

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST

**Búza fagytűrést befolyásoló szabályozógén funkcionális azonosítása
lúdfűben**

Tóth Evelin

Készült a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken
és az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetében

Tanszéki konzulens: Dr. Papp István, egyetemi tanár

Társ konzulens: Dr. Vágújfalvi Attila, tudományos főmunkatárs

Bírálok: _____

Budapest, 20_____

konzulens

tanszékvezető/szakirányfelelős

konzulens

FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK, FOGALMAK

ABS : abszcizinsav

AFP: Anti Freeze Protein

CBF: C-repeat binding factor

COR gén: Cold Regulated gene

DRE elem: dehydration-responsive element

ICE1: Inducer of *CBF* expression 1

LEA: Late Embryogenesis Abundant protein

F₀: minimális fluoreszcencia szint

F_m: maximális fluoreszcencia szint

F_v: változó fluoreszcencia

F_v/F_m: a PS II maximális kvantum hatásfoka

Fogalmak

Vízpotenciál: a víz egységnyi térfogategységre eső kémiai potenciálja

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Célkitűzés.....	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. A stressz általános jellemzése	6
3.2. Hideg és fagy hatása a növényekre.....	7
3.3. Hidegedződés és fagytűrés	9
3.4. Hideghatásra indukálódó gének, fehérjék	9
3.5. Szárazság hatása a növényre	10
3.6. Vízhányra indukálódó gének.....	12
3.7. Transzkripció faktorok a génszabályozásban	13
3.8. A CBF gének jellemzése	14
3.9. A transzformáció jelentősége	17
3.10. Transzformációval elért eredmények CBF gének esetében	18
3.11. Reverz-transzkripció PCR technika (RT-PCR)	19
3.12. A fagytűrés meghatározásának lehetőségei.....	19
3.13. A szárazság-stressz tolerancia mérésének lehetőségei.....	20
4. Anyag és módszer.....	22
4.1. Növényanyag	22
4.2. Növénynevelés.....	22
4.3. Transzformáció ellenőrzése.....	23
4.4. A TaeCBF16 gén kifejeződésének kimutatása RT-PCR-rel	25
4.5. Élettani vizsgálatok.....	28
5. Eredmények.....	31
5.1. A TaeCBF16 transzformáns növények	31
5.2. Transzformáció ellenőrzése.....	31
5.3. A TaeCBF16 gén működésének tesztelése	32
5.4. Az élettani vizsgálatok eredményei	34
6. Következtetések.....	41
6.1. Transzformáció	41
6.2. Transzformáns növények	41
6.3. Génműködés	41
6.4. Fagytolerancia	42
6.5. Szárazság-stressz tolerancia	42
7. Összefoglalás.....	43
8. Köszönetnyilvánítás.....	45
9. Irodalomjegyzék	46

1. Bevezetés

Az életciklusuk során a növényeket gyakran éri abiotikus környezeti stressz. Ez az élettelen környezeti tényezők, a hőmérséklet, a csapadék, a talaj ásványi anyag tartalma, stb., olyan mértékű megváltozását jelenti, hogy az a növény fejlődését, élettani folyamatait, növekedését befolyásolja. A mezőgazdaságban termesztett növények esetében ebből kifolyólag a szélsőséges környezeti tényezők azok, melyek egy adott területen való termesztetőségüket leginkább limitálják. A növénynemesítő kétféle stratégiát, illetve ezek kombinációját választhatja annak érdekében, hogy az általa előállított fajták minél kevésbé sérüljenek az extrém klimatikus viszonyok következtében. Vagy a stressz-adaptáció szempontjából legérzékenyebb életciklust, a virágzás időzítését befolyásolja, vagy azonosítja és a nemesítés során figyelembe veszi azokat a géneket, melyek növelik a stressz-toleranciát. Emiatt a fagyállóság és a szárazság kivédésének élettani, biokémiai és molekuláris hátterének megismerése nagymértékben kutatott téma. A növényeket érő abiotikus hatások olyan változásokat indítanak el a növényekben, mely mögött gének összehangolt működése áll. E gének expresszióját transzkripciós faktorok szabályozzák. Ilyen transzkripciós faktorok a *CBF* gének, melyek stressz hatására indukálódnak és a megváltozott környezeti tényezőkhez való alkalmazkodásban szerepet játszó egyéb gének működését szabályozzák.

