

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A búza 5A kromoszómájának hatásai
a vegetatív/generatív átmenet során**

PhD értekezés tézisei

Boldizsár Ákos

Témavezető:

Kocsy Gábor

az MTA doktora



PÉCS, 2018

1. Tudományos előzmények

Az őszi búzafajták a hazai élelmezési és takarmányozási iparban nagyon fontos szereppel bírnak. Ezek a fajták az októberi vetés után, a hőmérséklet jelentős csökkenése előtt kihajtanak és fejlődésnek indulnak. Növekedésük e korai szakaszában a bokrosodási csomóban lévő hajtáscsúcsuk még vegetatív állapotban van. A téli fagyok túlélése érdekében vegetatív állapotban is kell maradniuk, mert így fagytűrésük sokkal jobb, mint a generatív átmenet elindulása után. A globális klímaváltozás következtében gyakoribbá váló szélsőséges időjárási körülmények miatt a korai átmenet és a rosszul időzített virágzás hatalmas termésvesztést okozhat. A virágzási idő és a fagytűrés háttérben lévő folyamatok megismerése ezért napjaink agrárkutatósaiban kulcsfontosságú.

Kétféle genetikai anyag is a rendelkezésünkre állt ahhoz, hogy a vegetatív/generatív átmenet alatt bekövetkező változásokat jobban megismerhessük. Az 5A kromoszómasubsztitúciós vonalokról – CS(Ch5A) = a Chinese Spring (CS) 5A kromoszómáját a Ch (Cheyenne) genotípus 5A-ja helyettesíti, CS(Tsp5A) = a CS 5A kromoszómáját a *Triticum aestivum ssp. spelta* (Tsp) genotípus 5A-ja helyettesíti – és a szülői CS vonalról már számos ismerettel rendelkezünk, mielőtt nekiálltunk a munkának. A Ch-ből származó 5A kromoszóma kiemelkedő fagyűrés növekedést idézett elő (Sutka 1981). Ezenkívül számos egyéb agronómiai tulajdonságra is pozitívan hatott. Később, egyre több ismeret állt a kutatók rendelkezésére a háttérben lévő molekuláris mechanizmusokról. Az 5A kromoszómán a vernalizációt szabályozó *Vrn1* lókuszhoz közel helyezkedik el a fagyűrésben szerepet játszó, *Fr1*-nek („frost resistance 1”) nevezett lókuszt is (Galiba és mtsai. 1995). A hidegedzés hossza és a fagyűrés közötti összefüggésre is hatással van az 5A kromoszóma; a CS(Ch5A) 10 nap után 66 %-os túlélést mutatott, ami sokkal jelentősebb emelkedés,

mint amit ugyanilyen hosszú edzés után a szülői (CS) vonal produkált (Veisz és Sutka 1989). Az *Fr1* és *Vrn1*, valamint a cukrok felhalmozásért felelős géneket tartalmazó lókuszok között is kimutatták már a kapcsolatot (Galiba és mtsai. 1997). A kromoszómasubsztitúciós vonalakban a hidegedzés alatt bekövetkező redox állapotváltozásokat vizsgálták Kocsy és mtsai. (2000), és összefüggést találtak a glutation akkumuláció és az 5A kromoszóma eredete között. Megállapították, hogy a GSH mennyiségi növekedése, melynek háttérében az 5A kromoszóma áll, hozzájárulhat a búza jobb fagyűréséhez.

A *Triticum monococcum* KU-104-es vonal magjait Shitsukawa és mtsai. (2007) $^{14}\text{N}^{7+}$ ionokkal bombázták, ezután elvetették azokat és önbeporozták a felnevelt növényeket, majd a következő generáció felnevelése után rátaláltak egy különleges fenotípussal rendelkező mutánsra. Ezt a mutánst az angol „maintained vegetative phase” nyomán *mvp*-nek nevezték el. A mutánst a vernalizáció sem tudta virágzásra bírni, aminek háttérében először csak a *VRN1* gén delécióját, később több gént érintő deléciót is találtak (Shitsukawa és mtsai. 2007, Distelfeld és Dubcovsky 2010). Az összes hiányzó gén az 5A kromoszóma egy szűk régiójában helyezkedett el.

