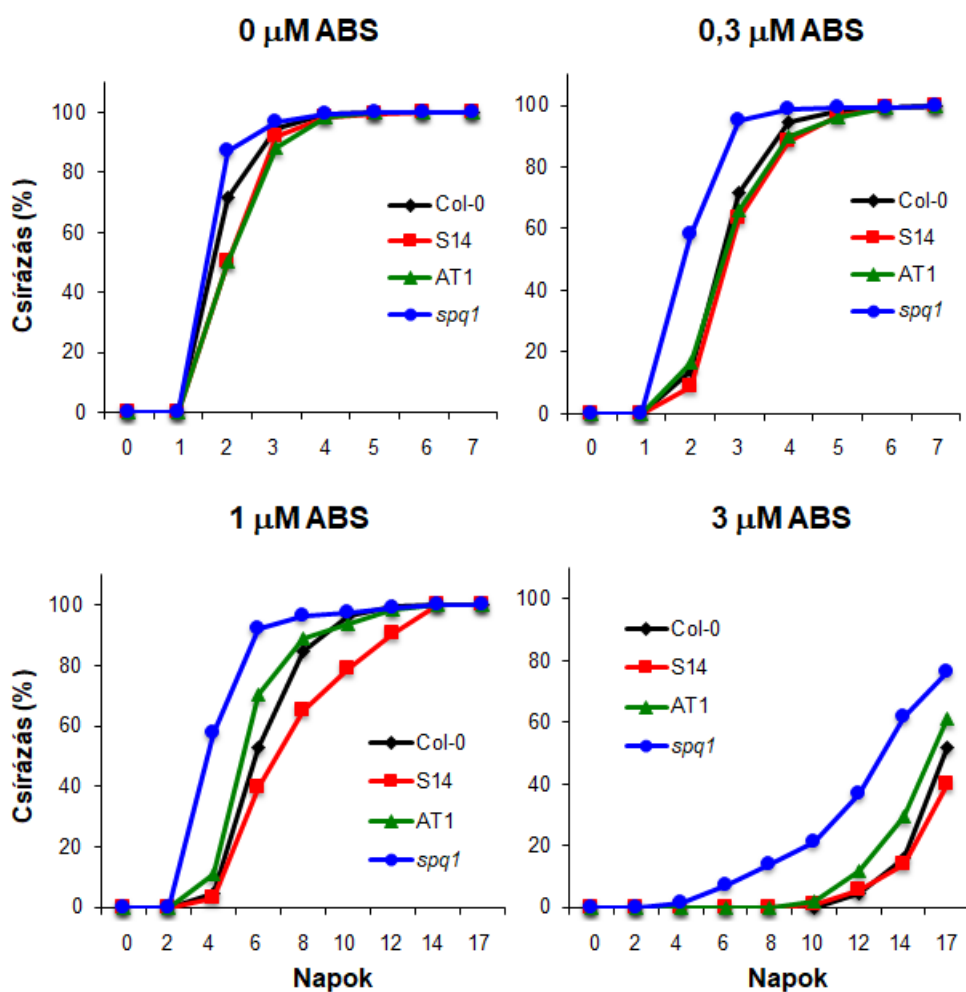
Irodalmi adatok arra utalnak, hogy kapcsolat lehet a paraquat hatása által befolyásolt ROS jelátviteli utak és a hormonális szabályozás, például az ABS jelátvitel között (Dong és mtsai., 2016; Cui és mtsai., 2019). A ROS és ABS jelrendszer kapcsolatának vizsgálata érdekében teszteltük a SPQ-túltermelő vonalak és a *spq1* mutáns ABS érzékenységét. Az *in vitro* növekedési tesztben a kontroll táptalajokon ($\frac{1}{2}$ MS) az összes növény hasonló növekedést mutatott, az ABS koncentráció függő mértékben gátolta a rozetta növekedést. A túltermelő SPQ vonalak rozetta mérete 1 μ M és 2,5 μ M ABS hatására kisebb volt, mint a vad típusú (Col-0) növényeké, míg az *spq1* mutánsoké minden ABS koncentráció esetében nagyobb volt (40. ábra, A-B). Az LcSPQ és AtSPQ túltermelő vonalak magasabb ABS jelenlétében kisárgultak, ami nagyobb mértékű klorofill vesztést jelzett, míg a *spq1* mutáns zöld maradt (40. ábra, A, C). A PlantSize programmal végrehajtott kvantitatív elemzés megerősítette ezeket a megfigyeléseket: az SPQ-túltermelő vonalak ABS hiperszenzitívek, míg a *spq1* mutáns toleráns volt ezekben a tesztekben.



40. ábra: Az SPQ-túltermelő és *spq1* mutáns növények növekedése ABS befolyása alatt. 7 napos kontroll táptalajon ($\frac{1}{2}$ MS) növekedett növényeket helyeztünk át többféle ABS koncentrációjú táptalajra (0-20 μ M) és teszteltük növekedésüket. A) Kontroll körülmények között és 10 nap kezelés után a növények B) rozetta mérete és C) klorofill tartalma a vad típushoz viszonyítva. A rozetták méretét és klorofill tartalmát a PlantSize képelemző program segítségével kaptuk meg. Col-0: vad típus, S14: 35S::LcSPQ, AT1: 35S::AtSPQ, *spq1*: knock-out mutáns. sd, * p < 0,05, ** p < 0,01 (t-próba), n = 24.

5.6.2 Csírázási képesség vizsgálata

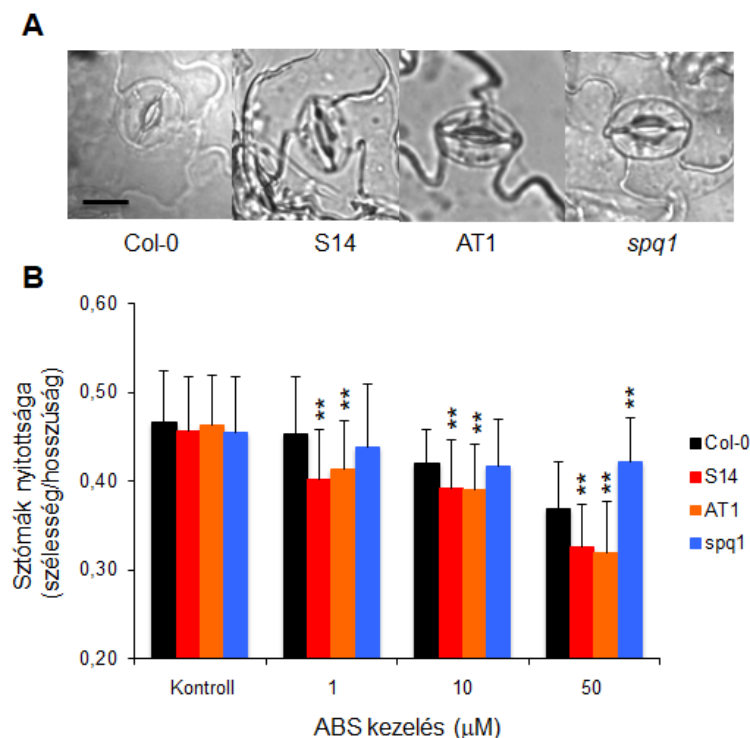
Az ABS egyik legfontosabb funkciója a csírázás gátlása, és az ABS érzékenységbeli különbségeket sokszor csírázási tesztekben mutatják ki. Az ABS hatását az SPQ-túltermelő és mutáns vonalakon csírázási tesztekkel is tanulmányoztuk. Többféle koncentrációt (0-3 μM) alkalmazva megállapítottuk, hogy az LcSPQ és AtSPQ túltermelő magok csírázási üteme minden ABS koncentráción hasonló volt a vad típushoz, míg az *spq1* mutáns magok ABS hatására korábban csíráztak (41. ábra). A csírázási kísérletek megerősítették a *spq1* mutáns ABS toleranciáját, míg a SPQ túltermelés nem, vagy csak kismértékben befolyásolta a csírázáskori ABS érzékenységet.



41. ábra: Az ABS érzékenység vizsgálata. Az ABS hatása az S14 (35S::LcSPQ), AT1 (35S::AtSPQ), *spq1* mutáns és vad típusú (Col-0) magok csírázására 0-0,3-1-3 μM ABS tartalmú táptalajon.

5.6.3 A SPQ befolyásolja a sztóma nyitottságot

Vízmegevonás alatt a sztómamozgás szabályozása az egyik legjelentősebb növényi válaszreakció, záródásukkal megakadályozható a további vízvesztés. E folyamat szabályozása az abszcizinsav legjelentősebb fiziológiai funkciói közé sorolható, mivel szárazság hatására az ABS által kiváltott turgor változás miatt a zárósejteket csukott állapotba kerülnek (Mustilli és mtsai., 2002; Finkelstein, 2013). Mivel a SPQ-túltermelés és -hiány befolyásolta az ABS érzékenységet ezért kíváncsiak voltunk, hogy az SPQ-túltermelő, illetve *spq1* mutáns vonalban az ABS milyen mértékben indukálja a sztómáik záródását. Ezért a levelekből készített epidermisz nyúzatokat különböző koncentrációjú ABS oldatokba helyezve regisztráltuk a sztómák nyitottságának változását (szélesség/átmérő). A kezeletlen vad típus (Col-0), SPQ-túltermelő (S14, AT1) és *spq1* mutáns vonalak pórusai hasonlóak voltak. A növekvő ABS koncentrációk (1 μ M, 10 μ M és 50 μ M) a túltermelő vonalak sztómáinak gyorsabb záródásához vezettek, míg a *spq1* mutáns sztómái kevésbé reagáltak a hormon által kiváltott sztómazáródásra (42. ábra).



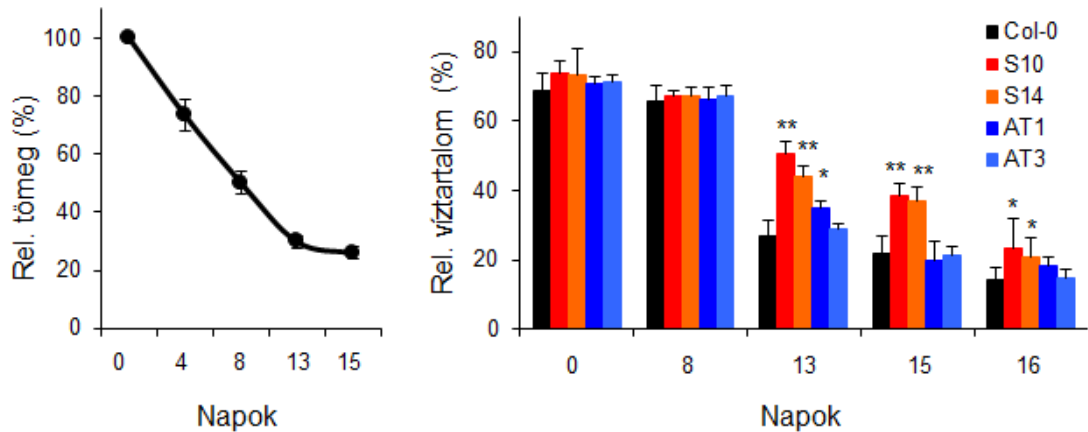
42. ábra: **Az SPQ-túltermelő és mutáns vonalak sztómamozgása.** Az epidermisz nyúzatokat a mikroszkópos képek készítése előtt 0-1-10-50 μ M ABS tartalmú pufferben 3 órát inkubáltuk. A) Col-0, S14, AT1 és *spq1* növények tipikus gázcsere nyílásai a kezeléseket követően. Méretskála: 20 μ m B) A sztómák nyitottságának mértéke, a nyílás átmérőjének és hosszának az arányát alapul véve. A vad típushoz viszonyítva sd, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-próba), $n = 50$.

A kísérlet alapján elmondhatjuk, hogy a *Lepidium* és *Arabidopsis* fehérjék megnövelik a sztómazárósejtek érzékenységét a hormonnal szemben, és ezáltal elősegítik azok gyorsabb ütemben történő záródását.

