



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**STABIL GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓVAL ELŐÁLLÍTOTT
ÁRPA VONALAK ABIOTIKUS STRESSZTŰRÉSÉT ÉS
SZEMMÉRETÉT BEFOLYÁSOLÓ GÉNJELEK VIZSGÁLATA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

ZOMBORINÉ NAGY BETTINA

**GÖDÖLLŐ
2016**

A doktori iskola

- Megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola
- Tudományága:** Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
- Program:** Növénynemesítési és biotechnológiai tudományok
- Vezetője:** Dr. Helyes Lajos,
Egyetemi tanár, intézetigazgató
az MTA doktora,
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet
- Témavezető:** Dr. Horváth Gábor
Tudományos főmunkatárs,
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Növényi Növekedés Molekuláris
Szabályozása Csoport

.....
Dr. Helyes Lajos
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Horváth Gábor
A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A környezeti stresszre adott növényi védekező mechanizmusok megismerése alapvetően fontos, hogy a termésbiztonságot szélsőséges környezeti feltételek között is fenn tudjuk tartani.

A szárazságtűrésre történő nemesítés egyik legfontosabb eszköze lehet a szárazságtűrés szempontjából kedvező hatású allélvariánsok megtalálása és ezek keresztezés során történő felhasználása. A kutatók által kiválasztott génjelöltek szerepének tisztázásában, illetve a szárazságtűrésre történő nemesítésben kulcs lépés a genotípusok (értékes génvariánsokat hordozó növények és egyéb nemesítési anyagok) szárazságtűrő képességének megbízható meghatározása. Egyes gabonafajták, pl. rizs esetében már publikált eredmények is mutatták, hogy a stressz toleráns és stressz érzékeny fajták eltérő aldo-keto redukáz génextpresszióval rendelkeznek. Munkánk során így arra szerettünk volna választ kapni, hogy a szárazságtűrő árpa genotípusok esetében tudunk-e hasonló irányvonalat kimutatni, illetve meg tudjuk-e adni ennek az esetleges különbözőségnek a genomikai hátterét. Ehhez kapcsolódóan az árpa 2 saját génjének („*HvARHI*” és „*HvSRG6*”) szárazságtűrésében betöltött szerepét vizsgáltuk expressziós analízisek segítségével a Törjék Ottó munkacsoportja által korábban már különböző haplotípus csoportokba sorolt, szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa genotípusokon.

A dolgozat további részei az *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített génátviteli eljárást és a vele elért eredményeket mutatják be. Az általunk is vizsgált, lucernából izolált ALR (*Medicago sativa* aldóz-redukáz, *MsALR*) gén a stressz folyamatok során képződő reaktív aldehidek redukciójával, illetve ozmotikumok szintézisével védelmet nyújthat az abiotikus stresszek ellen. A lucerna eredetű aldo-keto redukázokat (AKR) termelő transzgenikus növények igazoltan magasabb toleranciát mutattak többféle abiotikus stresszel szemben is, pl. szárazság (Oberschall et al. 2000), UV (Hideg et al. 2003), hő (Turóczy et al. 2011). A doktori munka során egyrészt azt vizsgáltuk, hogy a lucerna ALR enzim milyen mértékben tudja kifejteni ezt a védőhatást. Másrészt, hogy a reaktív karbonil vegyületek eltávolítása a citoplazmában vagy a kloroplasztiszbán fontosabb. Ennek eldöntésére olyan konstrukciót is létre hoztunk, mely lehetővé teszi az egyes detoxifikáló tulajdonságú fehérjék kloroplasztiszbába történő transzportját. A génjelöltet tavaszi árpában túltermeltettük és a megnövekedett génextpresszió hatását vizsgáltuk a transzformáns növény abiotikus (dehidratáció, só és karbonil) stressz-adaptációja során. A jellemzés módszerét egy abiotikus stresszre adaptált tranziens génextpresszió tesztrendszer (Marzin et al. 2008) képezte.

Az abiotikus stresszhatásoknak ellenálló növények előállításával mellett a kutatások kiemelkedő fontosságú másik célja a terméspotenciál növelése

is; így például a szemtermés méretének javítása, vagy a szemfeltöltődés folyamatának befolyásolása is fontos nemesítői szempont. Irodalmi adatok alapján kiválasztottunk egy gént, mellyel szintén az árpa szemméretét kívántuk befolyásolni. Választásunk a korábban rizsből izolált és jellemzett GW2 (grain weight 2 gén, szemsúly meghatározásában szerepet játszó) génre esett. Antiszensz orientációban használva a transzformáció során a rizsszemek szélességének jelentős növekedésével szignifikánsan sikerült a szemtermés súlyát növelni, mely a szem vastagságában és hosszában bekövetkezett enyhe növekedéssel párosult (Song et al. 2007). Kutatásaink során a gén árpa homológjaival végeztünk transzformációs kísérleteket, hogy megbizonyosodjunk szemméret befolyásolásában betöltött szerepükről.

Az értekezés fő célkitűzéseit így az alábbi pontokban foglalom össze:

1. Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek, a *HvARH1* és *HvSRG6* gének expressziójának vizsgálata abszcizinsav kezelés hatására.
2. A tavaszi árpa *Agrobacterium tumefaciens* -szel történő transzformációja, a technológia adaptálása és az elkészített konstrukciókkal stabil transzformáns árpavonalak létrehozása.
3. A lucernából izolált *MsALR* gén bináris vektorba építése olyan transzgenikus vonalak előállítása céljából, amelyek az ALR fehérjét a citoplazmában (p6d35S-*MsALR*) vagy a kloroplasztiszban (p6d35S-cp*MsALR*) halmozzák fel. A transzgen beépülésének és kifejeződésének bizonyítása és kópiaszámának meghatározása molekuláris módszerekkel.
4. Az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszokban betöltött szerepének fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló tanulmányozása. Ezt a kutatást a létrehozott stabil transzformáns árpa vonalak dehidratáció, só és karbonil stressztűrés vizsgálatain keresztül végeztem. A fluoreszcens sejtarány értékek által igazolt stressz tolerancia mértékét más biokémiai módszerekkel (klorofill tartalom, prolin, tiobarbitúrsav reaktív anyagok (TBARS) felhalmozódás mérése) is alátámasztottam.
5. A szemméret befolyásolásában szerepet játszó GW2 gén árpa homológjait antiszensz orientációban tartalmazó stabil transzformánsok létrehozása, a transzformáns vonalak jellemzése molekuláris biológiai módszerekkel. A vonalak fenotipizálása, szemméret pixel-analízisen alapuló vizsgálata.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növénynevelés, növényanyag

A stabil transzformációs kísérleteket éretlen tavaszi árpa embriókon (*Hordeum vulgare* cv. 'Golden Promise') végeztük.