Munkám során a fenti anyagok felhasználásával egy átfogó vizsgálatba kapcsolódhattam be, amely folyamán többféle megközelítéssel elemeztük a vegetatív/generatív átmenet alatt bekövetkező, fagyűrésre ható génexpressziós-, redox- és hormonális változásokat.

2. Célkitűzések

- Génexpressziós vizsgálatok elvégzése a vegetatív/generatív átmenet során kromoszómasubsztitúciós búza vonalakban. Kísérleteinkhez kontrollként a szülői CS (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum* cultivar 'Chinese Spring') vonalat használtuk; a CS(Ch5A) esetében a CS 5A kromoszómája a Cheyenne (Ch) genotípus 5A-jával került szubsztituálásra, míg a CS(Tsp5A) esetében az új kromoszóma a *Triticum aestivum* ssp. *spelta* vonalból származott.
- Ugyanezen a kísérleti anyagon az antioxidánsok közé tartozó tioloktól függő redox állapotváltozások elemzése. A tiolok közül a glutation (mint legfontosabb kis molekulatömegű antioxidáns tiol) és a hidroximetilglutation (hmGSH), valamint a glutation egyik építőkövének, a ciszteinnek a mennyiségi analízise.
- Átfogó összefüggés kimutatása a vegetatív/generatív átmenet során megváltozó gének (pl.: *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*) transzkripció mintázata és a redox állapot között az 5A kromoszómasubsztitúciós vonalakban.

- Kromogén *in situ* hibridizációs technika beállítása a *VRN1* gén hideg által előidézett, illetve a fejlődési állapottól függő expressziós változásainak sejtszintű nyomon követése céljából a különböző búza genotípusok (CS, Ch, CS(Ch5A) és CS(Tsp5A)) hajtáscsúcsaiban.
- A *VRN1* gént is tartalmazó kromoszómarégió transzkripció mintázatra gyakorolt hatásának elemzése *Triticum monococcum* vad (KU-104-es vonal) és deléciós mutáns (*mvp2*; „maintained vegetative phase” mutáns, virágzásra képtelen vonal) vonalak segítségével a vegetatív/generatív átmenet során felhasználva a microarray analízisben rejlő lehetőségeket.
- A szalicilsav és a citokininek mennyiségének vizsgálata a vegetatív/generatív átmenet és a virágkezdemény korai fejlődése során a *Triticum monococcum* vonalakban.

3. Anyagok és módszerek

1.1 Tiol mérés HPLC technikával

A folyékony nitrogénben fagyasztott mintákat TissueLyser II segítségével zúztuk össze, majd a diszulfidokat (a szabad tiolok nélkül) redukált állapotban mértük. Ezzel párhuzamosan az összes tioltartalmat is meghatároztuk. Így a kettő különbségéből ki tudtuk számolni a redukált formájú molekulák mennyiségét is.

Mindkét esetben DTT-vel redukáltuk a mérendő molekulákat, majd MBB-vel jelöltük azokat. A jelölt molekulák fluoreszcencia jelét egy fordított-fázisú HPLC-s elválasztás után W474 pásztázó fluoreszcens detektorral mértük.

A tiolok azonosítása és mennyiségük kiszámítása sztenderdekből készített kalibrációs sorozatok segítségével történt. A kromatogramokból meghatározott injektált mennyiségre vonatkoztatott pmol-ban megadott molekula mennyiséget a kiértékelés során növényi friss tömegre vonatkoztattuk és nmol-ban adtuk meg.

1.2 Hormonmérések

1.2.1 szalicilsav mennyiségi meghatározása

A SA (szalicilsav) és előanyagainak meghatározásához Pál és mtsai. (2005) módszerét alkalmaztuk. A benzoésav és a FS (fahéjsav) esetében 230-300 nm hullámhossz tartományú UV spektroszkópiát alkalmaztunk (W996 detektor), míg a SA és *o*HFS (*orto*-hidroxifahéjsav) esetében a mennyiségi fluorimetriás analízishez W474 detektort használtunk.

