

SZAKMAI BESZÁMOLÓ  
/2012.03.01.-2016.02.29./

## **KIVONAT**

A jelen kutatási programban a szaporodásbiológiával összefüggésbe hozható gének azonosítását, izolálását, illetve funkcionális vizsgálatát végeztük el az ürömlevelű parlagfűben. A pályázat fő célkitűzéseit teljesítettük, a kutatási eredményekből ez idáig három angol és egy magyar nyelvű kéziratunk jelenleg elbírálás alatt van, míg további három angol nyelvű kézirat elkészítésén dolgozunk (lásd: Publikációk). Ez utóbbiakat 2016. augusztus 31-éig küldjük el a megjelölt szakfolyóiratokhoz. A pályázathoz 2014. szeptemberében csatlakozott Nagy Róbertné Dr. Virág Eszter, MTA posztdoktori ösztöndíja ekkor jár le. A posztdoktor feladata a K100919 pályázat lezárulta (2016. február 29.) utáni félévben *in silico* elemzések, valamint a projekt során kapott eredmények feldolgozása és publikálása.

## **Projekt célok és alkalmazott módszerek rövid összefoglalása**

A projekttervben három fő célt tűztünk ki: 1) A virágzással összefüggésbe hozható gének azonosítása; 2) E gének teljes cDNS szekvenciájának izolálása; 3) Az izolált gének funkcionális vizsgálata.

A célok megvalósítása érdekében 13, morfológiailag jól elkülöníthető növényről gyűjtöttünk hím-, és nővirág, valamint levélmintákat a teljes virágzási időszak folyamán heti két alkalommal. A hímvirágok esetében hét, a nővirágoknál kilenc, míg a levelek esetében öt fejlődési stádiumot különítettünk el és gyűjtöttünk külön. Az így begyűjtött mintákból RNS-t tisztítottunk, majd az RNS egy részét mintatípusonként (hím, nő, levél) összekevertük, hogy minden fejlődési stádium reprezentálva legyen, és cDNS-t szintetizáltunk. Kétféle vizsgálati módszert, a szubtraktív hibridizációt (hím vs. nő; nő vs. hím; hím + nő vs. levél) és az RNS-szekvenálást alkalmaztunk. A kapott szekvencia adatok alapján a kódoló szekvenciákat cDNS klóntárból izoláltuk és megállapítottuk a gének teljes kódoló szekvenciáját. A virágzágének funkcionális vizsgálatát nyolc génen qPCR-rel végeztük el a három mintatípus különböző fejlődési stádiumokban tisztított RNS-ből kiindulva. Az expressziót a  $\beta$ -tubulinéhoz viszonyítottuk. A gének funkcionális vizsgálatához az *Amb a 1*, *AP2*, *LFY* és *SMZ* gének csendesítése céljából RNAi génonkonstrukciókat hoztunk létre és transzformáns növényeket regeneráltunk.

A molekuláris vizsgálatok mellett a parlagfű virágzása szabályozottságának jobb megértése céljából két egymás utáni évben *in vitro* kísérleteket állítottunk be. Az első évben 6, a másodikban 12 anyanövényről indítottunk hetente 3-3 hajtást a teljes virágzási szezonban, és vizsgáltuk a megvilágítás hosszának genotípussal összefüggő hatását a virágzás megindulása vonatkozásában.

## **EREDMÉNYEK**

### **Virágzás szabályozottsága és gének az ürömlevelű parlagfűben**

Megállapítható, hogy a szabadban növekvő anyanövényekről indított *in vitro* hajtások megőrzik az anyanövény virágzási időpontra vonatkozó programozottságát 16 órás megvilágítás mellett, azonban a virágidentitás (hím vs. nő ivarú) kevésbé szabályozott, mivel gyakori, hogy a hímvirágok helyén is nővirágfüzérék fejlődnek, ami a természetben elég ritka. A 12 órás megvilágítás bár megzavarja a

virágzás időpontjára vonatkozó programozottságot, de tendenciát nem sikerült kiolvasni a virágzási időpontokból.