Az árpa leveleken végzett tranziens expressziós, génbelövéses kísérletekhez 7-10 napos árpa növénykékről levágott, kb. 6 cm hosszúságú első leveleket helyeztünk 0,5 % (w/v) víz-fitoagar (Duchefa) táptalajra, összesen 6-6 műanyag Petri-csészébe (Ø 6 cm, Greiner), mind a kontroll Golden Promise, mind az MsALR transzformáns vonalakból. A Petri-csészék egyenként 5-5 árpa levelet tartalmaztak.

Árpa transzformáció

Az árpa *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 törzs) által közvetített stabil genetikai transzformációja során Hensel és Kumlehn (2004) által kidolgozott protokollt követtük.

RNS izolálás, cDNS-szintézis és valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció PCR (RT-qPCR)

A génexpressziós vizsgálatokhoz szükséges össz-RNS izolálásokat Chomczynski és Sacchi (1987) módszere alapján Tri-reagenssel (Sigma) végeztük. A tisztított RNS mintákból szintetizált cDNS-eket real-time (valós idejű) PCR futtatásokhoz használtuk, melyeket az ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System készülékén végeztünk. Az adatok analíziséhez a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittegen, 2001).

Tranziens expressziós tesztrendszer anyagai és módszertana: részecskebelövés és stressz kezelés

A tranziens részecskebelövés során az aranyszemcsék két tranziens expressziós plazmiddal történő bevonásához Mihály Róbert doktori disszertációjában (2009) részletesen leírt protokollt követtük.

A tranziens tesztrendszer felállításához szükséges vektorokat Dr. Patrick Schweizer biztosította (IPK Gatersleben, Genome Analyses Department, Transcriptome Analysis Group).

A levágott leveleket Marzin et al. (2008) által leírtak szerint génbelövésrel tranziensen transzformáltuk, majd a belövést követően 24 óráig, nem stresszelt körülmények között hagytuk felhalmozódni a zölden fluoreszcens (GFP) és az éretlen, nem fluoreszkáló DsRED (*Discosoma sp.* RED, vörös

fluoreszcens protein) fehérjét, Parafilm® -mel lezárt Petri-csészékben, klimatizált helyiségben (24 °C állandó hőmérsékleten, nem közvetlen megvilágítással). Egy nap elteltével Olympus SZX12 fluoreszcens sztereo mikroszkóp alatt (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) megszámoltuk a GFP expresszáló epidermisz sejtek számát, majd a levágott levelek 50 % -a stressz kezelés nélküli, víz-fitoagar (0.5 % (w/v), Duchefa Biochemie, Harleem, The Netherlands) táptalajon maradt, fennmaradó másik 50 % -uk pedig kísérletenként eltérő stressz kezeléseken (dehidratáció, só és metilglioxál) esett át, melyeket az alábbiakban részletezett módon hajtottunk végre:

Dehidratációs stressz esetén a levágott levelek 50 % -át tettük ki kiszáritásos stressznek úgy, hogy tömegüket a levágáskor mért kiindulási tömegük 60 % -ára csökkentettük kiszáritással, lamináris boxban (Gelaire, Italy), 22 °C hőmérsékleten, 60±30 perc alatt. Miután elérték a kívánt tömeget, átnedvesített filter papírral (0.25 ml H₂O) ellátott Petri-csészékbe helyeztük őket, s Parafilm® -mel (Pechiney, Chicago, IL, USA) lezárva, nem közvetlen megvilágítású helyre helyeztük őket.

Sóstressz esetén a stressz kezelt, levágott levelek 175 mM NaCl (nátrium klorid)-ot tartalmazó víz-fitoagar táptalajra kerültek. A NaCl-ot a kívánt koncentrációban autoklávozás előtt adagoltunk a táptalajba.

Metilglioxállal (MG) végzett kezeléseket esetén a stressz kezelt leveleket 12.5 mM MG-t (Sigma) tartalmazó víz-fitoagar táptalajra kerültek. A MG-t ebben az esetben a táptalaj autoklávozása után, steril körülmények között adagoltuk az előhűtött táptalajhoz.

Mindegyik stressz kezelés esetén mind a kontroll és stressz körülmények között tartott levelek 96 óráig voltak inkubálva. A stressz kezeléseket végeztével megszámoltuk a levélszegmenseken vörösen fluoreszkáló epidermisz sejteket, s ezek számát normalizáltuk a belövést követően, stressz kezelés nélkül felhalmozódni hagyott zöld fluoreszcens sejtek számával.

A pixel alapú szemméret jellemzés digitális fotográfiával

A szemméret meghatározására a T2 nemzedék kiválasztott vonalaiból 80-80 mag tömegét mértük le Ohaus Model EP114C analitikai mérleg (Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA) segítségével (0.1 mg mérési pontosság). A lemért szemek szemméret meghatározást a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer részét képező SSAP program segítségével (Seed Size Analysis Program, v. 0.95) végeztük el. A program és a fényképek analíziséhez szükséges függvényeket Sass László (SzBK, Növénybiológiai Intézet) fejlesztette.

GFP és DsRED expresszáló epidermisz sejtek mikroszkópos detektálása

A GFP és DsRED expresszáló sejtek számolása Olympus SZX12 fluoreszcens sztereo mikroszkóp segítségével történt. A GFP és DsRED expresszáló sejtekről készült fényképfelvételek Olympus Camedia C7070 digitális kamerával készültek, DScaler szoftver (4.1.15. verzió, www.dscaler.org) használatával.

