

# AZ ABIOTIKUS STRESSZ-ADAPTÁCIÓT SZABÁLYOZÓ OSMYB4, TACBF14 ÉS TACBF15 TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK FUNKCIÓJÁNAK IGAZOLÁSA TRANSZGÉNIKUS ÁRPÁBAN

Doktori értekezés

SOLTÉSZ ALEXANDRA

Martonvásár 2011

A doktori iskola Megnevezése:	Szent István Egyetem, Növénytudományi Doktori Iskola
Tudományága:	Növénynemesítési és -biotechnológiai tudományok
Vezetője:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja Igazgató, egyetemi tanár SZIE, Genetika és Biotechnológia Intézet
Témavezető:	Dr. Vágújfalvi Attila Tudományos főmunkatárs MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet Növényi Molekuláris Biológia Osztály

Dr. Heszky László Iskolavezető Dr. Vágújfalvi Attila témavezető

# TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1 Δ gabonafélék alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciája	0
2.1. A gabonatelek alacsony-nomersekteti suessz-toleranelaja	13
2.2. Hallszkilpelös taktolok	12
2.2.1. Novellyl transzkripciós faktorok	14
2.2.2. A transzkripcios laktorok szerepe az abiolikus stressz-valaszban	. 14
2.2.2.1. A MYB genek jellemzese	. 15
2.2.2.1.1 Az $OsMYB4$ gen szerepe	.1/
2.2.2.2. A <i>CBF</i> gének jellemzése	. 18
2.2.2.1. A CBF gének Arabidopsis-ban	. 20
2.2.2.2. A <i>CBF</i> gének a gabonafélékben	. 21
2.2.3. A transzkripciós faktorok szerepének bizonyítása transzformációval	. 23
3. ANYAG ES MODSZER	. 27
3.1. Növényanyag	. 27
3.2. A transzformációs konstrukciók előállítása	. 28
3.3. Transzformáció Agrobacterium tumefaciens közvetítésével	. 31
3.4. Az árpa transzformáció molekuláris bizonyítása	. 32
3.5. Fagytesztek	. 32
3.5.1. Az OsMYB4 transzformáns árpavonalak fagytesztjei	. 33
3.5.2. A TaCBF transzformáns árpavonalak fagyasztása	. 33
3.5.3. A fagytűrés indirekt meghatározása az $F_v/F_m$ paraméter mérésével	. 33
3.5.4. Konduktancia vizsgálatok	. 33
3.5.5. A fagytűrés direkt meghatározása	. 34
3.6. Alacsony-hőmérsékleti stresszkezelés	. 34
3.7. Komplex stressztűrési vigor teszt (CSVT)	. 35
3.7.1. Enzimaktivitás meghatározás a CSVT során	35
3.8 Ozmotikus stressz kísérlet	36
3.9 Génexpressziós vizsgálatok	37
3 9 1 RNS izolálás	37
3.9.7 Reverz transzkrinció	37
3.0.3 Az OsMVR/ transzformáns árnavonalak expressziós vizsgálata	37
3.0.1 A TaCRE transitionnais arpavonalak expression vizsgalata	37
3.10 Alkalmazott primarak listója	38
2 11 Statisztikai apolízis	. 30
3.11. Statisztikai alializis	.41
4. EKEDIVIENTEK	.43
4.1. AZ OSIVI I D4 transzkripcios raktor szerepenek bizonyitasa transztormacióval	.43
4.1.1. A pMDC99-cor15a-Osm1B4-NOS konstrukcio eioaintasa arpa transzformaciojanoz	.43
4.1.2. Az OsMYB4 transzgen beepulesenek igazolasa	.45
4.1.3. Az OsMYB4 transzgenikus vonalak fenotipizalasa	.48
4.1.3.1. Fagyteszt	.48
4.1.3.2. Komplex stressztűrési vígor tészt (CSVT)	. 50
4.2. Az TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok szerepének bizonyítása	
transztormációval	. 54
4.2.1. A pBract214- <i>TaCBF14</i> és pBract214- <i>TaCBF15</i> konstrukciók előállítása árpa	<b>_</b> .
transztormációjához	. 54
4.2.2. Arpa transzformációja a pBract214-TaCBF14 és a pBract214-TaCBF15 konstrukciók	kal
	. 56
4.2.3. A transzformáns kontroll és a TaCBF transzgénikus jelölt növények molekuláris	
vizsgálata	. 58

4.2.4. A <i>TaCBF</i> transzformáns vonalak fagytesztje	
4.2.4.1. A TaCBF transzformáns vonalak fagytűrésének tesztelése hideg-edzé	si
periódussal	
4.2.4.2. A TaCBF transzformáns árpavonalak fagytűrésének tesztelése edzési	periódus
nélkül	72
4.2.5. A TaCBF transzformáns növények ozmotikus stressz-toleranciájának vizs	gálata74
4.2.6. A <i>TaCBF</i> transzformáns növények génexpressziós vizsgálata	
4.2.7. A <i>TaCBF</i> transzformáns árpavonalak fejlődésbeli eltérése a vad típusú Go	olden
Promise-tól	
4.3. Új tudományos eredmények	
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	
5.1. Az alacsony hőmérséklet indukálja a cor15a-OsMYB4 transzformáns növénye	kben a
transzgén kifejeződését	
5.2. Az OsMYB4 transzkripciós faktor növeli a transzformáns árpavonalak fagyáll	óságát 84
5.3. Az OsMYB4 transzkripciós faktor megnöveli az árpanövénykék vigorát	
5.4. A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok fokozzák a tavaszi Golden P	romise árpa
fagytűrését	
5.5. A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe lehet az ozmotik	us stressz-
tolerancia kialakításában	
5.6. A TaCBF transzkripciós faktorok befolvásoliák a CBF regulonhoz tartozó gén	ek
expresszióiát transzgénikus árnáhan	
5.7 A TaCBF transzgénikus árnavonalak feilődése lassabb a vad tínusú Golden Pr	omise-énál 91
6 ÖSSZEFOGLALÁS	95
7 SUMMARY	99
Mellékletek	103
M1_IRODALOMIEGYZÉK	103
M2 KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK TÁBLÁZATOK	119
M2.1 A CSVT kísérletben tanulmányozott gének expressziós vizsgálatához has	znált primerek
listáia	119
M2 2 A $T_aCBF$ transzformáns árnavonalak első fagytesztiéhez tartozó statisztik	cai
táblázatok	120
M2.3 A TaCBF transzformáns árpavonalak ozmotikus stressz-kezelése során m	ért relatív
víztartalom adatok	
M2.4. A Golden Promise és a transzformáns kontroll vonal feilődése	
KÖSZÖNETNYI VÁNÍTÁS	

# JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA	Abszcizinsav			
ADH	Alkohol dehidrogenáz			
AlaAT	Alanin aminotranszferáz			
ALDH	Acetaldehid aminotranszferáz			
AMY	Alfa-amiláz			
ASAT	Aszpartát aminotranszferáz			
ATP	Adenozin-trifoszfát			
CBF	<u>C</u> -repeat <u>b</u> inding <u>f</u> actor			
CSVT	(Complex Stressing Vigour Test) Komplex stressztűrési vigor teszt			
DREB	Dehydration-responsive element-binding factor			
DW	(Dry weight) Száraz tömeg			
FC	Fold Change			
FK	Fruktokináz			
FT	Fagyteszt			
F <sub>m</sub>	A sötétadaptált növény levelén mérhető maximális fluoreszcencia			
F <sub>v</sub>	A sötétadaptált növény levelén mérhető változó fluoreszcencia			
FW	(Fresh weight) Friss tömeg			
Fwd	Forward primer			
GA	Gibberellin sav			
GAMYB	gibberellinsav által regulált MYB			
GARC	GA response complex			
GDC	Glutamát dekarboxiláz			
GDH	Glutamát dehidrogenáz			
GP	Golden Promise			
IAA	Indol-ecetsav			
ICE	Inducer of <u>C</u> BF <u>expression</u>			
LEA protein	(Late Embryogenesis Abundant protein) Embriófejlődés késői fehérjéi			
LDH	Laktát dehidrogenáz			
MYB	(Myeloblastosis oncogene) Mieloblasztóma onkogén			
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid			
NR	Nitrát reduktáz			

PCR	(Polimerase Chain Reaction) Polimeráz láncreakció
PDC	Piruvát dekarboxiláz
PEG	Polietilén glikol
РК	Piruvát kináz
PSII	A növények II. fotokémiai rendszere
Real-Time RT-PCR	Valós idejű RT-PCR
Rev	Reverse primer
RT-PCR	Reverz transzkripciót követő PCR
RWC	(Relative Water Content) Relatív víztartalom
SUS	Szacharóz szintáz
TF	Transzkripciós faktor
TW	(Turgid weight) Telített tömeg

# 1. BEVEZETÉS

A világ mezőgazdaságának alapvető problémája, hogy a termés mennyisége évről évre változik az aktuálisan fellépő környezeti stresszek, mint például a téli fagyok, a szárazság, a szikes területeken a magas sótartalom, az alacsony, vagy éppen a magas hőmérséklet, stb. függvényében. Az abiotikus stresszek káros hatásának leküzdését nehezítheti az, hogy a különféle stressz-faktorok gyakorta szimultán jelentkeznek, valamint az a tény is, hogy az egyes stresszek fellépése térben, időben és intenzitásban is változhat - akár egy vegetációs perióduson belül is. Az abiotikus stressztolerancia kvantitatív, azaz több gén által meghatározott jelleg. Mivel komplex jellegek - akár egyidejű - fellépésével kell számolnunk, ezért nagyon fontos azoknak az anyagcsere-folyamatoknak, illetve a megfelelő szabályozó géneknek a jellemzése, amelyek az adott stressztűrés kialakításában részt vesznek. A növények esetében számos általános, többféle stressz-hatás fellépésekor is megnyilvánuló válaszreakciókat találunk. Ilyen például a "növényi stresszhormon", az abszcizinsav tartalom változása, az ozmotikusan aktív anyagok felhalmozódása, a membránkárosodások kivédésére irányuló, vagy a stressz során keletkezett reaktív oxigén-származékokat elimináló folyamatok beindulása. Ezért egyes stresszfolyamatok mechanizmusának megértése sok esetben egy másik stressz-válasz megértését is közelebb hozhatja.

Az abiotikus stressz-tolerancia kialakulásában résztvevő élettani, biokémiai folyamatok tanulmányozása, azok genetikai hátterének felderítése sok évtizedes múltra tekint vissza. A genetikai szabályozás molekuláris vizsgálata viszonylag új terület, a transzkripciós faktorok szerepének tanulmányozása pedig "forró pontja" a kutatásnak. A növényi sejtekben a gének egy része konstitutívan expresszálódik, míg más gének csak specifikus jelre indukálódnak, vagy éppen csökken az expressziójuk. A transzkripciós faktorok a DNS megfelelő szakaszaihoz kötődve képesek bekapcsolni, erősíteni, vagy éppen gátolni az RNS átírást, a transzkripciót. Egy transzkripciós faktor többféle gént is ki- vagy bekapcsolhat, és az egyes faktorok többféle szignál hatására is aktiválódhatnak.

A rizsből izolált *OsMYB4* gén egy transzkripciós faktort kódol, melynek a hidegre adott stresszválaszban van szerepe; több ezer gént szabályoz vagy direkt módon, vagy intermedier transzkripciós faktorokon keresztül. Az alacsony-hőmérsékleti stressz esetében a legrészletesebben a CBF/DREB1 transzkripciós faktorok szerepét tanulmányozták. Az ezeket kódoló gének alacsony hőmérséklet hatására, a hideg-akklimatizáció korai fázisában, tranziens módon expresszálódnak. Mind homológ, mind heterológ kísérleti rendszerben igazolták, hogy a *CBF/DREB1* génnel transzformált növények megnövekedett hideg-, illetve fagytűrést, és fokozott szárazságtűrést mutattak. Osztályunkon két *CBF* génről (*CBF14* és a *CBF15*) mutatták ki, hogy kiemelkedő szerepük van a gabonafélék fagytűrésében.

7

A génfunkciós vizsgálatok egyik módja, ha a jelölt gént transzformáns növényben túltermeltetjük. A transzkripciós faktorokkal történő transzformációval számos más, a gazdanövényben lévő gén működését befolyásolhatjuk, melynek mérhető hatása lehet a stressz-adaptációban. Munkánk során a rizsből származó *OsMYB4*, valamint az őszi búzából izolált *TaCBF14* és *TaCBF15* transzkripciós faktort kódoló gének funkcióját vizsgáltuk transzformáns árpában. A jelölt géneket tavaszi árpában túltermeltettük (overexpresszáltattuk) és a megnövekedett génexpresszió hatását vizsgáltuk a transzformáns növény abiotikus (hipoxia, alacsony-hőmérséklet, fagy, ozmotikus stressz) stressz-adaptációja során.

A Ph.D. értekezésem célkitűzéseit az alábbi pontokban foglaltuk össze:

- A rizsből izolált OsMYB4 gén bináris vektorba építése az Arabidopsis thaliana-ból származó cor15a stressz-indukálható promóterrel, valamint az őszi búzából izolált TaCBF14 és TaCBF15 gének bináris vektorba építése konstitutív expressziót biztosító promóterrel.
- 2. A tavaszi árpa Agrobacterium tumefaciens-szel történő transzformációs technikájának elsajátítása, és az elkészített konstrukciókkal stabil, OsMYB4, TaCBF14, és TaCBF15 transzformáns árpavonalak készítése.
- **3.** Az adott transzgén beépülésének és kifejeződésének bizonyítása, és a kópiaszámának meghatározása molekuláris módszerekkel.
- **4.** Az OsMYB4 transzkripciós faktor szerepének tanulmányozása a létrehozott stabil *cor15a-OsMYB4* transzformáns árpavonalak fagytűrésének tesztelésével, valamint a vonalak hideg- és oxigén-hiányos stressztűrés vizsgálatával.
- **5.** A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok szerepének bizonyítása a fagytűrés kialakításában a transzformáns árpavonalakon végzett fagytesztekkel; továbbá a gének szerepének tanulmányozása az ozmotikus stressz kivédésében.

# 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

# 2.1. A gabonafélék alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciája

A növényi abiotikus stressz-élettannal, annak genetikai szabályozásával jónéhány szakkönyv (Jenks és Hasegawa 2005, Jenks és Wood 2010, Pareek et al. 2010) és összefoglaló dolgozat foglalkozik (Floris et al. 2009, Chinnusamy et al. 2010, Roy et al. 2011). Mivel a dolgozatomban olyan transzkripciós faktorok vizsgálatával foglalkozom, amelyeknek elsősorban a hideg-, és fagytűrésben, valamint a hipoxia elleni védekezésben van szerepük, ezért az Irodalmi áttekintés során ezekről a stressz-hatásokról nyújtok áttekintést.

Abiotikus környezeti stressz alatt az élettelen környezeti tényezők (hőmérséklet, csapadék, a talaj ásványi anyagai, stb.) olyan megváltozását értjük, amely a növény fejlődését, növekedését, élettani működését, virágzását, stb. gátolja, vagy extrém esetben letális. A stressztűrés genetikai szempontból egy fenotípus, megjelenése a környezeti feltételeken túl az élőlény genetikai meghatározottságától is függ, mértékét e két tényező kölcsönhatása határozza meg. Az edződés (akklimatizáció) az az élettani folyamat, amelynek révén a növény eléri a genetikailag meghatározott stressztűrését.

Az őszi gabonafélék télen megfelelő talajborítást nyújtanak, ezáltal csökkentik a talajeróziót, és a hosszabb tenyészidő miatt mintegy 15-25%-kal több termést produkálnak, mint a tavasziak. Termesztésük tehát gazdaságosabb és környezetkímélőbb, mint a tavaszi gabonaféléké. Mivel Magyarországon szinte kizárólag őszi búzát termesztenek, ezért a szárazságtűrés mellett a fagytűrés is fontos követelmény a hazai fajtákkal szemben. A télállóság az a tulajdonság, amely képessé teszi a növényeket arra, hogy a tél viszontagságait (hideg, oxigénhiány, felfagyás, betegségek, stb.) károsodás nélkül elviseljék. Ennek legfontosabb eleme a fagyállóság, vagy fagytűrés, amely alkalmassá teszi a növényeket a fagypont alatti hőmérsékletek elviselésére. E komplex mennyiségi jelleg mértékét a genetikai háttér (faj, fajta, genotípus) és a környezet együttesen határozza meg. Az alacsony hőmérsékleti stressz, illetve a fagy kivédéséhez, azaz ahhoz, hogy a növények elérjék a genetikailag meghatározott fagyállóságukat, szükségük van egy hosszabb ideig tartó, alacsony hőmérsékletű növekedési periódusra: az edződés időszakára. Természetes körülmények között hazánkban a hidegedződés ősszel történik, rövidülő nappalhossz, és a hőmérséklet fokozatos csökkenése során. Az "edzett" növények elviselik a fagyponttól néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérsékletet is; pl. az őszi búza túléli a -10°C alatti hőmérsékleteket is. Az edzettség mértékét befolyásolja a talaj víztartalma is. Nedves környezetben kevésbé edződnek a növények, illetve hamarabb elvesztik edzettségüket. Az edződés mesterségesen, kísérleti körülmények között is kiváltható, a folyamat modellezhető. A maximális fagyállóság eléréséhez a növényeket növénynevelő kamrában, kontrollált körülmények között fokozatosan csökkenő hőmérséklet és nappalhossz mellett nevelik, majd hosszabb ideig (néhány hétig) alacsony, de fagypont fölötti hőmérsékleten edzik. A legtöbb esetben egy néhány napig tartó második, fagypont alatti edzési periódust (second-phase cold hardening) is alkalmaznak (Sutka 1981, Tischner et al. 1997).

A növények fagyállóságában fiziológiai szempontból a sejtmembrán játszik kiemelkedően fontos szerepet (Levitt 1980). A sejtek közötti térben lévő szabad víz megfagyása a vízpotenciál csökkenésével és az oldatkoncentráció növekedésével jár együtt. Így nagy kémiai és ozmotikus potenciálkülönbség keletkezik a sejten belüli, és a sejtek körüli térben lévő oldatok között, ennek következtében a sejtekből víz áramlik ki, aminek a hatására a protoplazma dehidratálódik és zsugorodik. A sejtek közötti térben lévő jég olvadásakor a folyamat ellentétesen játszódik le, a protoplazma rehidratálódik, térfogata nő (Lewitt 1980). Az edzett növények sejthártyája kibírja ezt a térfogatváltozást, az edzetleneké azonban nem (Steponkus 1984). Annak ismeretében, hogy -10°C-nál az ozmotikusan aktív víz több mint 90%-a kiáramlik a sejtből (Thomashow 1999), érthető, hogy az alacsony-hőmérsékleti stresszek egy részét a vízhiány okozza (Steponkus 1984, Steponkus et al. 1993). Ezért az ozmotikusan aktív anyagok felhalmozódásának igen nagy szerepe van a vízvesztéssel járó stresszek kivédésében.

Természetes körülmények között gyakran az abiotikus stressz-faktorok együttes megjelenésével kell számolnunk. Enyhe, felmelegedéssel tarkított teleken, ha nappal a hótakaró felső része megolvad, éjszaka pedig újra megfagy, egy jégkéreg keletkezik a szántóföldeken. A jégkéreg gátolja az oxigén diffúzióját, alatta anaerob körülmények alakulnak ki, az anaerob légzés termékei pedig károsítják a növényeket (Pethő 1993). Az őszi és tavaszi erős esőzés, valamint a tavaszi hirtelen hóolvadás a talaj túlzott átnedvesedését (waterlogging), magas talajvízszint kialakulását eredményezheti. A szántóföldeken - különösen az alacsony fekvésű területeken - a víz összegyűlhet, és a vetések akár napokra a víz alá kerülhetnek (belvíz, submergence, flooding). A víz alatt a gyökérzet, vagy akár a teljes növény anaerob körülmények közé kerül, ami szintén a növény pusztulásával járhat. Ilyen esetekben tehát az alacsony-hőmérsékleti stressz mellett a csíranövényeknek az oxigén-hiányos állapottal is meg kell küzdeniük. A gabonafélék többsége igen érzékeny már a talaj fokozott átnedvesedésére is: az elvetett magyak csírázásának feltétele a megfelelő hőmérséklet, valamint a talaj megfelelő nedvességtartalma és oxigén-ellátottsága. Vízzel túlságosan átitatott talajban a gabonafélék – a rizs kivételével – nem tudnak kicsírázni. Oxigénhiány esetén alapvetően megváltoznak az anyagcsere-folyamatok. Az elárasztás során csökken a sejt oxigénszintje, a fotoszintézis limitált. Ahhoz, hogy a sejt fenntartsa az életműködését, az energianyerés céljából az ATP (adenozin-trifoszfát) szintézisét és a NAD<sup>+</sup> (nikotinamid-adenindinukleotid) regenerációját az anaerob légzés útján biztosítja. Oxigén-hiányos környezetben az oxidált NAD<sup>+</sup> aerob regenerációja elégtelen a sejt azonnali ATP-szükségletének a fedezésére, ezzel szemben a glikolízis oxigén hiányában is képes a NADH-t NAD<sup>+</sup>-dá oxidálni Az anaerob légzés szubsztráthasznosítás szempontjából kevésbé hatékony, a tartalék tápanyagok hamar felhasználódnak, a sejt energia-ellátottsága romlik, ráadásul káros anyagcseretermékek, reaktív oxigénformák is termelődnek (Dennis et al. 2000, Fukao és Bailey-Serres 2004, Bailey-Serres és Voesenek 2008). Három fő fermentációs útvonal alakult ki a növényekben oxigén-hiány esetén, melyek során (1) laktát, (2) etanol, vagy (3) alanin képződik (1. ábra).



**1. ábra:** Metabolizmus alacsony oxigén-ellátottság esetén [Bailey-Serres és Voesenek (2008) 3. ábra alapján (320. o.)]. A kék nyilak jelzik azokat az útvonalakat, amelyek hipoxia során kerülnek előtérbe. A kék háttérrel jelölt enzimek rövidítése: ADH: alkohol dehidrogenáz, AlaAT: alanin aminotranszferáz, ALDH: acetaldehid aminotranszferáz, AMY: alfa-amiláz, ASAT: aszpartát aminotranszferáz, FK: fruktokináz, GDC: glutamát dekarboxiláz, GDH: glutamát dehidrogenáz, LDH: laktát dehidrogenáz, NR: nitrát reduktáz, PDC: piruvát dekarboxiláz, PK: piruvát kináz, SUS: szacharóz szintáz. Pirossal néhány kulcsenzim lett kiemelve

# 2.2. Transzkripciós faktorok

A transzkripciós faktorok (TF) a génszabályozás esszenciális résztvevői, minden élőlényben megtalálhatóak. Eukariótákban az ún. "általános transzkripciós faktorok" (general transcription factors) a transzkripció létrejöttéhez szükséges pre-iniciációs komplex kialakításában vesznek részt. Ilyenek például a TFIIA, TFIIB, TFIID faktorok, melyek nem feltétlenül a szabályozott gén DNSéhez kötődnek, hanem az RNS polimerázzal kerülnek direkt kapcsolatba. Más TF-ok a differenciális génexpressziót teszik lehetővé. Ezek a faktorok szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjék, melyek a gének transzkripcióját szabályozzák. A cél-gén promóteréhez kötődve aktiválják, vagy éppen gátolják a gén átírását. Kiemelkedő szerepük van a génszabályozásban: biztosítják egy adott gén szövet-, fejlődés-, vagy stimulus-specifikus expresszióját (Goodrich és Tjian 2006).

A transzkripcós faktorokat kódoló génekben több funkcionális szekvencia (domain) található. A DNS-kötő domain aminosavai lépnek kapcsolatba a szabályozott gén promóterének bázisaival, e domain szekvenciája, struktúrája tehát alapvetően meghatározza, hogy az adott TF mely gén/gének szabályozására képes. Érthető tehát, hogy a TF-ok csoportosítása a DNS-kötő domain strukturális tulajdonságain alapszik, ennek alapján sorolják őket családokba, alcsaládokba. Az azonos családba tartozó TF-ok DNS-kötő domain-je nagymértékben konzervált, azonban számos példa van arra is, hogy az egy családba tartozó TF-ok különböző folyamatok szabályozásában is részt vesznek. Ezt a többi domain működése teszi lehetővé. A TF-ok sok esetben homo- vagy hetero-oligomerként működnek (oligomerizációs domain), a ligandum-kötő, és főként a regulációs domain-ek (melyek más TF-okkal való kapcsolódást biztosítanak) a génexpresszió finom szabályozását teszik lehetővé (Goodrich és Tjian 2006).

#### 2.2.1. Növényi transzkripciós faktorok

Miután 2000-ben befejeződött a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modell-növény genomjának teljes szekvencia-meghatározása, lehetővé vált a fehérjéket, ezen belül a transzkripciós faktorokat kódoló gének számának becslése. Az előbbiek számát 25 498-re, míg az utóbbiakét - a DNS-kötő domain-ek elemzése alapján - mintegy 1500-ra becsülték; mára ez a szám a 2000-et is meghaladja. A közel azonos genom-méretű modell állatok, a *Drosophila melanogaster* és a *Caenorhabditis elegans* esetében a TF-ok száma mintegy 600-ra tehető (Riechmann et al. 2000a), ami egyértelműen jelzi, hogy a növényi genom relatíve több TF-t kódol, mint az állati genom (5-10% vs. 4-5%). A TF gének nagyobb arányán túl azok DNS-kötő specificitásban is nagyobb diverzitást tapasztaltak a növények esetében. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a transzkripciós szintű regulációnak nagyobb

szerepe van a növényekben, mint az állatokban (Mitsuda és Ohme-Takagi 2009). A négy legfontosabb adatbázis (RARTF http://rarge.gsc.riken.jp/rartf/, AGRIS http://arabidopsis.med.ohiostate.edu/AtTFDB , DATF http://datf.cbi.pku.edu.cn/ , PlnTFDB http://plntfdb.bio.unipotsdam.de/v2.0/index.php?sp\_id=ATH ) az *Arabidopsis* TF-ait átlagosan 72 családba sorolta. Az olyan génlókuszok száma, melyek TF-okat kódolnak eltérő az egyes adatbázisokban, azonban 1318-at mind a négy közöl (Mitsuda és Ohme-Takagi 2009). A TF-ok mintegy fele növényspecifikus, azaz olyan DNS kötő domain-t tartalmaz, mely csak növényekből ismert (Riechmann et al. 2000a).

A gabonafélék egyik modellnövényét, a rizst (*Oryza sativa* L.) tekintve a DRTF adatbázis (The Database of Rice Transcription Factors <u>http://drtf.cbi.pku.edu.cn/index.php</u>) az *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* esetében 2834 TF-t tart jelenleg számon, melyeket 63 családba sorolnak. A rizsénél 38-szor nagyobb genom-méretű kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.) mintegy 7000 TF szekvenciát azonosítottak (3820 validált), melyeket 40 családba soroltak. A TF családok rizs és búza közötti összevetése azt mutatta, hogy e családok konzerváltak (Romeuf et al. 2010). Az *Arabidopsis* és a rizs közötti filogenetikai analízis (Xiong et al. 2005) a TF-ok mintegy felénél ortológ kapcsolatot mutatott ki, ami arra utal, hogy e TF-ok génjei közös ősöktől származnak.

# 2.2.2. A transzkripciós faktorok szerepe az abiotikus stressz-válaszban

A TF-okat tehát a DNS-kötő domain-jük alapján soroljuk családokba. Az egy bizonyos típusú TF által szabályozott gének csoportját regulonnak nevezzük. A növényekben az abiotikus stressz-válaszban betöltött szerepük alapján legalább négy különböző regulont azonosítottak, ezek: (1) a CBF/DREB1 regulon; (2) a NAC (NAM, ATAF és CUC) és ZF-HD (zinc-finger homeodomain) regulon; (3) az AREB/ABF (ABA-responsive element-binding protein/ABA-binding factor) regulon; (4) és a MYC (myelocytomatosis oncogene)/MYB (myeloblastosis oncogene) regulon (Saibo et al. 2009). Az első két regulon az ABA (abszcizinsav; elsődleges stresszhormon)-független, a második kettő az ABA-függő jelátviteli úthoz tartozik (2. ábra).

Értekezésemben egy *MYB*, a rizsből származó *OsMYB4* gén; és két *CBF*, a búzából izolált *TaCBF14* és *TaCBF15* gének szerepével foglalkozom, ezért a MYB és CBF/DREB1 TF-ok jellemzését fejtem csak ki részletesen.



2. ábra: Az abiotikus stresszválasz transzkripcionális szabályozási hálózata [Saibo et al. (2009) alapján újrarajzolva]. Ovális keret jelzi a TF-okat, kör alakú a TF működését módosító enzimeket. A kis piros háromszögek poszt-transzlációs módosulást jelölnek. A kék négyzetben lévő kérdőjelek olyan, valószínűleg MYC ICE1-szerű TF-okra utalnak, melyek CBF1/DREB1B és CBF2/DREB1C típusú TF-okat aktiválnak. A zöld négyzetek az abiotikus stresszválaszban szerepet játszó gének promóterében lévő cisz-elemeket mutatják. A fekete pöttyök sumoilációt jeleznek.

# 2.2.2.1. A MYB gének jellemzése

Az első *MYB* gént, a *v-MYB* gént a madár mieloblasztózis vírusból írták le (Klempnauer et al. 1982), míg az első növényi *MYB* gént, mely az antocianin szintézisben játszik szerepet, a kukoricaszem aleuron rétegéből azonosították (Paz-Ares et al. 1987). Az *Arabidopsis* genomjának megismerése tette lehetővé a növényi *MYB* gének részletes vizsgálatát. Azóta számos növényfajban tanulmányozták a *MYB* gének genetikáját, szerepét. E kutatások alapján a *MYB* gének túlnyomó többségét transzkripcós faktornak tartják (Jin és Martin 1999), és kiderült, a MYB szuper-géncsalád tartalmazza a legtöbb gént a növényi géncsaládok közül (Riechmann és Ratcliffe, 2000b).

A MYB fehérjéket az erősen konzervált MYB domain jellemzi. E domain akár egymás után négyszer is ismétlődő, olyan nem-tökéletesen azonos aminosav-szekvencia ismétlődésekből (R) áll, amelyek mindegyike 52 aminosavból épül fel. Minden ismétlődés három α-hélixet alakít ki; a harmadik az, amelyik a DNS-sel direkt kapcsolatot hoz létre. A MYB fehérjék osztályozása a szomszédos ismétlődések számán alapszik. Az emlősökből leírt c-MYB fehérje R1, R2, R3

ismétlődésekből áll, más MYB fehérjék ismétlődéseit az R1, R2 és R3 szekvenciákhoz való hasonlóság alapján nevezik el (Dubos et al. 2010).



**3. ábra:** A növényi MYB TF-ok négy osztálya az R ismétlődések alapján, valamint egy tipikus R2R3-MYB elsődleges és másodlagos szerkezete (H: hélix; T: turn; W: triptofán; X: aminosav). [Dubos et al. (2010) 1. ábrája alapján újrarajzolva.]

A növényi MYB-eket négy osztályba sorolják (3. ábra). Ezek közül a legkisebb a 4R-MYB csoport, melyet négy R1/R2-típusú ismétlődés jellemez. A második osztályba (3R-MYB) az R1R2R3 típusú MYB-ek tartoznak, a harmadik pedig egy heterogén osztály (1R-MYB, ill. MYB-rokon), mivel ide olyan fehérjéket sorolnak, melyek egyetlen, vagy csak részleges MYB ismétlődést tartalmaznak. A legtöbb növényi MYB a negyedik, az R2R3 családba tartozik. Ezekre jellemző, hogy a DNS kötő MYB domain az N-terminális szakaszon lokalizálható, a C-terminális részen egy aktivációs vagy repressziós domain található, míg a fehérje többi szakasza nagymértékben variábilis. Az R2R3 MYB fehérjéket a C-terminális domain aminosav szekvencia hasonlóság alapján sorolják további alcsoportokba (Dubos et al. 2010). A két modellnövény, az *Arabidopsis* és a rizs MYB TF-ainak jelenleg ismert számát az 1. táblázatban ismertetjük.

Az R2R3 MYB fehérjék rendkívül sokféle folyamat szabályozásában vesznek részt. Az egyetlen közös vonásuk az, hogy "növény-specifikus" folyamatokban játszanak szerepet: ilyen a növényi fejlődés irányítása, a növényi sejtek sorsának, azonosságának meghatározása, az elsődleges és másodlagos anyagcsere szabályozása, vagy a biotikus és abiotikus stressz folyamatok szabályozása (Martin és Paz-Ares 1997).

