

**Fajtafüggő életteni és transzkriptszintű változások szárazságstressz hatására
búzában**

Ph.D. értekezés tézisei

Szécsényi Mária

Témavezető: Dr. Györgyey János

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet
Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK

Szeged
2010

Bevezetés

Az aszály mint környezeti hatás egyre inkább középpontba kerül a gyakran emlegetett globális felmelegedés, illetve az élelmezési gondok szempontjából. Hatalmas területeken természetünk haszonnövényeket, búzát, rizst, kukoricát, stb., amelyek hozamát erőteljesen befolyásolja a szárazság, annak mértéke és időtartama. A termésveszteség elkerülése végett a nemesítők szárazságtűrő fajták létrehozásán dolgoznak, amelyhez fiziológusok, biokémikusok és molekuláris biológusok segítsége is szükséges. Ennek magyarázata a növények aszálystresszre adott válaszainak sok szinten való megnyilvánulása - különböző morfológiai, élettani, enzimikus és transzkriptszinten zajló változások kísérik a vízhiány elkerülését, késleltetését és a hozzá való alkalmazkodást. Mindezen reakciók egyik legfőbb koordinátora a növényi stresszhormon, az abszcizinsav (ABS). Hatására záródnak a sztómák, csökken a transzspiráció, fokozódhat a gyökérnövekedés, az oldalgyökerek képződése és a gyökérszövetek vízfelvétele, valamint gátlódhat a levélnövekedés. Ezen változások hátterében többek között különböző gének túl-, illetve alulműködése áll, amelyek kifejeződése ABS-függő és/vagy ABS-független jelátviteli utakon keresztül szabályozódik. Funkciójukat tekintve ezen gének különböző fehérjéket kódolnak: ozmotikumok szintézisének enzimeit, védőfunkciót ellátó fehérjéket, az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó proteineket, a növényi sejt membránjainak hidraulikus konduktivitását növelő transzportfehérjéket, különböző proteázokat, transzportereket, sejtfal-biogenezissel kapcsolatos fehérjéket, valamint a stresszválasz szabályozásában résztvevő fehérjéket.

A sztómák záródásának egyik káros következménye a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szintézise - megnőhet a szuperoxid-gyökanion ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök (OH^{\bullet}) koncentrációja. Nagymértékű reakcióképességük következtében károsítják a makromolekulákat. A növények – hogy megelőzzék ezt a folyamatot – egy komplex, antioxidáns védekezési rendszert állítottak fel, melynek enzimikus és nem enzimikus résztvevői ismertek. A legfontosabb, a ROS-ok eliminálásában szerepet játszó enzimek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), az aszcorbát-peroxidáz (APX) és a kataláz (CAT). A nem enzimikus csoport két, legfontosabb tagja a glutation (GSH) és az aszcorbinsav (AsA). Az AsA az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszik i) közvetlen módon, amikor a szabadgyököket közvetlenül oltja ki, és ii) közvetett úton, amikor elektrondonorként szerepel az APX által katalizált reakcióban, amely

során a H_2O_2 redukálódik. A reakció során keletkező monodehidro-aszorbátgyök (MDAsA) háromféleképpen alakulhat vissza AsA-vá: i) vagy a monodehidroaszorbát-reduktáz (MDAR) általi redukcióval, vagy ii) az első fotokémiai rendszerben található, redukált ferredoxin által, vagy pedig iii) spontán diszproporcionálódással, amikor két MDAsA egy AsA-vá és egy dehidroaszorbáttá (DHAsA) alakul. A DHAsA a GSH-függő dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR) alakítja vissza AsA-vá. Az oxidált GSH-t (GSSG) a glutation-reduktáz (GR) redukálja, amihez NAD(P)H-t használ elektrondonorként. A fent említett folyamatok alkotják az aszorbát-glutation (AsA-GSH) ciklust.