A szubtraktált szekvenciák és az RNS-szekvenálás alapján összesen 54 *Arabidopsis thaliana* virágzásgénnel/géncsaláddal találtunk 80% feletti szekvencia hasonlóságot az ürömlevelű parlagfűben (1. táblázat). Ugyanakkor, a legtöbb génre különböző allélikus változatokat is izoláltunk, így összesen 296 parlagfű virágzásgén változatot tudtunk azonosítani. A virágzásgének mellett további géneket is azonosítottunk, melyek csak a hím- vagy nővirágban, illetve mindkettőben kifejeződtek, de a levélben nem. Ezek proteínáz inhibitor, cisztatin-proteináz inhibitor, poligalakturonáz inhibitor, protoporfirinogén-oxidáz, glutation-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, lipáz, lipid transzfer fehérje, acetil transzferáz, acetolaktát szintáz, ATP-szintetáz, transzláció-kezdő faktor, zsírsav elongáz, és zsírsav hidroxiláz családokba tartozó gének voltak.

Publikációk: [1], [4], [5]

### Allergén gének

Az *Amb a 7* gén kivételével, melyről se nukleotid, se aminosav szintű információ nem áll rendelkezésre azonosítottuk az *Amb a 1 – 11* és *Amb CPI* géneket, valamint allélikus változataikat. Ezenkívül, az *Artemisia vulgaris Art v 2*, *Art v 3.02.02*, *Art v 4* és *Art v 5* allergén génekkal aminosav szinten nagyfokú hasonlóságot mutató géneket is azonosítottunk a parlagfűben. Izoláltunk az *Amb a 3* allergén génnel nagyfokú hasonlóságot mutató géneket. Ez idáig az *Amb a 3* gének csak részleges aminosav sorrendje volt ismert (egy 1981-ben született publikációnak köszönhetően). Az általunk izolált kódoló szekvenciák a protein C-terminálisának variabilitását leszámítva azonos aminosav sorrendűek az *Amb a 3* fehérje ismert szekvenciájával. Eredményeink hasznosíthatóak az immunológiai kutatásokban/vizsgálatokban.

Publikációk: [2], [4], [6]

### További génizolálási eredmények

#### - Herbicidek célgéneinek izolálása

Mivel a parlagfű a legelterjedtebb gyomnövény Magyarországon és a világ számos egyéb pontján, és egyre gyakrabban regisztrálnak különféle herbicidekkel szemben rezisztens parlagfű biotípusokat, ezért a rendelkezésre álló szekvencia-információinkból kiindulva izoláltuk a parlagfűben található herbicidek célgéneket (2. táblázat). Ezek közül az actil-koenzim A karboxiláz a gyakorlati védekezés szempontjából nem releváns, mivel az ACCáz gátlókat egyszikűek ellen használják. Meghatároztuk a kódoló szekvenciákon a szerrezisztenciát eredményező pont mutációkat, így eredményeink hasznosíthatóak a parlagfű target site alapú herbicidek rezisztenciájának gyors azonosítására.

Publikációk: [3]

#### - Kloroplasztisz genom

Egy korábbi munkánk során részben megállapítottuk az ürömlevelű parlagfű cpDNS-ének nukleotid sorrendjét. A jelen vizsgálatokban kapott eredményekkel a korábbiakat kiegészítve rekonstruáltuk a parlagfű cpDNS-ét, és filogenetikai, illetve evolúciós elemzéseket végzünk.

Publikációk: [7]

## Génműködés vizsgálatok

A nyolc virágzágén, valamint az *Amb a 1*, *3* és *11* allergén gén qPCR-rel történt expressziós vizsgálatát elvégeztük, és az eredmények kiértékelését valamint a kézirat elkészítését a posztdoktor ösztöndíjas ideje alatt (2016.08.31-ig) tudjuk megvalósítani.

Publikációk: [5], [6]

Az *Amb a 1*, *AP2*, *LFY* és *SMZ* gének RNAi konstrukciójával transzformált növényeknél a transzformáció sikeressége, illetve a konstrukciók működése kérdéses. A GUS gént, ki tudjuk mutatni opin-esszével, és a kanamicin rezisztencia is működik, azonban az RNAi-k nem fejeződnek ki. A pályázattól függetlenül e vizsgálatokat tovább folytatjuk.