1. táblázat: Az ismert MYB	TF-ok száma	Arabidopsis-ban	és rizsben.	[Dubos et al.	(2010) 1.
táblázatának adatai]					

MYB osztályok	Arabidopsis	rizs
R2R3-MYB	126	109
1R-MYB, MYB-rokon	64	70
3R-MYB	5	5
4R-MYB	1	1

# 2.2.2.1.1. Az OsMYB4 gén szerepe

A rizs *OsMYB4* génje az R2R3 családba tartozik; cDNS-ét (génbanki azonosítószám: Y11414) koleoptil cDNS-könyvtárból izolálták (Pandolfi et al. 1997). Az *OsMYB4* gén a rizs számára hideg-stresszt jelentő 10-15°C-on expresszálódik a hajtásban, de alacsony szinten kontroll körülmények között is átíródik. Három napos rizs koleoptilében 4°C-os hidegkezelés hatására négy órán belül jelentősen megnő az mRNS átírása, de só-, szárazság-, magas hőmérséklet-, anoxia-, ABA-, vagy IAA (indol-ecetsav) -kezelés nem indukálja. Ez azt jelzi, hogy rizsben a *OsMYB4* génnek a hidegre adott stresszválaszban van szerepe (Vannini et al. 2004).

Az OsMYB4 gén konstitutív overexpressziója transzgénikus Arabidopsis-ban (Wassilewskija ökotípus) megnövekedett toleranciát/rezisztenciát eredményezett számos abiotikus, így hideg és fagy (Vannini et al. 2004), szárazság (Mattana et al. 2005), só és oxidatív stresszek, mint UV, ózon (Vannini et al. 2006); és biotikus stresszel (gomba és vírus) szemben (Vannini et al. 2006). Tranziens expressziója Arabidopsis-, és dohány- (Nicotina tabacum cv. Petit Havana) protoplaszt rendszerben transzaktiválta a lúdfűből izolált COR15a gén promóterét, de rizs (cv. Arborio) protoplaszt rendszerben nem, ami azt mutatja, hogy nem közvetlenül az OsMYB4 képes aktiválni a cor15a promótert, hanem az bizonyos közbülső transzkripciós faktorokon keresztül aktiválódik, amelyek dohányban és Arabidopsis-ban jelen vannak, de rizsben hiányoznak (Vannini et al. 2004). Az OsMYB4 gén transzkriptumának túltermeltetésével bizonyos metabolitok, elsősorban olyan vegyületek, amelyeknek a fagyállóság kialakításában kulcsszerepük van, így a cukrok és prolin akkumulációja fokozódott, és ezzel párhuzamosan megnőtt a transzgénikus cseppecskevirág (Osteospermum ecklonis) hideg-, és fagytűrése is (Laura et al. 2010).

A különböző fajokon végzett kísérletek rámutattak azonban arra is, hogy az *OsMYB4* transzgén hatása nagymértékben függ a gazdanövény genomi hátterétől: transzgénikus paradicsomban (*Solanum lycopersicum* L. cv. Tondino) megnövekedett szárazságtűrést és vírus-rezisztenciát okozott, de nem volt hatása a hideg-toleranciára (Vannini et al. 2007). Ráadásul a konstitutív *CaMV35S* promóter által vezérelt transzgén alacsony transzformációs gyakoriságot és a

transzformáns paradicsom sterilitását okozta, mely negatív hatást a stresszindukálható *cor15a* promóter alkalmazása minimalizálta (Vannini et al. 2007). *OsMYB4* génnel már fás szárú növényt, almát (*Malus pumila* Mill. Cv. Greensleeves) is transzformáltak. E kísérlet során pleiotróp hatásként törpe fenotípust figyeltek meg, ugyanakkor a transzgén megnövekedett hideg-, és szárazságtűrést eredményezett a transzgénikus almában (Pasquali et al. 2008).

Az *OsMYB4* transzkripciós faktor által szabályozott géneket heterológ és homológ transzgénikus rendszerben is tanulmányozták. Transzgénikus *Arabidopsis*-ban microarray analízissel sok olyan *OsMYB4*-által szabályozott gén szerepét igazolták, melyeknek már ismert a funkciója az abiotikus és a biotikus stresszválaszban (Vannini et al. 2006). *OsMYB4* gént transzgénikus rizsben túltermeltetve bizonyították, hogy az *OsMYB4* transzkripciós faktor egy fő központi szabályozó szerepet foglal el a hierarchikus transzkripcionális hálózatban; direkt, vagy indirekt módon - intermedier TF-okon keresztül - szabályoz több ezer gént (Park et al. 2010). Igazolták továbbá azt is, hogy az OsMYB4 transzkripcionális hálózat és a CBF/DREB TF-ok függetlenek egymástól (Park et al. 2010).

#### 2.2.2.2. A *CBF* gének jellemzése

Az abiotikus stressz-tolerancia kialakításában szerepet játszó transzkripciós faktorok funkcióját lúdfűben az alacsony-hőmérsékleti stressz esetében tanulmányozták a legrészletesebben. Ezek között is a legjobban jellemzett a CBF/DREB1 TF-ok szerepe. Ezek a CBF/DREB1 TF-ok az általuk szabályozott gének promóterében található CRT/DRE rövidítéssel jelölt szekvenciához kötődnek, elnevezésük is erre utal (<u>CRT/DRE B</u>inding <u>F</u>actor) (Stockinger et al. 1997, Liu et al. 1998). A kettős elnevezés onnan ered, hogy a két labor egymástól függetlenül, szinte egy időben közölte eredményeit. Sok hideg-, és dehidratációs stresszre indukálódó gén promóterében megtalálható a CRT/DRE (C-repeat/dehydration-element) cisz-elem, ami egy CCGAC "core" szekvenciát tartalmaz, melyhez kötődnek a CBF fehérjék (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki 1994, Stockinger et al. 1997). A CBF fehérjék az APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) DNS kötő domain meglétével jellemzett AP2/ERF szupercsaládba, ezen belül az ERF család CBF/DREB1 alcsaládjába tartoznak. A CBF fehérjéket az ún. "CBF signature" konzervált aminosav szekvencia mellett az attól N-terminális irányban elhelyezkedő (PKK/RPAGRxKFxETRHP), illetve C-terminális irányban található (DSAWR) szignál motívumok (signiture motif) különböztetik meg a család többi tagjától (Jaglo et al. 2001).

*Arabidopsis*-ban leírtak egy olyan transzkripciós faktort, mely maguknak a *CBF* géneknek a transzkripcióját szabályozza hidegben. Ez az *ICE1* (<u>Inducer of CBF expression 1</u>) gén konstitutívan expresszálódik, normál hőmérsékleten inaktív állapotban marad, azonban hidegkezelés hatására

aktív állapotba kerül, hozzákapcsolódik a *CBF* gének promóteréhez, így indukálva a *CBF*-ek transzkripcióját (Gilmour et al. 1998). *ICE1* génnel transzformált *Arabidopsis*-ban a gént konstitutívan túltermelve hidegben (és csak hideg környezetben) megnő a CBF regulonhoz tartozó gének átírása a vad típushoz képest, továbbá nő a fagyállóság mértéke is (Chinnusamy et al. 2003). A CBF/DREB1 TF-ok kifejeződését az *ICE1*-t poszttranszkripcinális szinten negatív regulátorként módosító ligázok (HOS1, SAZ1, SIZ1) is befolyásolják (2. ábra). Ezeket és további, már részletesen tanulmányozott CBF/DREB1 regulátor géneket foglalja össze Chinnusamy et al. (2010).

A *CBF* géneket *Arabidopsis*-ban írták le; azóta 54 növénynemzetségben, 31 kétszikű (köztük 13 fásszárú faj) és 23 egyszikű növényben is azonosítottak *CBF* ortológ géneket (Navarro et al. 2009). A *CBF* gének alacsony hőmérséklet hatására, tranziens módon expresszálódnak a hideg-akklimatizáció korai fázisában (Gilmour et al. 1998). Minél alacsonyabb a hőmérséklet, a *CBF*-ek transzkripciója annál intenzívebb (Zarka et al. 2003). A közelmúltban kimutatták, hogy hidegedzett nyírfában (*Betula pendula*) a fagy utáni olvadási periódus során szintén megnő *CBF*-ek és egy általuk szabályozott gén (*BpLTI36*) transzkriptumának mennyisége, ami azt jelzi, hogy a CBF-indukálta folyamatok újra aktiválódnak a stresszt követő regenerációs időszak alatt (Welling és Palva 2008). A *CBF/DREB1* géneket olyan fajokban is leírták, melyek életciklusuk során nem akklimatizálódnak fagypont körüli hőmérsékletekhez. Ilyen például a paradicsom és a rizs (Jaglo et al. 2001, Dubouzet et al. 2003, Zhang et al. 2004), ugyanakkor kimutatták azt is, hogy paradicsomban a CBF regulon kisebb és kevésbé változatos, mint a hideg-akklimatizálódni képes *Arabidopsis*-ban.

*CBF/DREB1* gént túltermelő növényekben kimutatták, hogy nem induktív hőmérsékleten is megnő az általuk szabályozott hideg-indukálható gének expressziója, és ennek eredményeként fokozódik ezeknek a növényeknek a fagytűrése (Jaglo-Ottosen et al. 1998, Liu et al. 1998). Transzgénikus *Arabidopsis* növényben igazolták, hogy a *CBF3* gén expressziójának növelésével nem csak a fagyállóság mértéke növekszik meg, hanem a transzformánsok a dehidratációs stresszel szemben is toleránsabbak lettek (Kasuga et al. 1999), ami jól példázza, hogy egy adott transzkripciós faktor nem csak egyetlen génregulációs folyamatban vehet részt.

A *CBF/DREB1* transzformáns növények megnövekedett hideg-, illetve fagytűrése, és fokozott szárazságtűrése mellett több tanulmányban a transzgén negatív pleiotróp hatását is leírták. Ezek szerint a *CBF/DREB1* gének konstitutív overexpressziója lassítja a transzgénikus növény fejlődését, késői virágzást, és/vagy akár törpeséget is okozhat (összefoglaló: Thomashow 2010, Hussain et al. 2011).

# 2.2.2.1. A CBF gének Arabidopsis-ban

A felfedezésük óta kiderült, hogy az *Arabidopsis* növény genomja 6 CBF/DREB1 és 8 DREB2 típusú gént kódol (Sakuma et al. 2002). Ezek közül a *CBF1*, *CBF2* és *CBF3* (*DREB1A*, *DREB1B* és *DREB1C*) gének hideg hatására indukálódnak, azonban nem indukálódnak szárazság-, vagy só-stressz esetén. A *CBF4* (*DREB1D*), a *DREB2A* és a *DREB2B* gének viszont dehidratáció és só-stressz esetében igen, de alacsony-hőmérsékleti stressz esetében nem indukálódnak (Liu et al. 1998, Nakashima et al. 2000, Haake et al. 2002).

Alacsony-hőmérsékleti stressznek kitett Arabidopsis növényekben a CBF1-3 gének mintegy 15 percen belül indukálódnak 14°C-on, vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten (Stockinger et al. 1997, Gilmour et al. 1998, Liu et al. 1998, Kasuga et al. 1999, Medina et al. 1999, Zarka et al. 2003), mely indukciót hamarosan jó néhány, elsősorban hideg-indukálható [ún. COR (Cold regulated)] gén expressziójának növekedése követ. Igazolták azt is, hogy egyes Arabidopsis CBF gének a hidegadaptáció szabályozásában nem, vagy csak részben azonos funkciót látnak el, azaz működésük során más-más géneket szabályoznak (Novillo et al. 2007). A CBF gének által szabályozott gének összességét, az ún. "CBF regulon"-t transzgénikus növények vizsgálatával tanulmányozták. Egy 8000 Arabidopsis gént reprezentáló microarray analízis alapján megállapították, hogy a hideg-indukálható géneknek 12%-a (Fowler és Thomashow 2002), míg egy 24 000 génes Affymetrix CHIP analízis szerint 28%-a (Vogel et al. 2005) tartozik a CBF regulonba. A CBF gének működésének fontosságát igazolja az, hogy azon gének 84%-a, melyek expressziója jelentős mértékben (több mint 15-szörösére) nőtt meg, a CBF regulonba tartoznak (Vogel et al. 2005). A hideg-indukálható COR gének működése nagymértékben hozzájárul az alacsonyhőmérsékleti stressz-tolerancia, vagy a fagyállóság kialakulásához. A CBF regulonba egyrészt a stressz-válasz korai szakaszában szerepet játszó szignál-transzdukciós fehérjék (protein kinázok és foszfatázok, stb.), a génszabályozást irányító transzkripciós faktorok, másrészt a sejtszintű válaszban direkt szerepet játszó fehérjék, enzimek tartoznak. Ide sorolhatók az erősen hidrofil tulajdonságú krioprotektív fehérjék, melyek membránokat stabilizálnak, makromolekulákat, így fehérjéket védenek, vagy olyan enzimek, melyek az alacsony-hőmérsékleti stressz, a sejtszintű fagy kivédésében játszanak szerepet (antioxidáns folyamatok, ozmolit akkumuláció, zsírsav metabolizmus, stb). Az Arabidopsis CBF regulonjába tartozó (112 gént figyelembe vevő) fehérjék funkcionális csoportosítását a 4. ábra szemlélteti.



**4. ábra:** A lúdfű CBF regulonjába tartozó fehérjék csoportosítása. [Fowler et al. (2005), 79. o., 4.2 ábra alapján újrarajzolva]

A metabolomika oldaláról közelítve is igazolták a CBF regulon szerepét. Hideg hatására 325-féle metabolit akkumulálódik *Arabidopsis*-ban, mely vegyületek 79%-át a nem induktív körülmények mellett, azaz normál hőmérsékleten nevelt *CBF3* gént túltermelő transzformáns növényekből is kimutatták. Mi több, azon metabolitok, melyeknek a hideg hatására több mint ötszörösére nőtt a mennyisége a hidegkezelt, nem transzformáns *Arabidopsis*-ban, 90%-a kimutatható volt a normál körülmények között nevelt (nem hidegkezelt) *CBF3* transzformáns növényekben is (Cook et al. 2004). Mindez arra utal, hogy a nem hidegkezelt, *CBF3* túltermelő növények metabolomikája meglehetősen hasonló a hidegkezelt nem transzformáns növényekéhez.

Az Arabidopsis-ban végzett transzkriptom és metabolomikai analízisek egyértelműen igazolják, hogy a *CBF* gének működése jelentős mértékben hozzájárul az alacsony-hőmérsékleti stressz-tolerancia létrejöttében. Ugyanakkor, éppen a transzkriptom elemzés mutat rá arra, hogy a CBF szabályozáson kívül más regulációs utak is fontosak: a hideg-indukálható *COR* géneknek csak egy része tartozik a CBF regulonba. Különböző mutáns vonalak (*eskimo1, ada2, hos9, hos10*, stb. mutánsok; összefoglaló: Survila et al. 2010) analízise is azt igazolja, hogy a CBF regulációs út mellet más regulációs utak is szükségesek a fagyállóság kialakulásához.

# 2.2.2.2. A CBF gének a gabonafélékben

Az Arabidopsis mellett a legtöbb információ a gabonafélék, így főként a búza (*Triticum aestivum*), alakor (*Triticum monococcum*) és az árpa (*Hordeum vulgare*) *CBF* génjeiről áll rendelkezésünkre. A gabonafélékben található ortológ *CBF* gének szintén hidegre és/vagy szárazságra indukálódnak, illetve néhány közülük (és így az általuk szabályozott gének) alacsony szinten kontroll körülmények között is expresszálódik. A fotoperiódus és a napi ritmus ugyancsak

befolyásolhatja a transzkripciójuk mértékét. A *CBF* gének bizonyos csoportjai csak a Perjefélékre (*Pooideae*) jellemzőek; valószínűleg a mérsékelt égövi élőhelyekre terjedésük, és az alacsony hőmérsékleti toleranciájuk kialakulása során fejlődtek ki bennük, mivel ezeknek a *CBF* géneknek az expressziója és indukálhatósága erőteljesebb az őszi fajtákban (Badawi et al. 2007). Megállapították, hogy a rizs genomja 5, az alakor genomja legalább 13, a kenyérbúza legalább 15, míg az árpa genomja pedig legalább 17 *CBF* gént kódol. A mérsékelt égövi gabonafélék *CBF* génjeinek szerepéről és diverzitásáról a legtöbb információt a búza mellett az árpában végzett kutatások szolgáltatták. A *Triticeae* fajok genomjai közötti nagyfokú homológia és szintenitás miatt a búzában és az árpában kapott kísérleti eredmények egymást kiegészítik, támogatják (összefoglaló: Galiba et al. 2009).

A búza abiotikus, főként alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciájának vizsgálata a martonvásári MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetben több évtizedes múltra tekint vissza. A Genetika Osztályon előállított genetikai anyagokon (monoszómás, szubsztitúciós, rekombináns vonalak) a búza 5A és 5B kromoszómáján térképezték az FR-A1, az FR-B1 fagytűrésért felelős lókuszokat, a VRN-A1 és VRN-B1 vernalizációs igényt meghatározó gént, az EPS-5BL koraisági lókuszt, továbbá olyan génlókuszokat azonosítottak, melyek a stresszadaptációban kiemelkedő szerepet játszanak (szénhidrát-, ABA-akkumuláció) (Galiba et al. 1995, 1997; Tóth et al. 2003). Alakorban egy fagyállósági gént, az FR-A2-t térképezték az 5A kromoszómán, valamint ugyanabba a pozícióba térképeztek egy TF-t kódoló gént, a CBF3-t, és egy hideg-indukálható gén (COR14b) expressziójáért felelős QTL-t is (Vágújfalvi et al. 2003). Ezzel elsőként hoztak összefüggésbe egy gént (CBF3), amely nagy valószínűséggel azonos egy fagyállósági génnel, az FR-A2-vel. Munkájukat az árpában végzett kísérletek megerősítették (Francia et al. 2004). A későbbiek során alakorban az 5A<sup>m</sup> kromoszóma Fr-A2 régiójában 11 CBF gént térképeztek (Miller et al. 2006). Génexpressziós kísérletekkel bizonyították, hogy ezek közül három, a CBF14, a CBF15 és a CBF16 expressziója indukálódik hideg-stressz hatására kenyérbúzában, továbbá hogy az expresszió mértéke és a fagyállóság között összefüggés áll fenn (Vágújfalvi et al. 2005). A fagytűrő G3116 és a fagyérzékeny DV92 alakor genotípusokat keresztezve létrehoztak egy térképezési populációt, melynek fagytesztje során kimutatták, hogy szintén három CBF gén, a CBF12, a CBF14, és a CBF15 az, amelyiknek szerepe van a fagytűrés kialakításában (Knox et al. 2008). A két különböző fajon, két eltérő kísérletben kapott eredmények között tehát két CBF gén azonosnak bizonyult: mindkét rendszer a CBF14 és a CBF15 géneknek a fagyállóság kialakításában játszott szerepét igazolta.

A növényi abiotikus stressz-tolerancia egyik legintenzívebben kutatott területe a CBF génreguláció; a gabonafélékben kapott eredmények nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy a

klasszikus genetika és a molekuláris biológia kapcsolódásával egyre közelebb kerüljünk egy olyan komplex rendszer megértéséhez, mint az alacsony-hőmérsékleti-, vagy a fagytolerancia.

#### 2.2.3. A transzkripciós faktorok szerepének bizonyítása transzformációval

Egy gén szerepének a bizonyítása egyrészt történhet oly módon, hogy az adott gén megnyilvánulást csökkentik, vagy megszüntetik (loss of function) és ezzel párhuzamosan vizsgálják a feltételezett tulajdonság (biokémiai, élettani, agronómiai, stb.) változását. Ez utóbbira az egyik lehetőség a kiütéses (knockout vagy knockdown) mutánsok elemzése. Mintegy 400 000 inzerciós *Arabidopsis* vonal áll rendelkezésre (Alonso és Ecker 2006), de előállításuk megkezdődött más fajokban is (rizs, *Brachypodium*). A mutánselemzés mellett egy másik lehetőség az adott gén transzformációval történő csendesítése. Másrészt, egy gén működése bizonyítható transzformációval a génexpresszió-fokozásán keresztül (gain of function) is.

Számos eredményes kísérletet publikáltak a stressz-toleranciában (elsősorban az abiotikus stressz-toleranciában) részt vevő gének funkciójának igazolásáról transzgénikus növények analízisével. Az ily módon tanulmányozott géneket három csoportba sorolhatjuk: 1 -gének, melyek ismert funkciójú enzimeket, vagy struktúrfehérjéket kódolnak; 2 -ismeretlen funkciójú gének; 3 - regulátor fehérjéket kódoló gének (Bhatnagar-Mathur et al. 2008). A stressz-adaptációban részt vevő gének szerepének igazolásához a kezdeti transzformációs kísérletek ún. egyfunkciós génekkel ("single action genes") történtek. Elsősorban olyan géneket vizsgáltak, melyek egyetlen metabolit módosításáért felelősek, pl. egyes anyagcsere utak kulcsenzimeit. Ezeket a kísérleteket Bhatnagar-Mathur et al. munkája (2008) foglalja össze.

Tekintettel azonban arra, hogy a növényi stressz-tolerancia - és különösen igaz ez az abiotikus stressz-toleranciára - egy komplex, sok gén által szabályozott rendszer, ahol a génregulációs hálózatok is kapcsolatban vannak egymással, az egyedi gének vizsgálatáról a hangsúly áthelyeződött a (több/sok gén működését befolyásoló) szabályozó gének tanulmányozására: nagyszámú TF szerepét bizonyították már transzformációval. Ezekről a TF-okról részletes listát, ismertetést tartalmaz Umezawa et al. (2006), valamint Zhang (2003) összefoglaló publikációja, míg Sung et al. (2003) szűkebb körben, csak azokat az eredményeket ismerteti, melyek a hőmérsékleti stressz-tolerancia javítására törekedtek.

A transzformált TF-ok túlnyomó többsége a nagy TF családok (AP2/EREBP, bZIP, NAC, MYB, MYC, WRKY) valamelyikébe tartozik. A legtöbb kísérletet az AP2/EREBP családba tartozó *CBF* génekkel végezték. Homológ és heterológ (főként *Arabidopsis*-ból származó) rendszerekben is bizonyították e gének stressz-adaptációban betöltött szerepét: *CBF* génekkel transzformáltak már búzát, rizst, dohányt, paradicsomot, epret, repcét, burgonyát, almát, papayát, stb. Ismert ugyanakkor

az is, hogy a TF-ok sok esetben más – akár különböző családba tartozó – TF-ral együttműködve fejtik ki hatásukat. Ezért a több TF együttes transzformációja segíthet olyan esetben, amikor az egyedi TF-ral végzett transzformáció nem vezetett eredményre (Pelaz 2001).

Nagymértékben befolyásolhatja az eredményt (azaz a tanulmányozni kívánt fenotípust, vagy pleiotróp hatásként akár az egész növény vitalitását, fejlődését) az, hogy a transzformált TF expressziója hogyan szabályozódik, vagyis milyen típusú promóter vezérli. Leggyakrabban az állandó működést biztosító konstitutív promótereket (CaMV 35S, növényi ubiquitin, rizs aktin, kukorica ADH) alkalmazzák. A konstitutív promóterek előnye, hogy folyamatos génexpressziót biztosítanak, melynek következtében az általuk szabályozott gén hatása kifejezettebb lehet, az nem függ környezeti hatásoktól, fejlődési állapottól. Sok esetben azonban – mivel a TF több gén működését is befolyásolja – ez a túlműködtetés megterhelő a növény számára, ami különböző abnormalitásban (pl. késleltetett virágzás, a növekedés retardációja, vagy éppen törpeség kialakulása) nyilvánul(hat) meg. Ezt a problémát az indukálható promóterek alkalmazásával lehet kivédeni. Az ideális indukálható promóter egyrészt biztosítja, hogy indukáló hatás hiányában a vezérelt gén nem nyilvánul meg, másrészt, hogy annak expressziója reverzibilis és dózisfüggő legyen (Bhatnagar-Mathur et al. 2008). Az ilyen promóterek indukálódhatnak kémiai anyagokra, vagy fizikai hatásokra, és ahogy a konstitutív promóterek is, kifejeződhetnek az egész szervezetben, vagy biztosíthatnak csak szerv-, ill. szövet-specifikus génexpressziót. Kémiai indukáló lehet alkohol, tetraciklin, szteroid, egyes fémionok, stb.; míg fizikai indukálóként a hőmérséklet-változás és a fény szerepe ismert leginkább. Egyes promóterek olyan szabályozó elemeket tartalmaznak, melyek stressz hatására (ozmotikus, só, magas vagy alacsony hőmérsékleti, sebzési, stb. stressz) indukálódnak. A szövet-specifikus promóterek alkalmazásának nagy előnye, hogy nem állandó, hanem a vizsgálni kívánt gén szövet- (szerv-, fejlődési állapot-) függő expresszióját biztosítja. Ezeket a promótereket endogén és exogén faktorok egyaránt indukálhatják, tehát az indukálható promóterek közé is sorolhatók.

Az indukálható promóterek előnyét bizonyítja például, hogy az *Arabidopsis CBF3/DREB1A* TF-t kódoló génjének konstitutív megnyilvánulása - bár az megnövekedett só-, és szárazságtűrést, valamint fagyállóságot eredményezett - jelentős mértékű növekedési zavarokhoz is vezetett, ám amikor e gént a stressz-indukálható *rd29A* promóter vezérelte, akkor már ilyen probléma nem lépett fel, mindamellett, hogy a fokozott stressz-ellenállóság megmaradt (Kasuga et al. 1999). A paradicsomban kifejeztetett *Arabidopsis CBF1* gén fokozott szárazság, hideg és oxidatív stressz-toleranciát eredményezett, de a növények fejlődésében zavarok mutatkoztak, amit az árpa *HvA22* génből származó, abiotikus stresszre indukálódó szintetikus promóter alkalmazása megszüntetett. Érdekes módon, ugyanazt a *CBF* gént, az *Arabidopsis*-ból származó *CBF3*-at (*DREB1A*) rizsbe transzformálva két kutatócsoport eltérő eredményt kapott. A gén konstitutív expressziója mindkét

esetben fokozott só-, szárazság-, és alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciát eredményezett, azonban, míg az egyik kutatócsoport jelentős növekedési zavarokat detektált (Ito et al. 2006), addig a másik kutatócsoport nem tapasztalt zavarokat a transzgénikus növények fejlődésében (Oh et al. 2005).

A stressz-toleranciában szerepet játszó TF-okkal végzett transzformációs munkák egy lehetséges veszélyére hívják fel a figyelmet Bhatnagar-Mathur et al. (2008). Véleményük szerint ahhoz, hogy egy adott gén expresszióját biztosítsák, a kutatók sok esetben olyan kivételes stresszkörülményeket alkalmaznak, melyek extrém szituációt jelentenek a növény számára. Szerintük az ilyen kísérletek agronómiai és élettani szempontból is téves következtetések levonásához vezethetnek. Az ilyen szempontú értékeléseknél figyelemmel kell lenni arra, hogy a tanulmányozott gén más stressz-génekkel, mechanizmusokkal is kapcsolatban áll(hat), ezért annak hatását hosszabb távon, más (stressz) körülmények között is tanulmányozni kell. Ez utóbbi a gabonafélék esetében különösen fontos szempont, hiszen e növények az egyedfejlődésük során sokféle stressznek vannak kitéve, nem csak egyetlen, rövid időtartamú, extrém stressznek. A szerzők azonban egyetértenek azzal, hogy az ilyen rövid távú, "mesterséges" stresszek alkalmazása adekvát, ha annak célja a gén funkciójának bizonyítása.

Túl azon, hogy egyes TF-ok szerepét transzformációval igazolják, ez a megközelítési mód, metodika segíthet a végső cél elérésében, azaz az agronómiai szempontból fontos növények egyes tulajdonságainak (különösen igaz ez olyan komplex tulajdonságok esetében, mint az abiotikus stressz-tolerancia) javításában. Egy, az e témakörrel foglalkozó dolgozat így fogalmaz: "Mivel a transzkripciós faktorok a sejtfolyamatok mester-szabályozóiként működnek, ezért a gabonafélék komplex tulajdonságainak módosításában kiváló jelöltként szerepelnek; a TF alapú technológiák jelentős képviselői lesznek a következő generációs biotechnológiai eljárásoknak" (Century et al. 2008).

# 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

# 3.1. Növényanyag

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) transzformációja nagymértékben genotípus-függő. A legsikeresebben transzformálható fajta a tavaszi Golden Promise. Munkánk során Golden Promise tavaszi árpából izolált éretlen embriókat transzformáltunk *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével. A *CBF* génekkel történő kísérleteink kapcsán együttműködést alakítottunk ki Dr Wendy Harwood-dal (Department of Crop Genetics, John Innes Centre (JIC), Norwich, UK), akitől egy hatékony árpa-transzformációs technikát tanulhattam meg. Ő bocsátotta rendelkezésünkre az alap expressziós pBRACT vektorokat (<u>www.bract.org</u>) és egy részletes protokollt, melyet azóta könyvfejezetben és cikként is publikáltak (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008).

Az árpaszemeket 2:2:1 arányú komposzt: perlit: homok földkeverékbe vetettük el; hetente néhány cserépnyi anyagot, több héten keresztül. A növények kontrollált körülmények között, növénynevelő kamrában nőttek 15/12°C (nappal/éjszaka) hőmérsékleten, 80% relatív páratartalom, és 16 h fény / 8 h sötét periódus mellett, a fényerősség 300 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> volt. Ezek a növények a fejlődésük során nem voltak permetezve, mert a tapasztalat szerint a peszticidek csökkenthetik az árpából izolált éretlen embriók szövettenyésztésének sikerességét.

A folyamatosan elültetett növények fejlődését, kalászolását nyomonkövettük és az optimálisan 1,5 mm átmérőjű éretlen embriókat tartalmazó kalászokat vágtuk le az árpanövényekről. A szemeket a kalászról lecsipkedtük, és steril körülmények között, lamináris fülkében sterileztük. A sterilezés lépései:

- mosás 70%-os EtOH-lal, 30 sec,
- steril desztillált vízzel öblítés 3×,
- mosás 50%-os nátrium-hipoklorit oldattal (Fluka), 4 min,
- steril desztillált vízzel öblítés 4×.

A steril szemekből mikroszkóp alatt izoláltunk éretlen embriókat. Az embriókezdeményt (a hajtáscsúcs- és a gyökércsúcs-kezdeményt) egy hegyes csipesz (No. 5 type, TAAB Laboratories Equipment Ltd.Ref. T083) segítségével lecsippentettük. Petri csészénként 25 szkutellumot helyeztünk kallusz indukáló ("CI"; callus induction) táptalajra (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008). A Petri csészéket a fénytől letakarva szövettenyésztő kamrában inkubáltuk, mely stabilan 24°C-os hőmérsékleten működött, 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> megvilágítás mellett. Az *Agrobacterium*-fertőzés egy nappal a éretlen embriók izolálása után történt.

# 3.2. A transzformációs konstrukciók előállítása

A rizs *OsMYB4* gént (génbanki azonosítószám: Y11414) az *Arabidopsis thaliana*-ból izolált *cor15a* stressz-, és ABA-indukálható promóterrel összeépítve Dr. Immacolata Coraggio (Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR; Milano, Italy) bocsátotta rendelkezésünkre egy expressziós kazettában (pUC-*cor15-MYB4*). Ebből a kiindulási konstrukcióból készítettük el az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével árpa transzformációjára alkalmas új konstrukciót, melynek lépései:

- Primer tervezése a *cor15a-OsMYB4-NOS* (promóter-transzgén-terminátor; együtt 2667 bp) szekvencia amplifikálására (3.10. fejezet, Primerek listája: 2. táblázat), mely biztosítja a helyspecifikus klónozást a pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO<sup>®</sup> klónozó vektorba (Invitrogen; a gyártó utasítása szerint).
- A *cor15a-OsMYB4-NOS* szekvencia amplifikálása PCR módszerrel (Accuprime<sup>™</sup> *Pfx* DNS polimeráz, Invitrogen). A PCR termék ellenőrzése gélelektroforézissel, tisztítása Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kittel.
- TOPO klónozó reakció (pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO Cloning Kit, Invitrogen): a PCR terméket pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO<sup>®</sup> klónozó vektor 2:1 arányú összekeverése, majd transzformációja *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 kémiai kompetens sejtbe (Invitrogen). A sejtkultúra szélesztése kanamicin (50 μg/ml) tartalmú LB agar táptalajon.
- 10 egyedi telep ellenőrzése kolónia PCR módszerrel (Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNS polimeráz; Promega), az univerzális M13 forward (-20) és M13 reverse primereket (3.10. fejezet: 5. táblázat) használva. A PCR pozitív kolóniák közül négyből folyékony tenyészet készítése 50 µg/ml kanamicin tartalmú LB oldatban, majd a sejtkultúrákból plazmidot izolálás Wizard<sup>®</sup> *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) kittel.
- A plazmid preparátumok ellenőrzése emésztéssel, *Not*I restrikciós enzimmel (Fermentas). Az enzim a pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO-*cor15a-OsMYB4-NOS* plazmidot 3 darabra hasítja (2987 bp, 1210 bp, 1115 bp), a fragmentek méretének ellenőrzése gélelektroforézissel.
- A *cor15a-OsMYB4-NOS* PCR fragment rekombinációja a pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO® klónozó (donor) vektorból a pMDC99 (Institute of Plant Biology and Zürich-Basel Plant Science Centre, University of Zürich, Zürich, Switzerland) Gateway alapú fogadó vektorba Gateway LR clonase (Invitrogen) felhasználásával. (A reakcióelegy: 4 μl LR clonase mix II, 1,7 μl pMDC99 fogadó vektort (270 ng/μl), 1 μl donor vektort (200 ng/μl), 9,3 μl TE puffert (pH=8,0). A rekombinációs reakció inkubálása szobahőmérsékleten, egy éjszakán át (overnight).
- LR reakcióelegy emésztése AhdI restrikciós enzimmel (New England Biolabs). (A donor és a fogadó vektorban is kanamicin rezisztencia gén szerepel, és a két vektor LR rekombinációs reakciója után a pMDC99-cor15a-OsMYB4-NOS konstrukcióra kell szelektálni. Az AhdI

restrikciós enzim egyszer hasítja a donor konstrukció háttér részét (backbone), de a *cor15a-OsMYB4-NOS* fragmentet, a fogadó vektort, és így a végső pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* konstrukciót nem.)