Klorofill és karotinoid tartalom meghatározása

A méréseket a belövéses kísérleti rendszerben használt leveleken (~300mg, 5 levél/ 6cm Ø Petri-csésze) végeztük, melyeket folyékony nitrogénben porrá őröltünk. A fotoszintetikus pigmenteket 4 °C-os, 80 v/v % koncentrációjú acetonban való dörzsöléssel extraháltuk. A mintákat centrifugálás után (4°C, 10 perc, 2500 rpm) spektrofotometriásan (Hitachi U-2900) mértük a következő hullámhosszokon: 663,6 és 646,6 nm (klorofill *a* és *b*), valamint 440,5 nm (karotinoidok). A kiértékeléshez Yang et al. (1998) által felállított képleteket használtuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzések a Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) szoftver segítségével készültek el, kétmintás t-próbát alkalmazva, $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten.

EREDMÉNYEK

Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek expressziós vizsgálati eredményei

A Törjék Ottó által vezetett csoportjának munkájához kapcsolódva vizsgáltuk az árpa 2 saját génjének abszcizinsav (ABA) kezelésre adott expressziós válaszát vizsgáltuk. A kiválasztott gének a következők voltak: *HvARH1*, valamint a *HvSRG6*.

A *HvARH1* gén esetében a korábban 3 fő haplotípus csoportba (*HvARH1-Z1*, *HvARH1-Z4* és a *HvARH1-Z6*) sorolt genotípusok közötti legfontosabb eltérés a *HvARH1-Z4* és *HvARH1-Z6* haplotípus csoportokon belül a promóter régióban, a translációs starttól 71 bázispárnyi távolságra upstream irányban elhelyezkedő 6 bp hosszúságú deléció, illetve a *HvARH1-Z1* haplotípus csoport esetében a promóter régióban, a translációs startponttól 735 bp távolságra upstream irányban elhelyezkedő 9 bp hosszú inszerció volt. Mindhárom haplotípus csoporton belül 3-3 genotípusban vizsgáltuk az inszerció-deléció mutációk hatását az ABA- indukált génexpressziós változásokban. A 6 hetes leveleken végrehajtott 24 órás, 50 μ M ABA kezelés hatására minden esetben erőteljes gén indukciót tapasztaltunk, ami a relatív transzkriptszint vizes kontroll kezelt mintákhoz viszonyított szignifikáns emelkedésében nyilvánult meg. A legkifejezettebb, s egyben az adott haplotípuson belül a leginkább egyöntetűbb változást a *HvARH1-Z1* haplotípushoz tartozó genotípusokban tapasztaltunk, ebben a csoportban a génexpresszió 20-60-szoros növekedést mutatott a vizes kontroll kezelt leveleken mértékhez. A *Z4* és *Z6* haplotípusba tartozó tájfajták alacsonyabb, 10-szeres gén expressziós szintet produkáltak. A *Z4* haplotípushoz tartozó *Compana* genotípusban detektált kimagasló expressziós szint azonban előrevetítette a nagyobb mintaszámmal végzendő további génexpressziós vizsgálatok (statisztikai) szükségességét.

A *HvSrg6* gén esetében az ABA indukált expressziós változásokat 5 olyan genotípusban vizsgáltuk meg, amelyek a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazták, illetve 3 olyan genotípusban (*Otis*, *Chilga* és *Diamond*), melynek promóter régiója a translációs starttól 158 bp távolságra egy 197 bp nagyságú inszerció-deléció mutációt tartalmazott. Az előző expressziós analízissel szemben itt az irodalmi adatokat követően jóval magasabb, 10 mM koncentrációjú ABA kezelést alkalmaztunk, melynek hatására azonban csak moderált génexpressziós változást tapasztaltunk, ennek a változásnak a nagysága 2,7 szeres indukciótól a 0,7 szeres represszióig érő tartományban mozgott.

Stabil árpa transzformáció az *MsALR* génnel

Az *MsALR* fehérjét termelő vektorkonstrukciók előállításakor felmerült a kérdés, hogy az oxidatív stressz során keletkező reaktív karbonil vegyületek eltávolítása a citoplazmában vagy a kloroplasztiszban fontosabb, esetleg a detoxifikáló enzim együttes jelenléte növelheti-e meg jobban a stressz ellenállóságot. Ennek eldöntésére olyan konstrukciók előállítását kezdtük meg, mely lehetővé teszi az egyes detoxifikáló tulajdonságú fehérjék citoszólba, vagy kloroplasztiszba történő transzportját.

A konstrukciók előállításával párhuzamosan az árpa *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációs protokolljának (Hensel et al. 2004) laboratóriumi körülményeink közé történő adaptálása is sikeresen megtörtént. Létrehoztunk 24 független (14,3 % transzformációs hatékonyság); az *MsALR* fehérjét a citoszólba, és 5 független; az *MsALR* fehérjét a kloroplasztiszba targetáló transzformáns árpavonalat (4,4 % transzformációs hatékonyság). A PCR analízissel ellenőrzött vonalak mindegyikében ki tudtuk mutatni nemcsak az *MsALR*, hanem a szelektációs markergén (*Hpt*) jelenlétét, és fehérje immunoblot analízis során pedig a szintetizálódó *MsALR* fehérjét. A termelt fehérjét a kloroplasztiszba targetáló *p6d35s-cpMsALR* vonalak esetében a citoszólos transzformáns vonalakkal összehasonlítható mértékben szintetizálódó fehérjét detektáltunk, bizonyítottam azt is, hogy az árpa Rubisco kis alegység tranzit peptid hatékony célbajuttató szekvenciát biztosított a fúziós protein számára. A citoszólos transzformáns vonalunk esetében (L3 vonal) a beépült transzgen kópiaszámát kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg. Az *Agrobacterium* által közvetített genetikai transzformáció a vizsgált *MsALR* transzformáns vonalunkon a várakozásokkal ellentétben magas kópiaszámot eredményezett: mindkét számolási módszerrel 10 feletti beépülési kópiaszámot mutatott ($14,9 \pm 2$ valamint $11,2 \pm 0,84$).