Célkitűzések

Munkánk során a búzát mint az egyik legfontosabb élelemforrásunkat tanulmányoztuk, mégpedig abból a szempontból, hogy milyen válaszra bírja egy hosszabb távú, mérsékelt kiszáradási folyamat a vegetatív fejlődés fázisában. Több búzafajtát vizsgáltunk, amelyeket szárazságstresszre toleránsnak, illetve érzékenynek találtak búzakonzorciumi, illetve külföldi nemesítő partnereink, elsősorban a vízhiány esetén realizált hozamuk alapján.

1. Két, szárazságstresszre toleráns búzafajta összehasonlításával, melyek közül az egyik egy őszi, „adaptív” genotípus, a másik pedig egy fakultatív, „elkerülő” stratégiát követő tájfajta, a következő kérdésre kerestük a választ:

- Milyen funkciójú fehérjét kódoló gének kifejeződése jellemzi az egyik, illetve a másik búzafajta gyökerét hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során?
- A génexpressziós változást mutató gének funkciója összefüggésbe hozható-e a két fajta eltérő, vízhiányhoz való akklimatizációs stratégiájával?

2. Stressztoleranciájukban eltérő jellegű búzafajtákat hasonlítottunk össze korlátozott vízellátás során.

- Mely élettani paraméterek változnak meg a hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során az egyes búzafajták esetében?
- Milyen funkciójú fehérjét kódoló gének kifejeződése jellemzi a szárazságstresszre ellenálló, illetve érzékeny fajták gyökerét?
- Találunk-e „toleranciagén(ek)e)t”, amely(ek) egyöntetűen különbséget mutat(nak) a toleráns és szenzitív genotípusok között?

3. Két, eltérő jellegű stressztoleranciával rendelkező búzafajta összehasonlításával a következő kérdésre kerestük a választ:

- Milyen aszkorbát-glutation ciklus izoenzimeket kódoló gének különíthetők el búzában?

- Hogyan változik az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek transzkriptszintje - izoenzimek szintjére lebontva - a két genotípus hajtásában hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során?
- A kapott eredmény hogyan függ össze a kísérlet során mért aszkorbát- és dehidroaszkorbát-tartalmakkal?

Anyagok és módszerek

Vizsgált búzafajták:

- *Triticum aestivum* L. cv. Plainsman V – közepes hozamú, minőségi termést hozó, szárazságtűrő, észak-amerikai, őszi búzafajta.
- *T. aestivum* L. cv. Cappelle Desprez – intenzív búzatermesztésben magas hozamot hozó, szárazság-érzékeny, francia, őszi búzafajta.
- *T. aestivum* L. cv. Jing-411 – szárazság-érzékeny, észak-kínai, őszi búzafajta.
- *T. aestivum* L. cv. Xiaoyan-54 – stressztűrő, kínai, őszi búzafajta.
- *T. aestivum* L. Kobomugi – Belső-Ázsiából származó, fakultatív tavaszi tájfajta.

Kísérleti rendszerek:

- Búzafajták nevelése perlitben

A kísérlet hat hétig tartott, melynek első két hetében előneveltük a növényeket, majd négy hétig a kontroll 1/6-nak megfelelő, csökkentett mennyiségű tápoldattal öntöztük őket. Hetente gyűjtöttünk mintákat.

- Búzafajták nevelése homok-perlit 2:1 arányú keverékében

A kísérlet hat hétig tartott, melynek első két hetében előneveltük a növényeket. A kontroll mintákat 70-80% talaj-vízkapacitású keverékben neveltük, a stresszelt növények esetében ez 30-40% FC volt. A nevelőközeg két hét alatt érte el a 40% FC-t, ezek voltak a kéthetes minták, majd további két hétig napi öntözéssel tartottuk fenn ezt a talajnedvesség-tartalmat. Ezek voltak a négyhetes minták.

Molekuláris vizsgálatok

- cDNS-macroarray - a perlitben nevelt búzafajták gyökér cDNS-einek hibridizációja árpa cDNS-eket tartalmazó macroarray-hez.