- Az emésztett LR reakcióelegy 1 μl-ének transzformációja 30 μl kémiai kompetens *E. coli* DH5α sejt szuszpenzióba (Invitrogen), szélesztés kanamicin (50 μg/ml) tartalmú LB táptalajra.
- A telepek ellenőrzése kolónia PCR módszerrel, PMDC99-Fwd/-Rev primerpárral (3.10. fejezet:
  2. táblázat; az eredeti pMDC99 expressziós vektoron 1996 bp méretű fragmentet amplifikál, míg a pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* konstrukcióról egy 2661bp hosszúságú fragmentet.) Két PCR pozitív kolóniából plazmid preparátum készítése, és szekvenáltatásuk (MTA SZBK, DNS Szekvenáló Laboratórium, Szeged) a PMDC99 Forward és PMDC99 Reverse primerekkel.
- Az így elkészített és ellenőrzött új konstrukció, a pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* transzformációja hősokkal (An et al. 1988), pSoup segítő plazmiddal az AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe. A sejtek növesztése rifampicin (50 μg/ml) tartalmú LB táptalajon, 28°Con.

A búza *TaCBF14* (génbanki azonosítószám: EU076382) és *TaCBF15* (génbanki azonosítószám: EU076383) géneket cDNS-ről amplifikáltuk, melyet 2 órán keresztül hideg-kezelt (2°C) Cheyenne őszi búza genotípusból izolált, DNase I enzimmel (Promega) emésztett RNS-ről (TRIzol® Reagent, Invitrogen) írtunk át reverz transzkripcióval (M-MLV RT, Promega). Expressziós vektornak a pBract214 (http://www.bract.org/constructsavailable/pBractVectors/Constructs/constructs.html) Gateway alapú bináris vektort használtuk, amelyben a bakteriális szelekciót a kanamicin-, míg a növényi szelekciót a hygromycin rezisztencia gén biztosítja. A két konstrukció elkészítésének lépései:

- Primer tervezése a *TaCBF14* és a *TaCBF15* gének amplifikálására (3.10. fejezet: 5. táblázat), mely biztosítja a helyspecifikus klónozást a pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> klónozó vektorba (Invitrogen; a gyártó utasítása szerint).
- A *TaCBF14* (689 bp) és a *TaCBF15* (847 bp) gének amplifikálása (Accuprime<sup>™</sup> *Pfx* DNS polimeráz, Invitrogen). A PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel, és tisztításuk DNA Gel Extraction Kit-tel (Montáge, Millipore).
- TOPO klónozó reakció (pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO Cloning Kit, Invitrogen): a PCR termék és a pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> klónozó vektor összekeverése 2:1 arányban; transzformáció *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 kémiai kompetens sejtbe (Invitrogen). A sejtkultúra szélesztése kanamicin (50 μg/ml) tartalmú LB agar táptalajon.

- 10 egyedi telep ellenőrzése kolónia PCR módszerrel (Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNS polimeráz, Promega), többféle primerpár-kombinációban (3.10. fejezet: 5. táblázat).
- 2-2 PCR-pozitív kolóniából plazmid preparátum készítése (Mini-M<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System, Viogene), és szekvenáltatásuk az univerzális M13 forward primerrel (MTA SZBK, DNS Szekvenáló Laboratórium, Szeged).
- A donor és a fogadó vektor is kanamicin-rezisztens, ezért a donor vektor emésztése olyan restrikciós enzimmel (*HpaI = KspAI*; Promega), ami a *CBF* géneket, a fogadó vektort, ill. a végső expressziós konstrukciókat nem vágja el.
- Az LR reakció összeállítása: 2 μl linearizált pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO-*TaCBF14*, ill. pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO-*TaCBF15* vektor (30ng/μl) + 2,1 μl pBract214 vektor (50 ng/μl) + 1,3 μl LR clonase mix II (Gateway LR clonase, Invitrogen) + 1,3 μl TE puffer (pH=8,0); 6,7 μl végtérfogatban.
- Az LR reakcióelegy inkubálása 25°C-on, egy éjszakán át PCR készülékben, másnap kezelése Proteinase K-val (Gateway LR clonase, Invitrogen, a gyártó leírása szerint).
- 4 μl LR reakcióelegy transzformációja 50 μl kémiai kompetens E. coli DH5α sejtbe (Invitrogen), szélesztés kanamicin (50 μg/ml) tartalmú LB táptalajra.
- 12 egyedi telep ellenőrzése kolónia PCR módszerrel. (A Hygromycin markergén jelenlétének, és különböző primerpár-kombinációkban a promóter-transzgén, transzgén-terminátor szakaszok meglétének ellenőrzése, 3.10. fejezet: 5. táblázat).
- 3-3 PCR-pozitív kolóniából plazmid preparátumok készítése, és ellenőrzésük restrikciós enzimekkel (*Bam*HI és *Sac*I, Fermentas) történő emésztéssel, majd szekvenáltatásuk (MTA SZBK, DNS Szekvenáló Laboratórium, Szeged) pAHUbi\_promD Fwd és Nosterm 3' Rev primerekkel (3.10. fejezet: 5. táblázat).
- Külön-külön 100 ng pBract214-*TaCBF14* és pBract214-*TaCBF15* plazmid preparátum transzformációja elektroporációval (Bartlett et al. 2008) 40 μl elektrokompetens AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe, 100 ng pSoup segítő plazmid preparátumával. A sejtek növesztése rifampicin tartalmú (50 μg/ml) LB táptalajon 28°C-on, 3 napig.
- Egy-egy egyedi kolóniából standard inokulum készítése Tingay et al. (1997) leírása szerint.

A klónozó és expressziós vektorok szekvencia illesztését, térképét a Vector NTI® (Invitrogen) számítógépes programmal készítettem el.

# 3.3. Transzformáció Agrobacterium tumefaciens közvetítésével

A pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* konstrukcióval az árpa éretlen embrióinak transzformációját, majd az anyag szövettenyésztését az olasz együttműködő kutatók végezték Tingay et al. (1997) szerint, Matthews et al. (2001) módosításaival.

A pBract202 (Hygromycin szelekciós markergént hordozó kontroll vektor), pBract214-*TaCBF14* és pBract214-*TaCBF15* konstrukciókkal transzformált AGL1 *Agrobacterium* törzsekből folyékony tenyészeteket állítottunk elő 10 ml "MG/L" tápoldatban, melyet egy éjszakán át inkubáltunk 28°C-on, 160 rpm rázatással. A baktérium-kultúrából pipettával egy-egy cseppet cseppentettünk az embriókra. 3 nap együtt-tenyésztést követően az árpa-embriókat 50 mg/l hygromycint és 160 mg/l timentint (az *Agrobacterium* elölése miatt) is tartalmazó "CI" táptalajra ("CI+H+T" táptalaj; Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008) helyeztük, a Petri csészéket sötétben tároltuk. Az embriók ezután kéthetente friss táptalajra kerültek.

Az embriókat 6 hétig sötétben tenyésztettük "CI+H+T" kalluszosító táptalajon (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008). Ezután az anyagot "T" (transition) táptalajra (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008) helyeztük át, mely egy átmeneti táptalaj a kallusz indukálási és a növényregenerálási periódusok között. Ez a táptalaj továbbra is tartalmaz 50 mg/l hygromycint és 160 mg/l timentint. A Petri csészéket ebben a kísérleti szakaszban fényre helyeztük, de egy háztartási papírtörlő kendővel 1 rétegben letakartuk őket, hogy ne érje erős fény az anyagot.

Újabb két hét után a kallusz tenyészetet a növények regenerációját biztosító "R" (regeneration) táptalajra (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008) helyeztük, fényre (fotoperiódus: 20 h megvilágítás / 4 h sötét). Az "R" táptalaj is tartalmazza az 50 mg/l hygromycint és 160 mg/l timentint. A regenerálódó növényeket a kalluszról óvatosan leválasztottuk, és egyesével üvegcsőbe öntött, "R" táptalajra helyeztük, azonos hygromycin és timentin koncentráció mellett. A megfelelően erős gyökérzetű növényeket 2:1 arányú Compo Sana dísznövény-pálmaföld : homok földkeverékbe ültettük, és kontroll körülmények között, növénynevelő kamrában neveltük fel őket.

A bakteriális célra készített táptalajok összetétele:

Az alap **LB tápoldat** összetevői: 10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-élesztő kivonat, 10 g/l NaCl; pH=7,5 (NaOH-dal állítjuk be). Szilárd LB-t tartalmazó lemezek készítésekor az LB oldathoz 15 g/l Bacto-agar-t adunk.

**MG/L tápoldat** (Garfinkel és Nester 1980) összetevői: 5 g/l mannitol, 2,5 g/l Bacto-élesztő kivonat, 1 g/l L-glutaminsav, 250 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg/l NaCl, 100 mg/l MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 10 μl Biotin (0,1 mg/l stock). pH=7,2 (NaOH-dal állítjuk be). Szilárd MG/L-t tartalmazó lemezek készítésekor az MG/L oldathoz 15 g/l Bacto-agar-t adunk.

# 3.4. Az árpa transzformáció molekuláris bizonyítása

Az *OsMYB4* transzformáns árpák esetén a jelölt növények leveléből CTAB módszerrel (Doyle és Doyle, 1990) izoláltunk genomi DNS-t. A kópiaszámot Southern blot hibridizációval határoztuk meg. A genomi DNS-t *Eco*RV restrikciós enzimmel emésztettük, a fragmenteket gélelektroforézissel választottuk el 0,8% (w/v) agaróz gélen (overnight), majd blottoltuk Hybond (Amersham GE Healthcare) membránon. A membránt 65°C-on 6 órán keresztül hibridizációs oldatban előhibridizáltuk, majd egy éjszakán át hibridizáltattuk 65°C-on  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP-izotóppal jelölt *cor15a-OsMYB4* próbát tartalmazó hibridizációs oldatban (Sambrook et al. 2001). A próbát a transzformációhoz használt konstrukcióról amplifikáltuk Cor15promfor3 forward primer és MYB4rev3 reverse primerekkel (3.10. fejezet: 2. ábra), melyek egy 836 bp hosszúságú terméket eredményeznek. A membránt egyszer mostuk 2X SSC oldattal, mely 0,1% SDS-t tartalmazot (20 min), majd 1X SSC (0.1% SDS) oldattal, ezután kétszer mostuk 0,5X SSC (0.1% SDS) oldattal (30 min), 65°C-on. A membrán x-ray filmen (Kodak) lett exponálva -80°C-on.

A hygromycin rezisztens *TaCBF* transzformáns árpa-jelöltek leveléből DNeasy Plant Mini Kit-tel (Qiagen) izoláltunk genomi DNS-t. A transzgén jelenlétét PCR-rel igazoltuk, melynek során olyan primereket kombináltunk párokba, amelyek a promóter – transzgén, vagy a transzgén – terminátor szekvencia-szakaszon amplifikálnak különböző hosszúságú fragmenteket (3.10. fejezet: 5. táblázat). A T<sub>0</sub> nemzedékben a *TaCBF* transzformáns árpák kópiaszám-meghatározását, majd a T<sub>1</sub> nemzedékben annak meghatározását, hogy az egyes utódnövényekben a transzgén homozigóta, vagy heterozigóta állapotban öröklődött, az angliai IDNA Genetics Limited végezte el kvantitatív Real-Time PCR-rel, hygromycin génre specifikus primerekkel.

# 3.5. Fagytesztek

A *TaCBF* transzformáns árpavonalak fagytesztjeit a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézetben végeztük el, az Osztályunkon (volt Genetika, ma Növényi Molekuláris Biológia Osztály) alkalmazott metodika szerint. Ugyanakkor az *OsMYB4* transzformáns árpavonalak fagytesztjeit az olaszországi CRA Genomics Research Center (Fiorenzuola d'Arda) kutatóintézetben, az együttműködésben résztvevő kutatócsoport által alkalmazott metodika alapján végeztük el. Ez okozza az eltérő kísérleti módszerek alkalmazását.

# 3.5.1. Az OsMYB4 transzformáns árpavonalak fagytesztjei

Egy hét előnevelés (20/15°C nappali/éjszakai hőmérséklet, 10 h fény / 14 h sötét fotoperiódus, 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás, 70%-os relatív páratartalom) után a növényeket 3 hétig hideg-edzettük 4°C-on (8 h fény / 16 h sötét periódus). Az edzett növényeket -10°C, -11°C és -12°C-on fagyasztottuk Crosatti et al. (2008) szerint. Az egyes vonalakat random módon, 10 ismétlésben ültettük el minden egyes fagyasztási hőmérséklet esetén.

#### 3.5.2. A TaCBF transzformáns árpavonalak fagyasztása

A *TaCBF* transzformáns árpavonalak fagyasztását Vágújfalvi et al. (2003) szerint végeztük el. Az egyes vonalakat faládákba ültettünk el random módon, vonalanként 20 ismétlésben. A növényeket 3 hétig kontroll körülmények között (17/13°C nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 h megvilágítás, 240 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás, 75%-os relatív páratartalom) előneveltük, majd 3 hétig hidegedzettük 4°C-on (azonos megvilágítási paraméterek mellett). A hideg-edzés nélküli fagyteszt esetében a kontroll körülmények között nevelt növényeket vetettük alá fagytesztnek. Az edzett növényeket -11°C és -13°C-on fagyasztottuk, az edzés nélküli fagyteszt esetén -6°C-ot alkalmaztunk fagyasztási hőmérsékletként. A fagy után 2 hét regenerációs periódus következett, kontroll körülmények között.

#### 3.5.3. A fagytűrés indirekt meghatározása az F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> paraméter mérésével

A növények II. fotokémiai rendszerének (PSII) fagyás által okozott működésbeli változását a PSII maximális kvantumhatásfokának meghatározásával állapítottuk meg, mely a sötétadaptált növény levelén mért változó ( $F_v$ ) és maximális ( $F_m$ ) fluoreszcencia aránya ( $F_v/F_m$ ) (Butler és Kitajima 1975). A klorofill fluoreszcens indukciós paraméterek ( $F_v/F_m$  arány és  $F_0$  érték) mérését a leveken fluorométerrel (Pulse amplitude-modulated fluorometer, PAM 2000, Walz, Effeltrich) végeztük el Rizza et al. (2001) szerint. Az  $F_v/F_m$  arányt és az  $F_0$  értékeket 10 ismétlésben mértük meg az alábbi időpontokban: közvetlenül a fagyasztás előtt, közvetlenül a fagyasztás után, valamint 24 h, és 48 h-val a fagyasztást követően.

#### 3.5.4. Konduktancia vizsgálatok

A konduktancia vizsgálatokhoz közel egyforma méretű, kb. 3 cm hosszú levél-szegmenseket vágtunk le fagyasztás előtt, és 24 h-val a fagyasztás után. A levéldarabokat 15 ml-es Falcon-

csövekbe helyeztük, és 5 ml steril szűrt MQ vízben rázattuk (300 rpm, egy éjszakán át). A vezetőképesség növekedését (minta konduktanciája) konduktométer (Electrical conductivity meter, Mikro KKT) segítségével határoztuk meg. Ugyanannak a levéldarabnak a maximális ion-kiáramlását 20 perces forralást követően határoztuk meg (minta maximális konduktanciája). Megmértük magának a steril szűrt MQ víznek a konduktancia értékét is. A minták relatív konduktanciáját a maximális konduktancia százalékos arányában adtuk meg a következő formula alapján:

Minta konduktanciája – MQ víz konduktanciája

### 3.5.5. A fagytűrés direkt meghatározása

A növények fagykárosodását a regenerálódó-képességük alapján is meghatároztuk. A növények túlélésének mértékét a fagyasztás után egy, ill. két héttel értékeltük egy 0-tól (a fagyasztást nem élte túl) 5-ig (a fagyasztást károsodás nélkül túlélő) terjedő skálán. A túlélési százalékot adott vonalra a fagyasztást túlélt / fagytesztnek kitett növények arányában számoltuk ki.

#### 3.6. Alacsony-hőmérsékleti stresszkezelés

Az *OsMYB4* transzformáns árpavonalak esetén 5-5 növényt (T<sub>1</sub> nemzedék) neveltünk kontroll körülmények között (20/15°C nappal/éjszakai hőmérséklet, 10 h megvilágítás, 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás, 70% relatív páratartalom) valamennyi transzformáns vonalból, valamint a Golden Promise vad típusból (GP). 10 nap után a hőmérsékletet 4/2°C-ra (8/16 h fény/sötét periódus) csökkentettük. Az egyedi növények leveléből kontroll körülmények között, valamint egy napos hideg-kezelést követően is mintát vettünk az expressziós vizsgálatokhoz.

Szintén az *OsMYB4* transzformáns árpavonalak esetén elvégeztünk egy olyan kísérletet, amikor 10 napig 17/13°C-on (nappali/éjszakai hőmérséklet), illetve 25/25°C-on neveltünk (16 h megvilágítás, 240 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás, 75%-os relatív páratartalom) 5-5 növényt vonalanként (L1, L5, L8 és GP vonalak); majd a növényeket 3 napra 4/4°C-os hidegbe (azonos fényviszonyok és páratartalom mellett) helyeztük. Mindhárom hőmérsékleten a vonalankénti 5 növény mindegyikéről vettünk mintát expressziós vizsgálatokra, és ezeket vonalanként egy összesített mintaként kezeltük ("poolozott" minták).

A *TaCBF* transzformáns árpavonalak esetén a fagytesztek során vettünk mintákat expressziós vizsgálatokra kontroll körülmények között (17/13°C nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 h

megvilágítás, 240  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás, 75%-os relatív páratartalom), és a hideg-edzés során különböző időpontokban (1 nap, és 1 hét 4/4°C).

# 3.7. Komplex stressztűrési vigor teszt (CSVT)

A komplex stressztűrési vigor tesztet (CSVT: Complex stressing vigour test) Barla-Szabó és Dolinka (1988) leírása szerint végeztük el. A vonalakból 320-320 szemet áztattunk 200 ml desztillált vízben, 48 órán keresztül 20°C-on, majd további 48 órán keresztül 2°C-on (hipoxia + hideg). Ezután a szemeket 25-sével nedves szűrőpapírra fektettük egymás mellé, majd egy másik nedves szűrőpapírral letakartuk azokat. A szűrőpapírokat felgöngyöltük, a hengereket vertikálisan tasakokba helyeztük, és a szemeket csírázni hagytuk 20°C-on, 96 órán keresztül. Csírázás után 200 csíra hosszát mértük meg, és ez alapján a csírákat az alábbi kategóriákba osztályoztuk:

- I. Normál csírák (N): hajtást és gyökeret is képes fejleszteni. Ezen belül: Nagy vigorú: (Hv, High vigour): a csíra hosszabb, mint az 5 leghosszabb csíra átlaghosszúságának a negyede. Közepes vigorú: (Mv, Medium vigour): a csíra rövidebb, mint az 5 leghosszabb csíra átlaghosszúságának a negyede.
- II. Abnormális csírák (Abn): Kis vigorúak. Az abnormális csírák csak hajtást, vagy csak gyökeret képesek fejleszteni.
- III. Nem-csírázott, vagy rothadt szemek (Ng, non-germinated): nem képesek fejleszteni sem hajtást, sem gyökeret, nem életképesek.

A kísérlet során 40-40 szemből vettünk mintát expressziós vizsgálatokra (RNS izolálásra) és enzimaktivitás mérésekre. 48 h hipoxia ("H" minták), ill. az újabb 48 h komplex stressz-kezelés (hipoxia és hideg -cold- stressz együtt: "H+C" minták) végén RNS izoláláshoz a szemekből kipreparáltuk az embriókat, míg az enzimatikus mérésekhez teljes szemeket tettünk el mintaként. A 96 h csíráztatás után a hajtásból vettünk mintákat.

A kísérletet a csírahossz-mérésekkel (200-200 szem) három ismétlésben elvégeztük.

# 3.7.1. Enzimaktivitás meghatározás a CSVT során

Az alábbi enzimek aktivitás értékeit mértük meg három ismétlésben:

1. *Alfa-amiláz* (AMY; EC 3.2.1.1)

4 árpaszemet, ill. 1 g hajtás ill. gyökér mintát homogenizáltunk 4 ml 0,01 M foszfát pufferben (pH=6,7; 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF) 4°C-on. Az extraktumot lecentrifugáltuk (3500 g, 20 min), majd a felülúszóból az AMY aktivitást Phadebas®  $\alpha$ -amylase test alapján határoztuk meg.

# 2. Aszpartát aminotranszferáz (ASAT; EC 2.6.1.1)

4 árpaszemet, ill. 1 g hajtás ill. gyökér mintát homogenizáltunk 4 ml 0,01 M foszfát pufferben (pH =7,8; 120 mM KCl<sub>2</sub> 0,2 mM pyridoxal-foszfát, 1 mM PMSF) 4°C-on. Az extraktumot lecentrifugáltuk (3500 g, 20 min). A felülúszóból az ASAT aktivitást Cazzulo et al. (1977), valamint Sauvage et al. (1991) szerint az alábbi reakcióelegy segítségével határoztuk meg: 12,5 mM L-aszpartát, 1 mM  $\alpha$ -ketoglutarát, 0,2 mM NADH és 9,6 U malát dehidrogenáz 100 mM foszfát pufferben; pH=7,8.

## *3. Laktát dehidrogenáz* LDH; EC 4.1.1.27)

4 árpaszemet, ill. 1 g hajtás ill. gyökér mintát homogenizáltunk 4 ml 0,01 M foszfát pufferben (pH=9,2 ; 1mM PMSF) 4°C-on. Az extraktumot lecentrifugáltuk (3500 g, 20 min). A felülúszóból az LDH aktivitást a következő reakcióelegy segítségével határoztuk meg Hoffman et al. (1986) leírása alapján: 0,5 mM Na-laktát, 0,4 mM hidrazin, 0,5 mM glicin és 0,5 mM NAD<sup>+</sup>. A laktát  $\rightarrow$  piruvát átalakulást a NAD<sup>+</sup> fogyásán keresztül spektrofotometriás méréssel, 340 nm-en mértük.

# 3.8. Ozmotikus stressz kísérlet

Két *TaCBF14* és két *TaCBF15* transzformáns vonalat, a transzformáns kontroll vonalat és a vad típusú Golden Promise árpát vontuk be a vizsgálatba. A kísérletet kontrollált körülmények között (17/13°C, 16/8 h nappal/éjszaka megvilágítás, 220 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitás), növénynevelő kamrában (Conviron, Canada) végeztük el. A kicsírázott szemeket feles erősségű Hoagland-tápoldatra (Nagy és Galiba, 1995) helyeztük. A 3 hét előnevelés során a növények alatt a tápoldatot naponta feltöltöttük és hetente kétszer lecseréltük. Ezután az ozmotikus stressz-kezelést lépcsőzetesen emelkedő koncentrációban PEG 6000-t (Polietilén-glikol 6000, Sigma) tartalmazó tápoldattal idéztük elő Molnár et al. (2004) alapján, az alábbi módosítással: 18% PEG 3 napig, 21% PEG 4 napig, 24% PEG 3 napig, és végül 27% PEG 4 napig.

Az eltérő PEG-koncentrációjú tápoldatok cseréjekor (kivétel a 18%-os PEG-kezelés után) mintát vettünk a növények leveleiből, hogy meghatározzuk azok relatív víztartalmát (RWC, relative water content). Az RWC-méréseket Schonfeld et al. (1988) szerint végeztük el. Közvetlenül a levelek levágása után megmértük a levelek friss tömegét (FW, fresh weight). Ezután a levélszegmenseket Petri csészébe, MQ vízzel nedvesített szűrőpapírra fektettük. 24 h után a leveleket papírtörlő kendővel óvatosan megszárítottuk, és újra lemértük a tömegüket (TW, turgid weight). Ezután a leveleket szárítószekrényben 65°C-on szárítottuk 24 órán keresztül, és megmértük a levelek száraz tömegét (DW, dry weight). Az RWC értékeket az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

RWC(%) = (FW-DW) / (TW-DW) \*100.
## 3.9. Génexpressziós vizsgálatok

#### 3.9.1. RNS izolálás

A növényekből TRIzol reagenssel (TRIzol® Reagent, Invitrogen) izoláltunk össz-RNS-t a gyártó útmutatása szerint. Az esetleges genomi DNS szennyezések eltávolításához a mintákat DNase I enzimmel (Promega) emésztettük.

## 3.9.2. Reverz transzkripció

Az *OsMYB4* minták esetén 3 µg RNS-ből írtunk cDNS-t reverz transzkripcióval Superscript<sup>™</sup> II RT reagent kit-et (Invitrogen) használva.

A *TaCBF* transzformáns növényekből izolált, DNase I (Promega) enzimmel emésztett, 1 µg RNSmintákból M-MLV Reverse Transcriptase-zal (Promega) szintetizáltunk cDNS-t.

A cDNS-ek koncentrációját Qubit fluorométerrel határoztuk meg, Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA HS Assay Kit-tel (Invitrogen). Egyenlő mennyiségű (1,5 ng) cDNS-t használtunk minden egyes szemikvantitatív RT-PCR (reverz transzkripciót követő PCR) reakcióhoz.

## 3.9.3. Az OsMYB4 transzformáns árpavonalak expressziós vizsgálata

Az *OsMYB4* transzgén expressziójának mértékét szemikvantitatív RT-PCR-rel, transzgénspecifikus primerpárral ellenőriztük (myb4risofor1 forward és myb4risorev3 reverse primerpárral; 3.10. fejezet: 3. táblázat). Referenciaként az árpa aktin, illetve a gliceraldehide-3-foszfát dehidrogenáz génre (Burton et al. 2004) tervezett primerpárt használtuk (3.10. fejezet: 3. táblázat). A CSVT kísérlet mintáit a 3.10. fejezet 4. táblázatában szerepelő primerekkel vizsgáltuk.

#### 3.9.4. A TaCBF transzformáns árpavonalak expressziós vizsgálata

A *TaCBF* transzformáns árpavonalak esetén a transzgén expresszióját (3.10. fejezet: 6. táblázat) szemikvantitatív RT-PCR-rel ellenőriztük valamennyi független transzformáns vonalban. Referenciaként az árpa ciklofillin génre (Burton et al. 2004) tervezett primerpárt használtuk (3.10. fejezet: 7. táblázat).

A legnagyobb mértékű fagytoleranciát mutató *TaCBF14*, és *TaCBF15* transzgénikus vonalakban (24/1/1 és 9A/1/1 vonalak) meghatároztuk néhány célgén expressziós szintjét Real-Time RT-PCR-rel. A 25  $\mu$ l végtérfogatú reakcióelegy 10,0  $\mu$ l SYBR GreenER qPCR SuperMix-t és 0,4  $\mu$ l ROX-t (Invitrogen), 0,4-0,4  $\mu$ l forward és reverse primert, 1  $\mu$ l templát cDNS-t és 7,8  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O-t tartalmazott. A reakciókat ABI 7500 Fast Real-Time PCR készüléken (Applied Biosystems) futtattuk le normál üzemmódban. A reakció hőmérsékleti programja: 95°C 10 min; 95°C 15 sec 60°C 1 min \*40 ciklus; 95°C 15 min, 60°C 1 min, 95°C 30 sec, 60°C 15 min, 4°C ∞. Kettő, az általunk tanulmányozott CBF-ekkel közeli rokonságban lévő transzkripciós faktor, a búzából származó DREB2 és DREB3 szerepét tanulmányozta egy ausztrál kutatócsoport, hasonló transzformációs rendszerben. Szintén a tavaszi Golden Promise árpát transzformálták, és a transzgén hatását néhány LEA proteint kódoló gén expressziójára, valamint számos CBF gén expressziójára több nemzedéken keresztül tanulmányozták Real-Time PCR-rel. Ők tehát megfelelő primereket terveztek a vizsgálandó génekre, és tesztelték a génexpressziós kísérleteikhez alkalmas referenciagéneket. Eredményeiket a Plant Biotechnology Journal folyóiratban publikálták (Morran et al. 2011). Az általuk használt primerek szekvenciáit tőlük elkértük, és ezeket használtuk mi is a génexpressziós kísérleteinkben a TaCBF transzkripciós faktorok szerepének vizsgálata során (3.10. fejezet: 7. táblázat). Meghatároztuk a HvCOR14b, HvA22, HvCBF9 (Morran et al. 2011); HvDHN5, HvDHN8 [Morran et al. (2011) publikációjában használt primereket Campoli et al. (2009) közölte] gének expressziós szintjét az árpa ciklofillin génre [Morran et al. (2011) publikációjában használt primerpárt Burton et al. (2004) közölte] normalizálva  $\Delta\Delta C_1$  módszerrel. A dolgozatban megadtam a relatív Fold Change (FC) és a Log<sub>2</sub>FC értékeit Bookout és Mangelsdorf (2003) szerint kiszámítva.

## 3.10. Alkalmazott primerek listája

A pMDC99-cor15a-OsMYB4-NOS konstrukció, és az OsMYB4 transzformáns árpavonalak előállításához és vizsgálatához használt primerek listája a 2., 3. és 4. táblázatban található.

cor15a-OsMYB4-NOS					
klónozása	klónozása Fwd Cor15aOsmyb4Nos Fwd				
		CACCGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC			
	Rev	Cor15aOsmyb4Nos Rev			
		CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCT	2667 bp		
ellenőrzése	Fwd	PMDC99 Fwd			
		ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGA			
	Rev	PMDC99 Rev			
		GCGAAAGGGGGGATGTGCTGCAA	2661 bp		
Transzformáció	Fwd	Cor15promfor3			
bizonyítása,		ACATTTAGGCTTGCAACCTTGTCGG			
próba készítése	Rev	Myb4rev3			
Southern blot-hoz		TGGAGAAGTTGCCCCGCTTGAT	831 bp		

**2. táblázat:** A pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* konstrukció elkészítéséhez, és a transzformáns árpavonalak azonosításához használt primerek listája.

**3. táblázat:** Az alacsony-hőmérsékleti stressz során tanulmányozott gének expressziós vizsgálatához használt primerek listája. GB: génbanki azonosító az NCBI adatbázisában.

Az OsMYB4 transzformáns árpavonalak expressziós vizsgálata					
OsMYB4 transzgén	Fwd	Myb4riso for1			
expressziójának		TTACCGTTTCTTCGGTTAATTGATTTG			
ellenőrzése	Rev	Myb4riso rev3			
		CATCGCATCGCATGATTCGC	134 bp		
aktin	Fwd	Actina fwd			
GB: AY145451		TCGCATGTTCCTGGGTTTTT			
	Rev	Actina rev			
		TCCCCCACGCTAGCA	55 bp		
gliceraldehid-3-	Fwd	HvGAPDH fwd			
foszfát dehidrogenáz		GTGAGGCTGGTGCTGATTACG			
(GAPDH)	Rev	HvGAPDH rev			
GB: M36650.1		TGGTGCAGCTAGCATTTGAGAC	198 bp		

**4. táblázat:** A CSVT kísérletben tanulmányozott gének expressziós vizsgálatához használt primerek listája. GB: génbanki azonosító az NCBI adatbázisában.

alfa-amiláz 1	Fwd	AMY1 fwd	
(AMY1)		ACAAGGTCATGCAGGGCTAC	
GB: FN179389	Rev	AMY1 rev	
		CTGGTCCTTAAACCCCCAGT	95 bp
alfa-amiláz 2	Fwd	AMY2 fwd	
(AMY2)		CTCTGGGCAAGTCCTGTTTC	
GB: FN179390	Rev	AMY2 rev	
		CTTGCCCATCAGGAAGTTGT	82 bp
alfa-amiláz 3	Fwd	AMY3 fwd	
alfa-amiláz 3 ( <b>AMY3</b> )	Fwd	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC	
alfa-amiláz 3 ( <b>AMY3</b> ) GB: FN179391	Fwd Rev	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC AMY3 rev	
alfa-amiláz 3 ( <b>AMY3</b> ) GB: FN179391	Fwd Rev	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC AMY3 rev ATATCCCTGCATGACCCTGT	82 bp
alfa-amiláz 3 ( <b>AMY3</b> ) GB: FN179391 alfa-amiláz 4	Fwd Rev Fwd	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC AMY3 rev ATATCCCTGCATGACCCTGT AMY4 fwd	82 bp
alfa-amiláz 3 (AMY3) GB: FN179391 alfa-amiláz 4 (AMY4)	Fwd Rev Fwd	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC AMY3 rev ATATCCCTGCATGACCCTGT AMY4 fwd CCCAATATCATGGGACGAAC	82 bp
alfa-amiláz 3 (AMY3) GB: FN179391 alfa-amiláz 4 (AMY4) GB: FN179392	Fwd Rev Fwd Rev	AMY3 fwd GGTGACCTTTGTGGACAACC AMY3 rev ATATCCCTGCATGACCCTGT AMY4 fwd CCCAATATCATGGGACGAAC AMY4 rev	82 bp

A TaCBF transzformáns árpavonalak előállításához és vizsgálatához használt primerek listája az 5.,

6. és 7. táblázatban található.