Tranziens génexpressziós tesztrendszer az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszban betöltött szerepének bizonyítására

A fluoreszcens tesztelés a dehidratációs, só és karbonil stressz során fellépő sejtszintű stresszválaszok értékelésében megfelelő módszernek bizonyult a p6d35S-*MsALR* (citoszól) és p6d35S-*cpMsALR* (kloroplasztisz) transzformáns vonalainkon; a kiválasztott vonalaink mind a GFP és DsRED fehérjéket termelő, zölden és vörösén fluoreszkáló epidermisz sejtek arányában a vad típusú kontroll növényekhez képest szignifikánsan magasabb értékeket mutatott, s egyben az alkalmazott abiotikus stresszekkel szemben ellenállóbbnak bizonyult. Munkánk alatt a stressz kezelések során mért GFP/DsRED sejtarányokban kapott szignifikáns különbségek

alátámasztására klorofill és karotinoid izolálásokat is végeztünk tehát. Megállapítottuk, hogy mindhárom stresszkezelés a várakozásoknak megfelelően mindkét transzformáns vonalunk esetében (L3 és cpL1) csökkentette a klorofill tartalmat. A dehidratáció és sóstressz esetén a stressz kezelt transzgenikus levelek szignifikánsan magasabb klorofill mennyiséggel voltak jellemezhetőek. A metilglioxállal (MG) végzett stressz kezeléseket a stresszelt transzgenikus levelek csak 5 %-kal több klorofill tartalmat mutattak. Karotinoid tartalom tekintetében a dehidratációs stressz kezelés után enyhe csökkenés volt megfigyelhető a transzgenikus és nem transzgenikus vonalainkon. A só és MG kezelés nem mutatott hasonló változást: ez a paraméter emelkedett vagy éppen nem változott a stresszkezelés hatására.

Az általunk végzett kísérletek mind azt igazolták, hogy az MsALR fehérjét túltermelő árpavonalaink mind ellenállóaknak bizonyultak az alkalmazott abiotikus stresszek esetében, függetlenül attól, hogy a termelt fehérjét a citoszólba, vagy a kloroplasztiszokba targetáltuk.

Árpa stabil genetikai transzformációja a GW2 gén csendesítésére

Dolgozatom következő részét a magméret meghatározásában szerepet játszó GW2 gén csendesítésére irányuló transzformációs kísérletek képezték. Ennek első lépéseként a rizs szemméret meghatározásában fontos szerepet játszó GW2 gén (mely egy E3 ubiquitin ligázt kódol) árpa homológjait kerestük meg és ezek kifejeződését csökkentettük antiszensz technológiával; a gének rövid, specifikus szakaszainak Golden Promise tavaszi árpába történő visszatranszformálásával. Az adatbázisokban történő kereséséből megállapítottuk, hogy az ismert kétszikű szekvenciák egy csoportot alkotnak, míg az egyszikűek esetében a kétfajta homológ egymástól élesen elkülöníthető. A két csoport közötti fehérjeszintű azonosság 40% körüli, azonban ez főként a fehérjék első felére koncentrálódik, ahol az ubiquitin ligáz aktivitásért felelős RING-domén található, a szubsztrát kötésért feltehetően felelős második szakasz szekvenciája egymástól teljesen eltérő. Ebből arra következtethetünk, hogy a fehérjék élettani funkciója is jelentősen különbözhet, noha mindkét esetben a fehérje degradációs útvonal irányító enzimeiről van szó. A rizs esetében a GW2 homológ fehérje szekvenciája bizonytalan. Bár az ezt kódoló genomikus régió ismert, a predikció nem fedi a cDNS-ek által megerősített aminosav sorrendet.

A transzformáns vonalainkon Gabonakutató Non-Profit Kft.-ben megkezdtuk a növények részletes vizsgálatát (Golden Promise kontroll növények és a transzgenikus árpák 6 vonala), melyben az egyedszámok (vonalként 18-20) megengedték a növények fenotípusos elemzését a kalászok paraméterei (fő és mellékajtások száma, szemszám, ezerszemtömeg, szem szélesség, hosszúság) alapján. A tapasztalt

fenotípusok alapján összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a rizs *GW2* közeli árpa homológjának antiszenszelése (ASHvGW2.1) a növény vegetatív növekedési fázisában bár erőteljes fenotípust nem okozott, a kalászosítás a kontrollhoz képest előbb kezdődött (körülbelül egy héttel). A kalász érésének folyamata lassúbb, hosszabb volt a teljes és viaszos érés időtartama. Feltételezéseink szerint ezzel is magyarázható a jobb szemfeltöltődés és a kialakuló nagyobb szemméret és -tömeg. Ezzel szemben a rizs *GW2* távoli árpa homológjának antiszenszelése (ASHvGW2.2) jelentős változást eredményezett már a vegetatív növekedés fázisában is. A növény alacsonyabb, igen jelentős (80 %-os) levéltömeg és az azt eredményező levélméret növekedéssel. A kalászosítás legalább egy hét késéssel indult meg a kontrollhoz képest, a kalászok gyakorlatilag a teljes érés során levélfedettek voltak. Különbséget tapasztaltunk a fő- és mellékajtások számában is, illetve az ezekről származó szemek méreteiben is. Az ASHvGW2.2 növények esetében kevesebb főajtás és több mellékajtás volt megfigyelhető, tehát a bokrosodás is erőteljesebb mértékű volt. Mindkettő homológ esetében egyaránt növekedett a mellékajtásonként mért ezerszemtömegek nagysága. Ez elsősorban a szemek szélesebb voltának, valamint ebből adódó nagyobb tömegükkel voltak magyarázhatóak a transzformánsok esetében, ehhez a szemhosszúságban mért csekély változások voltak feljegyezhetőek a kontroll növényeken mért szemekhez képest.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek expressziós vizsgálati eredményei

Az elmúlt évek szakirodalmi eredményeinek köszönhetően számos olyan tényező vált ismertté, amely a szárazságtűrésben szerepet játszó gének transzkripcióját befolyásolja. Egyes gabonafajták, pl. rizs esetében már publikált eredmények is mutatták, hogy a stressz toleráns és stressz érzékeny fajták eltérő aldo-keto redukáló génexpresszióval rendelkeznek (Karuna Sree et al. 2000). Munkánk során így arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a szárazságtűrő árpa genotípusok esetében tudunk-e hasonló irányvonalat kimutatni, illetve meg tudjuk-e adni ennek az esetleges különbözőségnek a genomikai hátterét. Munkánk során első lépésként vizsgáltuk az árpa saját génjeinek abszcizinsav (ABA) kezelésre adott expressziós válaszát. A *HvAHR1* gén vizsgálata során a *Compana* genotípusban a többi mintához képest detektált kimagasló expressziós szint azonban előrevetítette a nagyobb mintaszámmal végzendő további génexpressziós vizsgálatok szükségszerűségének felvetését, nagyobb mintaszámból még pontosabb következtetéseket vonhatunk le az adott haplotípus csoportokba tartozó genotípusok hormon indukált expressziós válaszaiból.