5.7 Az SPQ fehérjék túltermelése és a szárazságtolerancia

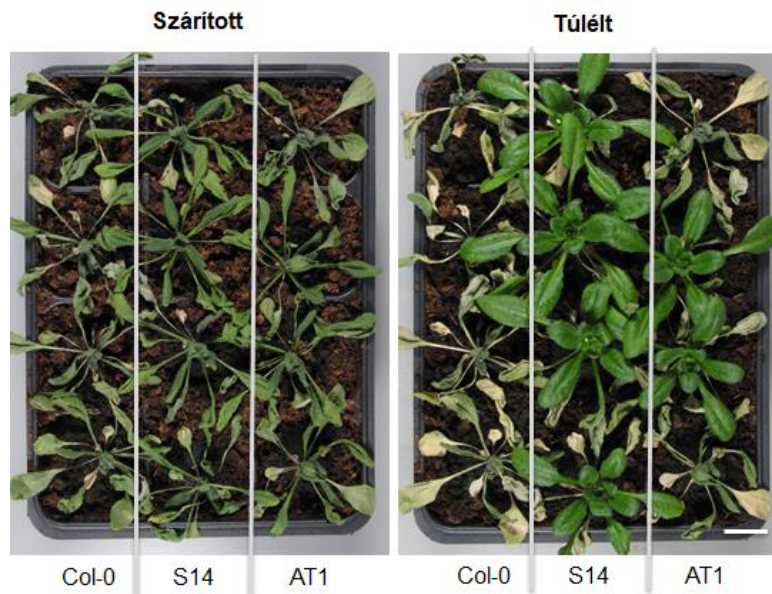
Számos közlemény leírja, hogy az abszcizinsav érzékenységet meghatározó jelátvitel az egyik legfontosabb szabályozó mechanizmus, ami vízhiány esetén csökkenti a növények vízvesztését és javítja a szárazsággal szembeni toleranciát. Mivel több *in vitro* tesztben a SPQ-túltermelő vonalak magasabb ABS érzékenységet mutattak, kíváncsiak voltunk, hogy a SPQ túltermelés miképp befolyásolja a transzgenikus növények szárazságtűrését. A szárazságtűrés meghatározása céljából üvegházban és növénynevelő kamrában nevelt 4 hetes vad típusú, LcSPQ és AtSPQ túltermelő növények öntözését különböző ideig szüneteltettük, majd a növények újra locsolásával teszteltük az újraéledésük képességét. A szárítások során a cserepek tömegének és a levelek relatív víztartalmának (RWC) a meghatározásával követtük nyomon a talaj, illetve a növények víztartalmában bekövetkező változást. Amikor a cserepek relatív tömege 25%-ra és a vad típusú növények (Col-0) relatív víztartalma 20%-ra csökkent, újra locsoltuk a növényeket, hogy a túlélést teszteljük. A kiszáritás során mértük a növényekben a szárazság hatására bekövetkező élettani változásokat: relatív víztartalom (RWC), lipid-peroxidáció mértéke (MDA), PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebessége (ETR).

A növények vízhiányos állapotának a mérésére használt egyik legjelentősebb paraméter azok relatív víztartalma (RWC). Egy egészséges növény RWC értéke 85%-95% közé tehető. Ennek a kritikus érték alá való esése a szövetek pusztulását tükrözi, mely fajonként és szövettípusonként más (Barr, 1962). A RWC változás alapján a SPQ-túltermelő növények vízvesztése kisebb mértékű volt, mint a vad típusú növényeké, bár az egyes vonalak között számottevő különbségeket találtunk (43. Ábra).



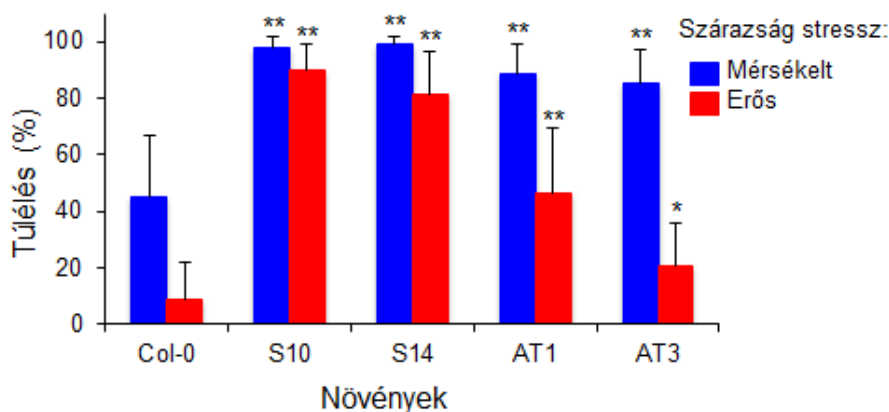
43. ábra: Vad típusú és SPQ-túltermelő *Arabidopsis* növények vízvesztése szárítás közben. A) Cserepek relatív tömegének és B) a növények relatív víztartalmának a változása a szárítás során. A relatív tömeg méréséhez 171 cserép tömegét vettük figyelembe. A relatív víztartalom méréséhez vonalanként 5 mintát és mintánként 3 levelet gyűjtöttünk. sd, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-próba), a vad típusához viszonyítva.

A természetben a szárazságtűrés egyik legfontosabb ismérve a vízvesztésnek kitett növényeknek stresszhatást túlélő képessége. A tolerancia teszteléséhez a különböző idejű vízmegvonást követő újra locsolás után 5-7 nappal vizsgáltuk a turgort visszanyerő, zöld túlélő és a hervadt, sárga, kiszáradt növények arányát (44. ábra).



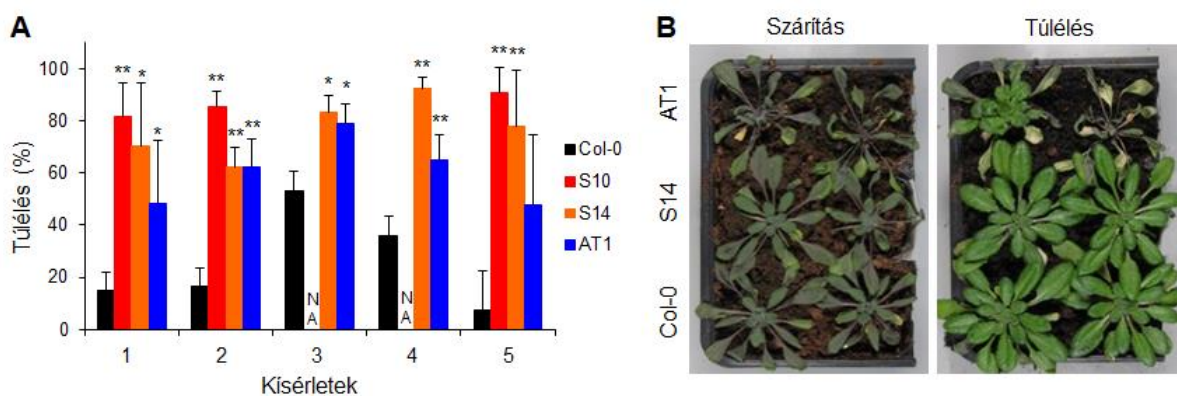
44. ábra: Az SPQ-túltermelő vonalak szárazságtoleranciája. A vad típusú Col-0 és 35S::LcSPQ (S14) és a 35S::AtSPQ (AT1) növények 16 nap vízmegvonást követően. A fotót 4 nappal a visszalocsolás után készítettük. Méretskála 1 cm.

A túlélő és kiszáradt növények számának meghatározásával számszerűsítettük a tolerancia mértékét. Az üvegházban tesztelt vonalak esetében a mérsékelt szárazságstressz után a vad típusú Col-0 növények 50 %-a élt túl, míg erős stressz követően csak 10 %-uk volt képes regenerálódni. Egy tipikus kísérletben a vad típusú növények 50 %-os arányához képest az SPQ túltermelő (S10, S14, AT1, AT3) növények túlélési képessége 80 – 95 % között volt. Erősebb stressz következtében a Col-0 (vad típusú) növények regenerációs képessége 10 %-re esett vissza, az LcSPQ túltermelő (S10, S14) növények túlélése 80 – 90 %-os volt míg az AtSPQ transzgenikus (AT1, AT3) növények 20 – 50% között éltek túl a száritást (45. ábra) volt.



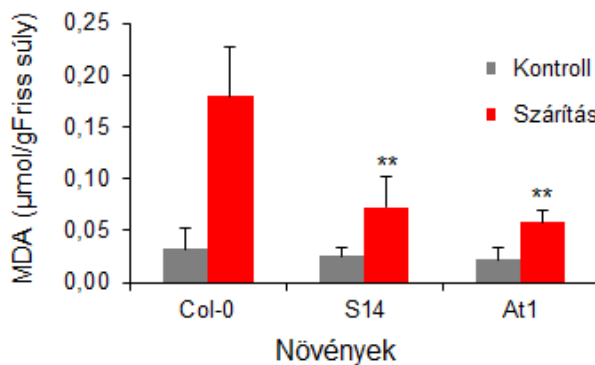
45. ábra: **Az SPQ-túltermelő vonalak szárazságtoleranciája.** A vad típusú Col-0, LcSPQ (S10, S14) és AtSPQ (AT1, AT3) túltermelő növények túlélési aránya 15 (mérsékelt stressz) és 16 (erős stressz) nap vízmegvonást követően, 4 nappal a visszalocsolás után. sd, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-próba), $n = 96 - 120$.

A transzgenikus vonalak szárazságtoleranciáját több alkalommal és különböző körülmények között (növénynevelő kamra, üvegház) is megvizsgáltuk. Annak ellenére, hogy a tesztelt genotípusok számszerű túlélési képessége kísérletenként változott, a SPQ túltermelő vonalak minden esetben jobban regenerálódtak, mint a vad típusú növények. A LcSPQ túltermelő vonalak valamivel jobb toleranciát mutattak, mint az AtSPQ transzgenikus növények (46. ábra).



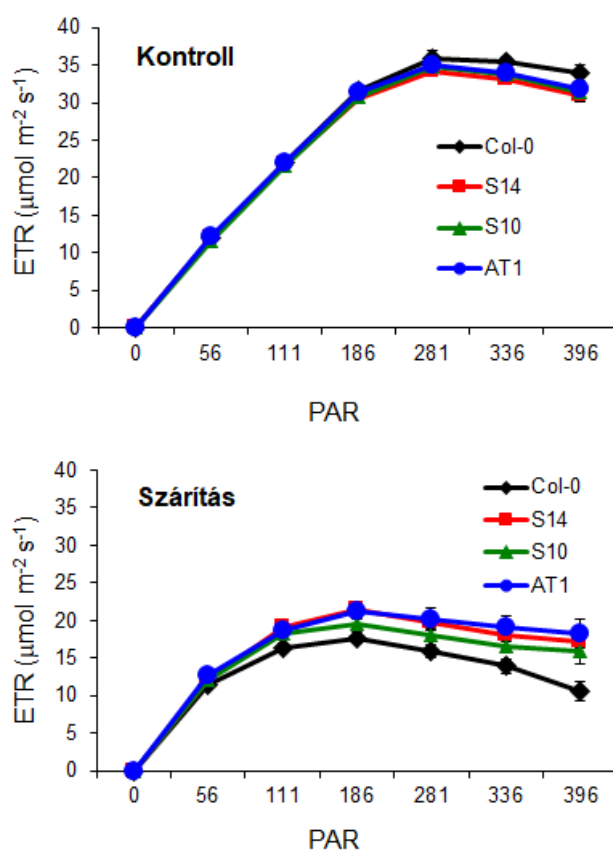
46. ábra: **Az SPQ-túltermelő vonalak szárazságtoleranciája.** A) A vad típusú (Col-0) és LcSPQ (S10, S14), AtSPQ (AT1) túltermelő növények túlélési aránya 5 független kísérlet alatt. 1-3 kísérlet: a növényeket kontrollált körülmények között neveltük, majd 4 hetes korukban 12 napig, 4 – 5 kísérlet: üvegházban 14 – 16 napig felfüggesztettük a locsolásukat. A regenerációs képességüket 7 nappal a visszalocsolást követően állapítottuk meg a túlélő növények százalékos arányának a figyelembevételével. B) Szárítást túlélő növények fotója a 4. kísérletből. Sd, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (t-próba).

A szárítások során a genotípusok toleranciáját lipid-peroxidációjuk mértékének a meghatározásával is ellenőriztük. A MDA tartalom 10 nap dehidráció után megemelkedett mind a vad típusú (Col-0) mind a transzgenikus vonalakban (S14, AT1) de a SPQ túltermelő vonalak esetében a lipid-peroxidáció emelkedése alacsonyabb volt, vagyis ezekben a növényekben a szárazságstressz kisebb oxidatív károsodást okozott (47. ábra).



47. ábra: **A lipid-peroxidáció változása szárazságstressznek kitett növényekben.** Kontroll és 10 napig szárított Col-0 (vad típusú), S14 (35S::LcSPQ) és AT1 (35S::AtSPQ) növények lipid-peroxidációjának mértéke. Sd, ** $p \leq 0,01$ (t-próba).

Szárazságstressz a növényekben számos fiziológiai változást okoz, melyek közül az egyik legjelentősebb a fotoszintetikus apparátus károsodása. A növények fotoszintetikus tulajdonságainak jellemzése érdekében összehasonlítottuk a szárításnak kitett vad típusú és SPQ túltermelő növények ETR értékeit. A kísérletek során az öntözött növények ETR értékei hasonlóak voltak a vad típusú (Col-0), LcSPQ (S10, S14) és AtSPQ (AT1) túltermelő transzgénikus növényekben. 10 nap dehidrációt követően jelentős csökkenés volt megfigyelhető az összes vonal esetében, azonban az S10, S14 és AT1 vonalaknál ez a csökkenés nem volt olyan drasztikus, mint a Col-0 növényeknél (48. ábra). Mindebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a *Lepidium* és *Arabidopsis* SPQ túltermeltetése stabilizálja a szárításnak kitett növények fotoszintetikus aktivitását.