**5. táblázat:** A *TaCBF* gének amplifikálásához, a konstrukciók ellenőrzéséhez, ill. a transzformáns jelölt növényekben a transzformáció igazolásához használt primerek listája. <sup>a</sup> az eredeti, nem rekombinálódó pEntry/D-Topo klónozó vektoron; <sup>b</sup> pEntry/D-Topo-*TaCBF14* klónozó konstrukción, <sup>c</sup> pEntry/D-Topo-*TaCBF15* klónozó konstrukción; <sup>d</sup> TopoCBF14 Rev primerrel; <sup>e</sup> TopoCBF15 Rev primerrel; <sup>f</sup> TopoCBF14 Fwd primerrel; <sup>g</sup> TopoCBF15 Fwd primerrel kombinálva amplifikál ekkora terméket.

TaCBF klónozása			termék
TaCBF14	Fwd	TopoCBF14 Fwd	
		CACCTAATTACCCCACAGTCG	
	Rev	TopoCBF14 Rev	
		TGCTTAGTCGAACAAGTAGCTC	689 bp
TaCBF15	Fwd	TopoCBF15 Fwd	
		CACCTAACCAACACTCCTCAG	
	Rev	TopoCBF15 Rev	
		AGCTGGCTGGAGTGTTTTAGTA	847 bp
A konstrukciók eller	nőrzése	, a transzformáció igazolása	
A klónozó	Fwd	M13 (-20) Fwd	
konstrukció		GTAAAACGACGGCCAG	324 bp <sup>a</sup>
univerzális	Rev	M13 Rev	1056 bp <sup>b</sup>
primere		CAGGAAACAGCTATGAC	1214 bp <sup>c</sup>
TaCBF14	Rev	In CBF14 rev	
transzgénben		ACGGCATCCTTGATCTCCTT	555 bp
TaCBF15	Rev	In CBF15 rev	
transzgénben		AGTCGGCGAAGTTGAGACAC	552 bp
Hygromycin	Fwd	Hyg Fwd	
foszfotranszferáz		ACTCACCGCGACGTCTGTC	
marker gén	Rev	Hyg Rev	
		GCGCGTCTGCTGCTCCAT	918 bp
Ubiquitin	Fwd	pAHUbi_promD Fwd	854 bp <sup>d</sup>
promóter		GCATATGCAGCAGCTATATG	1012 bp <sup>e</sup>
NOS	Rev	Nosterm 3' Rev	1073 bp <sup>f</sup>
terminátor		GATATCAGCTTGCATGCATGCCGG	1209 bp <sup>g</sup>

6. tábláz	at: A	TaCBF	transzformáns	árpavonalakban	a transzgén	expressziós	vizsgálatához
használt	prime	rek listáj	ja.				

TaCBF transzgén expressziójának ellenőrzése					
TaCBF14	Fwd	OE CBF14 Forward 1			
transzgén		AACCGATGACGAGAAGGAAA3			
	OE CBF14 Reverse 1				
		AACTCCGAGTAGCACGATCC3	121 bp		
TaCBF15	Fwd	OE CBF15 Forward 1			
transzgén		GTCGTCCATGGAAAATACCG3			
	Rev	OE CBF15 Reverse 1			
		ATGTGTCCAGGTCCATTTCC3	144 bp		

**7. táblázat:** A *TaCBF* transzformáns árpavonalak Real-Time RT-PCR-rel történő expressziós vizsgálatához használt primerek listája Morran et al. (2011) alapján. GB: génbanki azonosító az NCBI adatbázisában.

A TaCBF transzgénikus	növén	yek expressziós vizsgálata	termék
HvCyclophilin	Fwd	HvCycloph Fwd	
referenciagén		CCTGTCGTGTCGTCGGTCTAAA	
GB: AK253120.1	Rev	HvCycloph Rev	
		ACGCAGATCCAGCAGCCTAAAG	122 bp
HvCOR14b	Fwd	HvCOR14b Fwd	
GB: AJ512944		TTGAGGATGTGAGCAAATGAG	
	Rev	HvCOR14b Rev	
		TACATCGTCAATGACGAGACC	103 bp
HvA22	Fwd	HvA22 Fwd	
GB: FD523313		GCTCCTCACCCACCTCCACTCC	
	Rev	HvA22 Rev	
		CTGAGCTGCTCCCTGACGACCTT	288 bp
HvCBF9	Fwd	HvCBF9 Fwd	
GB: AY785877		AGCACTACTGTCAACATGTAG	
	Rev	HvCBF9 Rev	
		CCTTGATTTCGATTCATGGAG	162 bp
HvDHN5	Fwd	HvDHN5 Fwd	
GB: AF043096		CCACCAGCATACCACTGAGACC	
	Rev	HvDHN5 Rev	
		TAGTGCTGTCCAGGCAGCTTGT	207 bp
HvDHN8	Fwd	HvDHN8 Fwd	
GB: AF181458		TGCTCCAGCGCCAGTGCAC	
	Rev	HvDHN8 Rev	
		CGATCAAGCTCTGGGCTTGTG	178 bp

## 3.11. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 16.0 verziójú statisztikai programcsomag segítségével végeztük el. A kiugró értékeket kiszűrtük (α=0,05). Az alapsokaságok normalitását egytényezős Kolmogorov-Smirnov próbával, a szórások egyezését Levene's teszttel ellenőriztük.

A páronkénti összehasonlítást (transzformáns vonalak a vad típushoz, ill. a transzformáns kontrollhoz képest) az SPSS Analyze/ Compare means/ One-Way ANOVA/ Post Hoc Multiple Comparisons menüvel végeztük el, ezen belül a szórásnégyzetek egyezősége estén az LSD (Least significance difference) módszert használtuk, ill. ha a szórásnégyzetek nem egyeztek meg, akkor a Tamhane teszttel kerestünk szignifikáns különbséget a vonalak között. Két mérési időpont összehasonlítására a t-próbát alkalmaztuk, az adatokat az Analyze/ Compare means/ Independent–Samples T-Test menüvel értékeltük ki ( $\alpha$ =0,05).

## 4. EREDMÉNYEK

Munkánk célja az volt, hogy olyan gének szerepét bizonyítsuk, amelyek az Osztályunkon folyó korábbi kutatások, illetve egy együttműködő kutatócsoport előzetes eredményei alapján az abiotikus stressz-rezisztencia fokozásában játszanak fontos szerepet. E munka során a rizs *OsMYB4* génjének hatását, illetve két *TaCBF* gén, a *TaCBF14* és *TaCBF15* szerepét vizsgáltuk árpa transzformáns növényekben.

Mivel e gének elsősorban az alacsony-hőmérsékleti stressz-tolerancia kialakításában játszanak szerepet, ezért tavaszi gabonafélék transzformációját terveztük. Ennek eredményeképpen - az adott gének túltermeltetésével - vélhetően fokozni tudjuk a transzformáns növények stressztűrését, így direkt módon bizonyítani tudjuk a gének szerepét. A géneket ezért túltermelést biztosító vektorokba építettük. Az *OsMYB4* gén esetén stressz-indukálható, míg a *TaCBF* gének esetén folyamatosan erős expressziót biztosító promótert választottunk a gén működésének szabályozására.

Próbálkoztunk tavaszi búza (CY-45) génbelövéses transzformációjával, de ezek a kísérletek nem vezettek eredményre: nem tudtunk transzformáns növényt regenerálni. Ezeket a kísérleteket nem mutatom be

#### 4.1. Az OsMYB4 transzkripciós faktor szerepének bizonyítása transzformációval

### 4.1.1. A pMDC99-cor15a-OsMYB4-NOS konstrukció előállítása árpa transzformációjához

A rizs *OsMYB4* gént (génbanki azonosítószám: Y11414) a lúdfűből izolált *cor15a* stresszindukálható promóterrel összeépítve Dr. Immacolata Coraggio bocsátotta rendelkezésünkre egy expressziós kazettában (pUC-*cor15a-OsMYB4*). A *cor15a* promótert az *OsMYB4* génnel és *NOS* terminátorral együtt (2667 bp) az expressziós kazetta plazmid preparátumáról PCR-rel amplifikáltuk és illesztettük klónozó vektorba (5. ábra).



5. ábra: A cor15a-OsMYB4-NOS fragmentet tartalmazó klónozó konstrukció

Expressziós vektornak a pMDC99 Gateway alapú bináris vektort választottuk, amelyben a Hygromycin foszfotranszferáz marker-gén biztosítja a leendő transzformáns növények szelekcióját, míg a bakteriális szelekciót a kanamicin rezisztencia gén teszi lehetővé. A *cor15a-OsMYB4-NOS* fragmentet a klónozó (donor) vektorból a pMDC99 fogadó vektorba rekombináltattuk. Miután szekvenálással is igazoltuk, hogy a konstrukció (6. ábra) minden eleme beépült a megfelelő orientációban, a vektort AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe transzformáltuk.



6. ábra: Az árpa transzformációhoz használt *pMDC99-cor15a-OsMYB4-NOS* konstrukció

## 4.1.2. Az OsMYB4 transzgén beépülésének igazolása

Az előállított konstrukcióval az árpa transzformációját *Agrobacterium* közvetítésével végeztük el. A transzgénikus jelölt növények leveléből genomi DNS-t izoláltunk, és PCR technikával vizsgáltuk a *cor15a* promóter és az *OsMYB4* szekvenciák meglétét (7. ábra). A 9 jelölt közül 8 regenerálódott növényben mutattuk ki a transzgén jelenlétét. A vonalakat a regenerálódott növények alapján L1-L9-ig jelöltük, az L6 vonal bizonyult nem transzformánsnak. A növények egy enyhén lassabb ütemű növekedést mutattak a vad típushoz képest, de a transzgén működése nem befolyásolta jelentős mértékben a fejlődésüket, és mind a 8 transzformáns vonal fertilisnek is bizonyult.



**7. ábra:** Az *OsMYB4* transzgén jelenlétének bizonyítása genomi PCR módszerrel a transzformáns jelölt árpavonalakban.

A transzgén kópiaszámát Southern blot hibridizációval határoztuk meg. A *cor15a-OsMYB4* szekvenciából egy 839 bp hosszúságú próbát készítettünk. A hibridizáció eredményeként arra következtettünk, hogy hat vonalban a transzgén 1 kópiában épült be, míg az L5 és L9 vonalak kétkópiásak (8. ábra).



8. ábra: A transzgén kópiaszámát Southern blot hibridizációval határoztuk meg az *OsMYB4* transzformáns vonalakban. A fekete háromszögek (▶) a transzgén hibridizációs jelét mutatják.

Az előállított OsMYB4 transzformáns árpavonalakban a transzgént egy hideg-, és ABA-indukálható promóter, az Arabidopsis thaliana-ból izolált cor15a (Baker et al. 1994) vezérli. Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a beépült transzgén működik-e, azaz a gén expresszál, a növényeket a promóter bekapcsolását indukáló környezetbe kellett tennünk. Ezért vonalanként 5-5 növényt (T<sub>1</sub> nemzedék), valamint a vad típusú Golden Promise (GP) árpából két növényt kontroll környezetből (20°C/15°C) hidegbe (4°C/2°C) tettünk át. A növények leveleiből kontroll körülmények között, valamint egy napos hideg-kezelést követően mintát vettünk, RNS-t izoláltunk, reverz transzkripcióval cDNS-t írtunk, és a mintákat szemikvantitatív PCR-rel vizsgáltuk (9. ábra). Az eredményeink igazolták, hogy a legtöbb transzformáns növény esetén az OsMYB4 mRNS-e túltermelődött a hidegkezelést követően, noha némelyik növényben már kontroll körülmények között is kimutattunk egy bizonyos mértékű expressziós szintet (pl. L2 vonal N1 növény), ill. néhány növényben nem volt jelentős különbség a transzgén expressziós szintjében a kontroll és hidegkezelt mintákban (pl. az L5 vonalban). Egyes növényekben (pl. L1 vonal N4 növény, vagy L2 vonal N3 növény) a transzgén expressziója nem volt kimutatható, valószínűleg az utódnemzedékben (T<sub>1</sub>) történő hasadás miatt ezek a növények nem voltak transzformánsok. A rendszerünk hatékonyságát, specifikusságát igazolja, hogy nem volt amplifikált termék a vad típusból izolált mintákban még 40 PCR ciklus után sem, míg a transzgénikus növények esetében 32 ciklus detektálható terméket eredményezett.



**9. ábra:** Az *OsMYB4* transzgén expressziója a transzformáns árpavonalakban (L1-L9): 5-5 növény (N1-N5) kontroll (K) és hideg-kezelt (H) mintáinak analízise. Negatív kontrollként a vad típusú Golden Promise (GP) árpát és vak (DNS-t nem tartalmazó) mintát alkalmaztunk, míg a transzformációhoz használt plazmid (Pl) szerepelt pozitív kontrollként a kísérletben.

Az *cor15a* promóterrel vezérelt *OsMYB4* transzgén hőmérséklet-függő indukálhatóságát szemikvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk három transzformáns vonalban (L1, L5, L8) és a vad típusú Golden Promise (GP) árpában (10. ábra). Vonalanként 5 növényről gyűjtöttünk egy összesített mintát ("poolozott" minta) 10 napos 17/13°C-os és 25/25°C-os növénynevelés után, valamint a 17/13°C-os előnevelést követő 3 napig tartó 4/4°C-os hidegkezelés végén. 17/13°C-on a transzgén expressziójának szintje megközelítette a hidegkezelt mintákban kimutatható *OsMYB4* expresszió mértékét. A transzgénről íródó mRNS kimutatható mennyiségű volt 25°C-on is, legnagyobb mértékű *OsMYB4* expressziót a kétkópiás L5 vonalban tapasztaltunk, de mindhárom transzgénikus vonalra elmondható, hogy a *cor15a* promóterrel szabályozott *OsMYB4* transzgén expressziós szintje kisebb volt, mint 17/13°C-on.



**10. ábra:** A *cor15a* promóterrel vezérelt *OsMYB4* transzgén hőmérsékletfüggő expressziója az L1, L5, L8 transzformáns vonalakban, és a vad típusú Golden Promise (GP) árpában.

## 4.1.3. Az OsMYB4 transzgénikus vonalak fenotipizálása

## 4.1.3.1. Fagyteszt

Miután igazoltuk, hogy az előállított vonalakban a transzgén beépült, és expresszálódik is, a transzformáns vonalak fenotipizálásával folytattuk a munkát. A vonalakat fagytesztnek tettük ki: arra voltunk kíváncsiak, hogy a növények fagyállósága javul-e a transzgén működésének hatására.

Előkísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy maga a vad típusú Golden Promise tavaszi árpa milyen mértékben fagyálló. Megállapítottuk, hogy 1 hét előnevelést és 3 hét hidegedzési periódust alkalmazva a Golden Promise genotípus a fagyteszt-rendszerünkben -10°C-on fagy meg, ez a hőmérséklet tehát a vad típus (GP) számára már 100%-ban letális.

Mivel az előkísérlet azt igazolta, hogy a GP -10°C-on kifagy, ezért az első kísérletünkben -12°C-os fagyasztási hőmérsékleten teszteltük mind a 8 transzformáns árpavonalat (T<sub>2</sub> nemzedék). A vonalak fagyállóságát a GP fagyállóságához viszonyítottuk. A fagy károsító hatását a klorofill fluoreszcens indukciós paraméterek ( $F_v/F_m$  arány) mérésével jellemeztük. A hideg-edzés végén (de még a fagyasztás előtt) valamennyi növényen, így a GP levelein mért  $F_v/F_m$  értékek is 0,73-0,74 között voltak, eszerint a genetikai transzformáció nem okozott károsodást a PSII rendszer működésében. A közvetlenül a fagyasztás után mért  $F_v/F_m$  értékek nem változtak az edzés végén

mért értékekhez képest, ekkor még nem volt kimutatható a PSII rendszer sérülése. Azonban 24 órával a fagyasztást követően szignifikáns különbséget mutattunk ki a vonalak között. A GP levelén mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikáns mértékben csökkentek a fagy hatására. Az  $F_v/F_m$  érték 0,731 volt a hideg-edzés végén, míg a fagyasztás után 24 órával ez az érték 0,414-ra csökkent. Néhány transzformáns vonal (pl. L2, L3) a GP-hoz hasonló mértékben károsodott, ezzel szemben voltak olyan vonalak (L1, L5, L8 és L9), melyek szignifikánsan jobb  $F_v/F_m$  értékeket mutattak, mint a GP (8. táblázat). Habár a transzformáns vonalak PSII rendszere kevésbé károsodott, mint a vad típusé, és ez arra enged következtetni, hogy ezeknek a transzgénikus vonalaknak megnőtt a fagyállósága, meg kell azonban azt is jegyeznünk, hogy a fagytesztet követő regenerációs periódus során a vonalak között nem találtunk olyan növényt, ami túlélte volna a -12°C-os tesztet.

	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>					
Vonalak	edzés végén	közvetlenül fagyasztás után	fagyasztás után 24h-val			
L1	0,734	0,721	0,570**			
L2	0,736	0,733	0,478			
L3	0,747	0,739	0,511			
L4	0,735	0,736	0,635***			
L5	0,743	0,748*	0,701***			
L7	0,738	0,733	0,538*			
L8	0,724**	0,730	0,694***			
L9	0,733	0,733	0,630***			
GP	0,746	0,731	0,414			

**8. táblázat:** T<sub>2</sub> nemzedék -12°C-on történő fagyasztásakor a mért  $F_v/F_m$  értékek. A vad típusú (GP) Golden Promise-tól való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05; 0,01; 0,001.

Az első kísérlet eredménye alapján szelektált L1 (az első fagytesztben mért  $F_v/F_m$  átlagértéke P  $\leq$  0,01 szinten szignifikánsan nagyobb, mint a GP-é), L5, L8 és L9 (az első fagytesztben mért  $F_v/F_m$  átlagértékeik P  $\leq$  0,001 szinten szignifikánsan nagyobbak, mint a GP-é) transzformáns vonalakkal megismételtük a fagytesztet. Habár az L4 vonalon mért  $F_v/F_m$  átlagértéke is P  $\leq$  0,001 szinten szignifikánsan nagyobb volt, mint a GP-é, ezt a vonalat már nem választottuk ki a többi kísérlethez, mert elegendőnek ítéltük a másik három hasonló toleranciát mutató szelektált vonallal (L5, L8 és L9) dolgozni. Melléjük egy közepesen ellenálló vonalat (L1) választottunk inkább. Az ismétlő kísérleteket már T<sub>3</sub> generáción végeztük el, a növények fagytűrését hideg-edzés után -11°C, ill. -12°C-on teszteltük. 24 órával a fagyasztást követően mind a négy transzformáns vonal  $F_v/F_m$  értéke szignifikánsan nagyobb volt a GP  $F_v/F_m$  értékeinél (a kéttényezős variancia-analízis alapján), megerősítve, hogy ezek a vonalak toleránsabbak a fagy károsító hatásával szemben, mint a vad típus (9. táblázat).

**9. táblázat:** A -11°C és -12°C-on tesztelt vonalak  $F_v/F_m$  átlagértékei, és a kéttényezős varianciaanalízis alapján számolt szignifikancia szintek (SL). T: hőmérséklet; A vad típusú Golden Promisetól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05; 0,01; 0,001.

	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>									
Vonalak	е	dzés vég	én	közvetlenül a fagyasztás után			fagyasztás után 24h-val			
	-11℃	-12℃	átlag	-11℃	-12℃	átlag	-11℃	-12℃	átlag	
L1	0,776	0,788	0,782	0,738	0,723	0,731	0,546***	0,365	0,456**	
L5	0,774	0,788	0,781	0,762***	0,752***	0,757***	0,617***	0,474**	0,546***	
L8	0,778	0,785	0,782	0,762***	0,736*	0,749***	0,613***	0,403***	0,508***	
L9	0,784*	0,792	0,788*	0,753**	0,732	0,743*	0,590***	0,417*	0,504***	
GP	0,775	0,788	0,782	0,732	0,717	0,725	0,317	0,294	0,306	
SL (vonal)	0,024			0,010			0,010			
SL (T)	0,001			0,002		0,010				
SL (vonal x T)		0,544 (NS	)	0,341 (NS)			0,022			

## 4.1.3.2. Komplex stressztűrési vigor teszt (CSVT)

Az OsMYB4 transzkripciós faktor lehetséges hatását a transzformáns csírázó szemek vigorára komplex stressztűrési vigor teszt (CSVT: Complex Stressing Vigour Test) során tanulmányoztuk. A tesztben egy hipoxiás, majd egy azt követő kombinált (hideg + hipoxia) stressz-kezelést alkalmaztunk. A kísérletet Barla-Szabó és Dolinka (1988) leírása szerint végeztük el. Három olyan *OsMYB4* transzgénikus vonalat (T<sub>3</sub> nemzedék, L1, L5 és L8 vonal) vizsgáltunk, melyekről a fagytesztek alapján igazoltuk, hogy a transzgén hatására fokozott az alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciájuk. E vonalak, valamint a vad típusú GP csírázóképességét határoztuk meg, és soroltuk kategóriákba az "Anyag és Módszer" részben (3.7. fejezet) megfogalmazottak szerint. A csírahossz-mérések alapján kapott adatokat a 10. táblázatban foglaltuk össze.

**10. táblázat:** Az *OsMYB4* transzformáns árpavonalakkal végzett CSVT eredményének összefoglalása. N: normál csíra, Hv (High vigour): nagy vigorú, Mv (Medium vigour): közepes vigorú, Abn: Abnormális csíra, Ng (Non-germinated): nem-csírázott, vagy rothadt szemek. A definíciók az Anyag és módszer 3.7. fejezetében találhatók. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0,05; 0,01; 0,001$ .

	magok		Ν				kontroll
Vonal	száma a CSVT-ben	Hv [%]	csírahossz [mm]	Mv [%]	Abn [%]	Ng [%]	csírázás
L1	199	91,44***	32,94***	3,00	4,5	1*	100%
L5	199	89,48***	39,87***	3,00	3,5*	4	100%
L8	197	77,80	34,02***	7,57	2,0**	12,5	80%
GP	200	76,00	19,46	5,00	9,0	10	95%

Mindhárom transzgénikus vonal átlagos csírahossza szignifikáns mértékben meghaladta a GP csírahosszát (10. táblázat, 11. ábra), és ezekben a vonalakban nagyobb arányban találtunk nagy

vigorral rendelkező csírákat, mint a vad típusban. Habár az L8 vonal kontroll (azaz stressz nélküli körülmények között meghatározott) csírázóképessége (80%) gyengébbnek bizonyult, mint a GP-é (95%), ennek a vonalnak is, ahogy a másik két tanulmányozott transzgénikus vonalnak, mindkét vigor paramétere (Hv és Mv) jobb volt, mint a GP-é (10. táblázat). Az abnormális csírák (definícó az Anyag és módszer 3.7. fejezetében) aránya a transzformáns vonalakban jelentősen kisebb volt, mint a vad típusban. Összességében elmondható, hogy szignifikánsan jobb vigorral rendelkeztek az *OsMYB4* transzgénikus árpavonalak. Ezeket az eredményeinket két ismétlő kísérlettel is megerősítettük.



**11. ábra:** Az egyes vonalak csírázása a CSVT végén. (GP: Golden Promise vad típus; L1, L5, L8: *OsMYB4* transzformáns árpavonalak)

Mivel az *OsMYB4* transzgénikus vonalak nagyobb mértékű stressz-toleranciát mutattak a hipoxiával, illetve a hipoxia és hideg együttes alkalmazásával szemben, ezért néhány, a hipoxia/anoxia stressz elleni védekezésben jelentős szerepet játszó enzim aktivitását (2.1. fejezet. 1. ábra) is nyomon követtük a stressz-kezelés során. Meghatároztuk az enzimaktivitás változásokat a

hipoxia ("H"), a hipoxia és hideg ("H+C") együttes alkalmazása alatt a szemekben, valamint az azt követő csírázási periódus után a hajtásokban. Ennek során mértük az alfa-amiláz enzim (AMY, EC 3.2.1.1) aktivitását, de nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes vonalak között a "H+C" mintákban. Azonban mindhárom transzformáns vonalban szignifikánsan nagyobb AMY-aktivitást határoztunk meg a "H" minták esetén, valamint a hajtás minták közül az L1 és L8 vonalakban (12.A ábra).



**12. ábra:** A CSVT során mért enzimaktivitások (A: AMY, B: LDH; C: ASAT) ábrázolása a H: hipoxia; a H+C: hipoxia és hideg-stressz, valamint a hajtásokból izolált mintákban. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0,05$ ; 0,01; 0,001.

A laktát dehidrogenáz (LDH, EC 4.1.1.27) enzim aktivitása hipoxia esetén az L5 vonalban emelkedett meg, míg a "H+C" minták közül az L1 és L5 vonalakban mértünk szignifikánsan nagyobb enzimaktivitást, mint a vad típusú GP-ban. A hajtásokból származó mintákban az L1 és L5 vonalak esetén detektáltunk szignifikánsan nagyobb enzimaktivitást (12.B ábra).

Az aszpartát aminotranszferáz enzim (ASAT, EC 2.6.1.1) aktivitása szignifikánsan nagyobb volt mindhárom transzformáns vonal csírázó szemeiben hipoxia alatt ("H"). A "H+C" minták esetében az L1 és L8 vonalban volt szignifikánsan magasabb az ASAT aktivitás, mint a GP-ban. A hajtásokban is mindhárom vonalban magasabb aktivitást tapasztaltunk, azonban a GP-tól való eltérés csak az L8 vonal esetében bizonyult szignifikánsnak (12.C ábra).

Génexpressziós szinten, szemikvantitatív RT-PCR-rel is vizsgáltuk az alfa-amiláz működését. Az AMY1 (GB: FN179389) gén expressziójában nem volt különbség (az adatot nem mutatom be), azonban az AMY2 (GB: FN179390) és az AMY3 gén (GB: FN179391) esetén az L1 és L8 vonalak hajtásból izolált mintáiban nagymértékű expressziót mutattunk ki. Nem találtunk különbséget az egyes vonalak között az LDH gének expressziós vizsgálata során, továbbá számos más, az anaerob stressz-válaszban szerepet játszó gén (úgy, mint alkohol dehidrogenáz, aldehid dehidrogenáz, stb.) esetén az OsMYB4 transzformáns vonalak és a vad típusú Golden Promise árpa között (az adatokat nem mutatom be; a vizsgálatokhoz használt primerek listája: Mellékletek, M2.1. táblázat).



**13. ábra:** Az *AMY2*, az *AMY3* gének és az *OsMYB4* transzgén expressziója a hajtás mintákban. Szemikvantitatív RT-PCR, referenciagénként aktint alkalmaztunk.

# 4.2. A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok szerepének bizonyítása transzformációval

# 4.2.1. A pBract214-*TaCBF14* és pBract214-*TaCBF15* konstrukciók előállítása árpa transzformációjához

A búza *CBF14* és *CBF15* géneket hideg-kezelt Cheyenne őszi búza genotípusból izoláltuk és tettük klónozó vektorokba (14. és 15. ábrák). A két órán keresztül 2°C-on hideg-stresszelt növényekből izolált mRNS-ről átírt cDNS-eket építettük be a vektorokba.



14. ábra: A TaCBF14 gént tartalmazó klónozó konstrukció



15. ábra: A TaCBF15 gént tartalmazó klónozó konstrukció

Expressziós vektornak a pBract214 Gateway alapú bináris vektort használtuk, amelyben a kukorica ubiquitin promóter + intron (Ubi1) biztosítja a transzgén konstitutív erős expresszióját (Christensen et al. 1992). A hygromycin foszfotranszferáz marker-gén teszi lehetővé a leendő transzformáns növények szelekcióját, míg a bakteriális szelekciót a kanamicin rezisztencia gén biztosítja (16. és 17. ábrák).



16. ábra: A pBract214-TaCBF14 konstrukció vektorrajza



17. ábra: A pBract214-TaCBF15 konstrukció vektorrajza

A kísérletek során előállítottunk transzformáns kontroll növényeket is, melyeket a pBract202 vektorral transzformáltunk. Ez a konstrukció csak a hygromycin szelekciót biztosító gént tartalmazza (18. ábra). E vonalak tették lehetővé, hogy magának a transzformációnak, illetve magának a (*CBF* transzgén nélküli) vektornak a hatását is vizsgálhassuk.



**18. ábra:** A pBract 202 vektor, mellyel transzformáns kontroll növényeket állítottunk elő; csak a hygromycin szelekciót biztosító gént tartalmazza.

## 4.2.2. Árpa transzformációja a pBract214-*TaCBF14* és a pBract214-*TaCBF15* konstrukciókkal

Munkánk során az elkészített konstrukciókkal éretlen árpa embriókat transzformáltunk. A pBract202 konstrukcióval történő *Agrobacterium*-fertőzés után 60 embriót, míg a pBract214-*TaCBF4*, ill. -*TaCBF15* konstrukcióval 137 és 146 embriót kalluszosítottunk el. A szövettenyésztés során folyamatosan ügyeltünk arra, hogy az egy embrióról fejlődött kalluszcsomó együtt maradjon, és két külön embrióról kialakult kalluszcsomó ne keveredjen. A kallusz növekedése során letörhetnek róla darabok, de ezeket a töredezett kalluszdarabokat egy csomóként kezeltük, együtt passzáltuk. A Petri csészék alján filctol segítségével elhatároltuk egymástól a külön embrióból kialakult kalluszcsomókat (19. ábra). Munkánk során csak az eltérő embrióból indukálódott kallusztelepről származó transzformáns növényeket tekintettük független transzformáns vonalnak.



**19. ábra:** A transzformált éretlen embriók szövettenyésztése. A Petri csésze alján filctollal határoltuk el egymástól a különböző embriókból kialakult kallusz-csomókat.

Az elkalluszosodott anyagot "T" (transition) táptalajra (Bartlett et al. 2008, Harwood et al. 2008) helyeztük át. A kalluszokat ebben a periódusban szoktattuk fokozatosan a megvilágításhoz. Az első zöld, differenciálódó levélszövetek már ekkor megjelentek. Az átmeneti periódus után a szövettenyészetet teljes fényre helyeztük, és növényregenerációt biztosító (hygromycin- és timentin-tartalmú, hormonmentes) táptalajon neveltük tovább. A kifejlődő kis növényeket - összesen 90 darabot - egyenként növénynevelő csövekbe helyeztük. Egyetlen egy növény (2/A/1/1, transzformáns kontroll jelölt) az üvegcsőben kifehéredett és elpusztult, vélhetően valójában nem volt rezisztens, vagyis nem volt transzformáns A 11. táblázatban foglaltuk össze a három konstrukcióval elvégzett transzformációs munka eredményeit. A transzformációk hatékonyságát a következő képlet alapján számoltuk ki:

független transzformáns vonalak száma / az embriók száma a kokultivációt követően\*100.

11.	táblázat:	А	pBRACT	konstrukciókkal	előállított	transzformáns	árpa	anyag	összefoglaló
tábl	ázata								

A transzformációhoz használt konstrukció	Az embriók száma a kokultivációt követően	Regenerálódott növények száma	Független transzformáns vonalak száma	Transzformációs hatékonyság [%]
pBract202	60	14	2	3,33
pBract214-TaCBF14	137	28	10	7,29
pBract214-TaCBF15	146	47	18	12,32

## 4.2.3. A transzformáns kontroll és a *TaCBF* transzgénikus jelölt növények molekuláris vizsgálata

A *TaCBF* génekkel végzett transzformációs kísérlet során összesen 89 növényt regeneráltunk. Ez összesen 30 független transzformáns vonalat jelent (11. táblázat). Valamennyi transzformáns jelölt növény leveléből mintát vettünk, genomi DNS-t izoláltunk és PCR módszerrel ellenőriztük a transzgén integrációját. A két független transzformáns kontroll (pBract202) vonal esetén a hygromycin szelekciós markergén beépülését bizonyítottuk. A *TaCBF14* génnel transzformált 10, és a *TaCBF15* génnel transzformált 18 független vonal növényeiben is kimutattuk a hygromycin rezisztenciát biztosító gént, igazoltuk továbbá az ubiquitin promóter, az adott *TaCBF* gén és a NOS terminátor jelenlétét is (20. és 21. ábrák).



**20. ábra:** A *TaCBF14* transzformáns független árpavonalak ellenőrzése különböző primerpárokkal, melyek a hygromycin szelekciós markergénre, az ubiquitin promóterre, a *TaCBF14* transzgénre, és a *NOS* terminátorra lettek tervezve. A transzformáns kontroll vonalak (2A/2/4 és 2B/1/5) csak a szelekciós markergénre PCR-pozitívak, a vad típusú Golden Promise (GP) mindegyik primerpárra PCR-negatív. Az ábra bal oldalán az alkalmazott primerek nevét és zárójelben a PCR termékek méretét tüntettük fel.