A *HvSRG6* gén esetében mivel a hormon hatására is csak mérsékelt génexpressziós különbségeket detektáltunk, elvégeztük a promóter régió internetes adatbázisban végzett elemzését is. Ennek eredménye bizonyította, hogy a hormonindukcióhoz szükséges elemek egyike sem található az inszerciós-deléciós régióban. Általánosságban, az irodalomban fellelhető adatok alapján azonban elmondható, hogy az *SRG6* gén expressziója azon genotípusokban kifejezetten magas, ahol sok fiziológiai karakter (gázcsere, PS(II) fotokémiai rendszer teljesítménye, sejtmembrán stabilitás) is kevésbé érzékeny a szárazság stressz (Rapacz et al. 2010) okozta változásokra, megerősítve ezáltal azt a feltevést, hogy a génjelöltünk fontos részét képezi a szárazság stressz elleni védelem komplex mechanizmusának (Xu et al. 2010; Tong et al. 2007). A gén ABA indukált expressziója mellett végzett egyéb fiziológiai paraméterek elemzése tehát még átfogóbb képet adhat a gén genotípus függő expressziójáról.

Stabil árpa transzformáció az *MsALR* génnel

A citoszólos transzformáns vonalunk esetében (L3 vonal) a beépült transzgén kópiaszámát, a jelenleg legmegbízhatóbb módszerrel (Gadaleta et al. 2011), kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg. Az *Agrobacterium* által közvetített genetikai transzformáció a vizsgált *MsALR* transzformáns

vonalkon a várakozásokkal ellentétben magas kópiaszámot eredményezett: mindkét számolási módszerrel 10 feletti beépülési kópiaszámot mutatott ($14,9 \pm 2$ valamint $11,2 \pm 0,8$). Ez az irodalomban fellelhető adatokhoz képest ellentétben állt, hiszen az agrobaktériumos transzformálás általában alacsony beépülési kópiaszámot eredményez (Bartlett et al. 2008). Az ellentétes orientációban beépülő transzgen kópiák genom instabilitáshoz, rekombinációs eseményekhez illetve géncsendesítéshez vezethetnek (Wolffe et al. 1997, Travella et al. 2005), bár ennek ellenkezőjére is vannak példák. Hernandez-Garcia és munkatársai (2010) új szója promóterek vizsgálatakor leírták azt, hogy egyenes arányosságot tapasztaltak a GFP transzgen kópiaszáma és a termelt GFP fehérje mennyisége között. Nem különleges tehát az sem, hogy egy több MsALR kópiát tartalmazó transzformáns vonalunk esetében magas fehérjeszintet tudunk kimutatni.

Változó frekvenciával mindig előfordulhatnak tehát olyan vonalak, melyek önmagukban több kópiát is tartalmaznak. Hensel és munkatársai (2008) sem tudtak közvetlen kapcsolatot találni a több kópiát tartalmazó transzformánsok előfordulása és a transzformáció során alkalmazott kezelések illetve *Agrobacterium* törzsek között. Fontos megjegyeznünk azt, hogy esetünkben ez a magas kópiaszám nem géncsendesítéshez vezetett (Wolffe et al. 1997), hanem a fehérje immunoblot analízise szerint magas expressziós szintet biztosított, melyhez a csoportban végzett korábbi kutatások (Oberschall et al. 2000) során termeltetett α -MsALR poliklonális ellenanyagot és peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG antiszérumot használtunk. Ez az ellenanyag képes volt a transzgenikus árpákban szintetizálódó MsALR fehérje kimutatására, amellett, hogy elhanyagolható háttért eredményezett a nem transzformáns Golden Promise vonalak fehérje mintáin. Az ellenanyag rutinszerű tesztelési eljárást biztosított az MsALR transzformáns jelölt vonalaink esetében.

A magas transzformációs hatékonyság az agrobaktériumos transzformáció egy másik előnyét is igazolta, miszerint a közvetett géntranszfer e fajtájánál a transzgen gyakrabban fejeződik ki. A biolisztikus és agrobaktériumos transzformációs módszer során eredményezett génextpressziós arányok összehasonlítására Travella és mtsai. (2005) végeztek kísérleteket árpában. Eredményeik szerint a génelövással előállított transzgenikus vonalak 25 %-a, míg az agrobaktériummal előállított vonalak 71 %-a eredményezett transzgen kifejeződést.

Tranziens génextpressziós tesztrendszer az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszban betöltött szerepének bizonyítására

A fluoreszcens fehérjék termeltetésén alapuló tranziens expressziós tesztrendszer általunk alkalmazott variánsának előnye más módszerekkel

szemben, hogy egyszerűen adaptálható más, laborkörülmények között előidézhető stressz esetén is, továbbá egyes – például gyökérnövekedést vizsgáló hidroponikus – kísérletekkel szemben lényegesen gyorsabb tesztelési eljárás. Olyan esetekben is információt nyújthat a vizsgált abiotikus stresszel szembeni tolerancia mértékére, amikor más paraméterek (például fotoszintetikus hatékonyság) még nem mutatnak detektálható különbséget.