## PUBLIKÁCIÓK

### Elbírálás alatt:

[1] Eszter Virág, Endre Barta, Kincsó Decsi, Eszter Farkas, Erzsébet Nagy, Kinga Klára Mátyás, Balázs Kolics, Barbara Kutasy, János Taller (2016) **De novo reconstruction of reproductive organ transcriptome of the common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**. *Frontiers in Plant Science* (under review) IF: 3,948

[2] János Taller, Kincsó Decsi, Eszter Farkas, Erzsébet Nagy, Kinga Klára Mátyás, Balázs Kolics, Barbara Kutasy, Eszter Virág (2016) **Whole genomic transcriptome based identification of Amb a 3-like pollen allergen in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*)**. *Journal of Botanical Sciences* (under review) IF: 0,33

[3] János Taller, Barbara Kutasy, Erzsébet Nagy, Kinga Klára Mátyás, Kincsó Decsi, Eszter Farkas, Balázs Kolics, Eszter Virág (2016) **Whole genomic transcriptome based identification of herbicide target genes in the common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**. *Weed Science* (under review) IF: 1,870

[4] Nagy Erzsébet - Kutasy Barbara - Mátyás Kinga Klára - Decsi Kincsó - Kolics Balázs - Virág Eszter - Taller János (2016) **A transzkriptomika hasznosítása a gyomkutatásban. Esettanulmány a legelterjedtebb gyomnövényről, az ürömlevelű parlagfűről (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**. *Magyar Gyomkutatás és Technológia* (benyújtva)

### Előkészítés alatt /2016. 08. 31-éig benyújtásra kerül/:

[5] János Taller, Kincsó Decsi, Eszter Farkas, Erzsébet Nagy, Kinga Klára Mátyás, Balázs Kolics, Barbara Kutasy, Eszter Virág (2016) **Differential expression of floral genes in staminate and pistillate flowers of the monoecious, invasive weed *Ambrosia artemisiifolia***. *Journal of Evolutionary Biology* (in preparation) IF: 3,232

[6] János Taller, Sergii Vakal, Eszter Farkas, Erzsébet Nagy, Barbara Kutasy, Kinga Klára Mátyás, Balázs Kolics, Kincsó Decsi, Eszter Virág (2016) **Expression, function and structural modeling of pollen allergic proteins of the common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**. *PLoS ONE* (in preparation) IF: 3,234

[7] Eszter Virág, Péter Poczai, Erzsébet Nagy, Kincsó Decsi, Eszter Farkas, Kinga Klára Mátyás, Balázs Kolics, Barbara Kutasy, János Taller (2016) **Comparative analysis and evolutionary patterns of chloroplast genome of the noxious invasive species *Ambrosia artemisiifolia***. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (in preparation) IF: 3,916