**21. ábra:** A *TaCBF15* transzformáns árpavonalak ellenőrzése különböző primerpárokkal, melyek a hygromycin szelekciós markergénre, az ubiquitin promóterre, a *TaCBF15* transzgénre, és a *NOS* terminátorra lettek tervezve. A transzformáns kontroll vonalak (2A/2/4 és 2B/1/5) csak a szelekciós markergénre PCR-pozitívak, a vad típusú Golden Promise (GP) mindegyik primerpárra PCR-negatív. Az ábra bal oldalán az alkalmazott primerek nevét és zárójelben a PCR termékek méretét tüntettük fel.

A beépült transzgén kópiaszámának meghatározását az angliai IDNA Genetics Ltd. végezte el Real-Time PCR-rel. Minden független vonal egy-egy növényéből ( $T_0$  nemzedék) genomi DNS-t izoláltunk, és kihígítottuk azokat a leírtaknak megfelelően. Az eredményeket a hygromycin markergénre vonatkoztatva kaptuk meg. A legtöbb transzformáns vonalban a transzgén egy kópiában épült be (12.táblázat).

<i>TaCBF14</i> vonalak	Kópiaszám	<i>TaCBF15</i> vonalak	Kópiaszám
4/A/1/1	1	9/A/1/1	1
456/1/1	1	9/A/2/1	4
5/1/1	3	9/B/1/2	1
6/A/1/2	1	12/A/1/3	1
6/B/1/1	1	12/B/1/1	1
21/B/1/1	2	12/B/2/1	1
23/A/1/2	1	12/C/1/1	3
23/A/2/1	1	12-18/1/1	1
23/B/1/1	2	12-18/2/1	1
24/1/1	1	12-18/3/2	1
		12-18/4/1	3
		17/1/1	1

17/2/1

17/3/1

17/4/1

18/1/1

19/1/2

19/2/1

1

4

1

2

1

1

12. táblázat: A TaCBF transzformáns független árpavonalakban a transzgén kópiaszáma

A pBract214-*TaCBF14*, ill. -*TaCBF15* konstrukciókkal transzformált anyagban a transzgént az erős konstitutív expressziót biztosító ubiquitin promóter szabályozza. A transzgén működését, expresszióját ezért már kontroll körülmények között nevelt növényekben is ellenőrizhettük a T<sub>1</sub> nemzedékben, ugyanis konstitutív expressziót feltételezve nincs szükség az egyébként hidegindukálható *TaCBF* gének alacsony-hőmérsékleti indukciójára. A génexpressziót RT-PCR-rel vizsgáltuk. Mivel a *CBF* gének egy géncsaládhoz tartoznak, és ezen belül az egyes *CBF*-ek szekvenciája nagyon hasonló, elképzelhető, hogy az adott búza *TaCBF* transzgénre tervezett primer képes kötődni a árpa saját genomja által kódolt valamelyik *HvCBF* gén expressziós termékéhez. Ezért ellenőriztük, hogy az adott *TaCBF* transzgénre tervezett primerpár kellően specifikus-e. A transzgénikus vonalak expressziós mintázatát az 22. és 23. ábrák mutatják.



**22. ábra:** A transzgén expressziójának ellenőrzése a *TaCBF14* transzformáns független vonalakban. A transzgén expressziójának vizsgálatára tervezett primerek nem amplifikálnak terméket a vad típusú Golden Promise (GP) árpában és a transzformáns kontroll növényekben (2A/2/4 és 2B/1/5).



**23. ábra:** A transzgén expressziójának ellenőrzése a *TaCBF15* transzformáns független vonalakban. A transzgén expressziójának vizsgálatára tervezett primerek nem amplifikálnak terméket a vad típusú Golden Promise (GP) árpában és a transzformáns kontroll növényekben (2A/2/4 és 2B/1/5).

A  $T_1$  nemzedékben annak megállapítása miatt, hogy az adott növény a transzgént homo- vagy heterozigóta formában tartalmazza-e, minden független vonalból 5-5 növényből izoláltunk Real-Time PCR által megkívánt minőségű genomi DNS-t. A mintákat az IDNA Genetics céghez küldtük el analízisre. A tesztet a kópiaszám-meghatározáshoz hasonlóan Real-Time PCR-rel végezték el. Az eredmények alapján kiválogattuk a homozigóta növényeket, és ezeket szaporítottuk fel a későbbi fenotipizálási és expressziós vizsgálatokhoz.

### 4.2.4. A TaCBF transzformáns vonalak fagytesztje

Két különböző típusú fagytesztet alkalmaztunk. Az első kísérleteinkben ( $T_1$  és  $T_2$  nemzedék) a természetben végbemenő folyamatoknak megfelelően a fagyasztást megelőzte egy hideg-edzési periódus. A  $T_2$  nemzedékben edzési periódus nélküli kísérleteket is végeztünk. A fagy károsító hatását a klorofill fluoreszcens indukciós paraméterek ( $F_v/F_m$  arány) analízisével jellemeztük, méréseinket kiegészítettük konduktancia vizsgálatokkal, valamint megállapítottuk a növények regenerálódó-képességének mértékét, és azok túlélési százalékait is.

#### 4.2.4.1. A TaCBF transzformáns vonalak fagytűrésének tesztelése hideg-edzési periódussal

Egy előzetes kísérletben megállapítottuk, hogy a vad típusú Golden Promise (GP) tavaszi árpa 3 hét hidegedzést (4°C nappal/éjszaka) követő -10°C-os fagyasztás után 100%-ban kipusztul. A következő kísérletünkben azt a fagyasztási hőmérsékletét kerestük, ahol különbség mutatkozik a *TaCBF* transzformáns vonalak és a vad típus fagyállóságában. Random módon kiválasztott két *TaCBF14* és két *TaCBF15* transzformáns vonalat (T<sub>1</sub> nemzedék), a GP-t és egy transzformáns kontroll vonalat (2B/1/5) teszteltük -11°C és -13°C-on. A kísérlet alatt mértük a klorofill fluoreszcens indukciós paramétereket (13. táblázat).

A fagyasztás előtti két mintavételi időpontban (az edzés előtt és az edzés után) az egyes vonalakat egymással összehasonlítva megállapítottuk, hogy a transzformáns vonalak és a vad típus, ill. a transzformáns kontroll növények  $F_v/F_m$  értékei között nem volt szignifikáns különbség, eszerint a genetikai transzformáció nem okozott károsodást a PSII rendszer működésében. Ha a két, fagyasztás előtti mintavételi időpontot (edzés előtt vs. edzés után) hasonlítjuk össze t-próbával, akkor elmondhatjuk, hogy az edzés végén mért  $F_v/F_m$  értékek bár alacsonyabbak az edzést megelőző értékekhez képest, és statisztikailag a két időpont között a különbség szignifikáns (kivéve a 4-5-6/1/4 vonalban); maguk az értékékek nem csökkentek le olyan mértékben, mint amennyire fagyasztás után. (Az ehhez tartozó adatok statisztikai értékelését a Mellékletek M2.2. tartalmazza.) Ezért a későbbi kísérletekben az edzés előtti mérési időpontot kihagytuk, az edzés végi időpontot tekintettük kontrollnak.

A transzformáns kontroll vonal (2B/1/5) PSII rendszere gyengébben működött a fagy hatására, mivel az  $F_v/F_m$  értékei szignifikánsan kisebbnek bizonyultak, mint a GP értékei, mind közvetlenül a fagyasztás után, mind 24, illetve 48 órával a fagy után (13. táblázat). Közvetlenül a -11°C-on történt fagyasztás után a 4-5-6/1/4 és a 23A/2/1 vonalak (*TaCBF14* transzgént tartalmazzák) esetén szignifikánsan nagyobb  $F_v/F_m$  értékeket mértünk a vad típushoz képest. Közvetlenül a -13°C-os fagyasztás után mért  $F_v/F_m$  értékek alapján a vad típushoz képest a 23A/2/1

vonal szignifikánsan jobb fagyállóságúnak bizonyult. 24 órával a -13°C fagy után - a 9B/1/2 vonalat kivéve - mindegyik transzformáns vonal, 48 óra után mind a négy *TaCBF* transzformáns vonal  $F_v/F_m$  értékekei szignifikánsan nagyobbak voltak a GP-nál. Ily módon sikerült azonosítani azokat a fagyasztási hőmérsékleteket, melyek alkalmasak a további tesztelésre, mivel ezeken a hőmérsékleteken jelentős különbség mutatkozik a vad típus és a transzgénikus növények fagyállóságában. Az egyik *TaCBF14* transzgént tartalmazó vonalból (4-5-6/1/4) négy növény túlélte a -11°C-os fagyot, és képes volt regenerálódni.

**13. táblázat:** A -11°C és -13°C fagyasztási előkísérlet során mért  $F_v/F_m$  értékek ábrázolása. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05; 0,01; 0,001.

		edzés	edzés utóp	fagyasztás után						
$F_v/F_m$	vonal			közvet	közvetlenül		24 h		48 h	
		ciott	utan	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	
Vad típus	GP	0,810	0,771	0,684	0,666	0,718	0,569	0,708	0,615	
Tr.										
Kontroll	2B/1/5	0,809	0,778	0,632***	0,598*	0,597***	0,037***	0,616***	0,028***	
TaCRE14	4-5-6/1/4	0,794	0,785	0,738*	0,713	0,725	0,713***	0,737	0,736***	
14CDI 14	23A/2/1	0,813	0,778	0,738*	0,731*	0,748	0,724***	0,750	0,723***	
TaCRE15	9B/1/2	0,812	0,758	0,730	0,652	0,710	0,573	0,699	0,680**	
1 <i>uCDI</i> 15	19/2/1	0,807	0,767	0,714	0,716	0,705	0,684**	0,738	0,693***	

Azért, hogy szelektáljuk a legtoleránsabb vonalakat, fagytesztet végeztünk mind a 28 független transzformáns vonallal ( $T_1$  nemzedék), a két transzformáns kontrollal és a vad típussal. A vonalak fagyállóságát az előző kísérlet alapján -11°C és -13°C-on teszteltük. Mértük a klorofill fluoreszcens indukciós paramétereket (14. táblázat), továbbá egy 0-tól 5-ig terjedő bonitálási skálán értékeltük (0: kipusztult, 5: sértetlen növény) a regenerálódás mértékét, valamint meghatároztuk a növények túlélési százalékát is.

Az edzés végi mérési időpontban 0,737-0,782 közötti  $F_v/F_m$  értékeket mértünk az egyes vonalakban (14. táblázat); a vad típusú GP, a transzformáns kontroll vonalak (2A/2/4 és 2B/1/5) és a transzformáns vonalak  $F_v/F_m$  értékei között a különbség nem volt szignifikáns. A -11°C, és a -13°C-os fagyasztás hatására a GP és a transzformáns kontroll vonalak PSII rendszere gyengén működött. 24, illetve 48 órával a fagykezelés után ezekben a kontroll vonalakban az  $F_v/F_m$  értékek 0,024-0,138 körüli értékre csökkentek. A -11°C-os fagy után 24 órával a 6A/1/2 (*TaCBF14* transzformáns) vonal levelein mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a GP-on mért értékekhez képest. A -13°C-os fagy után 24 órával a 4A/1/1 és a 24/1/1 vonalakban, 48 órával a fagyasztás után pedig a 4A/1/1, a 6A/1/2, a 21B/1/1 és a 24/1/1 vonalakban (mindegyik *TaCBF14* transzformáns vonal) mértünk szignifikánsan nagyobb  $F_v/F_m$  értékeket, mint a vad típusú GP-ban.

		odzás	fagyasztás után					
$\mathbf{F}_{\mathbf{v}'}$	$\mathbf{F}_{\mathbf{m}}$	végén	2	4 h	4	48 h		
		vegen	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C		
Vad típus	GP	0,782	0,076	0,027	0,138	0,030		
Tr.	2A/2/4	0,774	0,031	0,026	0,028	0,079		
kontroll	2B/1/5	0,752	na	0,028	na	0,024		
	4A/1/1	0,741	0,459	0,682**	0,627	0,741**		
	4-5-6/1/1	0,766	0,250	0,623	0,374	0,341		
su	5/1/1	0,737	0,288	na	0,593	na		
<b>14</b> nái	6A/1/2	0,753	0,689***	0,658	0,756	0,758***		
3F orr	6B/1/1	0,766	0,309	0,573	0,664	0,502		
<i>CI</i> szfi	21B/1/1	0,766	0,466	0,285	0,468	0,781***		
<b>Ta</b> ans	23A/1/2	0,758	0,564	0,399	0,681	0,272		
tra	23A/2/1	0,764	0,441	0,324	0,324	0,272		
	23B/1/1	0,774	0,558	0,232	0,583	0,083		
	24/1/1	0,763	0,588	0,713*	0,756	0,745***		
	9A/1/1	0,768	na	0,259	na	0,193		
	9A/2/1	0,764	0,359	0,032	0,143	0,217		
	9B/1/2	0,765	0,380	0,270	0,180	0,294		
	12A/1/3	0,777	0,310	0,180	0,323	0,178		
	12B/1/1	0,748	0,248	0,142	0,197	0,055		
	12B/2/1	0,746	0,398	na	0,457	na		
su	12C/1/1	0,779	0,235	0,465	0,226	0,330		
15 nái	12-18/1/1	0,776	0,032	0,121	0,258	0,077		
3F ort	12-18/2/1	0,768	0,251	0,097	0,160	0,078		
cCI szfe	12-18/3/2	na	na	na	na	na		
<b>Ta</b> ans	12-18/4/1	0,738	0,470	0,055	0,285	0,143		
tra	17/1/1	0,760	0,120	0,025	0,139	0,028		
	17/2/1	0,759	0,087	0,091	0,049	0,086		
	17/3/1	0,774	0,287	0,113	0,196	0,239		
	17/4/1	0,779	0,082	0,080	0,209	0,067		
	18/1/1	0,741	0,132	na	0,031	na		
	19/1/2	0,780	0,271	0,171	0,269	0,030		
	19/2/1	0,750	0,236	na	0,153	na		

**14. táblázat:** A -11°C és -13°C fagyasztási kísérlet során mért  $F_v/F_m$  értékek táblázata. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05; 0,01; 0,001; na: nincs adat.

A 48 órás fluoreszcens indukciós paraméterek mérése után visszavágtuk a növények leveleit, és kontroll körülmények között neveltük őket. Egy és két hét regenerációs periódus elteltével bonitáltuk a növényeket, vagyis felvételeztük a regenerálódásuk mértékét az egyedi növények szintjén. Vonalanként átlagértéket és szórást számoltunk az adatokból, és statisztikai módszerrel meghatároztuk a vad típustól való eltérés szignifikancia szintjét. Az eredményeket a 15. táblázatban foglaltuk össze. A vad típusú GP és a transzformáns kontroll növények nem tudtak regenerálódni, ezeknek a vonalaknak minden egyes egyede elpusztult. Azonban számos transzformáns vonal bonitálási értékei szignifikánsan nagyobbak voltak a vad típusénál. A

*TaCBF14* transzformáns vonalak közül a 4A/1/1, a 4-5-6/1/1, a 6A/1/2, a 6B/1/1, a 21B/1/1, a 23A/1/2, a 23A/2/1 és a 24/1/1 vonalak, a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül pedig a 9A/1/1 és a 12B/2/1 vonalak mutattak megnövekedett fagytűrést, mivel bizonyos mértékben képesek voltak regenerálódni a -11°C-os, de még a -13°C-os fagykezelés után is.

**15. táblázat:** A -11°C és -13°C fagyasztási kísérlet során mért bonitálási értékek egy 0-5 terjedő skálán értékelve (0: kipusztult, 5: sértetlenül túlélt), és a túlélési % ábrázolása. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0,05$ ; 0,01; 0,001; na: nincs adat.

		fagyasztás utáni bonitálási értékek					túlálási %	
Bon	itálás	1	hét	2	hét	tulei		CSI 70
		-11°C	-13°C	-11°C	-13°C		-11°C	-13°C
Vad típus	GP	0,00	0,00	0,00	0,00		0	0
Tr.	2A/2/4	0,00	0,00	0,00	0,00		0	0
kontroll	2B/1/5	na	0,05	na	0,00		na	0
	4A/1/1	0,97***	0,73***	0,97*	0,25***		27,78	31,58
	4-5-6/1/1	0,28*	0,60**	0,40	0,76*		12,50	10,00
ns	5/1/1	0,00	na	0,00	na		0	na
14 ná	6A/1/2	1,05***	0,50**	0,70**	0,25*		36,84	15,00
3F orr	6B/1/1	0,25	0,60**	0,30	0,48**		11,76	18,75
<b>CI</b> zfi	21B/1/1	2,05***	0,72**	1,95***	0,58**		45,00	22,22
<b>Fa</b> ins	23A/1/2	0,59**	0,66***	0,15	0,38*		5,56	10,53
, tra	23A/2/1	0,33*	0,45	0,39	0,23*		16,67	15,79
	23B/1/1	0,33**	0,05*	0,10	0,00		7,69	0
	24/1/1	2,00***	0,93***	2,20***	0,58***		55,56	25,00
	9A/1/1	na	0,65**	na	0,43*		na	11,76
	9A/2/1	0,00	0,00	0,00	0,00		0	0
	9B/1/2	0,05	0,00	0,00	0,00		0	0
	12A/1/3	0,30*	0,00	0,05	0,00		5,88	0
	12B/1/1	0,15	0,16	0,05	0,00		5,56	0
	12B/2/1	1,08***	na	1,00**	na		35,71	na
us	12C/1/1	0,06	0,05	0,00	0,00		0	0
' <b>15</b> ná	12-18/1/1	0,60*	0,00	0,26*	0,00		20,00	0
BF ori	12-18/2/1	0,13	0,25	0,07	0,20		9,09	5,00
CI	12-18/3/2	na	na	na	na		na	na
Ta	12-18/4/1	0,19	0,20	0,00	0,00		0	0
tra	17/1/1	0,22	0,00	0,17	0,00		7,69	0
	17/2/1	0,06	0,00	0,00	0,00		0	0
	17/3/1	0,00	0,00	0,00	0,00		0	0
	17/4/1	0,00	0,00	0,00	0,00		0	0
	18/1/1	0,35	na	0,05	na		9,09	na
	19/1/2	0,05	0,00	0,00	0,00		0	0
	19/2/1	0,13	na	0,00	na		0	na

A túlélési százalék megállapítása egyértelműen igazolja, hogy egyes transzgénikus vonalak egyedei között volt olyan, amelyik képes volt túlélni a fagykezelést. A -11°C-os fagyasztási hőmérsékletet számos vonal túlélte bizonyos százalékban (15. táblázat), de még a -13°C-os fagykezelés után is

találtunk túlélő növényeket a 4A/1/1, a 4-5-6/1/1, a 6A/1/2, a 6B/1/1, a 21B/1/1, a 23A/1/2, a 23A/2/1 és a 24/1/1 *TaCBF14* transzformáns vonalakban, azonkívül a 9A/1/1, valamint a 12-18/2/1 *TaCBF15* transzformáns vonalakban.

Hogy megerősítsük az eredményeket, megismételtük a fagytesztet a T<sub>1</sub> hasadó nemzedéken, a szemek fogyatkozó száma miatt csak a -13°C-os fagyasztási hőmérsékletet alkalmazva. A kísérlet során mértük a klorofill fluoreszcens indukciós paramétereket az edzés végén, közvetlenül a fagyasztást követően, továbbá 24 és 48 órával a fagy után. A levélmintákon konduktanciavizsgálatot végeztünk, meghatároztuk a levelekből történő ion-kiáramlás százalékos értékét az edzés végén (kontroll), és a fagyasztás után 24 órával (FT után) (16. táblázat).

**16. táblázat:** A -13°C-on végzett fagyteszt során mért  $F_v/F_m$  értékek, és a levélminták konduktanciavizsgálatával mért ion-kiáramlás százalékos adatai. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0.05$ ; 0.01; 0.001; na: nincs adat.

F/F			f	agyasztás u	tán	Ion-kiáramlás [%]	
⊥ <sub>v</sub> /	Г <sub>т</sub>	edzés végén	közvetl.	24 h	48 h	1011-Klara	iinas [70]
Von	alak				40 11	kontroll	FT után
Vad típus	GP	0,755	0,646	0,584	0,632	11,5	69,4
Tr.	2A/2/4	0,732*	0,580	0,122***	0,046***	10,7	82,2
kontroll	2B/1/5	0,759	0,517	0,224***	0,269	9,4	92,0
	4A/1/1	0,701***	0,649	0,706*	0,745***	6,0**	30,1*
	4-5-6/1/1	0,752	0,646	0,695*	0,227	9,5	90,5
us	5/1/1	0,737	0,689	0,732**	0,726***	88,5	13,0
'14 má	6A/1/2	0,751	0,717	0,765***	0,763***	8,3*	9,0***
BF ori	6B/1/1	0,737	0,677	0,572	0,619	7,7*	24,3**
CI	21B/1/1	0,739	0,629	0,606	0,599	14,3	29,0*
Ta	23A/1/2	0,737	0,706	0,639	0,601	9,9	15,6***
tra	23A/2/1	0,740	0,643	0,711**	0,733***	8,6	23,3**
	23B/1/1	0,740	0,650	0,618	0,498	10,1	46,5
	24/1/1	0,721**	0,631	0,628	0,632	8,7	28,5**
	9A/1/1	0,770	0,659	0,707**	0,675	10,6	40,8
	9A/2/1	0,759	0,692	0,658	0,490	14,2	70,3
	9B/1/2	0,757	0,656	0,666	0,638	9,6	46,8
	12A/1/3	0,748	0,583	0,636	0,520	5,8***	47,1
	12B/1/1	0,739	0,640	0,562	0,587	7,1	53,6
	12B/2/1	0,757	0,669	0,644	0,589	4,3**	135,1
us	12C/1/1	0,739	0,660	0,613	0,527	7,5*	82,7
<b>15</b> ná	12-18/1/1	0,765	0,693	0,676*	0,543	10,9	61,9
3F ori	12-18/2/1	0,773	0,673	0,658	0,637	12,1	42,0
<b>CI</b>	12-18/3/2	0,723	0,549	0,029	0,062	na	na
<b>Ta</b> ins	12-18/4/1	0,749	0,680	0,674	0,650	8,5	33,6**
tra	17/1/1	0,756	0,702	0,675*	0,525	9,2	34,0*
	17/2/1	0,744	0,679	0,572	0,509	10,2	67,9
	17/3/1	0,757	0,701	0,698**	0,682	12,0	25,2**
	17/4/1	0,733	0,632	0,536	0,449	6,2**	83,1
	18/1/1	0,768	0,686	0,662	0,556	9,3	72,9
	19/1/2	0,726**	0,617	0,616	0,608	7,2**	70,2
-	19/2/1	0,748	0,623	0,477	0,576	9,2	73,6

Az edzés végén mért  $F_v/F_m$  paraméter értékek szignifikánsan kisebbek voltak a 2A/2/4 (transzformáns kontroll), a 4A/1/1, 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns), és a 19/1/2 (*TaCBF15* transzformáns) vonalakban (16. táblázat). A közvetlenül a fagyteszt után meghatározott  $F_v/F_m$  paraméterekben egyik vonal esetén sem találtunk a vad GP-hoz képest szignifikáns eltérést. Szignifikáns különbségeket 24 illetve 48 órával a fagykezelés után detektáltunk. A 2A/2/4 és 2B/1/5 transzformáns kontroll vonalak PSII rendszere erősebben sérült, mint a GP-é; ezekben a vonalakban a fagyasztás után mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikánsan kisebbek, mint a vad típusban mértek. A *TaCBF14* transzgénikus vonalak esetében nagyobb  $F_v/F_m$  értékeket mértünk a 4A/1/1, 5/1/1, 6A/1/2, 23A/2/1 vonalakban mindkét fagyasztás utáni mérési időpontban. A *TaCBF15* vonalak esetében a fagyasztás után 24 órával mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a 9A/1/1, 12-18/1/1, 17/1/1, 17/3/1 transzgénikus vonalakban, azonban 48 óra után nem mértünk a GP-tól szignifikáns mértékben eltérő  $F_v/F_m$  értékeket.

A növények levelein konduktancia-vizsgálatot végeztünk; kevésbé károsodott a fagy hatására az a vonal, amelynek levélmintáiban kisebb ion-kiáramlást mértünk. Ezek a 4A/1/1, 6A/1/2, 6B/1/1, 21B/1/1, 23A/1/2, 23A/2/1, 24/1/1 *TaCBF14* transzgénikus vonalak, valamint a 12-18/4/1, 17/1/1, 17/3/1 *TaCBF15* transzgénikus vonalak (16. táblázat).

Az értékelés harmadik szempontja a fagyteszt utáni regeneráció mértékének vizsgálatán alapult. A regenerációt egyrészt egy 0-tól 5-ig terjedő bonitálási skálán értékeltük (0: kipusztult, 5: sértetlen növény; 24. ábra) egy és két héttel a fagykezelés után, másrészt meghatároztuk a növények túlélési százalékát (25. ábra). Megállapítottuk, hogy sem a vad típus, sem a két vizsgált transzformációs kontroll vonal a -13°C-os fagy után már nem volt képes regenerálódni, ezek között a vonalak között nem találtunk túlélő növényeket (0%), és a bonitálási értékük is 0 és 0,1 között volt. Azonban a bonitálási értékek statisztikai kiértékelése alapján a GP-nál szignifikánsan jobb a TaCBF14 transzformáns vonalak közül a 6A/1/2, a 23A/1/2, a 23A/2/1 és a 24/1/1; míg a TaCBF15transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 és a 18/1/1 (24. ábra). A különbség a túlélési százalékot tekintve még szembetűnőbb volt. Ennek során meghatároztuk, hogy adott vonalból a fagyasztásnak kitett növények közül mennyi élte túl a vad típus számára már 100%-ban letális -13°C-os fagyot (25. ábra). A TaCBF14 transzformánsok közül túlélőket a 4A/1/1, 21B/1/1, 23A/1/2 és a 23A/2/1 vonalak egyedei között, míg a TaCBF15 transzformánsok közül a 9A/2/1, 12B/2/1, 12-18/2/1, 12-18/4/1, 17/3/1, 17/4/1 és a 18/1/1 vonalak egyedei között találtunk. Külön kiemelnénk a 6A/1/2 (TaCBF14) és a 9A/1/1 (TaCBF15) vonalat, melynek egyedei 50%-os túlélést mutattak, továbbá a 24/1/1 (TaCBF14) vonalat, mely 70%-os túlélési arányt mutatott (25. ábra).



**24. ábra:** A -13°C-on végzett fagyteszt bonitálási értékeinek ábrázolása 1 illetve 2 hét regeneráció után. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0.05$ ; 0.01; 0.001.



25. ábra: A -13°C-on végzett fagyteszt után két héttel felvételezett túlélési % adatok ábrázolása.

Ezután az eddigi fagytesztek alapján szelektált legjobb transzformáns vonalakkal, de már a homozigóta  $T_2$  nemzedéken ismételtük meg a fagytesztet, -11°C és -13°C-on. Mértük a klorofill fluoreszcens indukciós paramétereket az edzés végén, majd 24 és 48 órával a fagy után. A levélmintákon konduktancia-vizsgálatot végeztünk, meghatároztuk a levelekből történő ionkiáramlás százalékos értékét az edzés végén (kontroll), és a fagyasztás után 24 órával. Ezenkívül egy 0-tól 5-ig terjedő bonitálási skálán értékeltük (0: kipusztult, 5: sértetlen növény) a regenerálódás mértékét egy és két hét regenerációs periódus után, valamint meghatároztuk a vonalak túlélési százalékát két hét regenerációt követően.

Az edzés végén mért  $F_v/F_m$  paraméter értékek szignifikánsan kisebbek voltak a 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns), és a 17/3/1 (*TaCBF15* transzformáns) vonalakban (17. táblázat). Habár a -11°C-os fagyasztás után 24 órával az  $F_v/F_m$  paraméterek átlagértékében volt eltérés (a 2A/2/4 transzformáns kontroll vonalban kisebb, míg a transzformáns vonalakban nagyobb értékeket mértünk), a különbség a vad GP-hoz képest nem szignifikáns. Szignifikáns különbségeket 48 órával a -11°C-os fagykezelés után detektáltunk. A 2A/2/4 transzformáns kontroll vonal PSII rendszere gyengébben működött a fagy hatására, mint a vad GP-é, mivel az  $F_v/F_m$  értékei szignifikánsan kisebbnek bizonyultak. A *TaCBF14* transzformáns vonalak közül a 6A/1/2, a 21B/1/1 és 23A/2/1 vonalakban mértünk szignifikánsan nagyobb  $F_v/F_m$  értékeket, mint a GP-ban, míg a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 és 12B/2/1-ben.

**17. táblázat:** A -11°C és -13°C-on végzett fagyteszt során mért  $F_v/F_m$  értékek. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \* ; \*\* ; \*\*\* ha  $P \le 0.05$  ; 0.01 ; 0.001; na: nincs adat.

$F_v/F_m$		edzés vágán	fagyasztás után					
			24	4 h	48 h			
		vegen	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C		
Vad típus	GP	0,726	0,498	0,115	0,624	0,106		
Tr. kontroll	2A/2/4	0,726	0,293	0,013	0,170***	0,017		
	4A/1/1	na	na	na	na	na		
CBF14	6A/1/2	0,731	0,701	0,685***	0,723*	0,713***		
	21B/1/1	0,731	0,661	0,697***	0,722**	0,704***		
	23A/1/2	na	na	na	na	na		
<i>Ta</i>	23A/2/1	0,736	0,656	0,670***	0,718**	0,722***		
	24/1/1	0,706*	0,717	0,706***	0,665	0,702***		
5	9A/1/1	0,734	0,735	0,683***	0,745**	0,738***		
'BF1	12B/2/1	0,726	0,703	0,495**	0,717*	0,610*		
	12-18/2/1	na	na	na	na	na		
aC	12-18/4/1	0,734	0,629	0,495	0,679	0,616*		
T	17/3/1	0,707*	0,629	0,560***	0,664	0,579***		

A -13°C-on végzett fagyasztás után 24 órával a GP-ban mért  $F_v/F_m$  paraméter átlagértéke 0,115-re csökkent az edzés végén mért 0,726-ról, és hasonló mértékű csökkenést tapasztaltunk a transzfománs kontroll vonalban is. Szignifikánsan nagyobb értékeket mértünk a 6A/1/2, a 21B/1/1, 23A/2/1, és 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns), valamint a 9A/1/1, 12B/2/1, és 17/3/1 (*TaCBF15*)

transzformáns) vonalakban 24 órával a -13°C-os fagy után; illetve ugyanezekben a vonalakban és a 12-18/4/1 *TaCBF15* transzformáns vonalban a 48 órás mérések során.

A fagytesztet egy másik módszerrel is értékelendő, meghatároztuk a levelekből történő ionkiáramlás százalékos értékét is (18. táblázat). Az edzés végén mért értékek között nem volt szignifikáns különbség, kivéve a *TaCBF15* transzformáns 9A/1/1 vonalat, amelyben kisebb ionkiáramlást detektáltunk, mint a vad típusban. -11°C-os fagy hatására a transzformáns kontroll 2A/2/4 vonalban szignifikánsan nagyobb ion-kiáramlást mértünk, ezek szerint ez a vonal erősebben károsodott, mint a GP. Kevésbé sérültek azonban a 9A/1/1 vonal levélmintái. Szintén kevésbé károsodott a -13°C-os fagy hatására a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 és a 17/3/1, valamint a *TaCBF14* transzformáns vonalak közül a 6A/1/2, a 21B/1/1, a 23A/2/1, és a 24/1/1, amely vonalak levélmintáiban kisebb ion-kiáramlást mértünk (18. táblázat).

**18. táblázat:** A -11°C-on és -13°C-on végzett fagyteszt során a levélminták konduktancia-vizsgálatának százalékos adatai. A vad típusú (GP) Golden Promise-tól való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha  $P \le 0.05$ ; 0.01; 0.001; na: nincs adat.

Ion-kiáramlás		odzós	fagyasztás után			
	1 annas 1/ 1	végén	24 h			
[ 70]		vegen	-11°C	-13°C		
Vad típus	GP	10,30	20,60	84,17		
Tr. kontroll	2A/2/4	10,48	89,54***	85,00		
	4A/1/1	na	na	na		
14	6A/1/2	8,59	11,27	14,93***		
3F	21B/1/1	10,54	14,74	10,63***		
CI	23A/1/2	na	na	na		
Ta	23A/2/1	9,89	9,52	14,59***		
	24/1/1	11,16	13,43	11,58***		
5	9A/1/1	7,27**	9,53*	11,31***		
BFI	12B/2/1	12,26	10,71	52,35		
	12-18/2/1	na	na	na		
a C	12-18/4/1	11,89	39,00	65,85		
L	17/3/1	10,52	19,26	37,06***		

A -11°C és -13°C-os fagy utáni regeneráció mértéke alapján, bonitálási skálán értékeltük a növények fagyállóságát; az eredményeket a szignifikancia-szintek jelölésével a 26. és 27. ábra demonstrálja. A vad típus és a transzformációs kontroll vonal regenerálódó képességét a -11°C-os fagy után 0-1 közöttinek ítéltük. A 17/3/1-t kivéve valamennyi *TaCBF14* és *TaCBF15* transzgénikus vonal esetén a vad típusnál szignifikánsan jobb bonitálási értékeket felvételeztünk. A -13°C-os fagyasztást követően a különbség még szembetűnőbb volt. A transzformáns kontroll vonal csekély mértékben képes volt újra kihajtani, de később elpusztult; a GP egyáltalán nem tudott regenerálódni. A bonitálási adatok statisztikai értékelése alapján szignifikánsan jobb

fagyállóságúnak bizonyult valamennyi *TaCBF14* ( $P \le 0,001$ ) transzgénikus vonal. A *TaCBF15* vonalak közül a 9A/1/1 és a 12-18/4/1 fagyállósága volt  $P \le 0,001$  szinten szignifikánsan jobb a vad típusnál.