Az aldóz-reduktáz gén a tranziens expressziós tesztrendszerben alkalmasnak bizonyult az abiotikus stresszek hatására képződő reaktív aldehidek toxikus koncentrációjának redukciónak (Oberschall et al. 2000). A GFP/DsRED fluoreszcens sejtek aránya mindenhol szignifikánsan több értéket mutatott a transzformáns vonalaink javára, a stresszkezelések végeztével. Ezzel összhangban van korábbi kutatásaink eredménye is, mely a citoplazmatikus aldóz-reduktáz fehérje *in vivo* védőfunkciójáról számolt be transzgenikus búza növényekben (Fehér-Juhász et al. 2014).

Kísérleteink során megvizsgáltuk a levelek fotoszintetikus aktivitásának változását a kiszáritás során. A kísérletben résztvevő növényeknél PSII fotokémiai rendszer maximális kvantum hatékonyságát (F_v/F_m) és effektív kvantumhatékonyságát [$Y(II)$] fluoreszcencia kinetika méréssel is meghatároztuk (adatok nem mutatva): először a levélszegmensek levágásakor, majd a belövést követően, végül a stresszkezelés befejezésekor is végeztünk méréseket. Bár az eredmények néhány kísérlet esetében a GFP/DsRED arány és a klorofill tartalom során mért adatokhoz hasonló eredményt szolgáltatott (a transzgenikus növényvonalunk magasabb értékeket mutatott a stresszkezelés végeztével), azonban ezek a különbségek egyetlen esetben sem bizonyultak szignifikánsnak a vad típusú Golden Promise leveleken mért adatokhoz képest. Megemlítendő azonban, hogy a transzgenikus árpa az MsALR enzimet a citoplazmában felhalmozva működése közben jelentősen csökkenthette a reaktív aldehidek káros hatását. Ez azonban csak áttételesen jelentheti a fotoszintetikus apparátus védelmét, így kaphattunk szignifikáns különbséget a teszt módszer alkalmazásakor annak ellenére, hogy a fotoszintetikus paraméterekben nem tapasztaltunk számottevő eltérést (adat nem mutatva). Mindezek alapján elmondható, hogy a tranziens tesztrendszer alkalmazásakor a növények különböző abiotikus stressz kezelésekre adott válasza során elsősorban olyan sejtszinten vizsgálható különbségeket mérünk, amikor a stressz tolerancia alakulása nem elsősorban a kloroplastszokhoz, mint fotoszintetikus sejt szervecskéhez köthető. Az eredményekből joggal következtethetünk nemcsak a vizsgált növények stresszel szembeni jobb túlélési arányaira, de közvetve ez által a túlélésből eredendő nagyobb termésmennyiségre is. A fent említett okok miatt a sejtszintű stressz tűrés jellemzésére inkább az eredmények részben részletezett paraméterek (klorofill és karotinoid tartalom) bizonyultak alkalmasnak.

Parida és Das (2005) közleményében írt a fotoszintetikus pigmentek stressz érzékenységéről, mely szerint a csökkent klorofill tartalom a só stresszre adott válasz általános jelensége, amely miatt a klorofill szintézis degradációja és klorózis megindulása figyelhető meg a növényekben, hasonlóan a szárazság-stressz (Kirnak et al. 2001) során megfigyeltekhez. Ezek a pigmentek szerepet játszanak a szinglet oxigénformák hatása elleni védelemben, megelőzve az oxidatív stressz által kiváltott lipid-peroxidációs folyamatok beindulását. Munkánk alatt a stresszkezelések során mért GFP/DsRED sejtarányokban kapott szignifikáns különbségek alátámasztására klorofill és karotinoid izolálásokat is végeztünk tehát. Megállapítottuk, hogy mindhárom stresszkezelés a várakozásoknak megfelelően mindkét transzformáns vonalunk esetében (L3 és cpL1) csökkentette a klorofill tartalmat. A dehidratáció és sóstressz esetén a stressz kezelt levelek szignifikánsan magasabb klorofill mennyiséggel voltak jellemezhetőek, mely igazolta az MsALR fehérje védő hatását az alkalmazott stresszekkel szemben a fotoszintetikus apparátus megvédése által. A metilglioxállal (MG) végzett stressz kezelések során mért klorofilltartalom változások csekély volta (5%). Karotinoid tartalom tekintetében a dehidratációs stressz kezelés után enyhe csökkenés volt megfigyelhető a transzgenikus és nem transzgenikus vonalainkon. A só és MG kezelés nem mutatott hasonló változást: emelkedett vagy éppen nem változott a stresszkezelés hatására. Ez a megfigyelés azzal is magyarázható, hogy a növények a kezelés ellenére is képesek voltak elegendő karotinoid bioszintézisére, mellyel szintén hatásosan védték a fotokémiai rendszer fehérjeit (nem fotokémiai kioltás- NPQ).

Az általunk végzett kísérletek mind azt igazolták, hogy az MsALR fehérjét túltermelő árpavonalaink mind ellenállóaknak bizonyultak az alkalmazott abiotikus stresszek esetében, függetlenül attól, hogy a termelt fehérjét a citoszólba, vagy a kloroplasztiszokba targetáltuk. Mindkét transzformációs megközelítés hasonló eredményeket adott, mely azzal is magyarázható, hogy az enzim természetes szubsztrátjainak (reaktív karbonilvegyületek) képződése mindkét intracelluláris helyen előfordulhat. Az ilyen vegyületek a kloroplasztiszokban lebontásra kerülhetnek közvetlenül a PSI rendszer által, de az aldo-keto reduktáz enzimek általi, enzimátikus úton történő lebontásuk fontossága megnövekszik a stressz, vagy rossz fényviszonyok hatására.

Árpa stabil genetikai transzformációja a GW2 gén csendesítésére

Az ASHvGW2.2 növények esetében kevesebb főhajtás és több mellékajtás volt megfigyelhető, tehát a bokrosodás is erőteljesebb mértékű volt. Mindkettő homológ esetében egyaránt növekedett a mellékajtásonként mért ezerszemtömegek nagysága. Ez elsősorban a szemek szélesebb

voltának, valamint ebből adódó nagyobb tömegükkel voltak magyarázhatóak a transzformánsok esetében, ehhez a szemhosszúságban mért csekély változások voltak feljegyezhetőek a kontroll növényeken mért szemekhez képest. Ez összhangban van az irodalomban fellelhető eredményekkel is. Song és mtsai. (2007) a *GW2* gén térképezésen alapuló azonosítását és klónozását végezték el, a transzformáns növényekben a mutáns *GW2* allél a rizs szemek szélességének jelentős növekedésével szignifikánsan megnövelte a szemtermés súlyát, mely a szem vastagságában és hosszában bekövetkezett enyhe növekedéssel párosult.