48. ábra: A **szárított és jól öntözött növények ETR értékei**. A vad típusú (Col-0) és SPQ túltermelő növények (S10, S14, AT1) elektrontranszport rátájában bekövetkező változások kontroll körülmények között és 10 nap vízmegvonást követően. Vonalként 40 mérési pont alapján, n = 20.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1 Kis paraquat rezisztens (SPQ) fehérje azonosítása

Az *Arabidopsis thaliana* genomjában (120 Mbp) 3241 a kis peptideket (SP, < 100 aminosav) kódoló átírt szakaszok száma (Open Reading Frames, ORFs), amelyek az összes gén 11%-át teszik ki (Su és mtsai., 2013). Az eddig leírt kis fehérjéknek szerepük van a növény védelmével kapcsolatos kommunikációban és jelátviteli utak szabályozásában (Su és mtsai., 2013, Fiume és mtsai., 2016). A halofita *Lepidium crassifolium*ban azonosítottunk egy kis fehérjét, melynek a túltermeltetése paraquat rezisztenciát eredményezett (SPQ) a transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növényekben (Rigó és mtsai., 2016). *In silico* elemzések során úgy tűnik, hogy az SPQ szerű fehérjék megtalálhatók minden magasabb rendű növényben. A *Lepidium*ban azonosított SPQ *Arabidopsis* homológja 70 aminosav hosszúságú és 8 kDa tömegű kis fehérje, ami 95 %-os szekvencia hasonlóságot mutat a sziki zsázsában beazonosított fehérjével. Az elemzés szerint a SPQ fehérje szekvenciák egyetlen egy konzervált doménnel, egy N-terminális szignál szekvenciával rendelkeznek. A vad típusú *Lepidium* és *Arabidopsis* növényekben az *SPQ* gének expresszióját só, ozmotikus és oxidatív stresszkezelések nem befolyásolták számottevően. Az interneten hozzáférhető *Arabidopsis* expressziós adatbázisok szerint az *AtSPQ* gén transzkripcióját nem, vagy csak kismértékben befolyásolják a környezeti hatások, vagyis az expressziós adatok nem utalnak arra, hogy a két növényfajban található *SPQ* géneknek szerepük lehet az abiotikus stresszhatások szabályozásában. Ennek ellenére az *LcSPQ* és *AtSPQ* cDNS-ek túltermeltetése figyelemreméltó paraquat rezisztencia kialakulásához vezetett a transzgénikus *Arabidopsis* növényekben (Rigó és mtsai., 2016), ami arra enged következtetni, hogy a rezisztencia nem a *Lepidium* SPQ sajátossága, hanem az *SPQ*-k megemelkedett expressziójának a következménye. További szekvencia analízisek nem mutattak hasonlóságot más paraquat rezisztenciáért felelős génekkel, tehát az SPQ fehérjének egyedülálló szerepe van a herbicid rezisztencia kialakulásában.

6.2 Az SPQ fehérjék szerepe a hormon és oxidatív stresszválasz szabályozásában

A paraquat, más néven metil-viologén, a PSI herbicidjei közé tartozik, mivel az I-es fotokémiai rendszer redukáló oldalán, mint akceptor molekula megzavarja a fotoszintetikus elektrontranszportot, ezáltal meggátolja a ferredoxin és NADP⁺ redukciós folyamatait. A paraquat az elektronokat felvéve kétvegyértékű kation (PQ²⁺) formából egyvegyértékű kation gyökké alakul (PQ^{•+}), ami után képes ismét oxidált állapotba kerülni, így a szuperoxid gyök képződés katalizátorának számít (Hawkes, 2014; Lascano R., 2012; Tiwari és mtsai., 2019). Az SPQ túltermeltetése csökkentette a paraquat által kiváltott károsodás mértékét a fotoszintézis során, és elhárította a PSII működésének a hanyatlását, mivel a herbicid hatására jelentkező PSII maximális és működő fotokémiai kvantumhatásfokának a csökkenése csak a vad típusú növényekben volt megfigyelhető, míg a transzgenikus növényekben nem. Az SPQ fehérjék védő funkciója valószínűleg nem korlátozódik csak a fotoszintézis során lezajló folyamatokra, mivel a megnövekedett expressziójuk következtében fellépő paraquat rezisztencia megfigyelhető volt a sötétben csíráztatott etiolált növényeken és a nem fotoszintetizáló gyökereken is. Ezt a feltételezést támasztja alá a GFP-fuzionált SPQ fehérjék vizsgálata *Arabidopsis* sejtekben, ami citoplazmatikus lokalizációra utal. A nem fotoszintetizáló szövetekben, illetve állati szervezetekben a paraquat a toxicitását az I, III és IV-es mitokondriális légzési komplexek elektrontranszportjának gátlásán keresztül feje ki, ami ROS képződéshez, megemelkedett lipid-peroxidációhoz és a sejtthálhoz vezethet (Krall és mtsai., 1988; Cochemé és Murphy 2008; Blanco-Ayala és mtsai., 2014). Növényekben a paraquat ROS generáló képessége fény hiányában szintén a mitokondriumban jelentkezhet (Bowler és mtsai., 1991; Cui és mtsai., 2019).

A herbicid rezisztencia mechanizmusának a feltárása során számos hipotézis született, melyek között szerepel a xenobiotikum megváltozott felvétele, szekvesztrálása a vakuólumokba, vagy az megemelkedett ROS detoxifikáció révén az oxidatív károsodás csökkentése (Hawkes, 2014). Mivel a SPQ-GFP fehérjék nem mutattak plazmamembránhoz kötött lokalizációt, így valószínűsíthető, hogy azok direkt módon nem a paraquat felvételének mechanizmusát szabályozzák.

A paraquat és a hozzá strukturálisan hasonló poliaminok kompetitív módon gátolják egymás felvételét a kukorica gyökérsejtekbe (Hart és mtsai., 1992). A herbicid felvétele a növényi sejtekbe részben a poliaminok felvételével megegyező útvonalon történik, ezáltal a poliamin transzporterek fontos szerepet játszanak a herbicid transzportjában (Fujita és mtsai., 2012). Több poliamin transzportfolyamatokban károsodott mutánsban csökkent a paraquat felvétel mértéke, ami bizonyos fokú rezisztenciához vezetett (Fujita és Shinozaki, 2014). A paraquat rezisztens *par1* mutánsban a Golgi lokalizált LAT családba tartozó fehérje funkciója sérült, ami gátolta a paraquat bejutását a kloroplasztiszba (Li és mtsai., 2013). A knock-out *prd11* mutánsban egy ABC transzporter gén hiánya vezetett a rezisztencia kialakulásához, ami megakadályozta a paraquat felvételét (Xi és mtsai., 2012). Hasonlóan paraquat rezisztens a *rmv1* mutáns is, amiben az *RMVI* gén természetes variánsa egy inaktív L-típusú aminosav permeázt (LAT) kódol (Fujita és mtsai., 2012). Eredményeink szerint a túltermelő transzgenikus *Arabidopsis* növények hasonló poliamin tartalommal rendelkeznek, mint a vad típusú Columbia, illetve putreszcin, spermin és spermidin hasonló módon gátolta a vad típusú és a SPQ-túltermelő növények gyökérnövekedését. Habár az SPQ fehérjék szerepét a transzport folyamatokban nem zárhatjuk ki, nem valószínű, hogy SPQ túltermelés következtében kialakuló rezisztencia a poliamin metabolizmussal vagy felvétellel áll kapcsolatban.

A SPQ-túltermelő növények fokozott érzékenységet mutattak az ABS-el szemben, míg a funkcióvesztéses *spq1* mutáns toleráns volt a hormonra az alkalmazott csírázás, növekedés és a sztómazáródási tesztekben. A ROS, különösen a hidrogén-peroxid a sejten belüli jelátvitelben is fontos szerepet játszik. A hidrogén-peroxid annak ellenére, hogy káros ROS-nak számít, a biotikus és abiotikus stressz során a jeltovábbításban is fontos szerepet tölt be (Goldack és mtsai., 2012). A peroxid szignál és az ABS jelátvitel közötti összefüggést már több növényfaj esetében leírták. Az ABS aktiválni tudja az antioxidáns enzimek működését, amiben a H_2O_2 a jeltovábbítás fontos eleme (Jiang és mtsai., 2002). Az ABS és a paraquat együttesen indukálja és irányítja az olyan antioxidáns enzimek működését, mint a SOD, APX és glutation-reduktáz, melyek az glutation-aszkorbát ciklus esszenciális antioxidáns enzimjei (Hu és mtsai., 2005). Az ABS hatással van az antioxidáns enzimek aktivitására az ozmotikus stressz alatt, ami a kialakuló oxidatív károsodás mértékét is enyhíti (Ozfidan és mtsai., 2012).

Az *rcd1* mutáns fényben és sötétben is paraquat rezisztenciát mutatott, ami hasonló az SPQ túltermelő transzgenikus növények rezisztenciájához (Ahlfors és mtsai., 2004; Fujibe és mtsai., 2004; Cui és mtsai., 2019). Egy új tanulmány szerint a paraquat kezelt *Arabidopsis* növények fotoszintetikus hatékonyságának fenntartásában az abszcizinsavnak is meghatározó szerepe lehet (Cui és mtsai., 2019). A SPQ fehérjék megemelkedett aktivitása következtében kialakuló paraquat rezisztencia és ABS hiperszenzitívitas közötti kapcsolat valószínűleg a ROS-hoz kapcsolódó jelátviteli utak módosításával, befolyásolásával magyarázható.

6.3 Az SPQ fehérjét túltermelő transzgenikus növények szárazságtoleranciája

Az SPQ-túltermelő növények megemelkedett szárazságtoleranciája az ABS hiperszenzitivitással járó gyorsabb sztómazáródás következménye is lehet. A hormon megnövekedett koncentrációja a zárósejtekben H₂O₂ akkumulációjához vezet, ami a Ca²⁺ csatornák aktivációján keresztül kiváltja a sztómazáródást (Foyer és Harbinson, 1994). Az abiotikus stressz során a PSII redukált működése a zárósejtek kloroplasztiszaiban szuperoxid és hidrogén-peroxid termelődéséhez vezet, melyek hírvivő molekulaként funkcionálhatnak és segíthetik az ABS által kiváltott sztómazáródást (Pfannschmidt, 2003, Wang és Song, 2008). Mindemellert az SPQ-túltermelő vonalak sztómazáródása közrejátszhat a szárazságstressz alatt az oxidatív károsodás csökkenésében is, ami pozitív hatással lehet a fotoszintézisre is. Az SPQ növények hosszantartó dehidráció után a vad típusnál jobban megőrizték az életképességüket és egyúttal PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebessége (ETR) is kevésbé csökkent. Míg a zárósejtek ABS érzékenysége csökkentette a levelek gázcseréjét, a csökkent oxidatív károsodás megkönnyítette a fotoszintetikus reakciók fenntarthatóságát. A kiszáradástűrő növényfajok toleranciájához és a növények túléléséhez a szárazság alatt elengedhetetlen a fotoszintetikus rendszerek védelme és a megfelelő antioxidáns rendszer jelenléte (Giarola és mtsai., 2017). Habár az SPQ fehérjék pontos funkciójának megértése további kísérleteket igényel, eddigi eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a SPQ fehérjék fontos összekötő pontként szolgálhatnak az ABS és H₂O₂ szabályozási rendszerben, ami a paraquat rezisztencia kialakulásáért is felelős lehet. Az *SPQ* gének megnövekedett aktivitása által biztosított szárazságtolerancia és herbicid rezisztencia agrobiotechnológiai szempontból is érdekes lehet.

6.4 PlantSize képelemző program fejlesztése

A nem destruktív fenomikai módszerek alkalmazása lehetővé teszi több mérés egyidejű elvégzését, illetve az egyedi növények paramétereinek időbeni követését, ezáltal a növények fenotípusának és fiziológiai plaszticitásának a hatékony jellemzését (Grosskinsky és mtsai., 2015; Vanhaeren és mtsai., 2015; Awlia és mtsai., 2016). A kereskedelmi cégek (pl. a LemnaTech vagy PSI) által forgalmazott nagy áteresztőképességű fenotipizáló rendszerek hatékonyan és többféle képalkotó eljárással tudják elvégezni a növények felvételezését, valamint a digitális adatok kiértékelését. Az ilyen rendszerek ugyanakkor igen drágák és a legtöbb laboratórium számára nem elérhetőek. Az utóbbi években többféle számítógépes módszer és alkalmazás vált elérhetővé, amik alkalmasak a növények bizonyos tulajdonságainak analizésére, de ezek az eljárások többnyire egyféle analizisre specializáltak (2. táblázat).

2. táblázat. A PlantSize program összehasonlítása más számítógépes módszerekkel és alkalmazásokkal.

Program /Módszer	Detektálás	Nevelési körülmény	Méret	Alak	Szín	Program nyelv/Szoftver	Kimeneti formátum	Referencia
LAMINA	Egyéni	Üvegházi	Igen	Igen	Nem	JAVA	.txt	Bylesjo és mtsai., 2008
Hue	Egyéni	Üvegházi	Nem	Nem	Igen	Matlab	.xls	Majer és mtsai., 2010
ImageJ	Egyéni	<i>In vitro</i> / Üvegházi	Igen	Igen	Nem	Java, R	.txt	Schindelin és mtsai., 2015
RosetteR	Többféle	<i>In vitro</i>	Igen	Igen	Nem	R	R fájl	Tome és mtsai., 2017
ColorChaker	Többféle	<i>In vitro</i>	Nem	Nem	Igen	ImageJ, Photoshop, Matlab	.csv	Liang és mtsai., 2017
Phenotiki	Többféle	Üvegházi	Igen	Igen	Igen	Matlab, CyVerse Cloud	.csv	Minervini és mtsai., 2017
Phenophyle	Többféle	Üvegházi	Igen	Igen	Nem	Web alapú, C	.csv	Green és mtsai., 2012
Rosette Tracker	Többféle	Üvegházi	Igen	Igen	Nem	JAVA, ImageJ	.txt, .csv, .xls	De Vylder és mtsai., 2012
PlantScreen Analyzer	Többféle	Üvegházi	Igen	Igen	Nem			Awlia és mtsai., 2016
PlantSize	Többféle	<i>In vitro</i>	Igen	Igen	Igen	Matlab	.xls	Jelen munka

A régebbi programok esetében, mint a LAMINA vagy ImageJ a képelemzés általában egyféle paraméterre korlátozódik és manuálisan, egyesével történik (Bylesjo és mtsai., 2008, Schindelin és mtsai., 2015). Ezek a programok általában makrók írásával tehetőek hatékonyabbá, ami programozói háttérrel kíván (Schindelin és mtsai., 2015). Az újabb alkalmazásokkal egyszerre több növény szimultán jellemzése is megoldható, ami fontos szempont a nagy áteresztőképességű elemzésekhez (De Vylder és mtsai., 2012, Green és mtsai., 2012; Minervini és mtsai., 2017; Tome és mtsai., 2017).