A géntechnológia, vagyis egy élőlény genomjának mesterséges módosítása segítségével lehetőségünk nyílik arra, hogy egyes géneket, a részletesebb megismerés érdekében az eredeti előfordulásuktól eltérő környezetben, azaz más élőlényekben vizsgáljunk. A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) széles körben alkalmazott modellnövény, kiválóan alkalmas transzformációs vizsgálatokra. Előnyei között említhető még a rövid generációs ideje, alacsony kromoszómaszáma ($n=5$), és öntermékenyülő volta, mely megkönnyíti a homozigóta utódok létrehozását. Termése hosszúkas becőtermés, mely 20-30 magot tartalmazhat. Megfelelő körülmények között a növény 3 hét elteltével virágot hozhat, egész életciklusát pedig 8-10 hét leforgása alatt befejezi. Ezen tulajdonságainak köszönhetően az *A. thaliana* megfelelő tesztnövény a kenyérbúzából (*Triticum aestivum*) izolált *TaeCBF16* gén vizsgálatához.

2. Célkitűzés

A növényi abiotikus stressz-tolerancia egyik legintenzívebben kutatott területe a *CBF* génreguláció. Ennek oka, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok számtalannövény fajban előfordulnak, és a legtöbbjükéről megállapították, hogy szerepük van a növényi abiotikus stressz-toleranciában, leginkább a fagy- és szárazság-tolerancia kialakításában. A klasszikus genetika és a molekuláris biológia kapcsolódásával egyre közelebb kerülhetünk egy olyan komplex rendszer megértéséhez, mint a fagytolerancia és a szárazságtűrés. A *CBF* gének azonosításával és élettani hatásuk megismerésével lehetőségünk nyílik arra, hogy olyan növényeket nemesítsünk, melyek jobban alkalmazkodnak a szélsőséges időjárási viszonyokhoz, termésmennyiségüket kevésbé korlátozza a klímaváltozás hatása. Dolgozatom első felében a fagy és a vízhiány okozta stressz-hatásról, valamint a *CBF* transzkripciós faktorok abiotikus stressz-toleranciában betöltött szerepéről írok. A továbbiakban egy fagyűrő genotípusú kenyérbúzából (*Triticum aestivum* ssp. cv. Cheyenne) származó, *TaeCBF16* gén hatását vizsgálom *Arabidopsis thaliana* modellnövényben. Vizsgálataimhoz rendelkezésemre álltak transzformáns vonalak, melyek Dr. Papp István (Budapesti Corvinus Egyetem) és Dr. Vágújfalvi Attila (MTA Agrártudományi Kutatóközpont) együttműködésével jöttek létre. Céljaim között szerepel molekuláris, valamint élettani vizsgálatokkal ezen növények fagyűrésének, valamint szárazság-toleranciájának összehasonlítása, a kontrollnövényként fenntartott *Arabidopsis thaliana* cv. Columbiához képest. Ezáltal bizonyosságot szeretnék szerezni a *CBF16* transzkripciós faktor abiotikus stressz-toleranciában betöltött szerepéről.