1. Táblázat. A parlagfűből *A. thaliana* referenciagének alapján azonosított és izolált virágzásgének.

Gén akronim	Gén teljes neve	Génbanki azonosító
<b>1 AGL24</b>	<b>AGAMOUS LIKE 24 (MADS-box protein)</b>	<b>AT4G24540</b>
<b>2 AP2</b>	<b>APETALA 2</b>	<b>AT4G36920</b>
3 ARP6	ACTIN RELATED PROTEIN 6	AT3G33520
4 CDF1	CYCLING DOF FACTOR1	AT5G62430
5 CO	Zinc finger protein CONSTANS	AT5G15840
6 COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1	AT2G32950
7 CRY1	CRYPTOCHROME1	AT1G04400
8 CRY2	CRYPTOCHROME2	AT4G08920
9 CSTF64	CLEAVAGE STIMULATION FACTOR 64	AT1G71800
10 CSTF77	CLEAVAGE STIMULATION FACTOR 77	AT1G17760
<b>11 DHF</b>	<b>DAY NEUTRAL FLOWERING</b>	<b>AT3G19140</b>
12 FCA	RNA binding / abscisic acid binding protein	AT4G16280
13 FD	ATBZIP14 (Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein)	AT4G35900
14 FKF1	FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1	AT1G68050
15 FLC	FLOWERING LOCUS C	AT5G10140
16 FLD	FLOWERING LOCUS D	AT3G10390
17 FLK	FLOWERING LOCUS KH DOMAN	AT3G04610
18 FLM	FLOWERING LOCUS M	AT1G77080
19 FPA	Flowering time control protein	AT2G43410
20 FRI	FRIGIDA	AT4G00650
<b>21 FT</b>	<b>FLOWERING LOCUS T</b>	<b>AT1G65480</b>
22 FVE	WD-40 repeat-containing protein MSI4	AT2G19520
23 FY	Flowering time control protein	AT5G13480
24 GA1	GA REQUIRING 1	AT4G02780
25 GAI	GA INSENSITIVE	AT1G14920
26 GI	GIGANTEA	AT1G22770
27 GID1A	putative gibberellin receptor	AT3G05120
28 GID1B	GIBBERELLIN	AT3G63010
29 GID1C	INSENSITIVE DWARF 1, gibberellin receptor	AT5G27320
30 GNC	GATA transcription factor 21, nitrate-inducible	AT5G56860
31 GNL	cytokinin-responsive gata factor 1	AT4G26150
32 LD	homeobox protein LUMINIDEPENDENS	AT4G02560
<b>33 LFY</b>	<b>LEAFY</b>	<b>AT5G61850</b>
34 LHP1	chromo domain-containing protein	AT5G17690
35 PHYA	PHYTOCHROME A	AT1G09570
36 PHYB	PHYTOCHROME B	AT2G18790
37 PRC2(CLF,EMF2)	Polycomb repressine complex 2 (Curly Leaf, Embryonic Flowering 2)	AT2G23380

38	RGA	REPRESSOR OF GA1-3	AT2G01570
<b>39</b>	<b>SMZ</b>	<b>SCHLAFMUTZE</b>	<b>AT3G54990</b>
40	SNZ	SNARCHZAPFEN	AT2G39250
41	SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 MADS-box protein	AT2G45660
<b>42</b>	<b>SPA</b>	<b>SUPPRESSOR OF PHYA-105</b>	<b>AT2G46340</b>
43	SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE	AT2G47070
44	SPY	SPINDLY	AT3G11540
<b>45</b>	<b>SVP</b>	<b>SHORT VEGETATIVE PHASE and FLOWERING</b>	<b>AT2G22540</b>
46	TEM1	TEMPRANILLO 1	AT1G25560
47	TEM2	TEMPRANILLO 2	AT1G68840
48	TOE1	TARGET OF EAT 1	AT2G28550
49	TOE2	TARGET OF EAT 2	AT5G60120
50	TOE3	TARGET OF EAT 3	AT5G67180
51	TPS1	TREHALOSE 6 PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT1G78580
52	VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3	AT5G57380
53	VRN1	VERNALIZATION 1	AT3G18990
54	VRN2	VERNALIZATION 2	AT4G16845

*Félkövér: qPCR-rel elemzett gének.*

**Táblázat 2. Izolált herbicid célgének**

<u>Azonosított herbicid célgének</u>	HRAC	Méret (bp)
• <b>ACCáz (acetyl- koenzim A karboxiláz)</b>	A	- 6750 bp (homomer)
• <b>ALS (acetolaktát szintáz)</b>	B	- 1965 bp
• <b>PDS (fitoén deszaturáz)</b>	F1	- 1659 bp
• <b>HPPD (hidroxifenil-piruvát-dioxigenáz)</b>	F2	- 1368 bp
• <b>EPSPS (enil-piruvilsikimát-foszfát szintáz)</b>	G	- 1539 bp
• <b>GS (glutamin szintáz)</b>	H	- 1074 bp
• <b>PPO (protoporfirinogén-oxidáz)</b>	E	- 1476 bp (mitokondriális)
<b><u>Korábban izoláltuk</u></b>		+ 1607 bp (plasztid)
• <b>psbA (D1 fehérje – fotoszintézis)</b>	C1,2,3	- 1062 bp (plasztid)

*HRAC: Herbicide-Resistance Action Committee nevű nemzetközi szervezet által használt szercsoport azonosító.*