Annak érdekében, hogy a *Lepidium crassifolium* géneket expresszáló transzgenikus *Arabidopsis thaliana* vonalak stressztűrését hatékonyan jellemezhessük, egy képelemző programot fejlesztettünk, és kidolgoztunk egy kép analízison alapuló fenotipizálási protokollt. A digitális fotókat feldolgozó PlantSize program segítségével egyszerűen és költséghatékonyan kaphatunk információt a növények fenológiai és fiziológiai jellemzőiről. A klorofill-tartalom meghatározására használt számítógépes képelemző módszerek általában a Hue vagy RGB szintér segítségével becsülték meg a növények pigment tartalmát, de morfológiai paraméterek megállapítására nem alkalmasak (Majer és mtsai., 2010, Liang és mtsai., 2017). A PlantSize programmal egyszerre több növényt is vizsgálhatunk és többféle paraméterekről szerezhetünk információt: egyidejűleg vizsgálható a növények mérete, alakja és színe (klorofill és antocián tartalom), ami egyedülállónak mondható az *in vitro* képelemző alkalmazások között. A technológia alkalmazása nem igényel költséges berendezéseket, a képalkotás egy hagyományos digitális kamera segítségével történik, majd a program felhasználóbarát felületén keresztül a képelemzés gyorsan (kb. 5-10 másodperc/fotó) elvégezhető. A szabad forráskódú program elérhetővé teszi a nagy áteresztő képeségű adatok generálását olyan laborokban is, ahol a költséges fenotipizáló platformok használata nem megoldható. A technológiát alapvetően *in vitro Arabidopsis* növények vizsgálatához optimalizáltuk, de megfelelő kalibrációt követően bármilyen lapos levélzettel, rozettával rendelkező növény jellemzésére is alkalmassá tehető.

A PlantSize segítségével könnyen és költséghatékonyan tudtuk meghatározni a transzgenikus és vad típusú növények *in vitro* növekedési ütemét, klorofill és antocián tartalmát a különböző stresszkezelések (paraquat, só, ozmotikus stressz, ABS) során. A PlantSize rendszer segítségével sikerült olyan nagyszámú mérést elvégezni, ami a *Lepidium* cDNS klónokat expresszáló transzgenikus *Arabidopsis* vonalak jellemzéséhez szükséges volt. A kvantitatív adatok birtokában a korábbiaknál pontosabban tudtuk meghatározni azokat a kicsi, de szignifikáns növekedési, morfológiai vagy élettani különbségeket, amik a stressztoleranciát jellemezték.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Növénybiológiai Intézetében, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoporton belül végeztem el. Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítettek munkámat. Elsősorban témavezetőimnek a szakmai iránymutatást és támogatást, Dr. Szabados Lászlónak, és Dr. Zsigmond Laurának, aki tudásával és tanácsaival sok akadályon átsegített, mind szakmai és emberi vonatkozásban. Hasonlóképp hálával tartozom Dr. Rigó Gábornak mentorálásáért és hogy hozzá bármikor fordulhattam segítségért. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Valkai Ildikó Annának, akivel a genetikai szűrés során kapott gének jellemzése és a PlantSize program fejlesztése alatt együtt dolgozhattam és ezáltal tőle, mint újonc vidám légkörben sokat tanulhattam. Köszönöm Sass Lászlónak a PlantSize fejlesztése során végzett meghatározó és kimagasló munkáját. Szeretnék köszönetet mondani a csoportom volt és jelenlegi tagjainak Dr. Koncz Csabának, Dr. Cséplő Ágnesnek, Dr. Mary Joseph Prathibának, Kovács Hajnalkának, Canjavec Bogátának, Imran, Abu Babának, Benyó Dánielnek, András Norbertnek, Sahiba Siddiquinak és James Smartnak, a sok bátorítást és hogy kellemes légkört biztosítottak az évek során. Szeretném megköszönni Király Annamáriának és Juhász-Erdélyi Annabellának a kísérletek során nyújtott kiváló asszisztensi segítségét. Köszönettel tartozom továbbá a Kutatóközpont korábbi és jelenlegi főigazgatóinak, Dr. Ormos Pálnak, Dr. Nagy Ferencnek, és Dr. Vass Imrének, a Növénybiológia Intézet igazgatójának, hogy munkámat támogatták.

Köszönöm barátaimnak, hogy végig mellettem álltak, bátorítottak és a lakótársaimnak a sok türelmét. A legnagyobb hálával családomnak, elsősorban édesanyámnak tartozom, hogy kitarott mellettem, támogatott és ösztönzött.

A doktori munkám anyagi háttérét az alábbi pályázatok finanszírozták:

GINOP-2.3.2-15-2016-00001, NKFI FK-128920 és Magyar Tudományos Akadémia Fiatal Kutatói Ösztöndíja.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Adamsen F. J., Pinter P. J., Barnes E. M., Lamorte R. L., Wall G. W., Leavitt S. W., Kimball B.A. (1999). Measuring wheat senescence with a digital camera. *Crop Science* **39**, 719-724
- Ahanger M. A., Akram N. A., Ashraf M., Alyemeni M. N., Wijaya L., Ahmad P. (2017) Plant responses to environmental stresses—from gene to biotechnology. *AoB PLANTS*, **9** (4), plx025.
- Ahlfors R., Lang S., Overmyer K., Jaspers P., Brosche M., Tauriainen A., Kollist H., Tuominen H., Belles-Boix E., Piippo M., Inze D., Palva E.T. & Kangasjarvi J. (2004) Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell*, **16**, 1925-1937.
- 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
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 373-399.
- Arvidsson S., Perez-Rodriguez P., Mueller-Roeber, B. (2011). A growth phenotyping pipeline for *Arabidopsis thaliana* integrating image analysis and rosette area modeling for robust quantification of genotype effects. *New Phytol* **191**, 895-907.
- Awlia M., Nigro A., Fajkus J., Schmoeckel S. M., Negrao S., Santelia D., Trtilek M., Tester M., Julkowska M.M., Panzarova K. (2016). High-Throughput Non-destructive Phenotyping of Traits that Contribute to Salinity Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **7**, 1414.
- Baba A. I., Rigo G., Ayaydin F., Rehman A.U., Andrasi N., Zsigmond L., Valkai I., Urbancsok J., Vass I., Pasternak T., Palme K., Szabados L. & Cseplo A. (2018) Functional Analysis of the *Arabidopsis thaliana* CDPK-Related Kinase Family: AtCRK1 Regulates Responses to Continuous Light. *Int J Mol Sci*, **19**.

- Badawi G.H., Kawano N., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kubo A. & Tanaka K. (2004) Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol Plant*, **121**, 231-238.
- Barr H.D., Weatherley, P.E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.*, **15**, 413-428.
- Bartels S., Boller T. (2015) Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 5183–5193.
- Bates B., Kundzewicz Z., Wu S. (2008) Climate Change and Water. *Intergovernmental Panel on Climate Change Secretariat*.
- Bechtold U. (2018) Plant Life in Extreme Environments: How Do You Improve Drought Tolerance. *Front Plant Sci.* **9**, 543.
- Bechtold N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **316**, 1194–1199.
- Blanco-Ayala T., Anderica-Romero A.C. & Pedraza-Chaverri J. (2014) New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res*, **48**, 623-640.
- Bona M. (2014) Taxonomic revision of *Lepidium* L. (Brassicaceae) from Turkey. *Istanbul Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Istanbul*, **44** (1), 31-62.
- Boursiac Y., L eran S., Corratg e-Faillie C., Gojon A., Krouk G., Lacombe B. (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci.*, **18** (6), 325-333.
- Bowler C., Sooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M. & Inz e D. (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J*, **10**, 1723-1732.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brooks T. L., Miller N. D., Spalding E. P. (2010). Plasticity of Arabidopsis root gravitropism throughout a multidimensional condition space quantified by automated image analysis. *Plant Physiol* **152**, 206-216.
- Burla B., Pfrunder S., Nagy R., Francisco R. M., Lee Y., Martinoia E. (2013) Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in Arabidopsis. *Plant Phys.*, **163**, 1446-1458.
- Bylesjo M., Segura V., Soolanayakanahally R. Y., Rae A. M., Trygg J., Gustafsson P., Jansson S., Street N. R. (2008). LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biol* **8**, 82.

- Chen Z. & Gallie D.R. (2015) Ethylene Regulates Energy-Dependent Non-Photochemical Quenching in Arabidopsis through Repression of the Xanthophyll Cycle. *PLoS ONE*, **10**, e0144209.
- Chiang H.C., Lo J.C. & Yeh K.C. (2006) Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator Arabidopsis halleri: a genomic survey with cDNA microarray. *Environ Sci Technol*, **40**, 6792-6798.
- Chomczynski P. & Mackey K. (1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, **19**, 942-945.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, **90**, 856– 867.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998), Floral dip: a simplified method for Agrobacterium- mediated transformation of Arabidopsis thaliana . *The Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Cochemé H.M. & Murphy M.P. (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem*, **283**, 1786-1798.
- Cornette J. L., Cease K B., Margalit H., Spouge J. L., Berzofsky J. A., DeLisi C. (1987) Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins, *Journal of Molecular Biology*, **195**, 659-685.
- Corratgé-Faillie C. and Lacombe B. (2017) Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *Journal of Experimental Botany*, **68**, 3107–3113.
- Cramer G. R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M. & Shinozaki K. (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* **11**, 163
- Cui F., Brosche M., Shapiguzov A., He X.Q., Vainonen J.P., Leppala J., Trotta A., Kangasjarvi S., Salojarvi J., Kangasjarvi J. & Overmyer K. (2019) Interaction of methyl viologen-induced chloroplast and mitochondrial signalling in Arabidopsis. *Free Radic Biol Med*, **134**, 555-566.
- Cummins I., Cole D.J. & Edwards R. (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J*, **18**, 285-292.
- Daszkowska-Golec A. (2016) The Role of Abscisic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress. *Drought Stress Tolerance in Plants*, **Vol 2**, 123-151.
- De Vylder J., Vandenbussche F., Hu Y., Philips W., Van Der Straeten D. (2012). Rosette tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiol* **160**, 1149-1159.

- De Zelicourt A., Colcombet, J., Hir, H. (2016) The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends in Plant Sci.* **21**(8), 677-685.
- Dhondt S., Wuyts N., and Inze D. (2013). Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. *Trends Plant Sci* **18**, 428-439.
- Dhondt S., Gonzalez N., Blomme J., De Milde L., Van Daele T., Van Akoleyen D., Storme V., Coppens F., T. S. Beemster G., Inze, D. (2014). High-resolution time-resolved imaging of in vitro Arabidopsis rosette growth. *Plant J* **80**, 172-184.
- Ding H.D., Zhang X.H., Xu S.C., Sun L.L., Jiang M.Y., Zhang A.Y. & Jin Y.G. (2009) Induction of protection against paraquat-induced oxidative damage by abscisic acid in maize leaves is mediated through mitogen-activated protein kinase. *J Integr Plant Biol*, **51**, 961-972.
- DiTomaso J. M., Hart J. J., Kochian L. V. (1993) Compartmentation Analysis of Paraquat Fluxes in Maize Roots as a Means of Estimating the Rate of Vacuolar Accumulation and Translocation to Shoots. *Plant Physiol.* **102**, 467-472.
- Dodd A. N., Kudla J., Sanders D. (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **61** (1), 593–620.
- Dong S., Hu H., Wang Y., Xu Z., Zha Y., Cai X., Peng L. & Feng S. (2016) A pqr2 mutant encodes a defective polyamine transporter and is negatively affected by ABA for paraquat resistance in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res*, **129**, 899-907.
- Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, **179**, 125–142.
- Feher-Juhasz E., Majer P., Sass, L., Lantos C., Csiszar J., Turoczy Z., Mihaly R., Ma, A., Horvath G.V., Vass I., Dudits D., Pauk J. (2014). Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum.* **36**, 663-673.
- Ferrando A., Farràs R., Jasik J., Schell J., Koncz C. (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells. *Plant J*, **22**, 1–8.
- Finkelstein R. (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book*, **11**, e0166.
- Fiume E., Guyon V., Remoué C., , Remoué C., Magnani E., Miquel M., Grain D., Lepiniec L. (2016) TWS1, a Novel Small Protein, Regulates Various Aspects of Seed and Plant Development. *Plant Physiol.* **172** (3), 1732–1745.
- Flowers T. J. és Colmer T. D. (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**, 945-963.