Az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy ezek az ubiquitin ligázok alapvető meghatározói lehetnek a vegetatív-generatív fázisok közötti átváltásnak. A gén szemméretet befolyásoló markerként történő alkalmazhatóságának különböző szemméretekkel rendelkező rozs, triticales double haploid (DH) populációkon történő vizsgálata egy további kutatómunka tárgyát képezheti. Igen érdekes lehet még a fenotípusok elemzése kétszikűekben is, mivel jelentős hatásuk lehet a biomassza mennyiségének meghatározásában.

Új tudományos eredmények

1. Szakirodalmi adatok alapján az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek; a *HvARH1* és *SRG6* gének abszcizinsav kezelés hatására adott génexpressziós változásait elemeztük. Az adott haplotípusokba tartozó árpa fajták esetén vizsgáltuk az inszerciós-deléciós mutációk hatását az ABA-indukált génexpressziós változásokban. A *HvARH1* génnél a kezelés hatására minden esetben a gén erőteljes indukcióját tapasztaltunk. Ez a *HvARH1-Z1* genotípusban volt a legkifejezettebb. Az *SRG6* gén esetében az irodalomban közöltekkel ellentétben viszont csak moderált génexpressziós változást figyeltünk meg.

2. Elkészítettük a p6d35s-MsALR és p6d35s-cpMsALR konstrukciókat, melyeket felhasználva *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével éretlen tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) embriókat transzformáltunk. Sikeresen állítottunk elő 24 független (14,3 % transzformációs hatékonyság), az MsALR fehérjét a citoszólba, és 5 független, az MsALR fehérjét a kloroplasztisba targetáló transzformáns árpavonalat (4,4 % transzformációs hatékonyság). A transzgén expresszióját, s utódnemzedékekbe történő átörökítését, kópiaszámát molekuláris genetikai módszerekkel mindegyik transzgenikus vonal esetében, több generáción keresztül alátámasztottuk.

3. Az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszokban betöltött szerepét fluoreszcencia detekciós módszerre alapozva tanulmányoztuk, a létrehozott stabil p6d35S-MsALR és p6d35S-cpMsALR árpavonalak dehidratáció, só és karbonil stressztűrés vizsgálataival. Itt az abiotikus (pl. dehidratáció) stresszre érzékeny DsRED marker fehérjét expresszáló sejtek aránya jelezte a stressz súlyosságát. A GFP/DsRED módszer felállítását követően megállapítottuk, hogy a fluoreszcens sejtarány alkalmas paraméter a levelek abiotikus stresszekkel szembeni ellenálló képességének gyors, rutinszerű vizsgálatára. A fluoreszcens tesztelés módszert bármilyen laborkörülmények közé könnyen adaptálhatóvá alakítottuk, mely egyaránt alkalmas lehet egyéb más Petri-csészékben végrehajtható stressz kezelése hatásának tanulmányozására is. A stresszkísérletek során igazoltuk, hogy az *MsALR* fehérje citoszólban, vagy kloroplasztisban való felhalmozódása egyaránt növeli a tavaszi árpa abiotikus stressz ellenállóságát.

4. A magméret befolyásolásában szerepet játszó *GW2* gén árpa homológjait antiszensz orientációban tartalmazó stabil transzformánsokat hoztunk létre a p635S-ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 konstrukciók segítségével. Az ASHvGW2.1 konstrukció esetén 4 független (3,22 % transzformációs hatékonyság), az ASHvGW2.2 konstrukció esetében pedig 2

független (2,02 % transzformációs hatékonyság) transzformáns vonalat bizonyítottunk. A fent említett vonalak jellemzése, fenotipizálása során megállapítottuk, hogy mindkét árpa homológ géncsendesítése megnöveli az átlagos növénymagasságot, és mindkét *GW2* homológ kifejeződésének csökkentése egyaránt megváltoztatja a szemsúly és szemszélesség eloszlását.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- BARTELS D., ENGELHARDT K., RONCARATI R., SCHNEIDER K., ROTTER M., SALAMINI F. (1991): An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO Journal*, 10: 1037–1043. p.
- BARTLETT J.G., ALVES S.L.C., SMEDLEY M., SNAPE J.W. & HARWOOD W.A. (2008): High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4: 1–12. p.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156–159. p.
- HENSEL G., KUMLEHN J. (2004): Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with Agrobacteria. Chapter 3, 35-44. In: Curtis, I.S. (ed): *Transgenic crops of the world: essential protocols*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 454. p.
- HENSEL G., VALKOV V., MIDDLEFELL-WILLIAMS J., KUMLEHN J. (2008): Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165(1): 71–82. p.
- HERNANDEZ-GARCIA C.M., BOUCHARD R.A., RUSHTON P.J., JONES M.L., CHEN X., TIMKO M.P., FINER J.J. (2010): High level transgenic expression of soybean (Glycine max) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology*, 10: 237-252. p.
- HIDEG É., NAGY T., OBERSCHALL A., DUDITS D., VASS I. (2003): Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-320 nm) stresses. *Plant, Cell & Environment*, 26: 513–522. p.
- KARUNA SREE B., RAJENDRAKUMAR C.S.V., REDDY A. R. (2000): Aldose reductase in rice (*Oryza sativa* L.): stress response and developmental specificity. *Plant Science*, 160: 149–157. p.
- KIRNAK H., KAYA C., TAŞ I., HIGGS D. (2001): The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27: 34–46. p.
- LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. (2001): Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*, 25: 402–408. p.
- MARZIN S., MIHALY R., PAUK J., SCHWEIZER P. (2008): A transient assay system for the assessment of cellautonomous gene function in dehydration-stressed barley. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3359–3369. p.
- MIHÁLY RÓBERT (2009): A DNS-oldat elkészítése a belövéshez, 39. p. In: *Génvádaszat, stabil genetikai transzformáció árpaiban és búzában*. Doktori (PhD) értekezés. Szent István Egyetem. 117. p.
- OBERSCHALL A., DEÁK M., TÖRÖK K., SASS L., VASS I., KOVÁCS I., FEHÉR A., DUDITS D., HORVÁTH G. V. (2000): A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stress. *The Plant Journal*, 24: 437–446. p.
- PARIDA A. K., DAS A. B. (2005): Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324–349. p.
- RAPACZ M., KOS'CIELNIAK J., JURCZYK B., ADAMSKA A, WO'JCIK M. (2010): Different patterns of physiological and molecular response to drought in seedlings of malt- and feedtype barleys (*Hordeum vulgare*). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196: 9–19. p.
- RONCARATI R., SALAMINI F., BARTELS D. (1995): An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *The Plant Journal*, 7: 809–822. p.