**26. ábra:** A -11°C-on végzett fagyteszt bonitálási értékeinek ábrázolása. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\* ; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05 ; 0,01 ; 0,001.



**27. ábra:** A -13°C-on végzett fagyteszt bonitálási értékeinek ábrázolása. A vad típusú Golden Promise-tól (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\* ; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05 ; 0,01 ; 0,001.

Két hét regenerációs periódus után meghatároztuk a vonalak túlélési százalékát, azaz megszámoltuk, hogy a fagytesztnek kitett növények közül mennyi élte túl valóban az alkalmazott fagyasztási hőmérsékletet (28. ábra). A vad típus, és a transzformáns kontroll vonal között kis százalékban találtunk túlélő növényeket. A -11°C-ot 20, illetve 36 %-ban élték túl a GP és a 2A/2/4 vonal egyedei, ezzel szemben a transzformáns vonalak mindegyike nagyobb százalékban mutatott túlélést. Sőt, a 4A/1/1, 6A/1/2, 23A/1/2, 24/1/1 *TaCBF14* transzformáns vonalak, valamint a 9A/1/1, és 12B/2/1 *TaCBF15* transzformáns vonalak minden egyede túlélte a fagykezelést. A -13°C-os fagyasztási hőmérséklet a vad típusú GP számára letális volt, a transzformáns kontroll vonalból egy túlélő növényt (5 %) találtunk. A *TaCBF14* transzformáns vonalak 76-92 % arányban mutattak túlélést. A vizsgált *TaCBF* transzformáns vonalak közül a *TaCBF15* transzformánsok átlagosan kisebb százalékban élték túl a -13°C-ot, de a 9A/1/1 vonal még ezt a hőmérsékletet is 100 %-ban túlélte (28. ábra).



**28. ábra:** A -11°C és -13°C-on végzett fagyteszt túlélési százalék értékeinek ábrázolása. GP: a vad típusú Golden Promise árpa

## 4.2.4.2. A TaCBF transzformáns árpavonalak fagytűrésének tesztelése edzési periódus nélkül

Mivel a transzgén működését egy állandó expresziót biztosító konstitutív promóter szabályozza, emiatt feltételeztük, hogy a transzgén folyamatos expressziója a hideg-indukálható gének (egy részének) aktiválásával a hideg-edződési periódust (részben) kiválthatja. Ezért vizsgáltuk, a transzgén hideg-edzés nélkül is növeli-e a növények fagyállóságát. Az edzés nélküli fagytesztet a *TaCBF* transzformáns árpavonalak homozigóta  $T_2$  nemzedékén végeztük el, az eddigi fagytesztek
alapján legfagytűrőbbnek bizonyult vonalakkal. A vonalak fagyállóságát -6°C-on teszteltük. Mértük a klorofill fluoreszcens indukciós paramétereket, továbbá egy 0-tól 5-ig terjedő bonitálási skálán értékeltük a regenerálódás mértékét, valamint meghatároztuk a növények túlélési százalékát is. Vonalanként átlagértéket és szórást számoltunk az adatokból, és statisztikai módszerrel meghatároztuk a vad típustól való eltérés szignifikancia szintjét.

A fagyasztás előtti mérési időpontban 0,779-0,798 közötti  $F_v/F_m$  értékeket mértünk az egyes vonalakban (19. táblázat). Tapasztalataink szerint ekkora ingadozás nem számít számottevőnek, azonban az adatok statisztikai kiértékelése szignifikáns különbséget mutatott ki a vonalak között. A GP-on mért értékekhez képest szignifikánsan kisebb értékeket mértünk a transzformáns kontroll (2A/2/4) vonal levelein; a *TaCBF14* transzformáns vonalak közül a 6A/1/2, a 21B/1/1, a 24/1/1; a *TaCBF15* transzformánsok közül pedig a 9A/1/1, a 12B/2/1 és a 12-18/4/1 vonalak levelein. 24, illetve 48 órával a -6°C-os fagyasztás után a vonalak PSII rendszere szinte ugyanolyan szinten működött, mint az edzés végén. Az  $F_v/F_m$  átlagértékek között nem volt szignifikáns eltérés, kivéve a 9A/1/1 *TaCBF15* transzformáns vonalat, mely vonal levelein mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a GP-on mért értékekhez képest.

Edzés nélküli FT -6°C			F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>			Bon		Tálálási		
		FT előtt	FT után			FT után				
			24 h	48 h		1 hét	2 hét		/0	
Vad típus	GP	0,798	0,764	0,771		0,43	0,00		0	
Tr. kontroll	2A/2/4	0,789**	0,755	0,769		0,10*	0,00		0	
TaCBF14	4A/1/1	na	na	na		1,00*	0,25		10,53	
	6A/1/2	0,779***	0,765	0,765		0,90	0,35		15,00	
	21B/1/1	0,792*	0,771	0,771		0,70	0,40		16,67	
	23A/1/2	na	na	na		0,55	0,25		10,53	
	23A/2/1	0,792	0,769	0,770		0,51	0,00		0	
	24/1/1	0,786***	0,766	0,767		1,60**	0,69***		26,32	
TaCBF15	9A/1/1	0,789**	0,781*	0,783		1,80***	0,69***		15,79	
	12B/2/1	0,787***	0,763	0,778		0,88	0,28		11,11	
	12-18/2/1	na	na	na		0,55	0,28		10,53	
	12-18/4/1	0,791*	0,762	0,775		0,53	0,13		10,53	
	17/3/1	0,798	0,777	0,780		0,60	0,00		0	

**19. táblázat:** A -6°C-on végzett edzés nélküli fagyteszt  $F_v/F_m$  és bonitálási értékei, valamint a túlélési % adatok. A vad típusú (GP) Golden Promise-tól való szignifikáns eltérés jelölése: \*; \*\*; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05; 0,01; 0,001; na: nincs adat.

A 48 órás  $F_v/F_m$  mérések után visszavágtuk a növények leveleit, és kontroll körülmények között neveltük őket. Egy és kettő hét regenerációs periódus elteltével az egyedi növények szintjén pontoztuk a regenerálódásuk mértékét. Az eredményeket a 19. táblázat tartalmazza. Megállapítottuk, hogy hideg-edzés nélkül a vad típusú GP, ill. a transzformáns kontroll vonal nem képes túlélni egy -6°C-os fagytesztet; egy hét regenerációs periódus után még 0,43, ill. 0,1 átlagos

bonitálási értékkel pontoztuk őket, de 2 héttel a fagyasztás után ez az érték 0-ra csökkent és nem találtunk közöttük túlélő egyedeket. Egy héttel a fagyasztás után minden transzgénikus vonalban voltak túlélő növények, míg két hét után a tanulmányozott 11 vonal közül 9-ben azonosítottunk túlélőket, habár az edzés nélküli fagyteszt túlélési százalék adatai csak 10-26 % között mozogtak. A leginkább regenerálódni képes, és legtöbb túlélő növényt a *TaCBF14* transzformáns vonalak közül a 24/1/1, a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül pedig a 9A/1/1-ben találtuk.

### 4.2.5. A TaCBF transzformáns növények ozmotikus stressz-toleranciájának vizsgálata

Ozmotikus stresszt polietilén glikol 6000 (PEG; Sigma) segítségével idéztünk elő, melynek koncentrációját fokozatosan növeltük a tápoldatban Molnár et al. (2004) kísérlete alapján. Két-két olyan *TaCBF14* (6A/1/2 és 24/1/1) és *TaCBF15* (9A/1/1 és 12-18/2/1) transzformáns vonalat, amelyek a fagytesztek során ellenállóbbnak bizonyultak; a transzformáns kontroll vonalat (2A/2/4), és a vad típusú Golden Promise árpát (GP) vontuk be a kísérletbe. A PEG-kezelés és az azt követő regenerációs periódus során mértük a vonalak levelének relatív víztartalmát (RWC). Az eredményeket a 29. és 30. ábrák szemléltetik, az adatokat a szignifikancia-szintek jelölésével a Mellékletek M2.3. táblázatban foglaltuk össze.



**29. ábra:** Az ozmotikus stressz-kezelés során mért relatív víztartalom (RWC) a vad típusú Golden Promise (GP) és a transzformáns vonalakban, növekvő PEG koncentráció esetén. A relatív víztartalmat a stresszt követő 3. illetve 7. napon (3d Rec, 7d Rec) is meghatároztuk.

Kontroll körülmények között a vonalak leveleinek relatív víztartalma 97% körül volt, majd a 18%os PEG-kezelés hatására kis mértékben lecsökkent, 95%-ra. 21%-os PEG-kezelésnél a transzformáns kontroll vonal és a 6A/1/2 *TaCBF14* transzformáns vonal RWC-a a GP értékeihez képest szignifikáns mértékben csökkent. 24%-os PEG kezelést követően a 9A/1/1, 12-18/2/1 (*TaCBF15* transzformáns), és a 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns) vonalak levelének relatív víztartalma szignifikánsan nagyobb volt a GP-nál. Az ozmotikus stressz-kezelést követő három nap regeneráció (Rec: recovery) után a különböző vonalak levelei visszanyerték a kiindulási (kontroll) víztartalmukat, a regenerációs periódus alatt (3. és 7. napon vett minták esetén) a vonalak RWC értékei között nem volt szignifikáns különbség.



**30. ábra:** A *TaCBF* transzformáns árpavonalakról az ozmotikus stressz-kezelés során kontroll körülmények közt, 24% PEG-kezelés után, majd az azt követő regenerációs periódus (3d Rec: 3 nap recovery) során készített fotók.

#### 4.2.6. A TaCBF transzformáns növények génexpressziós vizsgálata

A szárazság-, hideg-, és sóstresszre indukálódó gének egyik legnagyobb csoportja a LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteinek, az embriófejlődés késői fehérjéi (Ingram és Bartels 1996, Thomashow 1999). Négy különböző, a LEA proteinek csoportjába tartozó gén (HvCOR14b, HvA22, HvDHN5, HvDHN8) és az árpa *CBF* gének közül a HvCBF9 gén működését vizsgáltuk a vad típusú GP, és az eddigi tesztek alapján legellenállóbb TaCBF14 transzformáns 24/1/1, valamint a TaCBF15 transzformáns 9A/1/1 vonalak kontroll és hideg-kezelt mintáin, Real-Time RT-PCR módszerrel. Referenciagénként az árpa ciklofillin gént használtuk, az adatokat  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel értékeltük ki. A 31. és 32. ábrákon mutatom be a relatív Fold Change (FC) értékeket (bal oldali grafikonok), amelyen az látszik, hogy relatíve hányszoros az adott gén expressziója a mintákban, ha a vad típus kontroll mintájában mért expressziót tekintjük 1-nek. Az ábrák a Log<sub>2</sub>FC értékeit is (jobb oldali grafikonok) bemutatják, mely a expresszióváltozás logaritmikus értéke. Így a hidegindukált állapothoz képest kisebb léptékű, de kontroll körülmények között kimutatható néhányszoros génexpresszió-beli különbségek is láthatóvá válnak a grafikonokon.

A *TaCBF* transzgén konstitutív expressziója a transzformáns vonalak kontroll körülmények közt nevelt (hideg-kezelést nem kapott) mintáiban indukálta a *HvCOR14b* gén kifejeződését; expressziójának mértéke megközelítette azt a szintet, amit a vad típusban a hidegkezelés okozott (31. ábra A és B). A 9A/1/1 vonalban kontroll körülmények között a vad típusban mért génexpresszió ötezerszeresét (relatív FC), a 24/1/1 vonalban közel háromezerszeresét mutattuk ki (31. ábra A). A *HvCOR14b* gén a vad típusban csak hidegkezelés hatására indukálódott, a transzformáns vonalakban pedig tovább nőtt az expressziójának mértéke a hideg-stressz hatására (31. ábra B). A *HvCBF9* gén azonos mértékben expresszálódott kontroll körülmények között a vizsgált vonalakban (31. ábra C és D), azonban hideg-kezelés hatására négyszer erősebben indukálódott a GP-ban, mint a transzgénikus vonalakban. A *HvA22* gén esetén tizenháromszor nagyobb expressziót mértünk kontroll körülmények között a 24/1/1 vonalban (31. ábra E), és ebben a vonalban volt a legkifejezettebb a *HvA22* hidegindekciója is; a vad típus és a 9A/1/1 vonalakban mért génexpresszió háromszorosát detektáltuk (31. ábra E).



**31. ábra:** A *HvCOR14b*, a *HvCBF9*, és a *HvA22* gének expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCRrel. Az egymás mellett lévő grafikonokon ugyanazon gén expressziós eredményét ábrázoltam; megadva a relatív FC (Fold Change; bal oldali grfikonok) és a Log<sub>2</sub>FC értékeket (jobb oldali grafikonok). A vad típusú GP (Golden Promise) kontroll mintáit tekintettük összehasonlítási alapnak.

A *HvDHN5* gén expressziója négyszer, illetve kilencszer nagyobb volt kontroll körülmények között a 9A/1/1 és a 24/1/1 vonalakban, mint a vad típusban (32. ábra A és B; az A grafikonon az y tengely léptéke miatt a néhányszoros génexpresszió-változás kontroll körülmények között nem kivehető, de a Log<sub>2</sub>FC-t ábrázolva látható a különbség). Hideg-kezelés hatására a kontroll értékhez képest ezerszeresére nőtt a *HvDHN5* gén expressziója GP-ban, ennél kisebb mértékben indukálódott a transzformáns vonalakban. A 24/1/1 vonalban a GP-ban mért értéknél ötször nagyobb *HvDHN8* expressziót mutattunk ki kontroll körülmények között, hideg-kezelés hatására azonban a legintenzívebben a vad típusban fejeződött ki ez a gén (32. ábra C és D).



**32. ábra:** A *HvDHN5*, valamint a *HvDHN8* gének expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. Az egymás mellett lévő grafikonokon ugyanazon gén expressziós eredményét ábrázoltam; megadva a relatív FC (Fold Change; bal oldali grfikonok) és a Log<sub>2</sub>FC értékeket (jobb oldali grafikonok). A vad típusú GP (Golden Promise) kontroll mintáit tekintettük összehasonlítási alapnak.

## 4.2.7. A *TaCBF* transzformáns árpavonalak fejlődésbeli eltérése a vad típusú Golden Promise-tól

A szövettenyésztésből regenerálódó növények között nem találtunk retardált, törpe fenotípusút. Valamennyi kalászolt, a kalászok fertilisek voltak, magot hoztak. Egy vonal, a 23A/2/1 levele csíkos volt már a T<sub>0</sub> nemzedékben, és a későbbi generációkban is találtunk a vonal egyedei közt csíkos levelűt. Mivel a szövettenyésztés során folyamatosan regenerálódtak transzformáns növények, így azok fejlődését nem tudtuk összehasonlítani a vad típusú Golden Promise-szal. A fagyteszteket 3 leveles állapotban lévő növényeken végeztük el, és azt tapasztaltuk, hogy már ebben a korai fejlődési állapotban is az egyes vonalak magassága között van eltérés. A legfejlettebb, legnagyobb a vad típusú Golden Promise volt. A fagytesztek alapján szelektált vonalak és egy transzformáns kontroll (2A/2/4) vonal homozigóta T<sub>2</sub> nemzedékének felszaporítását üvegházi körülmények között végeztük el. Ennek során megfigyeltük, hogy a transzformáns kontroll vonal a vad típusúval egy időben kezdett el kalászolni a vetéstől számított 12. héttől, és nem volt eltérés a növények magasságában (Mellékletek: M2.4). Hozzájuk hasonlóan fejlődött két olyan transzformáns vonal (17/3/1 és 21B1/1, mindkettő *TaCBF15* transzgénikus), amelyek ugyan megnövekedett fagytűrést mutattak a vad típushoz képest, de a szelektált transzformáns vonalak

között nem ezek voltak a legellenállóbbak. A *TaCBF14* transzformánsok közül a 6A/1/2 és a 24/1/1 (33.A ábra) vonalak enyhe lemaradást mutattak a fejlődésükben a vad típushoz képest, a főkalászuk zászlós levele csak a vetéstől számított 13. héten kezdett el kifejlődni. A 23A/2/1 (*TaCBF14* transzformáns), és a *TaCBF15* transzformánsok közül a 9A/1/1 (33.B ábra) és a 12B/2/1 vonalak fejlődése volt a legelmaradottabb a vad típushoz képest, a vetéstől számított 13. héten a kalász még csak hasban volt tapintható.



**33. ábra:** A vad típusú Golden Promise (GP) és a *TaCBF14* transzgénikus 24/1/1, valamint a *TaCBF15* transzgénikus 9A/1/1 vonal fejlettségi állapota a vetéstől számított 13. héten

### 4.3. Új tudományos eredmények

- Elkészítettük a pMDC99-cor15a-OsMYB4-NOS, a pBract214-TaCBF14 és a pBract214-TaCBF15 konstrukciókat, melyeket felhasználva Agrobacterium tumefaciens közvetítésével tavaszi árpát (Hordeum vulgare L. cv. Golden Promise) transzformáltunk. Előállítottunk 8 független OsMYB4, 10 független TaCBF14 és 18 független TaCBF15 transzformáns árpavonalat, továbbá 2 független transzformáns kontroll árpavonalat.
- 2. A pMDC99-*cor15a-OsMYB4-NOS* transzformáns árpavonalak fagytesztjei során a PSII fotorendszer vizsgálatával igazoltuk, hogy az OsMYB4 transzkripciós faktor növeli a tavaszi árpa fagyállóságát.
- 3. Igazoltuk, hogy az OsMYB4 transzkripciós faktor növeli a komplex, oxigén-hiány és hideg együttes stressz-kezelésnek kitett transzgénikus árpanövénykék vigorát. Génexpressziós és enzimatikus vizsgálatokkal is bizonyítottuk, hogy a vad típushoz képest megnövekedett az alacsony oxigénellátottság során fontos szerepet játszó alfa-amiláz, laktát dehidrogenáz és aszpartát aminotranszferáz enzimek aktivitása a transzgénikus vonalakban.
- 4. Igazoltuk, hogy a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe van a fagytolerancia kialakításában. Konduktancia-vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a transzformáns vonalak levele kevésbé károsodott a fagykezelés hatására, mint a vad típusé. A transzgénikus vonalak levelein szignifikánsan nagyobb F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> értékeket mértünk, mint a vad típuson, eszerint a transzgénikus vonalak PSII rendszere kevésbé sérült. A regenerálódás mértéke (bonitálás), és a túlélési százalék alapján a szelektált *TaCBF14* transzformáns vonalak, és a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 fagytűrőbbnek bizonyult, mint a vad típusú Golden Promise. A legellenállóbb *TaCBF* transzgénikus árpavonalak túléltek a vad típus számára letális fagyasztási hőmérsékletnél néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérsékletet.
- 5. Kimutattuk, hogy a *TaCBF* transzformáns árpavonalakban megváltozik bizonyos, a CBF regulonhoz tartozó gének kifejeződése, és a vad típussal szemben már kontroll körülmények között is fokozottan expresszál egy alacsony-hőmérsékleti stressz hatására indukálódó gén, a *HvCOR14b*.
- 6. Előkísérleteink alapján a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe van az ozmotikus stressz kivédésében.

- 7. Kimutattuk, hogy pleiotróp hatásként a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok fejlődési visszamaradottságot, lassab fejlődést és késői virágzást okoztak a transzgénikus árpavonalakban.
- 8. Előállítottunk egy több fagyteszt által szelektált, *TaCBF14* illetve *TaCBF15* transzgént tartalmazó új genetikai alapanyagot, mely a jövőben további vizsgálatok, és a CBF regulon működését feltáró kísérletek alapanyaga lehet.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

# 5.1. Az alacsony hőmérséklet indukálja a *cor15a-OsMYB4* transzformáns növényekben a transzgén kifejeződését

Rizsben az OsMYB4 transzkripciós faktor fő központi szabályozó szerepet foglal el a hierarchikus transzkripcionális hálózatban. Befolyásolja a stresszek során fellépő sejtkárosodások kivédését, a metabolizmust és a növény fejlődését. Nagyszámú, különböző családba tartozó, intermedier transzkripciós faktoron keresztül (MYB, ERF, bZIP, NAC, ARF és CCAAT-HAP típusú TF-ok) szabályoz többezer gént (Park et al. 2010). Számos növényfajt, így lúdfüvet (Vannini et al. 2004), paradicsomot (Vannini et al. 2007), cseppecskevirágot (Laura et al. 2010), almát (Pasquali et al. 2008) is transzformáltak már a rizsből izolált MYB4 transzkripciós faktorral. Ezekben a kísérletekben a transzgén megnyilvánulását konstitutív expressziót biztosító promóterrel biztosították. A transzgén működése megnövelte ugyan az abiotikus, és néhány esetben a biotikus stresszekkel szembeni toleranciát is, de a különböző fajokon végzett kísérletek eredményeinek összevetése azt mutatja, hogy az OsMYB4 transzgén hatása nagymértékben fajfüggő volt, azaz a stressz-tolerancia mértéke nagymértékben függött a transzformált gazdanövény genomi hátterétől. Az OsMYB4 transzgénikus növények többé-kevésbé törpe fenotípust mutattak (Vannini et al. 2006, Pasquali et al. 2008), és/vagy egy részük steril volt (Vannini et al. 2007), a szerzők azonban nem mutattak ki összefüggést a transzgén expressziójának szintje és a fenotípusos abnormalitások mértéke között. Az OsMYB4 transzgént egy abiotikus stressz-indukálható, az Arabidopsis-ból származó COR15a gén promóterével működtetve paradicsomban sikerült a konstitutív promóterrel történő transzformáció negatív hatásait kiküszöbölni (Vannini et al. 2007).

Mivel eddig főként kétszikű fajokban vizsgálták az OsMYB4 transzkripciós faktor stressztoleranciát befolyásoló hatását, ezért munkánk során gazdaságilag fontos gabonafajt, árpát transzformáltunk a génnel. Figyelembe véve a konstitutív promóterek alkalmazásának káros mellékhatásait, Vannini et al. (2007) eredményei alapján az indukálható *cor15a* promótert alkalmaztuk a transzgén működésének szabályozására. Mivel a *cor15a* promóter hideg hatására indukálódik (Baker et al. 1994), ennek megfelelően, az előállított transzgénikus árpa növényekben a transzgén expresszióját indukálta a hideg-kezelés. Ugyanakkor egy alap-szintű *OsMYB4* transzgén expressziót mutattunk ki már kontroll körülmények között is a vizsgált növények többségében. Néhány esetben az azonos transzgénikus növényről vett kontroll és hideg-kezelt mintákban a transzgén expressziós szintjei között nem volt jelentős különbség, azaz már a kontroll mintában is hasonlóan magas szinten expresszált a transzgén, mint a hideg-kezeltben. Azonos jelenséget figyeltek meg más kísérleti rendszerben is, amikor a *cor15a* promóterrel vezérelt *OsMYB4* gén expresszióját tanulmányozták (Vannini et al. 2007) a nem induktív körülmények között nevelt transzgénikus paradicsom növényekben. A szerzők a jelenséget az alkalmazott promóter "szivárgásával" magyarázták. Kísérletünkhöz a kontroll növényeket 20/15°C-on neveltük. Nem találtunk irodalmi adatot arról, hogy maga a COR15a gén mely hőmérsékleti intervallumon belül indukálódik Arabidopsis-ban. A COR15a egy homológ génjének, a COR14b génnek az indukciós hőmérsékletét alakorban (Triticum monococcum) tanulmányozták (Vágújfalvi et al. 2003), melynek során megállapították, hogy a tavaszi, fagyérzékeny genotípusban a gén már 20°C, illetve 15°C-on is expresszálódik. Mivel a transzformációhoz tavaszi árpát használtunk, ezért elképzelhető, hogy az alkalmazott kontroll hőmérséklet is induktív volt. Egy másik lehetséges magyarázat, ha feltételezzük, hogy ezt a "háttér" expressziót a hygromycin szelekciós markergént szabályozó konstitutív CaMV35S promóter okozza. Yoo et al. (2005) leírták, hogy a szelekciós markergén erősen konstitutív expresszióját biztosító 35S enhancer (erősítő) szekvencia befolyásolhatja (növelheti) a konstrukcióban lévő, nem a CaMV35S promóter által közvetlenül vezérelt (downstream) transzgén expresszióját is. Ezen kívül a független transzformációs események nyomán különböző helyekre beépült kópiák genomi környezete - a kromatin szerkezet, illetve közeli enhancer vagy represszor elemek hatása - is jelentősen befolyásolhatja a promóter aktivitását.

#### 5.2. Az OsMYB4 transzkripciós faktor növeli a transzformáns árpavonalak fagyállóságát

Az OsMYB4 transzkripciós faktor alacsony-hőmérsékleti stressz-toleranciában betöltött szerepét az előállított transzgénikus árpavonalak fagytesztjével vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a Golden Promise tavaszi árpa fagytoleranciáját kis mértékben ugyan, de növelte az OsMYB4 transzgén. A fagytesztekben legjobbnak bizonyult transzgénikus vonalak PSII rendszere a fagy után (szignifikáns mértékben) hatékonyabban működött, mint a vad típusé. A T<sub>2</sub> generáción végrehajtott fagytesztben - mely mind a nyolc transzformáns vonalat tartalmazta - megállapítottuk, hogy a közvetlenül a fagyasztás után mért  $F_v/F_m$  értékek nem változtak szignifikáns mértékben az edzés végén mért értékekhez képest, ahogy azt korábban Rizza et al. (2001) is tapasztalták. Az alkalmazott hideg-edzési periódusnak tehát nincs a fotoszintetikus apparátust károsító hatása. A  $T_3$ generáción végzett teszt eredményei az első kísérletet megerősítik; a vad típusú GP és az egyes transzgénikus vonalak klorofill indukciós paramétereiben mért szignifikáns különbség egyértelműen jelzi, hogy az OsMYB4 transzgén fokozza a PSII rendszer stabilitását. Hatással van a transzformáns vonalak fagytűrésére, de ez a hatás nem olyan nagyfokú, hogy a transzformáns vonalak túléljenek annál alacsonyabb fagyasztási hőmérsékletet is, mely a vad típus számára már letális. Az OsMYB4 gén a PSII rendszer stabilitását és megnövekedett fagytűrést eredményezett transzformáns Arabidopsis-ban (Vannini et al. 2004), továbbá szintén megnövekedett fagytűrést és a fagyállóság kialakulásában fontos szerepet játszó metabolitok - cukrok, valamint prolin akkumulációját okozta Osteospermum-ban (Laura et al. 2010) is. Az egyes növényfajokon végzett kísérletek eredményei nem minden esetben ilyen világosak. Almában az OsMYB4 gén expresszióját konstitutív promóter vezényelte, a transzgénikus növényekben a transzgén expressziója különböző szintű volt. A hideg-stresszel szembeni ellenállóság növekedését, az azzal kapcsolatos metabolitok felhalmozódását egyértelműen csak azokban a növényekben lehetett igazolni, amelyekben a transzgén magas szinten expresszált (Pasquali et al. 2008). Annak ellenére, hogy a hideg-stressz hatására a transzgén indukálódott, a cor15a-OsMYB4 transzformáns paradicsom fagytűrése nem növekedett meg a vad típushoz képest (Vannini et al. 2007). Az, hogy milyen hatása van az OsMYB4 transzgénnek a fagytűrés mértékére, függ a transzformált fajtól. Genetikailag nem kódoltak minden növényben azok az OsMYB4 transzkripciós faktor által szabályozható downstream gének, amelyek aktivitása szükséges a hideghez történő akklimatizációhoz. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az OsMYB4 gén, ha nem jelentős mértékben, de megnöveli az árpa fagyállóságát. Azonban, ha az árpa fagyállóságának, vagy az alacsony-hőmérsékleti stressztoleranciájának javítása a cél, akkor az eredményeink alapján más gén transzformációját tartjuk célszerűnek. Mind saját kutatásaink, mind az irodalmi adatok alapján e célra alkalmasabbnak tartjuk a CBF géneket.

#### 5.3. Az OsMYB4 transzkripciós faktor megnöveli az árpanövénykék vigorát

Több transzformációs tanulmány foglalkozik az *OsMYB4* gén funkcionális analízisével. A transzgénikus *Arabidopsis*-szal végzett kísérletek széleskörűen demonstrálják a megnövekedett toleranciát különböző abiotikus - úgy, mint hideg, fagy, szárazság, só, UV, ózon -, és a rezisztenciát többféle biotikus - vírus, baktérium és gomba - fertőzéssel szemben. Ismereteink szerint az *OsMYB4* transzgén hatását a csírázásra még nem tanulmányozták. A *MYB* géncsalád szerepe az anoxia/hipoxia stresszel szemben nem meglepő; *Arabidopsis*-ban leírták, hogy az *AtMYB2* transzkripciós faktor az *AtADH1* (alkohol dehidrogenáz1) gén fokozott működésén keresztül az alacsony oxigén-koncentráció okozta stressz kivédésében játszik szerepet (Hoeren et al. 1998).

Az őszi, vagy tavaszi vetések idején, természetes körülmények között a szántóföldeken az alacsony hőmérsékleti stressz mellett gyakran hipoxiás körülmények is kialakulnak. E kettő együtt - kombinált stresszként - jelentős mértékben csökkentheti a szemek csírázó-, vagy a fiatal növények fejlődő-képességét. A komplex stressztűrési vigor teszt (CSVT, Complex Stressing Vigour Test) az International Seed Testing Association (ISTA) Vigour Test Committee (Hampton és TeKrony 1995) által elfogadott vizsgálat, amely komplex stressz-kezelésen alapul (Barla-Szabó és Dolinka 1988). A teszt alatt együttesen alkalmazunk oxigénhiányt és hidegstresszt azáltal, hogy a szemeket

négy napon keresztül vízben áztatjuk, ebből az első két nap szobahőmérsékleten (20°C), a második két napon hidegben (2°C). Kísérletünkben igazoltuk, hogy a komplex stressz-kezelésnek kitett *OsMYB4* transzgénikus árpanövénykék szignifikánsan jobban fejlődtek a vad típushoz képest. A transzgénikus vonalak nagyobb vigorral rendelkeztek, és a tesztelt szemek hosszabb hajtást produkáltak.

Kísérletünk során az oxigén-hiányos állapot miatt megváltozott metabolizmusban kulcsszerepet betöltő enzimek (2.1.2. fejezet 1. ábra) aktivitását is tanulmányoztuk. Az amiláz enzimek kiemelkedően fontos szerepet játszanak az anaerob anyagcserében. Két transzformáns vonal hajtásában (L1 és L8) megnövekedett alfa-amiláz (AMY) aktivitást mutattunk ki, mind génexpressziós, mind enzimatikus szinten. Az L5 vonal is nagyobb vigorral rendelkezett, mint a GP, és hipoxia esetén ebben a vonalban is szignifikánsan nagyobb AMY enzimaktivitást detektáltunk. Azonban az L5 vonal hajtás mintáiban mért AMY aktivitás sem enzimatikus, sem génexpressziós szinten nem volt magasabb a vad típusban mérthez képest. Erre az ellentmondásra magyarázatot adhat a transzgén inszerciójának vizsgálata. Lehetséges, hogy a beépülés helye eredményezi az L5 vonalban tapasztalt represszált AMY aktivitást (az L1 és L8 vonalakhoz képest). Esetleg olyan más mechanizmusok biztosítják ennek a vonalnak a nagy vigorát, amelyeket eddig még nem ismerünk, mivel a megnövekedett AMY aktivitás nem közvetlen kapcsolatban van a szemek, illetve a csíranövények vigorával. Az amiláz enzim-aktivitásnak a szerepe a hipoxia elleni védekezésben kísérletekkel alátámasztott tény, mivel a magban lévő keményítő AMY által történő bontása biztosítja az energiát a hajtás meghosszabbításához (Bailey-Serres és Voesenek 2008). A rizs képes alfa-amilázt szintetizálni anoxia stressz alatt is, míg más gabonafélék, mint az árpa, anoxia esetén nem képesek termelni ezt az enzimet, nem tudnak csírázni (Perata et al. 1993). Gubler et al. (1995) izoláltak egy gibberellinsav (GA) által regulált MYB (GAMYB) transzkripciós faktort, ami a high-pI alpha-amyláz gén promóterében lévő szabályozó elemhez (GARC: GA response complex) kötődik, és transz-aktiválja azt az árpa aleuron sejtekben. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a GAMYB gén része a GA-függő jelátviteli útnak, és a működése az AMY gén megnövekedett expresszójához vezet. Igazolták azt is, hogy a rizs és az árpa anaerob körülmények között eltérően reagál a GA-kezelésre: az árpaszemben nem indukálódik AMY transzkriptum anoxia alatt még GAkezelés hatására sem, szemben a rizzsel (Loreti et al. 2002). Kísérletünkben még anaerob körülmények között is megnövekedett AMY aktivitást mutattunk ki árpában, melyet a rizsből származó OsMYB4 transzkripciós faktor működésének tulajdonítunk. A transzgénikus vonalak nagyobb vigorral rendelkeztek a komplex stresszkezelés során, mint a vad GP, ami miatt feltételezhető az OsMYB4 gén szerepe az elárasztás során fellépő anoxiával szembeni védekezésben.