- Foyer C.H. & Harbinson J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (eds C.H. Foyer & P.M. Mullineaux), pp. 1-42. CRC Press, Boca Raton.
- Fu SF., Chen PY., Nguyen QT., Huang LY., Zeng GR., Huang TL., Lin CY., Huang HJ. (2014) Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* **14**,
- 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 rcd1, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiol*, **134**, 275-285.
- Fujita M., Fujita Y., Iuchi S., Yamada K., Kobayashi Y., Urano K., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2012) Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 6343-6347.
- Fujita M. & Shinozaki K. (2014) Identification of polyamine transporters in plants: paraquat transport provides crucial clues. *Plant Cell Physiol*, **55**, 855-861.
- Fujita Y., Yoshida T., Yamaguchi-Shinozaki K. (2013) Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant.* **147**(1), 15-27.
- Furbank R. T., and Tester M. (2011). Phenomics--technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci* **16**, 635-644.
- Fülöp K., Pettkó-Szandtner A., Magyar Z., Miskolczi P., Kondorosi E., Dudits D., Bakó L. (2005) The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J.* **42**, 810–820.
- Giarola V., Hou Q., Bartels D. (2017) Angiosperm Plant Desiccation Tolerance: Hints from Transcriptomics and Genome Sequencing. *Trends Plant Sci*, **22**, 705-717.
- Gitelson A. A., Gritz Y., Merzlyak M. N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant* **160**, 271-282.
- Giusti M. M., Wrolstad R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.
- Gonnet G. H., Cohen M. A., Benner S. A. (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science*, **256**, 1443–1445.
- Gressel J. (1984) Evolution of herbicide-resistant weeds. *Ciba Found Symp*, **102**, 73-93.

- Grigore M. N., Oprica L. (2015) Halophytes as Possible Source of Antioxidant Compounds, in a Scenario Based On Threatened Agriculture and Food Crisis. *Iran J Public Health*. **44** (8), 1153–1155.
- Grosskinsky D. K., Svensgaard J., Christense, S., Roitsch T. (2015). Plant phenomics and the need for physiological phenotyping across scales to narrow the genotype-to-phenotype knowledge gap. *J. Exp. Bot.*, **66**,
- Gully K., Pelletier S., Guillou MC., Ferrand M., Aligon S., Pokotylo I., Perrin A., Vergne E., Fagard M., Ruelland E., Grappin P., Bucher E., Renou JP., Aubourg S. (2019) The SCOOP12 peptide regulates defense response and root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **70** (4), 1349–1365.
- Hart J.J., Ditomaso J.M., Linscott D.L. & Kochian L.V. (1992) Transport Interactions between Paraquat and Polyamines in Roots of Intact Maize Seedlings. *Plant Physiol*, **99**, 1400-1405.
- Haswell E. S., Verslues P. E. (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *The Journal of General Physiology*, **145** (5), 389-394.
- Hawkes T.R. (2014) Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Pest Manag Sci*, **70**, 1316-1323.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **125**, 189–198.
- Heckwolf S., Heckwolf M., Kaeppler S. M., De Leon N., Spalding E. P. (2015). Image analysis of anatomical traits in stalk transections of maize and other grasses. *Plant Methods* **11**, 26.
- Hiltscher H., Rudnik R., Shaikhali J., Heiber I., Mellenthin M., Meirelles Duarte I., Schuster G., Kahmann U. & Baier M. (2014) The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes. *Front Plant Sci*, **5**, 475.
- Hu X., Jiang M., Zhang A. & Lu J. (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, **223**, 57-68.
- Huang 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**, 2991-3007.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, **27**, 325-333.

- Jancowski S., Catching A., Pighin J., Kudo T., Foissner I. & Wasteneys G.O. (2014) Trafficking of the myosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. *Plant Journal* **77**, 497–510.
- Jang J. Y., Kim D. G., Kim Y. O., Kim J. S., Kang H. (2004): An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **54**, 713–725.
- Jansen M., Gilmer F., Biskup B., Nagel K.A., Rascher U., Fischbach A., Briem S., Dreissen G., Tittmann S., Braun S., Jaeger I. D., Metzclaff M., Schurr U., Scharf H., Walter A. (2009). Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Functional Plant Biology* **36**, 902–914.
- Jarraud M. (2005) Climate and land degradation. *World Meteorological Organization*.
- Jiang M. & Zhang J. (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot*, **53**, 2401-2410.
- Jóri B., Soós, V., Szegő, D., Páldi E., Szigeti Z., Rácz I., Lásztity D. (2007) Role of transporters in paraquat resistance of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 57-65.
- Junker A., Muraya M. M., Weigelt-Fischer K., Arana-Ceballos F., Klukas C., Melchinger A. E., Meyer R. C., Riewe D., Altmann T. (2014). Optimizing experimental procedures for quantitative evaluation of crop plant performance in high throughput phenotyping systems. *Front Plant Sci* **5**, 770.
- Käll L., Krogh A. Sonnhammer E. L. L. (2004) A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J. Mol. Biol.* **338**, 1027–1036
- Kang J., Hwang J.-U., Lee M., Kim Y. Y., Assmann S. M., Martinoia E., Lee Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 2355-2360.
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretschmar T., Lee Y., Martinoia E. (2011) Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*, **9**, e0153.
- Kasukabe Y., He L., Nada K., Misawa S., Ihara I. & Tachibana S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **45**, 712-722.
- Koncz C., Martini, N., Szabados, L., Hroudá, M., Bachmair, A., Schell, J. (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: *Plant Molecular Biology Manual* (ed S.B. Gelvin), pp. 53-74. Kluwer Academic Publishers.

- Krall J., Bagley A.C., Mullenbach G.T., Hallewell R.A. & Lynch R.E. (1988) Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells. *J Biol Chem*, **263**, 1910-1914.
- Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water Relations of Plants and Soils. *Academic Press*, **3**, 42-79.
- Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P., Seal C. E. (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol*, **188** (3), 655-673.
- Kumar M. N., Jane W. N., Verslues P. E. (2013) Role of the putative osmosensor Arabidopsis histidine kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiol*, **161**, 942-953.
- Kurepa J., Smalle J., Van Montagu M. & Inze D. (1998) Polyamines and paraquat toxicity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **39**, 987-992.
- Kuromori T., Miyaji T., Yabuuchi H., Shimizu H., Sugimoto E., Kamiya A., Moriyama Y., Shinozaki K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 2361-2366.
- Kwon S.J., Jeong, Y.J., Lee, H.-S., Kim, J.S., Cho, K.-Y., Allen, R.D., Kwak, S.-S. (2002) Enhanced Tolerances of Transgenic Tobacco Plants Expressing Both Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase in Chloroplasts Against Methyl Viologen-Mediated Oxidative Stress. *Plant Cell and Environment*, **25**, 873 - 882.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lasat M.M., DiTomaso, J.M., Hart, J.J., Kochian, L.V. (1997) Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of a paraquat-resistant Hordeum glaucum biotype. *Physiologia Plantarum*, **99**, 255-262.
- Lascano R. M., N., Robert, G., Rodriguez, M., melchiorre M., TRippi, V., Quero G. (2012) Paraquat: an oxidative stress inducer. *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds.*, 135-148.
- Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S. & Kwon S.Y. (2007) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep*, **26**, 591-598.
- Levitt J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. New York: *Academic Press*.
- Leymarie J., Vavasseur A., Lascève G. (1998) CO₂ sensing in stomata of abi1-1 and abi2-1 mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol Biochem* **36**, 539-543.
- Li J., Mu J., Bai J., Fu F., Zou T., An F., Zhang J., Jing H., Wang Q., Li Z., Yang S. & Zuo J. (2013) Paraquat Resistant1, a Golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of paraquat. *Plant Physiol*, **162**, 470-483.

- Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M. X., Arondel V., Bates P. D., Baud S., Bird D., Debono A., Durrett T. P., Franke R. B., Graham I. A., Katayama K., Kelly A. A., Larson T., Markham J. E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K. M., Wada H., Welti R., Xu C., Zallot R., Ohlrogge J. (2013) Acyl-lipid metabolism. *In Arabidopsis Book*, Vol.11 e0161.
- Liang Y., Urano D., Liao K. L., Hedrick T. L., Gao Y., Jones A. M. (2017). A nondestructive method to estimate the chlorophyll content of Arabidopsis seedlings. *Plant Methods* **13**, 26.
- Lichtenthaler H. K. (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Ann N Y Acad Sci.* **851**, 187-98.
- Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001). "Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. ," in Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons*, F:F4:F4.3.
- Ling Q., Huang W., Jarvis, P. (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in Arabidopsis thaliana. *Photosynth Res* **107**, 209-214.
- Linkies A., Müller K., Morris K., Turečková V., Wenk M., Cadman C. S. C., Corbineau F., Strnad M., Lynn J. R., Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. (2009) Ethylene Interacts with Abscisic Acid to Regulate Endosperm Rupture during Germination: A Comparative Approach Using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **21**, 3803–3822.
- Liu S., Lv Z., Liu Y., Li L., Zhang L. (2018) Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet Mol Biol.* **41**(3), 624–637.
- Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A., Grill E. (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064–1068.
- Madeira F., Park Y. M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A. R. N., Potter S. C., Finn R. D., Lopez R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research.* **47**, 636–641.
- Majer P., Sass L., Horvath G.V., Hideg E. (2010). Leaf hue measurements offer a fast, high-throughput initial screening of photosynthesis in leaves. *J Plant Physiol* **167**, 74-76.
- Markwell J., Osterman J. C., Mitchell J. L. (1995). Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth Res* **46**, 467-472.
- Marti L., Stefano G., Tamura K., Hawes C., Renna L., Held M. A., Brandizzi F. (2010) A missense mutation in the vacuolar protein GOLD3 6cause sorganizational defects in the ER and aberrant protein trafficking in the plant secretory pathway. *The Plant Journal* **63**, 901

- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.-T., Santoni V. (2008). Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Ann. Rev. Plant Biology*, **59**, 595-624.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, **282**, 5389-662-682.
- Milborrow B.V. (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis, *Journal of Experimental Botany*, **52** (359), 1145–1164.
- Mile O., Lakatos G., Mészáro, I. (2008) Photochemical activity and osmotic adjustment of some halophyte and xerophyte species in different microtopographic conditions. *Community Ecology*, **9** (1), 131–139.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. & Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, **33**, 453-467.
- Mishra A. K., Singh V. P. (2010) A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, **391**, 202-216.
- Mishra A. and Tanna B. (2017) Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Front. Plant Sci.* **8**, 829.
- Mittler, R. (2016) ROS are good. *Trends in Plant Sci.* **22**(1), 11-19.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490–498.
- Mummenhoff K., Polster A., Mühlhausen A., Theißen G. (2008) *Lepidium* as a model system for studying the evolution of fruit development in Brassicaceae. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1503–1513.
- Murakeozy E. P., Nagy Z., Duhaze C., Bouchereau A., Tuba Z. (2003) Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *Journal of Plant Physiology* **160**, 395 –401.
- Murgia I., Tarantino D., Vannini C., Bracale M., Carravieri S. & Soave C. (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J*, **38**, 940-953.
- Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F. & Giraudat J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, **14**, 3089-3099.
- Mutka A. M., Bart R. S. (2014). Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Front Plant Sci* **5**, 734.

- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104** (1), 34-41.
- 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*, **7** (11), e49103.
- Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z. K., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, **34**, 137-148.
- Nielsen H. (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara D. Protein Function Prediction. *Methods in Molecular Biology*, **1611**, 59-73.
- Norman M.A., Fuerst, E.P., Smeda, R.J., Vaughn, K.C. (1993) Evaluation of Paraquat Resistance Mechanisms in *Conyza*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **46**, 236-249.
- Okamoto M., Kuwahara A., Seo M., Kushiro T., Asami T., Hirai N., Kamiya Y., Koshiba T., Nambara E. (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **141**, 97-107.
- Ozfidan C., Turkan I., Sekmen A.H. & Seckin B. (2012) Abscisic acid-regulated responses of *aba2-1* under osmotic stress: the abscisic acid-inducible antioxidant defence system and reactive oxygen species production. *Plant Biol (Stuttg)*, **14**, 337-346.
- Papdi C., 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.
- Park H. Y., Seok H. Y., Park B. K., Kim S. H., Goh C. H., Lee B. H., Lee C. H., Moon Y. H. (2008) Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **375**, 80-85.
- Park S. Y., Fung P., Nishimura N. et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, **324**, 1068–1071.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E. & Schroeder J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**, 731-734.
- Pfannschmidt T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci*, **8**, 33-41.

- Preston C., Holtum J.A. & Powles S.B. (1991) Resistance to the herbicide paraquat and increased tolerance to photoinhibition are not correlated in several weed species. *Plant Physiol*, **96**, 314-318.
- Punta M., Forrest L. R., Bigelow H., Kernytsky A., Liu J., Rost B. (2007) Membrane protein prediction methods. *Methods*, **41** (4), 460–474.
- Ramanjulu S., Bartels D. (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* **25**, 141–151.
- Ramel F., Sulmon C., Serra AA., Gouesbet G., Coue I. (2012) Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Exp. Botany*, **63** (11), 3999-4014.
- Reed J. W., Nagpal P., Poole, D S, Furuya, M, Chory, J (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell*, **5** (2), 147-157.
- Reed J. W., Nagpal P., Bastow R. M, Solomon K. S., Dowson-Day M. J., Elumalai R. P., Millar A. J. (2000) Independent action of ELF3 and phyB to control hypocotyl elongation and flowering time. *Plant Physiol.*, **122** (4), 1149–1160.
- Riccardi M., Mele G., Pulvento C., Lavini A., D'andria R., Jacobsen S.E. (2014). Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. *Photosynth Res* **120**, 263-272.
- Richardson A. D., Duigan S. P., Berlyn G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* **153**, 185-194.
- Rigó G., Papdi Cs., Szabados L. (2012) Transformation using controlled cDNA overexpression system. *Methods in Molecular Biology* **913**, 277–290
- Rigo G., Valkai I., Farago D., Kiss E., Van Houdt S., Van de Steene N., Hannah M.A. & Szabados L. (2016) Gene mining in halophytes: functional identification of stress tolerance genes in *Lepidium crassifolium*. *Plant Cell Environ*, **39**, 2074-2084.
- Rost B., Fariselli P., Casadio R. (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* **5**(8),1704–1718.
- Rungrat T., Awlia M., Brown T., Cheng R., Sirault X., Fajkus J., Trtilek M., Furbank B., Badger M., Tester M., Pogson B.J., Borevitz J.O., Wilson P. (2016). Using Phenomic Analysis of Photosynthetic Function for Abiotic Stress Response Gene Discovery. *Arabidopsis Book* **14**, e0185.
- Salehi-Lisar S. J. & Bakhshayeshan-Agdam H. (2016) Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran L. S. (eds) Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1., *Springer, Cham*.

- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sass L., Majer P., Hideg, E. (2012) Leaf hue measurements: a high-throughput screening of chlorophyll content. *Methods Mol. Biol.* **918**, 61–69.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Fris, E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- 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* **82**, 518-529.
- Schwacke R., Fischer K., Ketelsen B., Krupinska K., Krause K. (2007) Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Mol Genet Genomics.* **277**, 631-46.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W. B., Flügge U., Kunze R. (2003) ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol*, **131**, 16–26.
- Schwartz R. M, Dayhoff M. (1978) Matrices for detecting distant relationships. In: Dayhoff M, editor. *Atlas of Protein Sequence and Structure.* **3** (5), 353–358.
- Selye H. 1936: A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**, 32.
- Shaaltier Y., Glazer, A., Bocion, P.F., Gressel, J. (1988) Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide, and ozone. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **31**, 13-23.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. and Higgins D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.
- Sinha V. B., Grover A., Aslam M., Pande V., Ahmed Z. (2014) Isolation and characterization of Ras-related GTP-binding protein (Ran) from *Lepidium latifolium* L. reveals its potential role in regulating abiotic stress tolerance. *Acta Physiol Plant*, **36**, 2353-2360.
- Smirnoff N. & Cumbes Q. J. (1989) Hydroxyl radicals scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057 -1060.
- Sozzani R., Busch W., Spalding E.P., Benfey P.N. (2014). Advanced imaging techniques for the study of plant growth and development. *Trends Plant Sci* **19**, 304-310.
- Spalding E. P., Miller N. D. (2013). Image analysis is driving a renaissance in growth measurement. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 100-104.

- Strasser R. J. (1988) A concept for stress and its application in remote sensing in: Lichtenthaler H. K.: Applications of chlorophyll fluorescence. *Academic Wishers*. 333-337.
- Su M., Ling Y., Yu J., Wu J., Xiao J. (2013) Small proteins: untapped area of potential biological importance. *Front Genet.* **4**, 28.
- Surówka E., Latowski D., Libik-Konieczny M., Miszalski Z (2019) ROS signalling, and antioxidant defence network in halophytes. In: Halophytes and climate change: adaptive mechanism and potential uses. *CABI*, **12**, 179-196.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* **35**, 259-270.
- Szabados L., Kovacs I., Oberschall A., Abraham E., Kerekes I., Zsigmond L., Nagy R., Alvarado M., Krasovskaja I., Gal M., Berente A., Redei G.P., Haim A.B., Koncz C. (2002). Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. *Plant J* **32**, 233-242.
- Szabados L., Kovács H., Zilberstein A., Bouchereau (2011) Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance in: Advances in Botanical Research, *Academic Press*, **57**(4), 105-150.
- Szabados L., Savouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Sci.* **15** (2), 89-97.
- Szigeti Z. (2018) A növényi stresszel kapcsolatos felfogásunk változásai. *Botanikai Közlemények* **105** (2), 165-178.
- Szigeti Z., Racz I. & Lasztity D. (2001) Paraquat resistance of weeds--the case of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Z Naturforsch C*, **56**, 319-328.
- Takahashi F., Suzuki T., Osakabe Y., Betsuyaku S., Kondo Y., Dohmae N., Fukuda H., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2018) A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*, **556**, 235-238.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008), Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, **54**, 733-749.
- Tiwari B., Kharwar S., Tiwari D. N. (2019) Pesticides and Rice Agriculture. *Cyanobacteria* Chapter 15, 303-325.
- Tome F., Jansseune, K., Saey B., Grundy J., Vandenbroucke K., Hannah M.A., Redestig H. (2017). rosetR: protocol and software for seedling area and growth analysis. *Plant Methods* **13**, 13.
- Tran L. S., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.*, **104**, 20623-20628.

- Tsimilli-Michael M., Kruger G. H. J., Strasser R. J. (1996) About the perpetual state changes in plants approaching harmony with their environment. *Arch. Sci. Geneva*, **49**, 173-203.
- Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Ohba Y., Wada K. & Kobayashi H. (1999) A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell*, **11**, 1195-1206.
- Tusnady G. E., Simon I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**(9), 849-50.
- Uddling J., Gelang-Alfredsson J., Piikki K., Pleijel H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth Res* **91**, 37-46.
- 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. *Plant Cell*, **11**, 1743-1754.
- Vanhaeren H., Gonzalez N., Inze D. (2015). A Journey Through a Leaf: Phenomics Analysis of Leaf Growth in Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book* **13**, e0181.
- Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J. & Zhu J. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant J*, **45**, 523–539.
- Vile, G.F., Winterbourn, C.C., Sutton, H.C. (1987): Radical-driven Fenton reactions: studies with paraquat, adriamycin, and anthraquinone 6-sulfonate and citrate, ATP, ADP, and pyrophosphate iron chelates. *Arch Biochem Biophys*. **259**, 616-26.
- Waldstein-Wartenberg F. ., Kitaibel P. (1799-1802) Descriptiones et icones plantarum rariorum Hungariae. **1**, t. 4.
- Walter A., Scharr H., Gilmer F., Zierer R., Nagel K. A., Ernst M., Wiese A., Virnich O., Christ M. M., Uhlig B., Junger S., Schurr U. (2007). Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: a setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytol.* **174**, 447-455.
- Wang Y., Chen Z. H., Zhang B., Hills A., Blatt M. R. (2013) PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors regulate K⁺ and Cl⁻ channels through reactive oxygen species-mediated activation of Ca²⁺ channels at the plasma membrane of intact Arabidopsis guard cells *Plant Physiol*, **163**(2), 566–577.
- Wang L. L., Chen A. P., Zhong N. Q., Liu N., Wu X. M., Wang F., Yang C. L., Romero M. F., Xia G. X. (2014) The Thellungiella salsuginea tonoplast aquaporin TsTIP1;2 functions in protection against multiple abiotic stresses. *Plant Cell Physiol* **55**, 148–161.

- Wang P., Liu H., Hua H., Wang L., Song C. P. (2011) A vacuole localized b-glucosidase contributes to drought tolerance in Arabidopsis. *Chin Sci Bull* **56**, 3538–3546.
- Wang P. & Song C.P. (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol*, **178**, 703-718.
- Wang L., Uilecan I. V., Assadi A. H., Kozmik C. A., Spalding E. P. (2009). HYPOTrace: image analysis software for measuring hypocotyl growth and shape demonstrated on Arabidopsis seedlings undergoing photomorphogenesis. *Plant Physiol* **149**, 1632-1637.
- Watts M. (2011) Paraquat. *Pesticide Action Network Asia and the Pacific*.
- Weight C., Parnham D., Waites R. (2008). LeafAnalyser: a computational method for rapid and large-scale analyses of leaf shape variation. *Plant J*, **53**, 578-586.
- Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* **20**, 1101–1117
- 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.
- Xi J., Xu P. & Xiang C.B. (2012) Loss of AtPDR11, a plasma membrane-localized ABC transporter, confers paraquat tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **69**, 782-791.
- 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.
- Yoshimura K., Miyao K., Gaber A., Takeda T., Kanaboshi H., Miyasaka H. & Shigeoka S. (2004) Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *Plant J*, **37**, 21-33.
- Yu Q., Cairns A. & Powles S. (2007) Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta*, **225**, 499-513.
- Yu X., Huang, S., Powles, S. (2010) Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **98**, 104-109.
- Yuan F., Yang H., Xue Y., Kong D., Ye R., Li C., Zhang J., Theprungsirikul L., Shrift T., Krichilsky B., Johnson D. M., Swift G. B., He Y., Siedow J. N., Pei Z. M. (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature*. **514**, 367–371.
- 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*. **6**, 88.

- Zhao Q. Xiao J. F., YU J. 2012. An Integrated Analysis of Lineage-specific Small Proteins Across Eight Eukaryotes Reveals Functional and Evolutionary Significance. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, **39**, 359-367.
- Zhou J., Wang J., Li X., Xia X.J., Zhou Y.H., Shi K., Chen Z. & Yu J.Q. (2014) H₂O₂ mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. *J Exp Bot*, **65**, 4371-4383.
- Zhou J., Xia X. J., Zhou J. H., Shi K., Chen Z., Yu J. Q. (2013) RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato, *Journal of Experimental Botany*, **65** (2), 595–607.
- Zivcak M., Brestic M., Sytar O. (2016) Osmotic Adjustment and Plant Adaptation to Drought Stress. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran LS. (eds) Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1. *Springer, Cham*.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A COS rendszer segítségével *Lepidium crassifolium*-ban sikeresen azonosítottunk egy kis fehérjét (Small Paraquat Resistance protein, LcSPQ), melynek túltermeltetése az *Arabidopsis thaliana* transzgenikus növényekben paraquat rezisztenciát eredményezett. A LcSPQ homológjainak azonosítása révén azt találtuk, hogy SPQ típusú gén minden, a különböző adatbázisokból elérhető, genomszekvenciával rendelkező és általunk vizsgált növényben megtalálható. Az *AtSPQ* gén expressziójának megemlése szintén paraquat rezisztenciát eredményezett, míg a gén funkcióvesztéses mutációja (*spq1*) enyhe érzékenységet okozott. A 69 illetve, 70 aminosavból álló, citoplazmában lokalizált LcSPQ illetve *AtSPQ* fehérjék fokozott aktivitása nem csak paraquat rezisztenciát eredményezett, de megnövelte ABS hormonnal szembeni érzékenységüket is, míg az *spq1* mutáns abszcizinsav toleranciát mutatott. Mind a *Lepidium*ből mind az *Arabidopsis*ből származó SPQ fehérjét túltermelő növények megemelkedett ellenállóképességet mutattak a vízhiány okozta szárazságstresszel szemben. A transzgenikus növények jobban túlélték a kiszáradást és fotoszintetikus elektrontranszportjuk is stabilabb maradt, mint a vad típusú *Arabidopsis* növényeknek. Bár a pontos molekuláris funkciója ezeknek a kis fehérjéknek nem ismert, az egyértelmű, hogy többféle stresszel kapcsolatos szabályozó mechanizmust befolyásolnak. További jellemzésük a szárazságtűréssel kapcsolatos agrobiotechnológiai alkalmazások kifejlesztéséhez vezethet.

A számítógépes képelemzés egyre elterjedtebb vizsgálati módszer, segítségével egyszerűen és gyorsan nyomon követhetjük a növények fejlődése során bekövetkező változásokat. Munkánk során egy olyan nem destruktív módszert fejlesztettünk ki, mellyel információt szerezhetünk az *Arabidopsis thaliana* növények morfológiai és fiziológiai paramétereiről. A rozetta morfológiai jellemzőinek meghatározása során lineáris kapcsolatot találtunk annak mérete és friss tömeg között, és hasonló tendenciát figyeltünk meg a friss tömeg és a pixel számok növekedése között is. A klorofill-tartalom meghatározása során pozitív korrelációt állapítottunk meg a növények Hue értéke (színárnyalat) és a mért klorofill tartalom között, míg az antocián tartalom esetében inverz összefüggést találtunk. A PlantSize alkalmazással egyszerűen és költséghatékonyan kaptunk adatokat az növények rozetta méretéhez köthető paramétereinek (terület, konvex hull, lefedettség, friss súly) valamint a klorofill és antocián tartalmának változásáról. A program és a kidolgozott analitikai módszer segítségével hatékonyan és pontosan tudtuk a stresszhatások következményeit vizsgálni, a *Lepidium* cDNS klónokat túltermelő transzgenikus növények növekedését, élettani jellemzőit nem destruktív módon tanulmányozni, stressz toleranciájukat jellemezni.

10. SUMMARY

The Small Paraquat resistance protein (SPQ) of *Lepidium crassifolium* has previously been identified due to its capacity to confer paraquat resistance to overexpressing transgenic *Arabidopsis* plants. LcSPQ overexpression of the closely related but previously unknown *Arabidopsis* SPQ can also enhance resistance to paraquat, while the knockout *Arabidopsis* mutant is slightly hypersensitive to this herbicide. The AtSPQ and LcSPQ proteins are composed of 70 and 69 amino acids, respectively, and both of them are localized in the cytosol. Besides being implicated in paraquat response, overexpression of SPQs enhance sensitivity to abscisic acid (ABA), while the T-DNA insertion of *AtSPQ* is insensitive to ABA. As consequence of ABA hypersensitivity, SPQs can considerably improve drought tolerance by reducing water loss, stabilizing photosynthetic electron transport and enhancing plant survival in water-limited environment. Although deciphering the precise biological function of SPQ proteins requires further studies, our data suggest, that SPQ proteins has pleiotrop function connecting multiple regulatory pathways in stress responses. Enhancement of drought tolerance and paraquat resistance through increased expression of the SPQ genes can have agrobiotechnological perspectives in crop plants.