1.2.2 citokininek mennyiségi meghatározása

A citokininek mérési módszerének alapjait Svačinova és mtsai. (2012) írták le, melyen néhány módosítást eszközöltünk. A stabil, izotóppal jelölt citokinin sztenderdekét jéghideg extrakciós mixben metanol/víz/hangyasav (15/4/1 térfogat elegy) oldottuk. A homogenizált mintákhoz ebből a mixből 1-1 ml-t adtunk, ezután a mintákat lecentrifugáltuk és a felülúszót Sep-Pak Plus C₁₈ oszlopon átszűrtük. A citokinineket Oasis MCX fordított fázisú-kation cserélő SPE oszlopon megkötöttük majd 0,35 M-os NH₄OH-t tartalmazó 60 %-os metanollal leoldottuk.

Az UHPLC-MS/MS analízis előtt az eluátum száraz lepárlását is elvégeztük. Az analízis során alkalmazott tömeg spektrométer - Xevo™ 14 TQ MS - egy Acquity UPLC® rendszerrel volt összekapcsolva. A citokininek minőségi és mennyiségi elemzését több ion egyidejű monitorozását lehetővé tevő módon végeztük. Az adatok kinyeréséhez a MassLynx™ szoftvert használtuk.

1.3 Génexpressziós vizsgálatok

1.3.1 qRT-PCR

A vizsgálatainkhoz szükséges RNS kivonásához a Direct-zol™ RNS Miniprep Kitet (Zymo Research) használtuk. A DNS szennyeződésektől mentes tiszta RNS kivonatból 1500 ng mennyiséget írtunk át mintánként cDNS-sé.

A qRT-PCR vizsgálatokhoz CFX96 real-time PCR készüléket használtunk. A reakcióelegy térfogatát 10 µl-re állítottuk be. Vizsgálatainkhoz a KAPA SYBR enzim mixet hígítva a következő reakcióelegyet állítottuk össze: 5 µl SYBR mix; 0,5-0,5 µl „forward” és „reverse” primer (10 µM), 1 µl cDNS (~ 15 ng/µl) és 3 µl MQ víz.

Az adatelemzés során a relatív expressziós szintek meghatározásához a ΔC_T módszert alkalmaztuk. Minden esetben a Ta30797-es háztartási gént (Paolacci és mtsai. 2009) használtuk referencia génként.

1.3.2 microarray analízis

A *Tm wt* és *mvp2* növények bokrosodási csomójából gyűjtött mintákból egy különösen tiszta RNS kivonatot készítettünk a Qiagen RNeasy Plant Mini Kit-jével. Összesen 200 ng RNS-t használtunk a hibridizációt megelőző jelöléshez és amplifikációhoz, amit „Low Input Quick Amp Labelling Kit”-tel, a gyártói utasításoknak megfelelően készítettünk. A jelölés után tisztított mintákat „Agilent Wheat genom 4x44K” lemezekre hibridizáltuk, szintén követve a gyártói utasításokat. Az array szkenneléséhez „Agilent DNA Microarray Scannert” használtunk. A pöttyök fluoreszcencia intenzitásának meghatározásában, a háttér kiszűrésében és az eredmények normalizálásában a „Feature Extraction” szoftver 9.5 verziója volt a segítségünkre. Ezután az adatok elsődleges elemzését a „GeneSpring GX” programmal végeztük, amiből a további vizsgálatokhoz csak azokat az adatokat exportáltuk, ahol minimum kétszeres expressziós különbség volt detektálható. Az ArrayExpress adatbázisban hozzáférhetők az eredményeink, az „E-MTAB-3968” (2016) azonosítószám alatt.

1.3.3 kromogén *in situ* hibridizáció

A búza hajtáscsúcsokat Unicryl gyantába ágyaztuk, majd 0,1 μm vastagságú metszeteket készítettünk, egy rotációs mikrotóm segítségével. A hibridizációs próbákhoz a célgént kódoló szekvencia egy rövidebb szakaszát pGEM-T Easy vektorba építettük és ennek mindkét száláról szintetizáltattunk próbát, T7 illetve SP6 RNS polimeráz enzimek felhasználásával. (Így egy a mRNS-sel komplementer „pozitív” és egy vele megegyező szekvenciájú

„negatív” próbához jutottunk.) Ezeket a próbákat egy itt nem részletezett hosszabb folyamat segítségével hibridizáltuk a metszetekre, majd a bennük lévő DIG-el jelölt uracilhoz egy anti-DIG-AP (alkalikus foszfatáz) enzimet kötöttünk, amely képes volt az alkalmazott BCIP molekulát defoszforilálni, ami az NBT festéket ezután kék csapadékká redukálta. A kék elszíneződést fénymikroszkópban is láthattuk.