- Oligonukleotid-microarray - a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták gyökér cDNS-einek hibridizációja búzaoligókat tartalmazó microarray-hez.
- valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció PCR (RT-qPCR) - a macro- és microarray-adatok validálásához, valamint az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek transzkriptszint-meghatározásához.
- Származtatott aminosav-szekvenciák összehasonlítása - a búza aszkorbát-glutation ciklus enzimek hasonlósági fáinak felállítása származtatott aminosav-szekvenciák többszörös illesztésével.

Élettani mérések

- Gázcsere-vizsgálatok - a nettó CO₂ asszimiláció (*A*), a transzspirációs ráta (*E*), a sztómakonduktancia (*g_s*), valamint az *A/g_s* hányadosból kapott vízhasznosítási hatékonyság (WUE) meghatározása a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták leveleiben.
- ABS-tartalom meghatározása - a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták gyökerében ELISA technikával.
- Relatív prolintartalom meghatározása - a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták leveleiben színreakciót követő spektrofotometriás módszerrel.
- Klorofill- és karotinoidtartalom meghatározása - a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták leveleiben acetonos kivonást követő spektrofotometriás módszerrel.
- Relatív víztartalom meghatározása - a homok-perlit 2:1 arányú keverékében nevelt búzafajták leveleiben tömegméréssel.

Eredmények összefoglalása

1. Két, szárazságstresszre toleráns búzafajta összehasonlítása hosszú távú, mérsékelt vízhiány során:

- A két, szárazságstresszre toleráns búzafajtában az indukciót mutató gének funkció szerinti osztályozásánál azt az eredményt kaptuk, hogy a vízhiány hatására a Kobomugi tájfajta gyökerében elsősorban a cisztein-típusú peptidázok transzkript-mennyisége nőtt meg, a Plainsman V genotípus esetében pedig az oxidoreduktázokat, a cisztein-típusú proteázokat, a peroxidázokat, valamint a sejtfallal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének dominálták a transzkriptmintázatot. Továbbá a validáláshoz használt GST-k mRNS-szintnövekedése a Kobomugi gyökerekre volt jellemző. A hasonló transzkriptmintázatot mutató gének analízisénel találtunk egy olyan csoportot, amelynek tagjai tartósan magas transzkriptszinten fejeződtek ki a Plainsman V növények gyökerében, míg a Kobomugiban átmeneti kifejeződés-növekedést produkáltak a vízhiány 2. hetében. Ezek a gének különböző funkciójú fehérjéket kódolnak, amelyek többek között a transzkripció-szabályozásban, fehérjemódosításban, jelátvitelben, detoxifikációban, szénhidrát-anyagcserében vesznek részt.

- A Plainsman V fajta egy „avoidance” (megelőző) stratégiát folytat mérsékelt aszálystressz esetén, vagyis fenntartja a gyökérnövekedést, ami összefüggést mutat sejtfallal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének indukciójával. Ehhez társul még a kevésbé visszafogott CO₂-asszimiláció, a kialakuló oxidatív stressz kivédését legalább részben peroxidázokkal végzi, melyek transzkriptszintje nő a vízmegvonás hatására. Ezen változások, valamint a fokozott WUE végső eredménye a mérsékeltlen visszaesett terméshozam. Ezzel szemben a Kobomugi tájfajta már korábban csökkenti sztómáinak nyitottságát (erősen visszaesett CO₂-asszimiláció), amelynek egyik jelentős következménye az oxidatív stressz megjelenése (MDA), és a hatását semlegesítő rendszer beindítása (GST). A kevésbé nyitott sztómák következtében nincs jelentős vízvesztés (az RWC alig csökken), amit támogatnak az újonnan szintetizált ozmotikumok is (szabad prolintartalom, cukrok). Tehát ez a tájfajta az ily módon megtartott vízkészletével próbál gazdálkodni, ami kevesebb termést eredményez, mint pl. Plainsman V esetében.