Image analysis of plants through color imaging is an increasingly popular method to define growth parameters, characterize plant development in time. We have developed a non-invasive method, which simultaneously measures basic morphological and physiological parameters of *in vitro* cultured plants such as *Arabidopsis thaliana*. Changes of plant size, shape and color is monitored by repeated photography with a commercial digital camera. Images are analyzed with the Matlab-based computer application PlantSize, which simultaneously calculates several parameters including projected rosette area (pixel area, fresh weight, convex area and ratio), and color (chlorophyll and anthocyanin contents). Numerical data are exported in MS Excel format. Subsequent data processing provides information on growth rates, chlorophyll and anthocyanin contents. The developed technology offers a simple, affordable and fast way to measure several morphological and physiological parameters of *Arabidopsis* plants. The methods are based on non-destructive imaging allowing repeated measurements and monitoring changes of various growth parameters in time. Using the PlantSize technology we were able to study precisely the effects of different stress conditions on *Arabidopsis* plants and characterize growth and basic physiological parameters of transgenic *Arabidopsis* plants, expressing *Lepidium* cDNA clones, which modulate their stress tolerance.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Faragó D. és Sass L., Valkai I., Andrási N., Szabados L (2018) plantsize offers an affordable, non-destructive method to measure plant size and color *in vitro*. *Front. Plant Sci.* **9**, 219.

doi: 10.3389/fpls.2018.00219

MTMT: 3343909

Impakt faktor: 4,298

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.

doi: 10.1111/pce.12768

MTMT: 3080577

Impakt faktor: 6,960

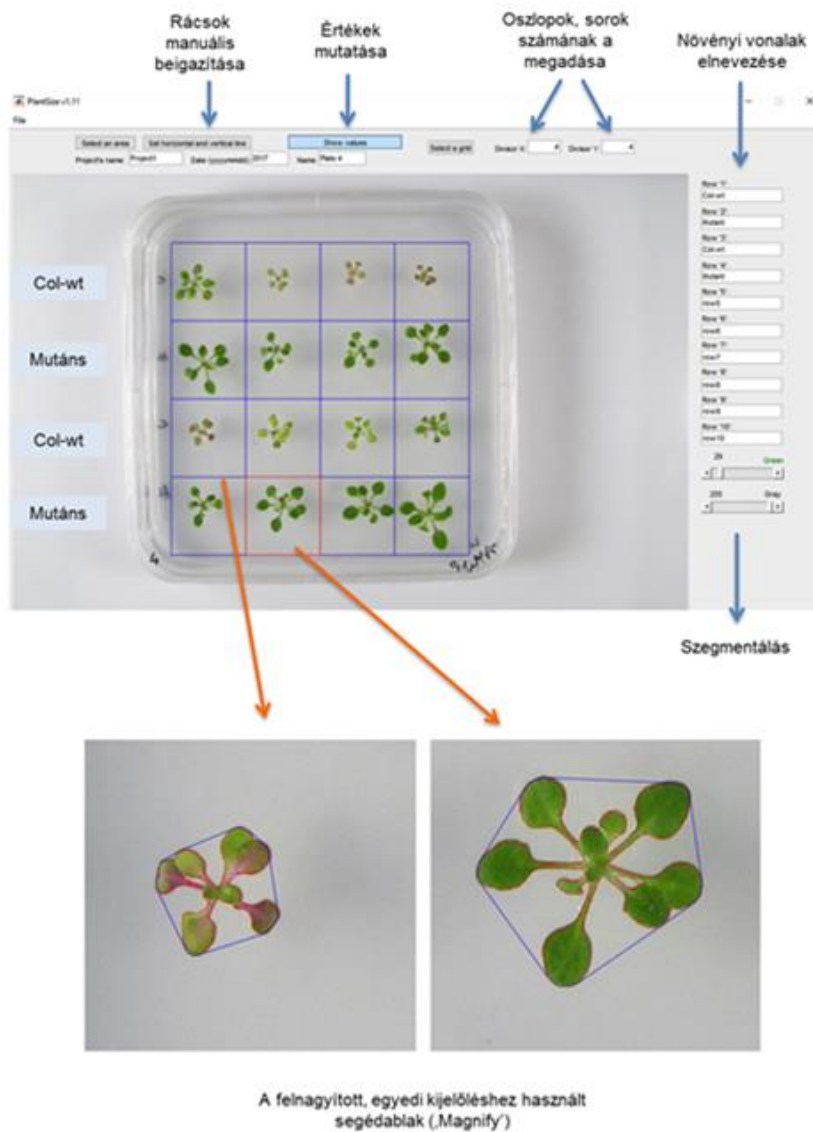
Közlés alatt:

Faragó D., Zsigmond L., BenyóD., Ayaydin F., Alcazar R, Rigó G., Szabados L. (2019) Small Paraquat resistance proteins modulate paraquat and ABA responses and confers drought tolerance to overexpressing Arabidopsis plants. *Plant Cell and Enviroment*.

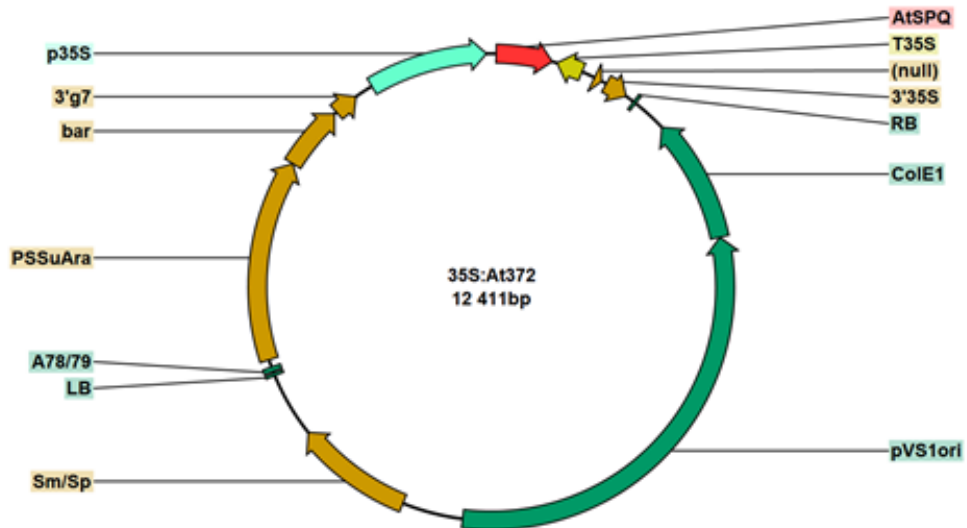
Szabadalom:

SPQ által biztosított szárazságtűrés. (Magyarországi és Európai, folyamatban).

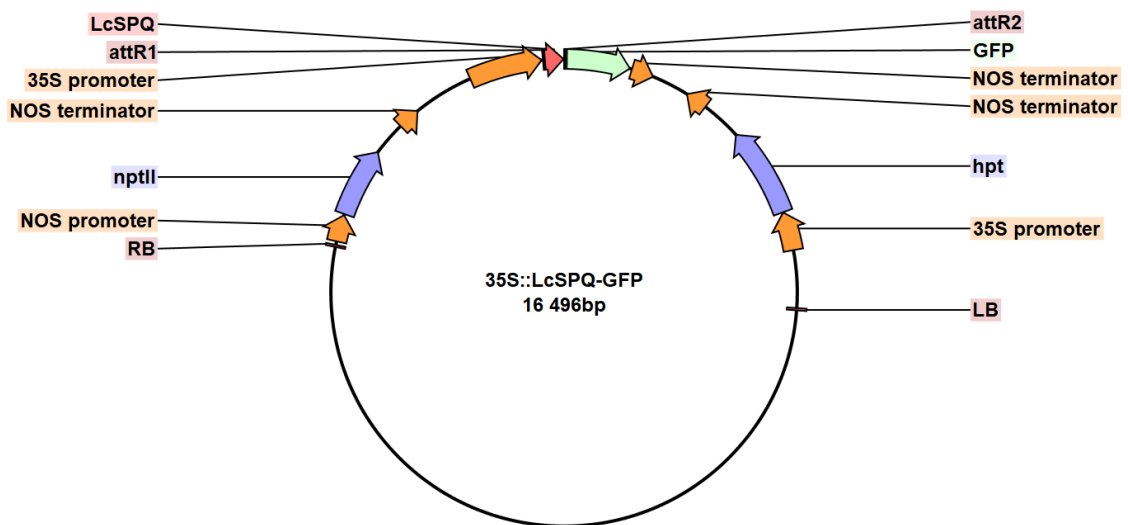
12. FÜGGELÉK



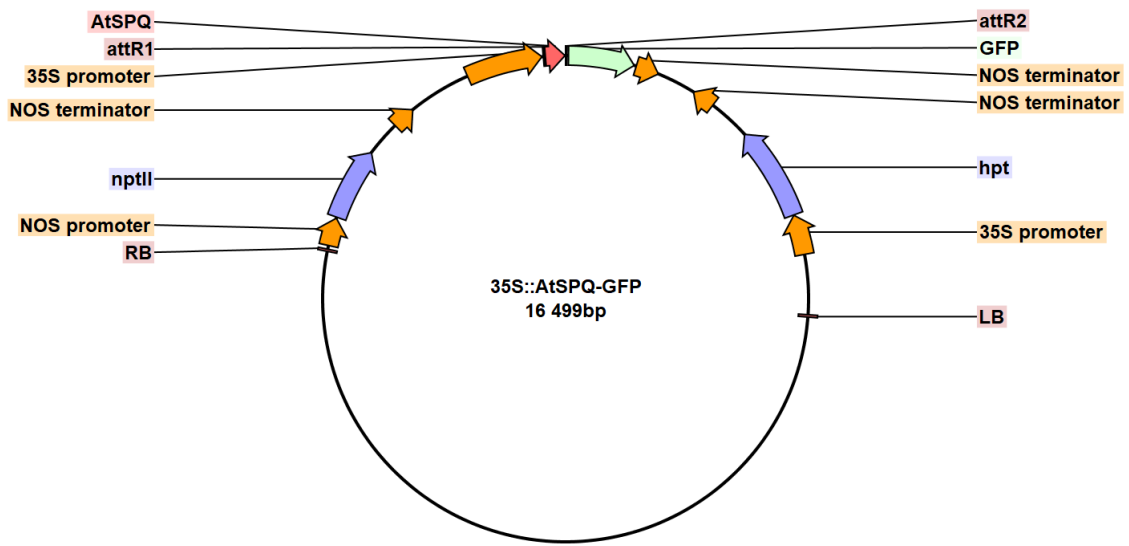
Függelék 1. ábra: A PlantSize kezelői felülete.



Függelék 2. ábra: Az *Agrobacterium*-közvetítette növény transzformációhoz felhasznált 35S::AtSPQ konstrukciót *pTCO27235S* (Rigó és mtsai., 2016) tartalmazó bináris vektor szerkezete.



Függelék 3. ábra: Az *Agrobacterium*-közvetítette növény transzformációhoz felhasznált 35S::LcSPQ-GFP konstrukciót tartalmazó *pGWB5* (Nakagawa és mtsai., 2007) bináris vektor szerkezete.



Függelék 4. ábra: Az *Agrobacterium*-közvetítette növény transzformációhoz felhasznált 35S::AtSPQ-GFP konstrukciót tartalmazó pGWB5 (Nakagawa és mtsai., 2007) bináris vektor szerkezete.