3. Irodalmi áttekintés

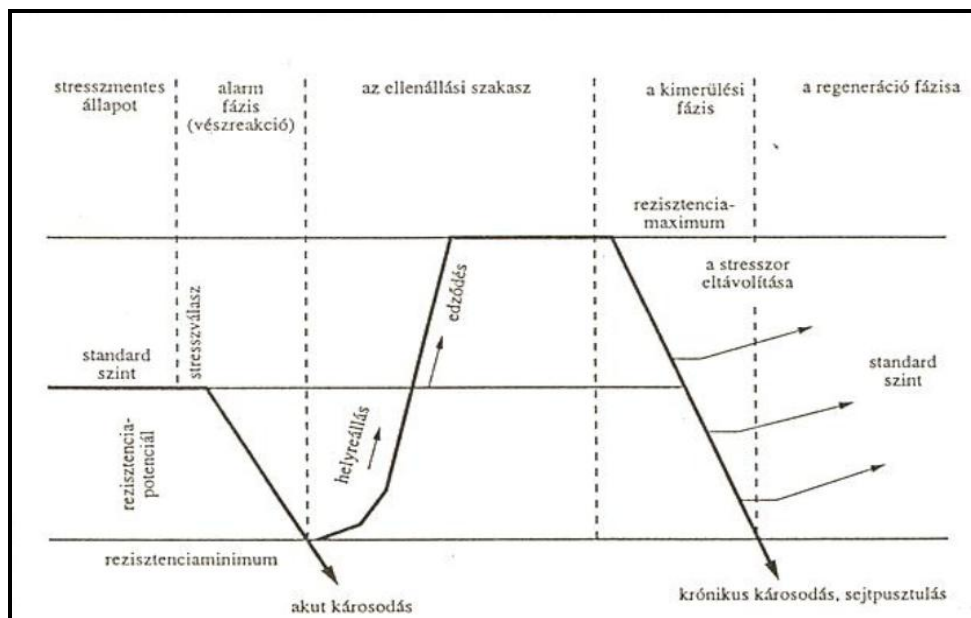
3.1. A stressz általános jellemzése

A megterheléssel járó helyzetek leírására, melyek során az adott szervezet viselkedése eltér a normálistól, a különböző tudományágak a stressz kifejezését használják. Szigeti (1998), a növényekre vonatkoztatva a következőképpen fogalmazta meg a stressz meghatározását. A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényt szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz.

Stresszornak azokat a környezeti elemeket nevezik, amelyek stresszt okoznak, ennek eredményeként az élőlények fiziológiai folyamataik megváltoztatásával próbálnak alkalmazkodni a kialakult stresszhelyzethez. A növényekre ható stresszorokat több szempont szerint is csoportosíthatjuk. Megkülönböztethetünk természetes, illetve antropogén tényezőket. A természetes stresszorok a természeti környezet spontán megváltozásai, mint pl. a nagy fényintenzitás, a fagy, a szikesedés vagy az ásványi anyagok hiánya. Az antropogén stresszorok pedig az emberi tevékenység eredményeként létrejövő károsító tényezők. Ide soroljuk a herbicideket, peszticideket, a légszennyező anyagokat, a toxikus fémek feldúsulását, stb. Más felosztás szerint beszélhetünk biotikus és abiotikus tényezőkről. Az abiotikus tényezők az élettelen környezeti hatások, mint a szél, a hőmérséklet, vízellátottság, stb. Míg a biotikus hatások stresszorok közé a növényi patogén vírusokat, baktériumokat, gombákat, rovarokat soroljuk. A stresszorokat aszerint is csoportosíthatjuk, hogy az élő szervezetet milyen erős stressz éri. Eszerint eustressznek nevezzük azt, mikor csak gyenge, stimulatív stressz-hatás éri a növényt. Az eustressz aktiválhatja a sejtanyagcserét, fokozhatja a növény fiziológiai aktivitását, ezáltal nem okoz semmiféle károsodást még hosszabb időtartamon keresztül sem. Ilyen hatása van számos növekedésgátlónak és anyagcsere-inhibítornak, melyek kis koncentrációban serkentő hatásúak. Nagyobb koncentrációban azonban már károsíthatják az anyagcserét, csökkenthetik a növény aktivitását, korai öregedést okozhatnak és a növény pusztulásáért is felelősek lehetnek. Ekkor már distresszről beszélünk.

Az élőlényekben, így a növényekben is a stressz hatására egy jellegzetes eseménysor indul be, amit stressz-szindrómának nevezünk. Ez három, egymástól jól elkülöníthető szakaszból áll. Az első a vészreakció, mely során a stressz-hatásnak köszönhetően fokozódik

a terhelés, a szervezet működése eltér a normálistól, ennek következtében pedig csökken a vitalitás, azaz a növény életképessége. Ekkor előtérbe kerülnek a lebontó folyamatok a felépítő jellegűekkel szemben. Az ellenállás minimumának elérése után akut károsodás következik be. Ha a növény rezisztencia-potenciálja lehetővé teszi, akkor a második fázisba, az ellenállási szakaszba jut, amelyben alkalmazkodási és reparációs folyamatok eredményeként a növény ismét normális működést mutat, fokozódik az ellenállóképessége és edzettebbé válik. A harmadik a kimerülési fázis, amely az alkalmazkodóképességet meghaladó mértékű igénybevétel esetén következik be. Ha a stressz-hatás megszűnik, a növény regenerálódik és beáll egy új standard szintre (Szigeti, 1998.) (1. ábra).