2. Stressztoleranciájukban eltérő jellegű búzafajták összehasonlítása korlátozott vízellátás során:

- A Plainsman V szárazságstresszre toleráns fajta a hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során csökkentette leveleinek relatív víztartalmát, pigmentjeinek mennyiségét; megnövelte a szabad prolintartalmat a hajtásban, az ABS-szintet pedig a gyökérben; a vízhasznosítása hatékonyabbá vált a stressz hatására. Az érzékeny Cappelle Desprez esetében nőtt a sztómakonduktancia, és így a transzspiráció is, csökkent a leveleinek a prolintartalma, amelynek következményeként kevésbé hatékonyan hasznosította a rendelkezésére álló vizet; a gyökerekben ABS-t halmozott fel. A toleráns Xiaoyan-54 mérsékelte sztómáinak nyitottságát - csökkent a fotoszintetikus kapacitás, a transzspiráció; a hajtás prolintartalma viszont nőtt, ugyanígy a gyökér ABS-tartalma is. A vízhiányra érzékeny Jing-411 a gyökérben szintén megemelte az ABS-szintet; csökkent gázcserenyílásainak vezetőképessége, továbbá fotoszintézis-redukció jelentkezett nála; leveleinek klorofilltartalma csökkent, ugyanígy a vízhasznosítási hatékonysága is.

- A Plainsman V fajta gyökérében azon gének mutattak megnövekedett kifejeződést, amelyek termékei a szénhidrát-anyagcserében vesznek részt (β -glükózidázok, trehalóz-6-foszfát-szintáz), valamint receptor-kináz, illetve kataláz aktivitással bírnak. A katalázok a Xiaoyan-54 esetében is előfordultak, melyek mellett megnövekedett még a dehidrineket, hidrolázokat, aszparagin-szintázt, illetve a glikolízis enzimeit kódoló gének transzkripciószintje. Ami a Cappelle Desprez növények gyökerét illeti, megnőtt a β -glükózidázokat kódoló gének átírása, továbbá a dehidrineket, β -galaktozidázokat, lipoxigenázokat, glutation-transzferázokat, citokróm P450 monooxigenázokat, szerin-típusú karboxipeptidázokat, valamint a jázmonsav bioszintézisének enzimeit (allénoxid-szintáz, 12-oxo-fitodiénsav-reduktáz) kódoló gének. A szárazságra érzékeny Jing-411 esetében megemelkedett a Myb-típusú transzkripciószintje, dehidrinek, a hőszokkfehérjék, a hidrolázok, a nem specifikus lipidáthelyező fehérjék, a glutamin-szintetázok, valamint a Xiaoyan-54 fajtához hasonlóan a glikolízis enzimeinek mRNS-szintje. Összegezve, mind a négy fajtában indukálódott a jelátvitel, a nitrogén-anyagcsere, a sejtmegegyezés, az oxidatív stressz elleni védekezés, csak az egyes fajták különböző géneket aktiváltak ugyanannak a folyamatnak az erősítésére.

- Találtunk olyan „toleranciagéneket”, amelyek expressziós változása csak a szárazságra rezisztens, illetve szenzitív fajtákra jellemző. A vizsgált négy fajta esetében ilyen génjelöltek

többek között a GST-k, a hősokkféherjék, az aquaporinok, a különböző transzporterek, a nem specifikus lipidáthelyező fehérjék, a katalázok és a hisztidin-kinázok.