A

```

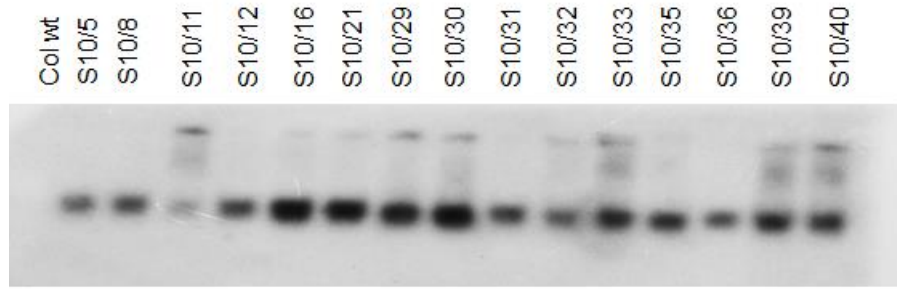
agtgcaggctagtcgcgccgcttgatatacacaagtttgtacaaaaaagttggcggcgcgcgcttctgctgaaatccca
aacaaaaagaaaaatattatagagagagagtaaaaaATGTTACAGCTGTTCTTTACGATAGCGTTCCGGCGGCCCGTT
AACGTTGTATATACCGCCGATGAGATGTTTGACGGTGTTTGTTGAGACGATGGAAGAGATGGGAATGGAAGGTAGGGTTA
TAGCCGGAGACTCTTACCTCGTGCCAGAATTGCTTGGTCTAGGCTTCTCGATTGCTTATTCTCCTTACAGTCTCTCGC
TTAAtttgctctctctctctctctctctctgtagatatacaaatattctcaattggtttttgggtgtgatcacgtacatggt
tctgatctcgatgtaattcgagattaggttttgggtgtgtgtgtgatcaaaataattaggagatggatctgaaact
cttttgttctgagctctctttattttaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

B

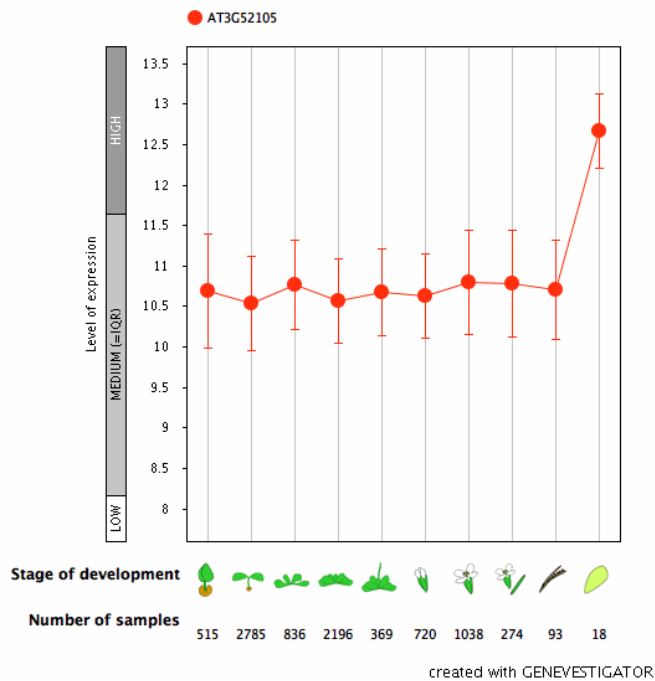
MLQLFFTTIAFSAAPLTLTYIPPMRCLTVFVETMEEMGMEGRVYSRLLPRARIAWSRLLDCLFSSSRPLA

Függelék 5. ábra: A PL372PQ01 vonal szekvencia analízise. A) A cDNS inszert nukleotid szekvenciája. A nyílt leolvasási keretet (ORF) a kék betűk jelölik. B) A prediktált aminosav szekvencia. Piros aláhúzás a feltételezett szignál szekvenciát jelöli.



Függelék 6. árba: A PL372PQ01 vonalból származó cDNS pCaMV 35S promóter által irányított expressziója a független transzgenikus vonalakban.

Dataset: 10 developmental stages from data selection: AT_AFFY_ATH1-0
Showing 1 measure(s) of 1 gene(s) on selection: AT-0



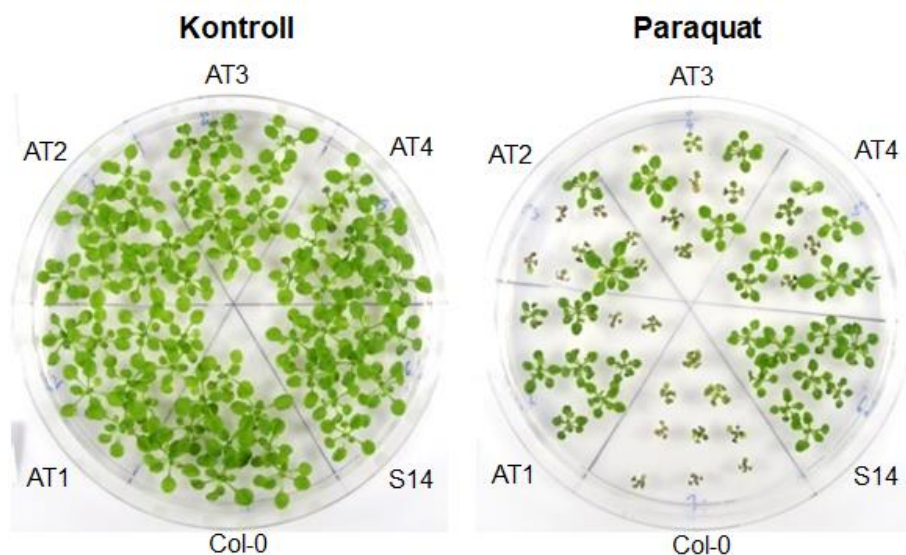
Függelék 7. árba: *AtSPQ* gén transzkript szintje. *AT3G52105* expressziós profiljának az elemzése a különböző fejlődési stádiumokban (GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array, <https://genevestigator.com/gv/>).

Arabidopsis thaliana (122)		Filter values for selected measure(s)				
		AT5G2105	Log2-ratio	Fold-Change	p-value	
		PI-score		1.5	no filter	
Aktiválás						
AT-00657	drought study 17 (10d) / untreated Col-0 flower bud samples (10d)		1.84	1.23	2.36	0.032
AT-00447	hypoxia study 8 / untreated Col-0 root samples		1.53	0.59	1.50	0.003
AT-00617	hypoxia study 17 (pPEP:HF-RPL18) / mock treated pPEP:HF-RPL18		0.81	0.79	1.74	0.095
AT-00617	hypoxia study 17 (pRPL16B:HF-RPL18) / mock treated pRPL16B:HF-RPL18		0.71	0.64	1.56	0.077
AT-00120	osmotic (late) / untreated green tissue samples (late)		2.74	0.74	1.67	<0.001
AT-00120	osmotic study 2 (late) / untreated root samples (late)		3.05	0.76	1.69	<0.001
AT-00656	salt / FACS study 2 (1h) / root cortex protoplast samples of mock treated primary root tip samples (Col-0)		1.75	0.76	1.68	0.005
AT-00534	salt study 5 (Col-0) / mock treated primary root tip samples (Col-0)		0.90	0.61	1.52	0.034
AT-00468	ABA + DMTU (20h) / solvent treated cell suspension samples (20h)		1.18	0.62	1.54	0.013
AT-00420	ABA study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)		1.78	0.71	1.63	0.003
AT-00433	ABA study 7 (agb1-2 gpa1-4) / solvent treated guard cell samples (Col-0)		0.79	0.64	1.58	0.058
AT-00433	ABA study 7 (Col-0) / solvent treated guard cell samples (Col-0)		2.87	0.86	1.82	<0.001
AT-00433	ABA study 8 (agb1-2) / solvent treated leaf samples (agb1-2)		0.60	0.59	1.51	0.093
AT-00433	ABA study 8 (agb1-2 gpa1-4) / solvent treated leaf samples (agb1-2)		1.27	0.72	1.63	0.017
AT-00433	ABA study 8 (Col-0) / solvent treated leaf samples (Col-0)		2.86	1.06	2.11	0.002
AT-00693	low light study 5 (Col-0) / standard light (Col-0)		1.81	0.83	1.78	0.007
AT-00693	low light study 5 (rap2.4a) / standard light (rap2.4a)		1.81	0.72	1.65	0.003
AT-00281	night extension (intermediate) / untreated rosette samples		1.22	0.77	1.71	0.027
AT-00281	night extension (late) / untreated rosette samples		2.51	1.00	1.99	0.003
Represszálass						
AT-00490	stratification (48h) / seed desiccation		3.78	-1.09	-2.14	<0.001
AT-00490	germination (1h) / seed desiccation		3.41	-1.22	-2.33	0.002
AT-00490	germination (6h) / seed desiccation		5.70	-1.43	-2.71	<0.001
AT-00490	germination (12h) / seed desiccation		7.79	-1.95	-3.86	<0.001
AT-00490	germination (12h) / stratification (48h)		2.64	-0.85	-1.81	<0.001
AT-00490	germination (24h) / seed desiccation		10.59	-2.65	-6.27	<0.001
AT-00490	germination (24h) / stratification (48h)		6.22	-1.55	-2.94	<0.001
AT-00490	germination (48h) / seed desiccation		12.93	-3.23	-9.41	<0.001
AT-00490	germination (48h) / stratification (48h)		8.56	-2.14	-4.40	<0.001
AT-00691	shift low light to dark to high light (35S:MBS1) / shift low light to dark to high light (Col-0)		1.88	-0.78	-1.71	0.004
AT-00691	shift low light to dark to high light (Col-0) / shift low light to dark to high light (flu1-1)		0.61	-0.75	-1.71	0.151
AT-00691	shift low light to dark to high light (flu1-1) / shift low light to dark to high light (RNAi-MBS2 mbs1-1)		3.04	-0.80	-1.74	<0.001
AT-00691	shift low light to dark to high light (RNAi-MBS2 mbs1-1) / shift low light to dark to high light (Col-0)		1.49	-0.59	-1.51	0.003
AT-00675	shift low to high light (adg1-1) / low light study 3 (adg1-1)		1.33	-0.62	-1.53	0.007
AT-00693	shift low to high light study 4 (Col-0) / low light study 5 (Col-0)		4.57	-1.33	-2.53	<0.001
AT-00693	shift low to high light study 4 (rap2.4a) / low light study 5 (rap2.4a)		4.70	-1.31	-2.49	<0.001
AT-00650	24-eBL + glucose (dark) / mock treated seedling samples		3.61	-1.14	-2.20	<0.001
AT-00650	24-eBL + glucose (dark) / 24-eBL (dark)		4.99	-1.25	-2.37	<0.001

Szín skála



Függelék 8. ábra: Az *AtSPQ* gén kifejeződésének a szintje a Genevestigator expressziós adatbázis (Hruz és mtsai., 2008, <https://genevestigator.com/gv/>) alapján.



Függelék 9. ábra: *AtSPQ* cDNS-t túlermelő független *Arabidopsis* transzgenikus növények paraquat rezisztenciája. Kontroll (1/2 MS) és 0,3 μ M paraquat tartalmú táptalajon növekedve. AT1-AT4: T2-es szegregáló *AtSPQ* cDNS-t túlermelő vonalak. S14: homizigóta *LcSPQ* cDNS-t túlermelő vonal.

Függelék 1. táblázat: Alkalmazott primerek listája.

Név	Szekvencia 5' -> 3'	Alkalmazás
AtSPQ-F-Sall	GAAGTCGACAAATCAGCATCTGCGTTTCCC	AT3G52105 cDNS fragment felszaporítása
AtSPQ-R-SmaI	CAACCCGGGCAATTTGATTCAATCTTTACT	AT3G52105 cDNS fragment felszaporítása
AtSPQ-AttB1-F	CAAGTTTGTACAAAAAGCAGATGTTGCAGCTGTTTTC	AT3G52105 cDNS fragment felszaporítása
AtSPQ-AttB2-R	TCACGTCCTCTCTCTTTCAGCTTCTTGTACAAAGTGG	AT3G52105 cDNS fragment felszaporítása (stop kodon módosítása)
LcSPQ-AttB1-F	CAAGTTTGTACAAAAAGCAGATGTTACAGCTGTTCTT	LcSPQ cDNS fragment felszaporítása
LcSPQ-AttB2-R	CTCTTCACGTCCTCTCGCTTCAGCTTCTTGTACAAAGTGG	LcSPQ cDNS fragment felszaporítása (stop kodon módosítása)
pTCO35SNEW5	GCAGGACGATCCGTATTTTACAAC	Klónok validálása a pTCO272/35S bináris vektorban
p35S2	ATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGAC	Fragmentek szekvenálása
GFP-Rev	CGGTTACCAGGGTGTGCGCC	Klónok validálása a pGWB5 bináris vektorban
SPQ-F	GATGGTGACGCTAGAGAATGG	Mutáns genotipizálás
SPQ-R	CTGGGCAAATTTGATTCAATC	Mutáns genotipizálás
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Mutáns genotipizálás
Leme-18s-F	CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT	<i>Lepidium meyenii</i> 18s szekvencia felszaporítása
Leme-18s-R	CCCCAACTTTCGTTCTTGATT	<i>Lepidium meyenii</i> 18s szekvencia felszaporítása
At/Lc18S-qPCR-F	ATTTCTGCCCTATCAACTTTCG	<i>Lepidium</i> és <i>Arabidopsis</i> 18S qPCR primer
At/Lc18S-qPCR-R	GTTTCTCAGGCTCCCTCCTCC	<i>Lepidium</i> és <i>Arabidopsis</i> 18S qPCR primer
Lesa-GAPDH-F	CAAGGACTGGAGAGGTGGAA	<i>Lepidium sativum</i> GAPDH2 szekvencia felszaporítása
Lesa-GAPDH-R	CAAACCTGTGCGCTCAAAGCA	<i>Lepidium sativum</i> GAPDH2 szekvencia felszaporítása
At/LcGAPDH-F	AGGCTGTTGAAAGTGTGTC	<i>Lepidium</i> és <i>Arabidopsis</i> GAPDH2 qPCR primer
At/LcGAPDH-R	TCTCATCGTATGTTGCAGCTTT	<i>Lepidium</i> és <i>Arabidopsis</i> GAPDH2 qPCR primer
UBC18-F	ACAGCAATGGACATATTTGTTTAGA	UBC18 qPCR primer
UBC18-R	TGATGCAGACTGAACTCACTGTC	UBC18 qPCR primer
AtSPQ-qPCR-F1	AAATCAGCATCTGCGTTTCCC	AtSPQ qPCR primer
AtSPQ-qPCR-F2	AAGATGTTTGACGGTGTGTTG	AtSPQ qPCR primer
AtSPQ-qPCR-R	TCCAGCTATAAACCTACCTTCC	AtSPQ qPCR primer
LcSPQ-qPCR-F	GAGATGTTTGACGGTGTGTTGTT	LcSPQ qPCR primer
LcSPQ-qPCR-R	TCCGGCTATAAACCTACCTTCC	LcSPQ qPCR primer
AT3G52110-F	TAAGAACCAGAGAACGTCCAATC	AT3G52110 qPCR primer
AT3G52110-R	AAGATGAAGCTGAAGAAGAAAAGAAC	AT3G52110 qPCR primer