4. Új tudományos eredmények összefoglalása

1. Bebizonyítottuk az 5A kromoszóma jelentős szerepét a redox homeosztázis szabályozásában, mivel a vegetatív/generatív átmenet során (KB állapotban) a kromoszómaszubsztitúciós vonalakban mindhárom általunk vizsgált kis molekulatömegű tiolból a CS vonaltól eltérő mennyiséget detektáltunk.
2. A szubsztitúciós vonalak elemzésével kimutattuk, hogy az 5A kromoszóma számos fagyűrész és vernalizációval kapcsolatos gén kifejeződését szabályozza a vegetatív/generatív átmenet során.
3. A microarray analízissel igazoltuk, hogy a csupán négy ismert gént érintő deléción is több mint 300 gén expressziós mintázatát befolyásolta az alakor vonalakban. Az analízis során létrehoztuk az E-MTAB-3968 számú microarray adatbázist („E-MTAB-3968” 2016), melynek megbízhatóságát számos gén esetében qRT-PCR-rel validáltuk ($R^2=0,98$).
4. Bioinformatikai elemzéssel megalkottuk a mutánsból hiányzó négy gén (*VRN1*, *AGLG1*, *CYS* és *PHY-C*) által kódolt fehérjék, illetve az ezekkel kölcsönható fehérjék hálózatát, melyben a fehérjéket kódoló gének relatív expressziós aktivitását is feltüntettük.
5. Kimutattuk az *mvp2* mutáció hatását a szalicilsav és előanyagai, valamint egyes citokininek mennyiségére a vegetatív/generatív átmenet során.

5. Hivatkozások

- Distelfeld, A., Dubcovsky, J. (2010) Characterization of the *maintained vegetative phase* deletions from diploid wheat and their effect on *VRN2* and *FT* transcript levels. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 223–232.
- E-MTAB-3968 (2016) *Transcription profiling by array of Triticum monococcum KU-104-1 and its mpv mutant during double ridge and spikelet initiation stages at cold temperatures*: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-M>.
- Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W., Sutka, J. (1997) Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 265–270.
- Galiba, G., Quarrie, S.A., Sutka, J., Morgounov, A., Snape, J.W. (1995) RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1174–1179.
- Kocsy, G., Szalai, G., Vágújfalvi, A., Stéhli, L., Orosz, G., Galiba, G. (2000) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210: 295–301.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2005) Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. *Physiologia Plantarum* 125: 356–364.
- Paolacci, A.R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., Ciaffi, M. (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* 10: 11.
- Shitsukawa, N., Ikari, C., Shimada, S., Kitagawa, S., Sakamoto, K., Saito, H., Ryuto, H., Fukunishi, N., Abe, T., Takumi, S., Nasuda, S., Murai, K. (2007) The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, *maintained vegetative phase*, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. *Genes & Genetic Systems* 82: 167–170.
- Sutka, J. (1981) Genetic Studies of Frost Resistance in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 59: 145–152.
- Svačinova, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K. (2012) A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* 8: 17.
- Veisz, O., Sutka, J. (1989) The relationships of hardening period and the expression of frost resistance in chromosome substitution lines of wheat. *Euphytica* 43: 41–45.

6. Publikációs Jegyzék

1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Boldizsár, Á., Carrera, D.Á., Gulyás, Z., Vashegyi, I., Novák, A., Kalapos, B., Pál, M., Galiba, G., Kocsy, G. (2016) Comparison of redox and gene expression changes during vegetative/generative transition in the crowns and leaves of chromosome 5A substitution lines of wheat under low-temperature condition. *Journal of Applied Genetics* 57: 1–13.

Boldizsár, Á., Vanková, R., Novák, A., Kalapos, B., Gulyás, Z., Pál, M., Floková, K., Janda, T., Galiba, G., Kocsy, G. (2016) The *mvp2* mutation affects the generative transition through the modification of transcriptome pattern, salicylic acid and cytokinin metabolism in *Triticum monococcum*. *Journal of Plant Physiology* 202: 21–33.