3. Az aszkorbát-glutation ciklus génjeinek transzkriptszint-változásai a szárazságra toleráns Plainsman V, illetve az érzékeny Cappelle Desprez leveleiben:

- A származtatott aminosav-szekvenciák többszörös illesztésével felállított hasonlósági fák alapján búzában az aszkorbát-glutation ciklus következő, sejtorganellumokra jellemző izoformáit találtuk: két APX-et (*cAPX I, II*), két MDAR-t (*cMDAR I, II*), egy DHAR-t (*cDHAR*) és egy GR-t (*cGR*), melyek a citoplazmába prediktálhatók. A kloroplasztisz sztrómájában két APX-et (*sAPX I, II*), egy-egy MDAR-t (*chlMDAR*), DHAR-t (*chlDHAR*) és GR-t (*chlGR*), valamint egy tilakoid-membránhoz kötött APX-et (*tAPX*). Ezen kívül pedig egy, a peroxiszóma membránjához kihorgonyzott APX (*mAPX*) és MDAR (*mMDAR*) gazdagította a kört.

- Az APX-ek között volt, amelyik csak a Plainsman V-ben (*cAPX II* és *tAPX*), csak a Cappelle Desprez levelekben (*sAPX II*), illetve mindkettőben (*cAPX I*) indukálódott. Az MDAR-ok közül csak a citoplazmában megtalálhatók transzkriptszintje nőtt meg mindkét fajtában (*cMDAR II*), illetve csak a Plainsman V (*cMDAR I*) hajtásában. A DHAR-okat vizsgálva csak a Cappelle Desprez hajtásában indukálódott a kloroplasztiszba prediktált *chlDHAR*. A GR-ok csak a Plainsman V fajtában mutattak a szárazságstresszre megnövekedett kifejeződést.

- Az aszályra érzékeny Cappelle Desprez esetében megváltozott az aszkorbátkészlet oxidáltsági állapota a kontrollhoz képest, vagyis a dehidroaszkorbát-tartalom megnőtt. Ennek oka valószínűleg az, hogy az oxidált aszkorbát-származékok (MDAsA, DHAsA) enzimatis visszaillesztése aszkorbinsavvá kisebb hatékonyságú. Ha figyelembe vesszük az egyes izoformák kifejeződésének változását, akkor az eltolódott AsA/DHAsA arány feltételezett oka, hogy a kloroplasztisz sztrómájában lévő *sAPX II* kifejeződését nem követi az *chlMDAR* fokozott expressziója. A Plainsman V növényekben viszont nem tapasztaltuk az AsA/DHAsA arány eltolódását - a fokozott *cAPX* kifejeződést a *cMDAR* hasonlóan megemelkedett mRNS-szintje követte.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Sečenji M., Hideg É., Bebes A., Györgyey J. (2010a) Transcriptional differences in gene families of the ascorbate–glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Reports*, **29**, 37-50.

Sečenji M., Lendvai Á., Miskolczi P., Kocsy G., Gallé Á., Szűcs A., Hoffmann B., Sárvári É., Schweizer P., Stein N., Dudits D., Györgyey J. (2010b) Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biology*, doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00295.x.

Egyéb közlemények

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Guóth A., Cseuz L., Tari I., Györgyey J., Erdei L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1878-1891.

Fehérné Juhász Erzsébet, Cseuz László, Horváth V. Gábor, Mai Antal, **Maria Secenji**, Sass László, Hideg Éva, Vass Imre, Dudits Dénes, Pauk János. A búzába történő génbeépítés módszerei és a hazai géntechnológiai eredmények a búza szárazságtűrésének javítására. *A búza nemesítésének tudománya*, Szerkesztette: Dudits Dénes, 2006.

Secenji M., Lendvai Á., Hajósné Z., Dudits D., Györgyey J. (2005) Experimental system for studying long-term drought stress adaptation of wheat cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, **49**, 51-52.

Secenji M., Hideg É., Bebes A., Györgyey J. (2008) Transcriptional changes in ascorbate-glutathione cycle under drought conditions. *Acta Biologica Szegediensis*, **52**, 93-94.

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Tari I., Györgyey J., Dudits D., Erdei L. (2008) Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in *Triticum aestivum* during polyethylene-glycol induced osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, **49**, 95-96.

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Tari I., Guóth A., Györgyey J., Erdei L. (2008) Monitoring the levels of phi and tau group GST genes in wheat cultivars under osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, **52**, 95-96.