Oxigénhiányos környezetben a laktát dehidrogenáz (LDH) alakítja át a laktátot piruváttá, a glikolízis végső termékévé. Hanson és Jacobsen (1984) az LDH anaerob indukcióját írta le az árpa aleuronsejtekben. Mustroph és Albrecht (2003) megnövekedett LDH aktivitást mutatott ki gabonafélék csíráiban hipoxia és anoxia stresszel szemben. Kísérletünkben az L5 transzgénikus vonalban megnövekedett LDH aktivitást mutattunk ki enzimatikus szinten a hipoxia során, ill. az L1 és L5 vonalakban a kombinált (hipoxia és hideg) stressz-kezelés esetén is. Az L5 vonalnak még a hajtásában is szignifikánsan nagyobb LDH enzimaktivitást mértünk, mint a vad GP-ban. Ugyanakkor szemikvantitatív RT-PCR-rel az *LDH* gén expressziójában nem találtunk különbséget a vonalak között. Ez a megfigyelésünk poszt-transzkripcionális módosításokkal magyarázható. Egyre növekszik az ismeretünk arról, hogy a transzkripcionális mellet a poszt-transzkripcionális és poszt-transzlációs szabályozási mechanizmusok is fontos szerepet töltenek be az abiotikus stresszválaszban (Mazzucotelli et al. 2008; Floris et al. 2009). A poszt-transzkripcionális szabályozási mechanizmusok magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy bár egy gén expressziója azonos szintű lehet egyes transzgénikus vonalakban, de (a transzgén különböző helyre történő beépülése miatt) az enzimek eltérő mértékben működnek.

Az aszpartát aminotranszferáz (ASAT) enzim az aszpartát és alfa-ketoglutarát szubsztrátokat oxálacetáttá és glutamáttá alakítja át. A glutamát a transzamináció prekurzora; és így, a feltételezések szerint központi szerepet játszik az anaerob aminosav metabolizmusban. Szerepe azonban nem egyértelmű: ellentmondásos adatokat találhatunk az ASAT aktivitásának változására hipoxia alatt. Good és Muench (1992) nem mutatott ki ASAT aktivitás-növekedést árpa gyökérben, míg de Sousa és Sodek (2003) az enzim indukcióját mutatta ki szója gyökérben. A CSVT kísérletünk során az *OsMYB4* transzgénikus árpa vonalakban megnövekedett ASAT enzimaktivitást mutattunk ki hipoxia, és komplex stressz-kezelés (hipoxia együtt a hideggel) alatt, ill. a hajtás mintákban. Ez arra enged következtetni, hogy az ASAT fontos szerepet játszik a hipoxiával szembeni tolerancia kialakításában.

# 5.4. A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok fokozzák a tavaszi Golden Promise árpa fagytűrését

Osztályunkon a kenyérbúzában (Vágújfalvi et al. 2005) és alakorban (Knox et al. 2008) végzett kutatások során igazolták, hogy a fagyállóság genetikai kontrolljában két *CBF* gén (*CBF14* és 15) játszik kiemelkedő szerepet. A gének szerepét közvetlen módon bizonyítottuk transzgénikus árpavonalakon. Létrehoztunk 10 független *TaCBF14* transzformáns, és 18 független *TaCBF15* transzformáns vonalat, valamint 2 független transzformáns kontroll árpavonalat. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a transzgén fagytűrés kialakításában betöltött szerepét, a transzformáns vonalakat

- összehasonlítva a vad típusú tavaszi Golden Promise genotípussal - fagytesztnek vetettük alá. Mindegyik független *TaCBF* transzformáns vonal fagytűrését -11°C és -13°C-on teszteltük, a növényeket a fagytesztek előtt hideg-edzettük. A transzformáns vonalak egy része túlélte az alacsonyabb fagyasztási hőmérsékletet, így az eredmények igazolása miatt a -13°C-os fagytesztet megismételtük. Ezen kísérletek eredményei alapján szelektáltuk a fagyállóbb vonalakat. A 20. táblázatban rendhagyó módon összesítettem a mérési eredményeket. Csak azokat az eseteket szemléltettem a szignifikancia szintek jelölésével, ahol az adott transzformáns vonal mérési adata, vagy megfigyelési adata szignifikánsan jobb volt a vad típusénál.

**20. táblázat:** A *TaCBF* transzformáns vonalak (*TaCBF14* és *TaCBF15*) szelektálására végzett fagytesztek során kapott valamennyi mérési eredmény (fotoszintetikus aktivitás, bonitálás, konduktometria) szignifikancia szintje és a túlélési százalék adatok összesítése. FT: fagyteszt; kond: konduktometria. A vad típustól való szignifikáns eltérés jelölése: \* ; \*\* ; \*\*\* ha  $P \le 0.05$  ; 0.01 ; 0.001.

Vonalak		1. FT									2. FT			túlélési %				
		$F_v/F_m$			bonitálás			$F_v/F_m$ kond			bonitálás		$\nabla *$					
		24 h		48 h		1 hét		2 hét		24 h 48 h		24 h	1 hét	1 hét 2 hét		1. FT		2.FT
		-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C		-11°C	-13°C	-13°C
TaCBF14 transzformáns	4A/1/1		**		**	***	***	*	***	*	***	*			19	27,8	31,6	16,7
	4-5-6/1/1					*	**		*	*					5	12,5	10	
	5/1/1									**	***				5			
	6A/1/2	***			***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	27	36,8	15	50
	6B/1/1						**		**			**			6	11,8	18,8	
	21B/1/1				***	***	**	***	**			*			14	45	22,2	33,3
	23A/1/2					**	***		*			***		*	10	5,56	10,5	30
	23A/2/1					*			*	**	***	**		*	10	16,7	15,8	37,5
	23B/1/1					**	*								3	7,69		
	24/1/1		*		***	***	***	***	***			**		***	21	55,6	25	70
<b>TaCBF15</b> transzformáns	9A/1/1						**		*	**			*	*	7		11,8	50
	9A/2/1																	10
	9B/1/2																	
	12A/1/3					*									1	5,88		
	12B/1/1															5,56		
	12B/2/1					***		**							5	35,7		10
	12C/1/1																	
	12-18/1/1					*		*		*					3	20		
	12-18/2/1															9,09	5	20
	12-18/3/2																	
	12-18/4/1											**			2			20
	17/1/1									*		*			2	7,69		
	17/2/1																	
	17/3/1									**		**			4			20
	17/4/1																	10
	18/1/1												*		1	9,09		20
	19/1/2																	
	19/2/1																	

A szignifikancia szintek és a túlélési százalék alapján tudtuk lecsökkenteni a további kísérletekben a vizsgálandó vonalak számát. A két gén hatását összehasonlítva megállapítható, hogy a *TaCBF15* transzformáns vonalak nem mutattak olyan mértékű fagyállóságot, mint a *TaCBF14* transzformáns vonalak. A *TaCBF14* transzgénikus anyagból a 4A/1/1, 6A/1/2, 21B/1/1, 23A/1/2, 23A/2/1, 24/1/1 vonalakat, a *TaCBF15*-ösök közül a 9A/1/1, 12B/2/1, 12-18/2/1, 12-18/4/1, 17/3/1 vonalakat választottuk ki a további tesztekhez.

A szelektált vonalak fagytesztjét, hideg-edzést alkalmazva, a homozigóta  $T_2$  nemzedéken végeztük el. A fagykezelés hatására a transzformáns vonalak levele a konduktancia-vizsgálatok alapján kevésbé károsodott, mint a vad típus levelei. A PSII rendszerük kevésbé sérült, mivel a leveleiken mért  $F_v/F_m$  értékek szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a vad típuson mért értékek. A regenerálódás mértéke (bonitálás) és a túlélési százalék alapján is a vizsgált *TaCBF14* transzformáns vonalak, és a *TaCBF15* transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 fagyállóbbnak bizonyult, mint a vad típusú Golden Promise. A többi tanulmányozott *TaCBF15* transzformáns vonal enyhén megnövekedett fagytűrést mutatott. A homozigóta  $T_2$  nemzedéken kapott eredményeink jobbak, mint a  $T_1$  generáció fagytesztjeinek eredményei, a különbségek a vad típushoz képest karakterisztikusabbak.

Mivel a *TaCBF* transzformáns árpákban a transzgén konstitutívan expresszálódik, ezért edzési periódus (induktív körülmény) nélküli fagytesztet is végeztünk a szelektált vonalakkal. Ennek során a fagyasztási hőmérsékletet 24 órán keresztül -6°C-on tartottuk. A fagyasztást követő 24 és 48 órás  $F_v/F_m$  mérések alapján nem volt mérhető károsító hatása a -6°C-os kezelésnek. Nem tapasztaltunk zavart a vad típus és a transzformáns vonalak PSII rendszerének működésében. Később jelentkezett a stressz hatása; a fagyasztás a vad típus számára letális volt, ellenben a fagyasztás utáni regenerációs periódus során a transzformáns vonalak - igaz, kis százalékban, de - képesek voltak regenerálódni. A kísérleti rendszerben a 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns) és a 9A/1/1 (*TaCBF15* transzformáns) vonalak fagytoleranciája bizonyult a legkiemelkedőbbnek. Az általunk alkalmazotthoz nagyon hasonló kísérleti rendszeren dolgoztak Morran és munkatársai (2011), akik búzából származó *TaDREB2* és *TaDREB3* transzkripciós faktorral transzformáltak Golden Promise tavaszi árpa genotípust, valamint búzát. A transzgén működését konstitutív (dupla *CaMV35S*), illetve szárazság-indukálható (*ZmRab17*) promóterrel szabályozták. Kimutatták, hogy a 3 hétig kontroll körülmények között előnevelt transzformáns árpa-növények 25-55 %-a túlélte a hirtelen, 12 órán át tartó -6°C-os fagykezelést.

Kísérleteinkkel igazoltuk a *TaCBF* transzformáns vonalak megnövekedett fagytűrését a vad típushoz képest. Ezáltal bizonyítottuk, hogy a *TaCBF14* és *TaCBF15* transzkripciós faktoroknak szerepe van a fagyállóság kialakításában. A homozigóta  $T_2$  nemzedéken végzett fagytesztek eredményei szerint a transzgén olyan mértékben megnövelte a fagytűrés mértékét, amely a Golden

Promise számára letális fagyasztási hőmérséklethez képest néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérséklet átvészelésére is képessé tette a vizsgált transzgénikus növényeket.

### 5.5. A TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe lehet az ozmotikus stressztolerancia kialakításában

Az ozmotikus stressz-indukálható gének egy része a promóterében egy CRT (C-repeat)/DRE (drought responsive element) rövidítéssel jelölt szekvenciát tartalmaz, amelyhez specifikusan kötődnek a CBF/DREB típusú transzkripciós faktorok, ezáltal szabályozva működésüket (Thomashow 1999, Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 2000). Számos kísérlettel igazolták, hogy adott CBF/DREB1 génnel transzformált növénynek - a megnőtt hideg-, vagy fagytűrés mellett megemelkedett a vízhiány (water deficit), a szárazság, az ozmotikus stressz, a deszikkáció, vagy a só stresszel szembeni toleranciája (összefoglaló: Hussain et al. 2011) is. Mivel igazolt, hogy a fagy relatív vízhiányos állapotot hoz létre a növényi sejtekben, a két-két legfagyállóbb transzgénikus vonalat (*TaCBF14*: 6A/1/2 és 24/1/1; *TaCBF15*: 9A/1/1 és 12-18/2/1) választottuk ki az ozmotikus stressztűrés tanulmányozására. A PEG kezelés hatására a 9A/1/1, a 12-18/2/1, és a 24/1/1 vonalak levelének relatív víztartalma szignifikánsan nagyobb volt a vad típusban mértnél. Eredményünk arra enged következtetni, hogy a tanulmányozott TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe lehet a szárazságtűrés kialakításában, az ozmotikus stressztűrés fokozásában. Ennek bizonyítására további kísérleteket kell végeznünk. Ezt az is indokolja, hogy PEG-kezelés mellett megnövekedett ozmotikus stressz-toleranciát tapasztaltak rizs OsDREB1B génnel transzformált dohányban (Gutha és Reddy 2008). Ezentúl az is, hogy Arabidopsis AtCBF1B gént konstitutívan expresszáló transzgénikus paradicsomban a transzgénikus növények víztartalma a vízhiány stressz során folyamatosan magas volt, a vad típussal szemben (Hsieh et al. 2002). E kísérletek igazolják, hogy a CBF géneknek szerepe van a vízháztartás fenntartásában. A továbbiakban ilyen irányba is kiterjesztjük kutatásainkat.

## 5.6. A vizsgált két TaCBF transzkripciós faktor befolyásolja a CBF regulonhoz tartozó gének expresszióját transzgénikus árpában

A LEA proteinek csoportjába tartozó négy gén (*HvCOR14b*, *HvA22*, *HvDHN5*, *HvDHN8*) és az árpa *CBF* gének közül a *HvCBF9* gén működését vizsgáltuk Real-Time RT-PCR módszerrel a 24/1/1 (*TaCBF14* transzformáns) és a 9A/1/1 (*TaCBF15* transzformáns) vonalak és a vad típusú Golden Promise kontroll és hideg-kezelt mintáin. Ezek azért informatív gének, mert bizonyított a szerepük a gabonafélék hidegedződésében és a fagyállóságuk kialakításában. Adataink igazolják, hogy a konstitutívan expresszálódó transzgén befolyásolja a vizsgált gének működését; legerőteljesebb hatást a HvCOR14b gén esetén tapasztaltaltuk. A HvCOR14b egy alacsonyhőmérsékleti stressz hatására expresszálódó gén (Crosatti et al. 1996, 1999, 2003, 2008; Giorni et al. 1999), melyet előszeretettel alkalmaznak a hideg-kezelés hatékonyságának igazolására gabonafélékben (Knox et al. 2008, Dhillon et al. 2010). A TaCBF14 és TaCBF15 transzgén már kontroll körülmények között is indukálta, és az közel olyan magas szinten expresszált, mint a vad típusban alacsony hőmérsékleti kezelés hatására. Morran és munkatársai (2011) ugyanilyen erős HvCOR14b expressziót tapasztaltak TaDREB3 transzformáns Golden Promise árpában. Ahogy Morran et al. (2011) a kísérleteiben, úgy a fagytesztjeink során a transzformáns növények megnövekedett fagytűrését mutattuk ki, akár a hidegedzési periódus elhagyása mellett is. A tanulmányozott CBF/DREB gének eszerint a HvCOR14b gén szabályozásán keresztül szerepet játszanak a fagyállóság kialakításában. A COR géneken kívül számos más gén szerepe is fontos a hidegedződés során, a fagytűrés kialakításában (összefoglaló tanulmány Arabidopsis-ról: Thomashow 1999, búza esetén: Winfield et al. 2010). A másik három tanulmányozott LEA proteint kódoló gén expressziós vizsgálata során, hasonlóan Morran et al. (2011) munkájához, néhányszor nagyobb génexpressziót detektáltunk a transzgénikus vonalakban - elsősorban a fagytesztek alapján legellenállóbb 24/1/1 vonalban -, mint a vad GP-ban, kontroll körülmények között. A túltermelt CBF/DREB transzgén pedig a hidegedződésben, a fagytűrés kialakításában résztvevő gének expressziójának, és végső soron fagytűrésnek a növekedését eredményezte.

A *HvCBF9* gén represszálódott a *TaDREB2* és *TaDREB3* transzgénikus árpa vonalakban (Morran et al. 2011), az általunk vizsgált *TaCBF14* és *TaCBF15* vonalakban pedig kevésbé indukálódott hidegkezelés hatására, mint a vad típusban. Ez felvet egy olyan kérdést, hogy vajon a *CBF/DREB* gének képesek-e egymást is szabályozni; egy *CBF/DREB* gén túltermeltetése, vagy akár csendesítése milyen hatással van a genomban kódolt többi *CBF/DREB* gén kifejeződésére. Expressziós vizsgálataink előkísérletnek tekinthetők; a jövőben ismétlő kísérlettel, valamennyi *CBF* gén vizsgálatával nagyobb biológiai mintaszámot alkalmazva törekedni fogunk az eredmények szórásának csökkentésére, hogy világosabb áttekintést nyújtsunk a CBF regulonhoz tartozó gének expressziós mintázatának változásáról. A *TaCBF14* és *TaCBF15* transzgén által okozott transzkriptom változást cDNS-microarray analízissel kívánjuk tisztázni, majd a legérdekesebb célgének expresszió-változását Real-Time RT-PCR módszerrel fogjuk validálni.

#### 5.7. A *TaCBF* transzgénikus árpavonalak fejlődése lassabb a vad típusú Golden Promise-énál

A vad típushoz képest fejlődésbeli visszamaradottságot, lassabb növekedést és késői virágzást tapasztaltunk a fagytesztek alapján szelektált TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktort

túltermelő árpavonalak üvegházi felszaporításakor. Nem mutattunk ki egyenes arányú korrelációt a visszamaradottság és a fagyállóság mértéke között. Az ellenállóbb transzgénikus vonalak mindegyike kisebb-nagyobb mértékben lemaradást mutatott a fejlődésében. A transzformáns kontroll és néhány transzformáns vonal a vad típusúval egy időben kezdett kalászolni, és fejlődésük során nem volt eltérés a növények magasságában. Nem maga a transzformáció, vagy a konstitutívan expresszálódó szelekciós markergén okozott zavart a fejlődésben, hanem a TaCBF transzgén kifejeződése. Hasonlóan Arabidopsis-ban, a CBF1, CBF2 és CBF3 gének konstitutív overexpressziója során lassabb fejlődést, kisebb-nagyobb mértékű törpeséget, és megkésett virágzást figyeltek meg (Liu et al. 1998, Gilmour et al. 2004). Továbbá számos más, CBF gént konstitutívan overexpresszáló transzformáns növényről jegyezték le a transzgén ilyen jellegű negatív hatását (Kasuga et al. 1999, Kim et al. 2004, Oh et al. 2007). Az effektust enyhíteni, csökkenteni tudták, ha a transzgén expresszióját szabályozó konstitutív promótert indukálható promóterre cserélték (Kasuga et al. 1999, Hsieh et al. 2002, Lee et al. 2003, Morran et al. 2011). Ugyanakkor, a szakirodalom tartalmaz ellenpéldát is, amikor a CBF transzgén konstitutív expressziója nem okozott fejlődésbeli eltérést a transzformáns növényben a vad típushoz képest (Jaglo-Ottosen et al. 1998, Oh et al. 2005, Wang et al. 2008).

Hogy miként hat a CBF gének túltermelése a növények fejlődésbeli visszamaradottságára, már számos kutatás tárgya volt. Az aminosav-szekvenciák tanulmányozásával kimutatták, hogy a DDF1 gén (dwarf and delayed-flowering 1) - ami egy AP2 transzkripciós faktort kódol filogenetikailag nagyon közel áll a CBF/DREB génekhez (Magome et al. 2004), továbbá igazolták ezt a DDF1 gént túltermelő Arabidopsis-ban, hogy a gibberellinek (GA-k) szintézise redukált. Ez törpeséget és késői virágzást okoz. Bizonyították, hogy a DDF1 gén indukálja a GA-deaktiváló gének transzkripcióját, amelyek csökkentik a bioaktív GA-k szintjét, ami pedig a DELLA fehérjék akkumulációját, és a növény növekedésének gátlását eredményezi (Magome et al. 2008). A DELLA proteinek a fejlődést-korlátozó fehérjéknek egy kis családjába tartoznak. A GA jelátviteli útban játszanak fontos szerepet (Harberd et al. 2009). Normál körülmények között, a bioaktív GA-k normál szintje mellett a DELLA fehérjék poli-ubiquitinálódnak, és a növény képes növekedni. Azonban, ha a bioaktív GA-k szintje lecsökken, a DELLA proteinek akkumulálódnak, és a növények fejlődése gátlódik. Achard et al. (2008) kimutatták, hogy CBF1 gént túltermelő, fokozott fagytűréssel rendelkező növényben megnő két olyan GA 2-oxidáz gén expressziója, ami a bioaktív GA-ket inaktívvá alakítja, és ezáltal törpeséget valamint késői virágzást eredményez. Bizonyították azt is, hogy a DELLA fehérjék aktivitása - azon túl, hogy a növények fejlődésére hat - szükséges ahhoz is, hogy a növények elérjék a maximális fagytoleranciájukat. Az, hogy a DELLA fehérjék milyen mechanizmuson keresztül hatnak a fagytűrés kialakítására, még nem tisztázott pontosan. A TaCBF14 és TaCBF15 transzformáns árpavonalakat azonban érdemes lenne ilyen megközelítésben is tanulmányozni, az *Arabidopsis*-ban már leírt DELLA fehérjéket kódoló gének árpahomológjainak expresszió-vizsgálatán keresztül.

Az elkészített pBract214-*TaCBF14*, ill. -*TaCBF15* konstrukciókkal az árpán kívül más gabonafélék transzformációját is elvégeztük. Mivel ezek a kísérletek még nem előrehaladottak, dolgozatomban nem mutattam be részletesen ezeket az eredményeket. A tavaszi Cadenza búzafajta biolisztikus transzformációjával sikeresen előállítottunk transzformáns vonalakat. A transzformáns vonalak azonosítását és a transzgén kópiaszámának meghatározását elvégeztük. Jelenleg a stabil transzformáns búzavonalak fagyteszt alapú szelekcióján dolgozunk. A gének funkcióját búzában indirekt módon, a gének csendesítésével is bizonyítani kívánjuk. Ehhez az RNS interferencián (RNAi) alapuló konstrukciókat elkészítettük, és szintén biolisztikus módszerrel a búza transzformációját elvégeztük. Az RNAi vonalak közül a stabil transzformánsokat igyekezünk kiválogatni a tesztelésekhez. Mivel a rizs sokkal érzékenyebb a hidegre, mint az árpa vagy a búza, és transzformációja viszonylag könnyebben kivitelezhető, mint az árpa, de főleg a búza genetikai módosítása, tervezzük *TaCBF14* és *TaCBF15* transzformáns rizs vonalak előállítását is. Így egy komplex transzformációs rendszeren, direkt és indirekt módon is bizonyíthatjuk a két *TaCBF* gén szerepét az abiotikus stressztolerancia kialakításában.

### 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A termesztett őszi gabonafélék télállóságának növelése/fokozása fő szempont a növénynemesítés számára. A modern molekuláris biológiai módszereket is használó agrárkutatások egyik alapvető célja azoknak a géneknek, illetve génregulációs rendszereknek a felderítése, amelyek befolyásolják a növények stressztűrését a - sok esetben hirtelen fellépő - abiotikus stresszekkel szemben. E kutatások intenzíven tanulmányozott területe az alacsony-hőmérsékleti stressztolerancia, a fagyállóság kialakulásának molekuláris szabályozása.

A génfunkciós vizsgálatok egyik módja, ha egy recipiens szervezetet transzformálnak a vizsgálandó génnel. Ezt követően tanulmányozzák a transzformáns szervezet megváltozott tulajdonságait, ily módon bizonyítva a transz- vagy ciszgén funkcióját. A génműködés szabályozásában alapvető szerepet játszanak a transzkripciós faktorok, melyek egy sor másik gén be-, és kikapcsolásával biztosítják az adekvát sejt, illetve növényszintű adaptációt. Így a transzkripciós faktorral történő transzformációval számos más, a gazdanövényben lévő gén működését, és ennek eredményeként stressztoleranciáját befolyásolhatjuk.

Munkánk során célul tűztük ki a rizsből izolált, elsősorban hidegre indukálódó OsMYB4; illetve a búzából izolált, korábbi kísérletek szerint a fagytűrés kialakításában szerepet játszó két TaCBF transzkripciós faktor funkcionális vizsgálatát. A génekkel tavaszi árpát (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) transzformáltunk, majd vizsgáltuk a transzformáns vonalak abiotikus stressztoleranciáját.

A rizs *OsMYB4* gén egy R2/R3 típusú transzkripciós faktort kódol, amelynek expressziója alacsony hőmérsékleten indukálódik. Mivel a szakirodalom szerint *OsMYB4* génnel transzformált növényekben megnövekedett toleranciát mutattak ki különböző abiotikus stresszekkel szemben, ezért előállítottunk nyolc *OsMYB4* transzformáns árpavonalat, melyekben a transzgén működését egy indukálható promóter, az *Arabidopsis thaliana*-ból izolált *cor15a* szabályozza. Vizsgáltuk a transzformáns vonalak stressztűrő-képességét hideg-, fagy-, és komplex (anoxia és hideg együtt) stresszkezelés során. A transzgénikus vonalak stressz-tűrését a vad típusú Golden Promise-hoz hasonlítottuk a kísérletek folyamán. -11°C és -12°C-on történt fagyasztás után a vad típushoz képest szignifikánsan nagyobb klorofill indukciós paramétereket mértünk a szelektált transzformáns vonalakban. Ezeknek a vonalaknak a PSII rendszere aktívabban működött, mely egyértelműen jelezte az *OsMYB4* transzgén fagyállóságra gyakorolt hatását. Azonban ez a javulás a teljes növény szintjén már nem volt elegendő ahhoz, hogy az *OsMYB4* transzformáns vonalak túléljék a vad típus

Az anoxia és hideg együttes stressz-kezelésnek (CSVT: Complex Stressing Vigour Test) kitett *OsMYB4* transzgénikus árpaszemek szignifikánsan jobban fejlődtek a vad típussal szemben, a

transzgénikus vonalak csírázó növényei nagyobb vigorral rendelkeztek, hosszabb hajtást fejlesztettek. A transzformáns árpákban az anaerob anyagcserében résztvevő enzimek működését vizsgálva az alfa-amiláz, a laktát dehidrogenáz és az aszpartát aminotranszferáz megnövekedett enzimaktivitását mutattunk ki, mely hatást a rizsből származó OsMYB4 transzkripciós faktor működésének tulajdonítunk. Következtetéseink szerint az *OsMYB4* gén expressziója a csíra vigorának fokozásával megnöveli a Golden Promise árpa fent említett stresszekkel szembeni toleranciáját.

A növényi abiotikus stressz-tolerancia kialakításában szerepet játszó transzkripciós faktorok közül az egyik legintenzívebben tanulmányozott a CBF géncsalád. Számos tanulmányban kimutatták, hogy adott CBF génnel transzformált növénynek megnőtt a hideg-, és/vagy fagytűrése, illetve a vízhiányos stresszel szembeni toleranciája. Az Osztályunkon folyó korábbi kísérletek során kimutatták, hogy a búza fagytűrésének kialakításában két CBF transzkripciós faktor játszik kiemelkedő szerepet. Azzal a céllal transzformáltuk a Golden Promise tavaszi árpát, hogy direkt módon, a gének konstitutív túltermeltetésével, és a recipiens növény megnövekedett fagytűrésével bizonyítsuk a gének szerepét. Sikeresen előállítottunk 2 független transzformáns kontroll, 10 független TaCBF14 és 18 független TaCBF15 stabil transzformáns vonalat (a transzformációs gyakoriság ebben a sorrendben: 3,33%; 7,29%; 12,32% volt), melyek fagytűrését edzési periódussal -11°C és -13°C-on, edzési periódus nélkül -6°C-on teszteltük. A sorozatos fagytesztek során a regenerálódás mértéke (bonitálás), a túlélési százalék, a klorofill fluoreszcens mérések, valamint a konduktancia vizsgálatok alapján szelektáltuk a legellenállóbb vonalakat. Az így azonosított hat TaCBF14 transzformáns vonal, és a TaCBF15 transzformáns vonalak közül a 9A/1/1 fagyállóbbnak bizonyult, mint a vad típusú Golden Promise. Eszerint a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktorok olyan mértékben megnövelték a transzgénikus vonalak fagytűrését, mely a vad típus számára letális fagyasztási hőmérsékletnél néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérséklet átvészelésére is képessé tette azokat. A többi tanulmányozott TaCBF15 transzformáns vonal enyhén megnövekedett fagytűrést mutatott. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepük van a fagyállóság kialakításában.

A konstitutívan expresszálódó transzgén befolyásolta a normál esetben hidegre indukálódó *HvCOR14b* fagyállósági gén működését. Mind a *TaCBF14*, mind a *TaCBF15* transzgén már kontroll körülmények között is indukálta e gén expresszióját. A gén kifejeződésének mértéke közel olyan magas szintű volt a transzgénikus vonalakban, mint a vad típusban mért expresszió alacsony hőmérsékleti kezelés hatására.

Előkísérlettel tanulmányoztuk néhány, a fagytesztek során a vad típusnál ellenállóbbnak bizonyult *TaCBF* transzformáns vonal ozmotikus stressz-toleranciáját. Első eredményeink szerint a

TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktoroknak szerepe lehet az ozmotikus stressz, illetve a szárazság elleni védekezésben is.

Jelenleg a fagytesztek alapján szelektált vonalak homozigóta nemzedékének felszaporításán dolgozunk. Ahogy már korábbi *CBF* transzformációs kísérletekben is tapasztalták, a vad típushoz képest fejlődésbeli visszamaradottságot, lassabb növekedést és késői virágzást figyeltünk meg a TaCBF14 és TaCBF15 transzkripciós faktort túltermelő árpák esetén, melyet valószínűleg a *CBF* gének gibberellin jelátviteli útra gyakorolt hatása, a bioaktív gibberellinek inaktivációja okoz. A szelektált homozigóta *TaCBF* transzgénikus vonalak kiváló alapanyagként felhasználhatók jövőbeni funkcionális genomikai vizsgálatainkhoz, a CBF regulonhoz tartozó gének tanulmányozásához, és a CBF-ek szárazságtűrésben betöltött szerepének tisztázásához.

### 7. SUMMARY

The enhancement of winter hardiness is the most important tasks facing breeders of winter cereals. Agricultural scientists are now using modern molecular biological methods to identify genes or gene regulation systems that influence the tolerance of plants to abiotic stress factors, which often occur extremely unpredictably. Frequently studied phenomena is the tolerance of low temperature stress and the molecular control of frost resistance.

One way of examining gene functions is to transform a recipient organism with the gene to be analysed, and then to study how the phenotype of the transformed organism change as the result of trans- or cis-gene functioning. Transcription factors play a major role in regulating gene function, switching other genes on or off in order to ensure adequate adaptation at the cellular or plant level. Transformation involving transcription factors can thus be used to influence the functioning of numerous other genes in the host plant, leading to changes in stress tolerance.

The aim of the present work was to carry out functional analysis on the OsMYB4 transcription factor isolated from rice, which is primarily induced by cold, and two TaCBF transcription factors shown by previous experiments to play a role in the development of frost tolerance. These genes were used to transform spring barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise), after which the abiotic stress tolerance of the transformed lines was examined.

The cold inducable *OsMYB4* gene of rice codes for a transcription factor of the R2/R3 type *MYB* gene. The data from the literature, which indicate that plants transformed with the *OsMYB4* gene have enhanced tolerance to various abiotic stress factors led us to develop eight *OsMYB4* transgenic barley lines, in which the functioning of the transgene was regulated by *cor15a*, an inducible promoter isolated from *Arabidopsis thaliana*. The stress tolerance of these transgenic lines was studied in the course of exposure to cold, frost and in a combination of anoxia and cold stress. The level of tolerance in the transgenic lines was compared to that of wild-type Golden Promise plants in each case. After freezing at  $-11^{\circ}$ C and  $-12^{\circ}$ C significantly higher chlorophyll induction parameters were recorded in selected transgenic lines than in the wild type. The PSII system of these lines functioned more intensively, clearly indicating the effect of the *OsMYB4* transgene. However, this improvement at the whole plant level was not sufficient to enable the *OsMYB4* transgenic lines to survive freezing temperatures that were lethal to the wild type.

*OsMYB4* transgenic barley grains subjected to combined anoxia and cold (complex stressing vigour test: CSVT) exhibited far better development than the wild type, and the seedlings of transgenic lines had greater vigour, developing longer shoots. Increased levels of anoxic-related enzymes, such as alpha-amylase, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase were detected in the transformed barley lines, which was attributed to the functioning of the OsMYB4

transcription factor originating from rice. It was concluded that the expression of the *OsMYB4* gene increased the tolerance of Golden Promise barley to these stress factors by enhancing the vigour of the seedlings.