2. Az értekezés témakörén kívül készült publikációk

Beczner, F., Antal, F., Kopp, A., Stiller, I., Kondrák, M., Boldizsár, Á., Bánfalvi, Z. (2017) The StubGAL83 subunit of the StubSNF1 complex interacts with HC-Pro of Potato Virus Y and influences virus multiplication in potato. *South African Journal of Botany* 113: 370–376.

Boldizsár, Á., Gulyás, Z., Carrera, D., Soltész, A., Vashegyi, I., Szalai, G., Galiba, G., Kocsy, G. (2011) Redox regulation of cold acclimation and vernalization in wheat. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 63–66.

Boldizsár, Á., Simon-Sarkadi, L., Szirtes, K., Soltész, A., Szalai, G., Keyster, M., Ludidi, N., Galiba, G., Kocsy, G. (2013) Nitric oxide affects salt-induced changes in free amino acid levels in maize. *Journal of Plant Physiology* 170: 1020–1027.

Galiba, G., Vanková, R., Tari, I., Bánfalvi, Z., Poór, P., Dobrev, P., Boldizsár, Á., Vágújfalvi, A., Kocsy, G. (2013) Hormones, NO, Antioxidants and Metabolites as Key Players in Plant Cold Acclimation. In: Imai R, Yoshida M, Matsumoto N (szerk) Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World Proceedings from Plant and Microbe Adaptations to Cold 2012. *Springer New York, New York, NY*, o 73–87

Gierczik, K., Novák, A., Ahres, M., Székely, A., Soltész, A., Boldizsár, Á., Gulyás, Z., Kalapos, B., Monostori, I., Kozma-Bognár, L., Galiba, G., Vágújfalvi, A. (2017) Circadian and Light Regulated Expression of CBFs and their Upstream Signalling Genes in Barley. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1828.

Gryshko, V.M., Artiushenko, T.A., Boldizsár, Á., Kocsy, G. (2016) Role of antioxidants in the protection against the combined effect of Cd, Zn, and Ni in wheat.

Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine 5: 110–116.

- Gulyás, Z., Boldizsár, Á., Novák, A., Szalai, G., Pál, M., Galiba, G., Kocsy, G. (2014) Central role of the flowering repressor *ZCCT2* in the redox control of freezing tolerance and the initial development of flower primordia in wheat. *BMC Plant Biology* 14: 91.
- Juhász, Z., Boldizsár, Á., Nagy, T., Kocsy, G., Marincs, F., Galiba, G., Bánfalvi, Z. (2015) Pleiotropic effect of chromosome 5A and the *mvp* mutation on the metabolite profile during cold acclimation and the vegetative/generative transition in wheat. *BMC Plant Biology* 15: 57.
- Kocsy, G., Pál, M., Soltész, A., Szalai, G., Boldizsár, Á., Kovács, V., Janda, T. (2011) Low temperature and oxidative stress in cereals. *Acta Agronomica Hungarica* 59: 169–189.
- Kocsy, G., Simon-Sarkadi, L., Kovács, Z., Boldizsár, Á., Sovány, C., Kirsch, K., Galiba, G. (2011) Regulation of free amino acid and polyamine levels during cold acclimation in wheat. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 91–93.
- Novák, A., Boldizsár, Á., Ádám, É., Kozma-Bognár, L., Majláth, I., Bãga, M., Tóth, B., Chibbar, R., Galiba, G. (2016) Light-quality and temperature-dependent *CBF14* gene expression modulates freezing tolerance in cereals. *Journal of Experimental Botany* 67: 1285–1295.
- Novák, A., Boldizsár, Á., Gierczik, K., Vágújfalvi, A., Ádám, É., Kozma-Bognár, L., Galiba, G. (2017) Light and Temperature Signalling at the Level of *CBF14* Gene Expression in Wheat and Barley. *Plant Molecular Biology Reporter* 35: 399–408.
- Reuter, G., Boldizsár, Á., Kiss, I., Pankovics, P. (2008) Candidate New Species of *Kobuvirus* in Porcine Hosts. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1968–1970.
- Reuter, G., Boldizsár, Á., Pankovics, P. (2009) Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*. *Archives of Virology* 154: 101–108.
- Reuter, G., Boldizsár, Á., Papp, G., Pankovics, P. (2009) Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Archives of Virology* 154: 1529–1532.