SONG X. J., HUANG W., SHI M., ZHU M. Z., LIN H. X. (2007): A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics*, 39: 623–630. p.

TONG S., NI Z., PENG H., DONG G., SUN Q. (2007) Ectopic overexpression of wheat *TaSRG6* gene confers water stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 172: 1079–1086. p.

TRAVELLA S., ROSS S., HARDEN J., EVERETT C., SNAPE J. & HARWOOD W. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23:780-9. p.

WOLFFE, A.P. (1997): Transcription control: repressed repeats express themselves. *Current Biology*, 7: 796-798. p.

XU Z., ZHOU G., SHIMIZU H. (2010): Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 649–654. p.

YANG C.M., CHANG K.W., YIN M.H., HUANG H.M. (1998): Methods for determination of the chlorophylls and their derivatives. *Taiwania*, 43: 116–122. p.

PUBLIKÁCIÓK

MTMT azonosító: 10027874

Tudományos folyóiratcikk

Nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk

András Cseri *, Mátyás Cserhádi *, Maria von Korff, Bettina Nagy, Gábor V. Horváth, András Palágyi, János Pauk, Dénes Dudits, Ottó Törjék (2011): Allele mining and haplotype discovery in barley candidate genes for drought tolerance. (* These authors contributed equally to this work).

Euphytica, 181: 341–356. p. (IF₂₀₁₀: 1.597)

Bettina Nagy, Petra Majer, Róbert Mihály, János Pauk, Gábor V. Horváth: Stress Tolerance of Transgenic Barley Accumulating the Alfalfa Aldose Reductase in the Cytoplasm and the Chloroplast.

Phytochemistry, közlésre beadva.

Hazai tudományos lapokban megjelent publikációk

Bettina Nagy, Majer Petra, Róbert Mihály, Dénes Dudits, Gábor V. Horváth (2011): Transient and transgenic approaches: functional testing of candidate genes in barley.

Acta Biologica Szegediensis, 55 (1): 129-133. p. (ISSN 1588-4082)

Nagy Bettina, Majer Petra, Mihály Róbert, Pauk János, Dudits Dénes, Horváth V. Gábor (2013): Fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló szárazság stressz tolerancia vizsgálatok a lucerna aldóz reduktáz fehérjét (MsALR) termelő árpa növényeken.

Növénytermelés, 62 (1): 53–72. p.

Az értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó tudományos folyóiratcikkek:

Éva Cs., Solti Á., Oszvald M., Tömösközi-Farkas R., Nagy B., Horváth G.V., Tamás L. (2016) Improved reactive aldehyde-, salt-, and cadmium tolerance of transgenic barley due to the expression of aldo-keto reductase genes.

Acta Physiologia Plantarum, közlésre beadva

Dudits D., Török K., Cseri A., Paul K., Nagy A.V., Nagy B., Sass L., Ferenc Gy., Vankova R., Dobrev P., Vass I., Ayaydin F. (2016): Response of Organ Structure and Physiology to Autotetraploidization in Early Development of Energy Willow *Salix viminalis* L.

Plant Physiology, 170 (3): 1504–1523. p.

Egyéb tudományos művek

Előadás összefoglalók, posztterek

Nagy Bettina, Horváth V. Gábor (2009): Functional characterization of candidate genes in barley: transgenic plants and grown cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 53 (1): 69. p. Dissertation summary.

Bettina Nagy, Gábor V. Horváth (2009) Functional characterization of candidate genes in barley: transgenic plants and grown cultivars. 8th International Symposium in the Series ‘Recent Advances in plant Biotechnology’: New development in green gene technology. September 1-4, 2009. Szeged, Hungary. 65. p. (poszter, angol)

Nagy Bettina, Goetz Hensel, Jochen Kumlehn, Török Katalin, Dudits Dénes, Horváth V. Gábor (2009): Functional characterization of candidate genes in barley: transgenic plants and grown cultivars. MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Straub-napok. November 25-26, 2009. Szeged, Hungary. 18. p. (poszter, angol).

Éva Csaba, Nagy Bettina, Horváth V. Gábor, Tamás László: Stressz-élettani vizsgálatok aldo-keto redukáz génekkel transzformált transzgenikus árpa vonalakon. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. kongresszusa. Augusztus 31-Szeptember 2., 2011. Szeged (előadás, magyar).

Bettina Nagy, Majer Petra, Róbert Mihály, Dénes Dudits, Gábor V. Horváth (2012) Increased stress tolerance of MsALR-expressing barley: evaluation by fluorescent method. MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Straub napok. Május 23-24, 2012. Szeged (poszter, angol).

Bettina Nagy, Gábor V. Horváth (2013) Characterization of stress tolerance of transgenic barley plants using cell-autonomous fluorescence detection method. Pannonian Plant Biotechnology Conference for PhD students in Plant Biology in connection to the EPSO „Fascination of plant day”. „Our future” book of abstracts, 18-20. p. (előadás, angol). ISBN: 978-963-89129-2-3

Bettina Nagy, Róbert Mihály, János Pauk, Gábor V. Horváth (2013)
Improving yield potential in barley using yield-related genes. 2nd
Conference of Cereal Biotechnology and Breeding. November 5-7.,
Budapest. Book of abstracts: 69-70.p.