Among the transcription factors involved in the development of abiotic stress tolerance, the *CBF* gene family has been investigated in the greatest depth. Numerous studies have demonstrated that plants transformed with a given CBF gene exhibit better tolerance of cold and/or frost, or of drought stress. It was proved in earlier experiments in Martonvásár that two CBF transcription factors have an outstanding role in the development of frost tolerance in wheat. The transformation of the Golden Promise spring barley plants was designed to prove the role of these genes directly by detecting the constitutive over-expression of the genes and the enhanced frost tolerance of the recipient plants. Two independent transgenic control lines, 10 independent, stable transgenic lines for TaCBF14 and 18 for TaCBF15 were successfully developed (with transformation frequencies of 3.33%, 7.29% and 12.32%, respectively), the frost tolerance of which was tested at  $-11^{\circ}C$  and -13°C after a period of hardening or at -6°C without hardening. The most resistant lines were selected on the basis of scoring for regeneration, survival percentage, chlorophyll fluorescence parameters and conductance. Six transgenic TaCBF14 lines and the 9A/1/1 transgenic TaCBF15 line proved to be more frost-resistant than the wild-type Golden Promise. The TaCBF14 and TaCBF15 transcription factors thus increased the frost tolerance of the transgenic lines to such an extent that they were able to survive freezing temperatures several degrees lower than that which proved lethal to the wild type. The remainder of the *TaCBF15* transgenic lines exhibited a slight increase in frost tolerance. The experiments proved that the transcription factors TaCBF14 and TaCBF15 play a role in the development of frost resistance.

The constitutive expression of the transgene influenced the functioning of the *HvCOR14b* frost resistance gene, which is normally induced by cold. Both the *TaCBF14* and the *TaCBF15* transgenes induced the expression of this gene even under control conditions. The level of gene expression in the transgenic lines was almost as high as that in the wild type after low temperature treatment.

A preliminary experiment was performed to investigate the osmotic stress tolerance of *TaCBF* transgenic lines exhibiting greater resistance than the wild type in the frost tests. The results suggest that the TaCBF14 and TaCBF15 transcription factors may also play a role in defence against osmotic stress and drought.

At present the homozygous generation of lines selected on the basis of the frost tests is being multiplied. As experienced in previous *CBF* transformation experiments, barley plants over-expressing the TaCBF14 and TaCBF15 transcription factors exhibit retarded development, slower growth and later flowering, probably due to the effect of the *CBF* genes on the gibberellin signal

transduction pathway, causing the inactivation of bioactive gibberellins. The selected homozygous *TaCBF* transgenic lines will be excellent basic material for future experiments on functional genomics, for investigations on genes belonging to the CBF regulon and for clarifying the role of CBFs in drought tolerance.

### M1. IRODALOMJEGYZÉK

ACHARD P., GONG F., CHEMINANT S., ALIOUA M., HEDDEN P., GENSCHIK P. (2008): The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, 20 (8): 2117–2129. p.

ALONSO J.M., ECKER J.R. (2006): Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics*, 7: 524-536. p.

AN G., EVERT P.R., MITRA A., HA S.B. (1988): Binary vectors. In: GELVIN S.B., SCHILPEROORT R.A. (Szerk.): *Plant Molecular Biology Manual A3*. Kluwer Academic Press, 1-19. p.

BADAWI M., DANYLUK J., BOUCHO B., HOUDE M., SARHAN F. (2007): The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Molecular Genetics and Genomics*, 277 (5): 533-554. p.

BAILEY-SERRES J., VOESENEK L.A.C.J. (2008): Flooding stress: acclimations and genetic diversity, *Annual Review of Plant Physiology*, 59: 313-339. p.

BAKER S.S., WILHELM K.S., THOMASHOW M.F. (1994): The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, 24 (5): 701-713. p.

BARLA-SZABÓ G., DOLINKA B. (1988): Complex Stressing Vigour Test: a new method for wheat and maize seeds. *Seed Science and Technology*, 16: 63-73. p.

BARTLETT J.G., ALVES S.C., SMEDLEY M., SNAPE J.W., HARWOOD W.A. (2008): High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4: 22. p.

BHATNAGAR-MATHUR P., VADEZ V., SHARMA K.K. (2008): Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27 (3): 411-424. p.

BOOKOUT A.L., MANGELSDORF D.J. (2003): Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, 1: e012.; DOI: 10.1621/nrs.01012

BURTON R.A., SHIRLEY N.J., KING B.J., HARVEY A.J., FINCHER D.G. (2004): The *CesA* gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology*, 134: 224-236. p.

BUTLER W.L., KITAJIMA M. (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 376 (1): 116-125. p.

CAMPOLI C., MATUS-CÁDIZ M.A., POZNIAK C.J., CATTIVELLI L., FOWLER D.B. (2009): Comparative expression of *Cbf* genes in the *Triticeae* under different acclimation induction temperatures. *Molecular Genetics and Genomics*, 282 (2): 141-152. p.

CAZZULO J.J., JUAN S.M., SEGURA E.L. (1977): Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56 (3): 301-303. p.

CENTURY K., REUBER T.L., RATCLIFFE O.J. (2008): Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant Physiology*, 147 (1): 20-29. p.

CHINNUSAMY V., OHTA M., KANRAR S., LEE B.H., HONG X., AGARWAL M., ZHU J.K. (2003): ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes and Development*, 17: 1043-1054. p.

CHINNUSAMY V., ZHU J.K., SUNKAR R. (2010) Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639: 39-55. p.

CHRISTENSEN A.H., SHARROCK R.A., QUAIL P.H. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689. p.

COOK D., FOWLER S., FIEHN O., THOMASHOW M.F. (2004): A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101 (42): 15243-15248. p.

CROSATTI C., DE LAURETO P.P., BASSI R., CATTIVELLI L. (1999): The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene cor14b and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiology*, 119 (2): 671-680. p.

CROSATTI C, MARÈ C, MAZZUCOTELLI E, BELLONI S, BARILLI S, BASSI R, DUBCOVSKY J, GALIBA G, STANCA AM, CATTIVELLI L (2003): Genetic analysis of the expression of the cold-regulated gene cor14b: a way toward the identification of components of the cold response signal transduction in Triticeae. *Canadian Journal of Botany*, 81 (2): 1162-1167. p.

CROSATTI C., NEVO E., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (1996): Genetic analysis of the accumulation of COR14 proteins in wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare*) barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (5-6): 975-981. p.

CROSATTI C., PAGANI D., CATTIVELLI L., STANCA A.M., RIZZA F. (2008): Effect of growth stage and hardening conditions on the association between frost resistance and the expression of the cold-induced protein COR14B in barley. *Environmental and Experimental Botany*, 62 (2): 93-100. p.

DENNIS E.S., DOLFERUS R., ELLIS M., RAHMAN M., WU Y., HOEREN F.U., GROVER A., ISMOND K.P., GOOD A.G., PEACOCK W.J. (2000): Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 51 (342): 89-97. p.

DE SOUSA C.A.F., SODEK L. (2003): Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environmental and Experimental Botany*, 50 (1): 1-8. p.

DHILLON T., PEARCE S., STOCKINGER E.J., DISTELFELD A., LI C., KNOX A.K., VASHEGYI I., VÁGÚJFALVI A., GALIBA G., DUBCOVSKY J. (2010): Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN-1* connection. *Plant Physiology*, 153 (4): 1846-1858. p.

DOYLE J.J., DOYLE J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15. p.

DUBOS C., STRACKE R., GROTEWOLD E., WEISSHAAR B., MARTIN C., LEPINIEC L. (2010): MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15 (10): 573-581. p.

DUBOUZET J.G., SAKUMA Y., ITO Y., KASUGA M., DUBOUZET E.G., MIURA S., SEKI M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2003): OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33 (4): 751-763. p.

FLORIS M., MAHGOUB H., LANET E., ROBAGLIA C., MENAND B. (2009): Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (7): 3168-3185. p.

FOWLER S., COOK D., THOMASHOW M.F. (2005): The CBF cold-response pathway. 71-99. p. In: JENKS M.A., HASEGAWA P.M. (Szerk.): *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing, 270 p.

FOWLER S., THOMASHOW M.F. (2002): Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold-response pathway. *The Plant Cell*, 14 (8): 1675-1690. p.

FRANCIA E., RIZZA F., CATTIVELLI L., STANCA A.M., GALIBA G., TÓTH B., HAYES P.M., SKINNER J.S., PECCHIONI N. (2004): Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) · 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (4): 670-680. p.

FUKAO T., BAILEY-SERRES J. (2004): Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? *TRENDS in Plant Science*, 9 (9): 449-456. p.

GALIBA G., KEREPESI I., SNAPE J.W., SUTKA J. (1997): Location of a gene regulating coldinduced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (1-2): 265-270. p. 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 (7): 1174-1179. p.

GALIBA G., VÁGÚJFALVI A., LI C., SOLTÉSZ A., DUBCOVSKY J. (2009): Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science*, 176 (1): 12-19. p.

GARFINKEL M., NESTER E.W. (1980): Agrobacterium tumefaciens mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology*, 144 (2): 732-743. p.

GILMOUR S.J., FOWLER S.G., THOMASHOW M.F. (2004): Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology*, 54 (5): 767–781. p.

GILMOUR S.J., ZARKA D.G., STOCKINGER E.J., SALAZAR M.P., HOUGHTON J.M., THOMASHOW M.F. (1998): Low temperature regulation of the *Arabidopsis CBF* family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal*, 16 (4): 433-442. p.

GIORNI E., CROSATTI C., BALDI P., GROSSI M., MARÈ C., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (1999): Cold-regulated gene expression during winter in frost tolerant and frost susceptible barley cultivars grown under field conditions. *Euphytica*, 106 (2): 149-157. p.

GOOD A.G., MUENCH D.G. (1992): Purification and characterization of an aerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. *Plant Physiology*, 99 (4): 1520-1525. p.

GOODRICH J.A., TJIAN R. (2006): Transcription: The Never Ending Story. In: MA J. (Szerk.): *Gene expression and regulation*. Higher Education Press Distributed by Springer Science and Business Media, 3-18. p.

GUBLER F., KALLA R., ROBERTS J.K., JACOBSEN J.V. (1995): Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *The Plant Cell*, 7 (11): 1879-1891. p.

GUTHA L.R., REDDY A.R. (2008): Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 68 (6): 533-555. p.

HAAKE V., COOK D., RIECHMANN J.L., PINEDA O., THOMASHOW M.F., ZHANG J.Z. (2002): Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130 (2): 639-648. p.

HAMPTON J.G, TEKRONY D.M. (1995): ISTA - Handbook of Vigour Test Methods (Harmadik Kiadás), International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland, 79-85. p.

HANSON A.D., JACOBSEN J.V. (1984): Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and alpha-amylase by O2 deficit in barley aleurone layers. *Plant Physiology*, 75 (3): 566-572. p.

HARBERD N.P., BELFIELD E., YASUMURA Y. (2009): The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *The Plant Cell*, 21 (5): 1328-1339. p.

HARWOOD W.A., BARTLETT J.G., ALVES S.C., PERRY M., SMEDLEY M.A., LEYLAND N., SNAPE J.W. (2008): Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques. In: JONES H.D., SHEWRY P.R. (Szerk.): *Transgenic wheat, barley and oats: Production and Characterization Protocols*. Humana Press, Methods in Molecular Biology, 478: 137-147. p.

HOEREN F.U., DOLFERUS R., WU Y., PEACOCK W.J., DENNIES E.S. (1998): Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics*, 149 (2): 479-490. p.

HOFFMAN N.E., BENT A.F., HANSON A.D. (1986): Induction of Lactate Dehydrogenase isozymes by oxigen deficit in barley root tissue, *Plant Physiology*, 82 (3): 658-663. p.

HSIEH T.H., LEE J.T., CHARNG Y.Y., CHAN M.T. (2002): Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*, 130 (2): 618-626. p.
HUSSAIN S.S., KAYANI M.A., AMJAD M. (2011): Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnology Progress*, 27 (2): 297-306. p.

INGRAM J., BARTELS D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403. p.

ITO Y., KATSURA K., MARUYAMA K., TAJI T., KOBAYASHI M., SEKI M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2006): Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 47 (1): 141-153. p.

JAGLO K.R., KLEFF S., AMUNDSEN K.L., ZHANG X., HAAKE V., ZHANG J.Z., DEITS T., THOMASHOW M.F. (2001): Components of the Arabidopsis C-repeat/Dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology*, 127 (3): 910-917. p.

JAGLO-OTTOSEN K.R., GILMOUR S.J., ZARKA D.G., SCHABENBERGER O., THOMASHOW M.F. (1998): Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280 (5360): 104-106. p.

JENKS M.A., HASEGAWA P.M. (Szerk.) (2005): Plant Abiotic Stress. Blackwell Publishing, 270 p.

JENKS M.A., WOOD A.J. (Szerk.) (2010): Genes for plant abiotic stress. Blackwell Publishing, 314 p.

JIN H., MARTIN C. (1999): Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*, 41 (5): 577-585. p.

KASUGA M., LIU Q., MIURA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1999): Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17 (3): 287-291. p. KIM H.J., HYUN Y., PARK J.Y., PARK M.J., PARK M.K., KIM M.D., KIM H.J., LEE M.H., MOON J., LEE I., KIM J. (2004): A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, 36 (2): 167-171. p.

KLEMPNAUER K.H., GONDA T.J., BISHOP J.M. (1982): Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 31 (2): 453-463. p.

KNOX A.K., LI C., VÁGÚJFALVI A., GALIBA G., STOCKINGER E.J., DUBCOVSKY J. (2008): Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus  $Fr-A^m2$  in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology*, 67 (3): 257-270. p.

LAURA M., CONSONNI R., LOCATELLI F., FUMAGALLI E., ALLAVENA A., CORAGGIO I., MATTANA M. (2010): Metabolic response to cold and freezing of *Osteospermum ecklonis* overexpressing *Osmyb4*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (9): 764-771. p.

LEE J.T., PRASAD V., YANG P.T., WU J.F., HO T.H.D., CHARNG Y.Y., CHAN M.T. (2003): Expression of Arabidopsis CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell and Environment*, 26 (7): 1181-1190. p.

LEVITT J. (1980): Responses of plants to environmental stresses. Második kiadás, Academic Press, New York, 607 p.

LIU Q., KASUGA M., SAKUMA Y., ABE H., MIURA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1998): Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10 (8): 1391-1406. p.

LORETI E., VERNIERI P., ALPI A., PERATA P. (2002): Repression of  $\alpha$ -amylase activity by anoxia in grains of barley is independent of ethanol toxicity or action of abscisic acid. *Plant Biology*, 4 (2): 266-272. p.

MAGOME H., YAMAGUCHI S., HANADA A., KAMIYA Y., ODA K. (2004): Dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*, 37 (5): 720-729. p.

MAGOME H., YAMAGUCHI S., HANADA A., KAMIYA Y., ODA K. (2008): The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA20x7, under high-salinity stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 56 (4): 613-626. p.

MARTIN C., PAZ-ARES J. (1997): MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 13 (2): 67-73. p.

MATTANA M., BIAZZI E., CONSONI R., LOCATELLI F., VANNINI C., PROVERA S., CORAGGIO I. (2005): Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 125 (2): 212-223. p.

MATTHEWS P.R., WANG M.B., WATERHOUSE P.M., THORNTON S., FIEG S.J., GUBLER F., JACOBSEN J.V. (2001): Marker gene elimination from transgenic barley, using cotransformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding*, 7 (3): 195-202. p.

MAZZUCOTELLI E, MASTRANGELO AM, CROSATTI C, GUERRA D, STANCA AM, CATTIVELLI L (2008): Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and posttranslational regulations control transcription. *Plant Science*, 174 (4): 420-431. p.

MEDINA J., BARGUES M., TEROL J., PÉREZ-ALONSO M., SALINAS J. (1999): The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, 119 (2): 463-469. p.

MILLER A.K., GALIBA G., DUBCOVSKY J. (2006): A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-Am2* in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 275 (2): 193–203. p.

MITSUDA N., OHME-TAKAGI M. (2009): Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50 (7): 1232-1248. p.

MOLNÁR I., GÁSPÁR L., SÁRVÁRI É., DULAI S., HOFFMANN B., MOLNÁR-LÁNG M., GALIBA G. (2004): Physiological and morpholgical responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31 (12): 1149-1159. p.

MORRAN S., EINI O., PYVOVARENKO T., PARENT B., SINGH R., ISMAGUL A., ELIBY S., SHIRLEY N., LANGRIDGE P., LOPATO S. (2011): Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9 (2): 230-249. p.

MUSTROPH A., ALBRECHT G. (2003): Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia. *Physiologia Plantarum*, 117 (4): 508-520. p.

NAGY Z., GALIBA G. (1995): Drought and salt tolerance are not necessarily linked: a study on wheat varieties differing in drought tolerance under consecutive water and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*, 145 (1-2): 168-174. p.

NAKASHIMA K., SHINWARI Z.K., SAKUMA Y., SEKI M., MIURA S., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2000): Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, 42 (4): 657-665. p.

NAVARRO M., MARQUE G., AYAX C., KELLER G., BORGES J.P., MARQUE C., TEULIERES C. (2009): Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal of Experimental Botany*, 60 (9): 2713-2724. p.

NOVILLO F., MEDINA J., SALINAS J. (2007): *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (52): 21002-21007. p.

OH S.J., KWON C.W., CHOI D.W., SONG S.I., KIM J.K. (2007): Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (5): 646-656. p.

OH S.J., SONG S.I., KIM Y.S., JANG H.J., KIM S.Y., KIM M., KIM Y.K., NAHM B.H., KIM J.K. (2005): Arabidopsis CBF3 / DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology*, 138 (1): 341-351. p.

PANDOLFI D., SOLINAS G., VALLE G., CORAGGIO I. (1997): Cloning of a cDNA encoding a novel *myb* gene (accession no. Y11414) highly expressed in cold stressed rice coleoptiles (Plant Gene Register PGR 97-079). *Plant Physiology*, 114: 747-749. p.

PAREEK A., SOPORY S.K., BOHNERT H.J., GOVINDJEE (Szerk.) (2010): Abiotic stress adaptation in plants. Published by Springer, 526 p.

PARK M.R., YUN K.Y., MOHANTY B., HERATH V., XU F., WIJAYA E., BAJIC V.B., YUN S.J., DE LOS REYES B.G. (2010): Supra-optimal expression of the cold-regulated *OsMyb4* transcription factor in transgenic rice changes the complexity of transcriptional network with major effect on stress tolerance and panicle development. *Plant, Cell and Environment*, 33 (12): 2209-2230. p.

PASQUALI G., BIRICOLTI S., LOCATELLI F., BALDONI E., MATTANA M. (2008): *Osmyb4* expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Report*, 27 (10): 1677-1686. p.

PAZ-ARES J., GHOSAL D., WIENAND U., PETERSON P.A., SAEDLER H. (1987): The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal*, 6 (12): 3553-3558. p.

PELAZ S., TAPIA-LOPEZ R., ALVAREZ-BUYLLA E.R., YANOFSKY M.F. (2001): Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Current Biology*, 11 (3): 182-184. p.

PERATA P., GESHI N., YAMAGUCHY J., AKAZAWA T. (1993): Effect of anoxia on the induction of alpha-amylase in cereal seeds. *Planta*, 191 (3): 402-408. p.

PETHŐ M. (1993): Mezőgazdasági növények élettana. Második, átdolgozott kiadás, Akadémiai Kiadó, Budapest, 349-391. p.

RIECHMANN J.L., HEARD J., MARTIN G., REUBER L., JIANG C., KEDDIE J., ADAM L., PINEDA O., RATCLIFFE O.J., SAMAHA R.R., CREELMAN R., PILGRIM M., BROUN P., ZHANG J.Z., GHANDEHARI D., SHERMAN B.K., YU G.L. (2000a): Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105-2110. p.

RIECHMANN J.L., RATCLIFFE O.J. (2000b): A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (5): 423-434. p.

RIZZA F., PAGANI D., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (2001): Use of chlorophyll fuorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding*, 120 (5): 389-396. p.

ROMEUF I., TESSIER D., DARDEVET M., BRANLARD G., CHARMET G., RAVEL C. (2010): wDBTF: an integrated database resource for studying wheat transcription factor families. *BMC Genomics*, 11: 185. p.

ROY S.J., TUCKER E.J. TESTER M. (2011): Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 232-239. p.

SAIBO N.J.M., LOURENCO T., OLIVEIRA M.M. (2009): Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103 (4): 609-623. p.

SAKUMA Y., LIU Q., DUBOUZET J.G., ABE H., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2002): DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290 (3): 998-1009. p.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. (Harmadik Kiadás), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.33.

SAUVAGE F.X., ROMIEU C.G., FLANZY C., ROBIN J.P. (1991): Aminortansferases in Grapes. Isolation and Characterization of Aspartate Aminotrasferase. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42 (3): 209-218. p. SCHONFELD M.A., JOHNSON R.C., CARVER B.F., MORNHINWEG W.D. (1988): Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28 (3): 526-531. p.

SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3): 217-223. p.

STEPONKUS P.L. (1984): Role of the plasma membran in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 543-584. p.

STEPONKUS P.L., UEMURA M., WEBB M.S. (1993): Membrane destabilization during freezeinduced dehydration. *Current Topics in Plant Physiology*, 10: 37-47. p.

STOCKINGER E.J., GILMOUR S.J., THOMASHOW M.F. (1997): Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94 (3): 1035-1040. p.

SUNG D.Y., KAPLAN F., LEE K.J., GUY C.L. (2003): Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*, 8 (4): 179-187. p.

SURVILA M., HEINO P., PALVA E.T. (2010): Genes and Gene Regulation for Low-temperature Tolerance.. In: JENKS M.A., WOOD A.J. (Szerk.): *Genes for Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing, 185 p.

SUTKA J. (1981): Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 59 (3): 145-152. p.

THOMASHOW M.F. (1999): Plant cold acclimation: freezing tolerance genes regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 571-599. p.

THOMASHOW M.F. (2010): Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold responsive pathway. *Plant Physiology*, 154 (2): 571-577. p.

TINGAY S., MCELROY D., KALLA R., FIEG S., WANG M., THORNTON S., BRETTELL R. (1997): Agrobacterium tumefaciens –mediated barley transformation. *The Plant Journal*, 11 (6): 1369-1376. p.

TISCHNER T., KÔSZEGI B., VEISZ O. (1997): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agronomica Hungarica*, 45 (1): 85-104. p.

TÓTH B., GALIBA G., FEHÉR E., SUTKA J., SNAPE J.W. (2003): Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (3): 509-514. p.

UMEZAWA T., FUJITA M., FUJITA Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2006): Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 17 (2): 113-122. p.

VÁGÚJFALVI A., APRILE A., MILLER A., DUBCOVSKY J., DELUGU J., GALIBA G., CATTIVELLI L. (2005): The expression of several *Cbf* genes at the Fr-A2 locus is linked to frost tolerance in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 274 (5): 506-514. p.

VÁGÚJFALVI A., GALIBA G., CATTIVELLI L., DUBCOVSKY J. (2003): The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Molecular Genetics and Genomics*, 269 (1): 60-67. p.

VANNINI C., CAMPA M., IRITI M., GENGA A., FAORO F., CARRAVIERI S., ROTINO GL., ROSSONI M., SPINARDI A., BRACALE M. (2007): Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice *Osmyb4* gene. *Plant Science*, 173 (2): 231-239. p.

VANNINI C., IRITI M., BRACALE M., LOCATELLI F., FAORO F., CROCE P., PIRONA R., DI MARO A., CORAGGIO I., GENGA A. (2006): The ectopic expression of the rice Osmyb4 gene in Arabidopsis increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69 (1-3): 26-42. p.

VANNINI C., LOCATELLI F., BRACALE M., MAGNANI E., MARSONI M., OSNATO M., MATTANA M., BALDONI E., CORRAGIO I. (2004): Overexpression of the rice *Osmyb4* gene

increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants. *The Plant Journal*, 37 (1): 115-127. p.

VOGEL J.T., ZARKA D.G., VAN BUSKIRK H.A., FOWLER S.G., THOMASHOW M.F. (2005): Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 41 (2): 195-211. p.

WANG Q.Y., GUAN Y.C., WU Y.R., CHEN H.L., CHEN F., CHU C.C. (2008): Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 67 (6): 589-602. p.

WELLING A., PALVA E.T. (2008): Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant Physiology*, 147 (3): 1199-1211. p.

WINFIELD M.O., LU C., WILSON I.D., COGHILL J.A., EDWARDS K.J. (2010): Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (7): 749–771. p.

XIONG Y., LIU T., TIAN C., SUN S., LI J., CHEN M. (2005): Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology*, 59 (1): 191-203. p.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1994): A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6 (2): 251-264. p.

YOO S.Y., BOMBLIES K., YOO S.K., YANG J.W., CHOI M.S., LEE J.S., WEIGEL D., AHN J.H. (2005): The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta*, 221 (4): 523-530. p.

ZARKA D.G., VOGEL J.T., COOK D., THOMASHOW M.F. (2003): Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*, 133 (2): 910-918. p.

ZHANG J.Z. (2003): Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (5): 430-440. p.

ZHANG X., FOWLER S.G., CHENG H., LOU Y., RHEE S.Y., STOCKINGER E.J., THOMASHOW M.F. (2004): Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regular that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39 (6): 905-919. p.

## M2. KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK, TÁBLÁZATOK

#### M2.1. A CSVT kísérletben tanulmányozott gének expressziós vizsgálatához használt primerek listája

gén	GB	GI	Forward	Tm	reverse	Tm	Termék (bp)
alkohol dehidrogenáz 1 (ADH1)	X07774	18874	GGATCAACACCGACAGAGGT	59.97	TGGAAGTCCCTACGAAATGG	59.93	93
alkohol dehidrogenáz (ADH2)	X12733	18883	TCGACAAAGTCTGCCTCCTT	59.99	TACCCTTCTTCGGTTTCGTG	60.10	81
alkohol dehidrogenáz (ADH3)	X12734	18885	TTGGTGCTACGCTCAATGTC	59.87	AGCCAGTCCTACAGCTCCAA	60.01	80
alkohol dehidrogenáz (ADH4)	AB006592	252972437	TCAAGGATCATTGGTGTGGA	59.89	TAGTGTGGTCCTTCGGGTTC	59.97	94
univerzális primer (4ADHs) (alkohol dehidrogenáz)	*	*	CACCGACGTCTACTTCTGGGA	58.3	CCATGAAGCTGGAGGCAT	55.2	78
Aldehid dehidrogenáz (ALDH2)	AB055519	15128579	ACAAGATCCATGGCCTCATC	59.89	AAGTTCCACGGGATGATCTG	59.93	100
L-laktát dehidrogenáz A (LDHA)	M55685	167066	GTACACCTCTTGGGCCATTG	60.38	GAGGCAAGGACAGAGACAGG	59.99	96
L-laktát dehidrogenáz B (LDHB)	M55684	167068	TGGACGTCCTCACCTACGTC	61.13	CTGAACCTGGAGGAGTCGAG	59.98	94
univerzális primer (LDHS) (L-laktát dehidrogenáz)	*	*	TCACCAAGAACTCGGACCTC	60.24	TCCTCTGCAGCAGGTTGAG	60.28	84
Nitrát reduktáz (NR)	X57844	19044	GTGGCAAGAAGATCACACGA	59.84	CGTACTTGTTGGGGCTTCTCC	59.73	96
NAD(P)H-bispecifikus nitrát reduktáz (NAR7)	X60173	19064	TCGAGTACAACCGTCAGGTG	59.74	GGAGGAGAAGAGGTCGAAGG	60.33	80
Piruvát dekarboxiláz (PDC)		TC167126	TGGGGGAGAAGAAGGACTCT	60.19	CCATTCCAGAAGCTCTTTGC	59.96	80

#### GB: génbanki azonosító az NCBI adatbázisában.

#### M2.2. A TaCBF transzformáns árpavonalak első fagytesztjéhez tartozó statisztikai táblázatok

A hideg-edzés előtt (=kontroll körülmények között) mért  $F_v/F_m$  értékek és az edzés végén mért adatok (tehát e két mérési időpont adatainak) statisztikai összehasonlítása.

Group Statistics									
	VAR00002	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean				
GP	kontroll	10	,80950	,010255	,003243				
	edz.vége	10	,77090	,025348	,008016				
TR kontroll	kontroll	10	,80920	,011989	,003791				
	edz.vége	10	,77790	,012297	,003889				
456/1/4	kontroll	10	,79360	,031802	,010057				
	edz.vége	10	,78450	,011326	,003582				
23A/2/1	kontroll	10	,81290	,010754	,003401				
	edz.vége	11	,77791	,023403	,007056				
9B/1/2	kontroll	10	,81180	,013481	,004263				
	edz.vége	11	,75800	,053926	,016259				
19/2/1	kontroll	10	,80690	,012087	,003822				
	edz.vége	10	,76670	,021965	,006946				

	Independent Samples Test									
		Levene's Tes of Var	st for Equality iances	t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Differe Lower	Interval of the ence Upper
GP	Equal variances assumed	4,054	,059	4,464	18	,000	,038600	,008647	,020433	,056767
	Equal variances not assumed			4,464	11,869	,001	,038600	,008647	,019737	,057463
TR kontroll	Equal variances assumed	,000	,984	5,763	18	,000	,031300	,005431	,019890	,042710
	Equal variances not assumed			5,763	17,988	,000	,031300	,005431	,019890	,042710
456/1/4	Equal variances assumed	1,036	,322	,852	18	,405	,009100	,010675	-,013328	,031528
	Equal variances not assumed			,852	11,247	,412	,009100	,010675	-,014334	,032534
23A/2/1	Equal variances assumed	,919	,350	4,324	19	,000	,034991	,008093	,018053	,051929
	Equal variances not assumed			4,467	14,326	,001	,034991	,007833	,018227	,051755
9B/1/2	Equal variances assumed	2,042	,169	3,062	19	,006	,053800	,017568	,017030	,090570
	Equal variances not assumed			3,201	11,362	,008	,053800	,016809	,016947	,090653
19/2/1	Equal variances assumed	3,651	,072	5,071	18	,000	,040200	,007928	,023544	,056856
	Equal variances not assumed			5,071	13,993	,000	,040200	,007928	,023195	3

# M2.3. A *TaCBF* transzformáns árpavonalak ozmotikus stressz-kezelése során mért relatív víztartalom adatok

Az ozmotikus stressz-kezelésnek kitett TaCBF transzformáns árpa-anyag leveleiben mért relatív víztartalom (RWC) százalékos adatainak (kontroll körülmények között, a lépcsőzetes PEG-kezelés folyamán, és a recovery során) összefoglaló táblázata a szignifikancia-szintek jelölésével. GP: a vad típusú Golden Promise árpa, 2A/2/4: transzformáns kontroll, 6A/1/2 és 24/1/1: *TaCBF14* transzformáns vonalak, 9A/1/1 és 12-18/2/1: *TaCBF15* transzformáns vonalak. : \* ; \*\* ; \*\*\* ha P  $\leq$  0,05 ; 0,01 ; 0,001.

	RWC %									
vonalak	kontroll	18% PEG	21% PEG	24% PEG	3d Rec	7d Rec				
GP	96,3	95,6	86,3	39,3	97,0	94,7				
2A/2/4	97,9**	93,7	77,2**	36,1	94,9	96,1				
6A/1/2	96,6	95,9	77,0**	42,0	95,2	95,5				
9A/1/1	97,4*	95,4	84,0	82,3***	97,7	95,9				
12-18/2/1	96,9	94,9	84,7	72,4***	97,0	95,4				
24/1/1	96,1	95,3	86,9	72,2***	96,9	95,9				

#### M2.4. A Golden Promise és a transzformáns kontroll vonal fejlődése



A vad típusú Golden Promise (GP) és a transzformáns kontroll (2A/2/4) vonal a vetéstől számított 12. héten.

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Bedő Zoltán Igazgató Úrnak, valamint a kapcsolódó pályázati forrásoknak (OTKA K75528; CNK 80781; AGRISAFE 203288 – EU-FP7-REGPOT 2007-1; CNR-MTA Olasz-Magyar Akadémiák Közti Együttműködés 2007-2009; TritiGen COST-STSM FA0604-2367) munkám, tanulmányaim támogatását.

Köszönettel tartozom szakmai irányításáért és a PhD-munkám ellátásához szükséges feltételek biztosításáért témavezetőmnek, Dr. Vágújfalvi Attilának, és osztályvezetőmnek, Dr. Galiba Gábornak. Köszönöm a Növényi Molekuláris Biológia Osztály valamennyi dolgozójának a segítségét. Köszönet illeti Dr. Tóth Balázst hasznos szakmai tanácsaiért, Novák Alizt az eredmények statisztikai kiértékelésében nyújtott segítségéért, és Vashegyi Ildikót, akire rábízhattam a transzformáns árpavonalak szövettenyészetének kezelését a két hónapos külföldi tanulmányutam idejére. Köszönetem fejezem ki Dr. Kocsy Gábornak, a korábbi diplomamunkám témavezetőjének, továbbá Horváth Imréné és Fehér E. Mónika asszisztenseknek.

Kísérleteink kapcsán Intézetünk szinte valamennyi osztályán megfordultam, köszönöm a Munkatársak segítségét, együttműködését.

Köszönöm Dr. Wendy Harwood-nak és Mark Smedley-nek (John Innes Centre, Norwich, UK) a segítőkészségüket, vendégszeretetüket az angliai tanulmányutam során, és hogy megtanulhattam Tőlük egy jól működő technikát az árpa transzformációjára, jelentősen hozzájárulva ezzel a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönöm Dr. Cristina Crosatti és Dr. Luigi Cattivelli segítségét (CRA – Genomics Research Centre, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország), akik itáliai tanulmányútjaim során szakmai munkámat irányították.

Köszönöm Édesanyámnak és Férjemnek a támogatását, továbbá családomnak és közeli barátaimnak, hogy mellettem álltak.