1. ábra: A stressz szindróma szakaszai (Szigeti, 1998)

3.2. Hideg és fagy hatása a növényekre

Hideg-stresszre érzékenynek tekintjük azokat a növényeket, melyek 0 és 15-20°C alatt semmilyen esetben sem maradnak életben. Ezzel szemben hideg-toleránsnak tartjuk azokat a növényeket, amelyek még 0°C közelében is képesek növekedni. A hidegérzékenység a genetikai tényezőkön túl a fejlettségi állapottól, az anyagcsere-aktivitás szintjétől is nagymértékben függ. Általában a növények aktív állapotban, fejlődésük kezdeti szakaszában,

nappal vagy erős fényben, a szárazság-stressz körülményei között, illetve egyes tápelemek hiánya esetén különösen érzékenyek a hidegre. Ugyanakkor bizonyos esetekben a hideg fiziológiai szükségletet jelent, pl. az őszi búzák vernalizációja esetén.

Az alacsony hőmérséklet következtében kialakuló jég az egyik legveszélyesebb tényező a növény számára a fagy-stressz során. Jég két helyen képződhet a növényi szövetekben. Ha a lehülés kellően gyors, a jég a sejten belül is kialakulhat. Az ilyen, sejten belüli jégképződés a sejt halálához vezet. A sejten kívüli, extracelluláris jégképződés megindul amint a hőmérséklet 0°C alá süllyed. A jég képződése miatt ozmotikus potenciál különbség alakul ki az extracelluláris jég és a sejten belüli víz között. E potenciálkülönbségnek megfelelően a víz a sejtől kiáramlik az intercelluláris térbe, ami dehidratációs stressz kialakulásához vezet. Tehát az alacsony hőmérsékleti stresszek nagy részét a vízhiány okozza.

A növények a vízvesztés és az ezzel járó, funkcióvesztést okozó molekuláris konformáció változások megakadályozásában aktívan vesznek részt az ozmoregulációban szerepet játszó biokémiai folyamatok aktiválása révén. Az ozmotikus adaptálódás sejtszintű válaszreakció, mely során hidrofíl szerves és szervetlen anyagok halmozódnak fel, csökkentve az ozmotikus potenciált, ezzel a vízpotenciált. A szerves anyagok közül legfontosabbak a szabad aminosavak, a poliaminok, szénhidrátok, glicin betain, stb. E vegyületek védő szerepe a kationos csoportjaik tulajdonságával magyarázható. Ezek ugyanis a sejt pH-ján protonáltak, és így lehetőségük van elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására más molekulákkal. Így például a nukleinsavak foszfátcsoportjaival kapcsolódva, stabilizálják azok szerkezetét, konformációját. Ugyanakkor ezek a vegyületek a sejtmembránok integritásának fenntartásában is szerepet játszanak.

A növényen belül az alacsony hőmérséklet leginkább a membránokat veszélyezteti, melyek a sérülések elsődleges elszennvedői. A csökkenő hőmérsékletnek köszönhetően a membránban változások következhetnek be, mégpedig molekuláris átrendeződések a lipid régióban. Ez a membrán szerkezetének változását okozza, mely kihat a membránhoz kötött fehérjékre is, káros lehet azok struktúrájára és funkciójára. Ezen kívül a sejten belül képződött jégkristályok irreverzibilis membránkárosodáshoz vezethetnek. Ezen folyamatok következtében a membrán nem tudja megőrizni fluiditását, mely pedig létfontosságú a sejt számára.

Az alacsony hőmérsékleti stressz nem csak ozmotikus stresszt jelent a sejtek számára. Abiotikus stressz hatásra reaktív oxigén gyökök keletkeznek a növényben, melyek károsíthatják a membránokat és a makromolekulákat. Ilyen vegyület a szuperoxid-, hidroxil-

gyök és a hidrogén peroxid. Ezek a vegyületek normális körülmények között is termelődnek, pl. a fotoszintézis során, de stressz hatásra a mennyiségük jelentősen megnő. Közömbösítésükre és eltávolításukra a növénynek antioxidáns vegyületeket kell termelnie, amihez az azokat szintetizáló enzimek mennyiségét növelnie szükséges. Ilyen enzim pl. a szuperoxid-diszmutáz, glutation-reduktáz és aszkorbát-peroxidáz (Kocsy et al. 2001).

Tekintettel arra, hogy a hidegstressz, különösen a fagystressz, közvetve szárazságstresszel jár együtt, nem meglepő, hogy a növények génexpressziós mintázatát vizsgálva hideg- és szárazságkezelés után, számos olyan gént találtak, mely mindkét stresszhatásra indukálódott (Shinozaki et al. 2003). Mindezidáig számos, az alacsony hőmérsékleti akklimatizációs folyamat génszintű szabályozásában résztvevő faktort azonosítottak. Kiderült, hogy a hideg hatásra expresszáldó gének egy részének regulációjában az úgynevezett *CBF* (C-repeat binding factor) transzkripciós faktorok játszanak szerepet (Stockinger et al. 1997).

