

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

Ph.D értekezés

Valkai Ildikó Anna

Témavezető: Dr. Szabados László

Dr. Rigó Gábor

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológia Intézet
SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szeged 2018

BEVEZETÉS

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

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

véletlenszerű génátvitelre a különböző fajok között. Példát találunk *E. salsgineum* cDNS könyvtár (Du és mtsai., 2008), illetve bináris, bakteriális mesterséges *Eutrema* kromoszóma könyvtár (Wang és mtsai., 2010) kifejeztetésére *Arabidopsis*-ban. Mindkét esetben sikerült azonosítani olyan géneket amelyek az *Arabidopsis* sótűrő képességét javították.

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

CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

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

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *A. thaliana*, *E. salsugineum* és *L. crassifolium* növények *in vitro* és *in vivo* nevelése, stresszkezelése.
- *Arabidopsis* Agrobaktérium közvetített genetikai transzformációja, transzgenikus növények szelekciója.
- DNS enzimatisz módosításán alapuló molekuláris klónozási technikák.
- Növény genomi DNS és össz-RNS tisztítása.
- Génkifejeződés vizsgálatok Northern blot technikával.
- Klorofill fluoreszcencia mérések, fotoszintetikus pigmenttartalom meghatározás.
- Növekedési ütem vizsgálatok, a rozetta méretek meghatározása PlantSize szoftverrel.
- T-DNS beépülési helyeinek azonosítása TAIL PCR technikával.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

hogy a *L. crassifolium* szárazság és sótűrése hasonlít vagy meghaladja a már ismert *E. salsugineum* növények stressztűrő képességét.

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

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

részt vesznek. Az ACBP-k a növényekben a stresszhatások utáni helyreállító folyamatokban is valószínűleg részt vesznek.

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

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

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

Fontosabb eredményeink a következők:

-Jellemeztük a *Lepidium crassifolium* stressztűrő képességét.

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

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

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

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

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

HIVATKOZOTT IRODALOM

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

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

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

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

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

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

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

Nevo, E., Chen, G. (2010) Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment* 33, 670–685.

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

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

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

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

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

MTMT: 3080577 Impakt faktor: 6,960

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

MTMT: 3343909 Impakt faktor: 4,298

Egyéb közlemények:

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

Impakt faktor: 3.226

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

MTMT: 3331743

Impakt faktor: 2,869

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

MTMT: 1913955

Impakt faktor: 4,931

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott társszerző és felelős szerző nyilatkozunk, hogy a jelölt téziseit ismerjük, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtuk fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogjuk felhasználni. Elismerjük, hogy Valkai Ildikónak az alábbi közlemény eredményeinek elérésében meghatározó szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja.

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

MTMT: 3080577 Impakt faktor: 6,960

*Meosztott első szerzők

.....
Dr. Rigó Gábor

társszerző

.....
Dr. Szabados László

felelős szerző

Szeged, 2018. május. 3.