3.3. Hidegedződés és fagytűrés

A növényeknek a stressz, így az alacsony hőmérsékleti stressz kivédéséhez is szükségük van egy hosszabb ideig tartó, alacsony hőmérsékletű növekedési időszakra, az edződés időszakára. A hideg-edződés a struktúrák és funkciók olyan nem örökletes változása, a hidegre adott olyan válasz, amely a növényt ért károkat csökkenti. Ezt más néven akklimatizációnak nevezzük. Természetes körülmények között hazánkban az edződés ősszel történik, a rövidülő megvilágítás és a hőmérséklet fokozatos csökkenése során. Mesterséges körülmények között, növénynevelő kamrákban lehetőség van e folyamat modellezésére, a hidegedzés kivitelezésére.

A több generáció alatt, génszinten kialakuló tartós ellenállóképességet adaptációnak nevezzük. Az adaptáció eredménye a tartós tolerancia (Kocsy et al. 2001).

3.4. Hideghatásra indukálódó gének, fehérjék

Stressz hatására mindig keletkeznek új mRNS-ek és fehérjék a sejtekben. Hideg hatására azonban a fehérjeszintézis egészét tekintve nem következik be olyan drámai változás, mint amelyet hősokk esetén tapasztalhatunk, vagy anaerob körülmények között.

Megállapították, hogy több, a hideg hatására átíródó fehérje a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjék homológja.

A LEA fehérjék az embriógenézis késői fázisában szintetizálódnak a mag kiszáradásakor, valamint a vegetatív szövetekben is képződnek szárazság esetén, abszcizinsav (ABS) kezeléskor, vagy magas só koncentráció meglétekor. Sokféle fehérje tartozik ugyan e csoportba, azonban mégis sikerült néhány közös jellemzőjüket megállapítani. Ezek szerint e fehérjék szokatlanul hidrofilek, forraláskor nem denaturálódnak, vagyis hőstabilak. Aminósav szekvenciájukra jellemző a cisztein és triptofán hiánya és az ismétlődő, lizinben gazdag szakaszok jelenléte. Felszíni töltéssel rendelkeznek, polipeptid láncuk gyakran amfipatikus α -hélixbe rendeződik, emiatt a vizet megkötik, fenntartják a membrán vízáteresztő képességét, valamint ionokat kötnek meg a vízhiány során túltöményedő citoplazmából.

Egy szintén hideg-stressz hatására termelődő fehérje az AFP (Anti Freeze Protein), mely nem csak növényekben, hanem halakban és rovarokban is megtalálható. Az AFP fehérjék gátolják a jégkristályok növekedését, befolyásolják a növekvő jégkristály alakját, és gátolják az újrakristályosodást is.

A dajkafehérjék, vagy chaperone-ok molekuláris védelmet biztosítanak, segítenek megtartani a fehérjék konformációját, mely igen fontos feladat alacsony hőmérséklet bekövetkeztekor.

A deszaturáz enzimek a membránok fluiditásának megtartásában játszanak szerepet. Az ozmotikus egyensúly fenntartásában kulcsfontosságú pl. a hideg hatására megemelkedő glutamin-szintetáz és a szaharóz-szintáz aktivitás. A már említett antioxidáns enzimek pedig a stressz során keletkező reaktív molekulák eltávolításában vesznek részt (Galiba et al, 2006).

Az alacsony hőmérsékleti stressz kivédésében fontos szerepet játszanak a CBF transzkripciós faktorok, ezek részletes jellemzését a későbbiekben teszem meg.

3.5. Szárazság hatása a növényre

Szárazság-stressz akkor éri a növényt, ha nem áll rendelkezésére elegendő felvehető víz, azaz, ha száraz a talaj, ha erős a párolgás, ha erős a fagy vagy magas a talaj sótartalma. A vízfelvétel akkor is gátolt, ha valamely tényező miatt a növény gyökérrendszere nem tud kellőképpen kiterjedni. Vízhiányra a növények metabolizmusuk, fiziológiai folyamataik és morfológiájuk megváltoztatásával reagálhatnak.

Ahhoz, hogy a szárazság-stressz által kiváltott válaszreakciók, élettani változások beinduljanak, a növénynek először is érzékelnie kell a szárazságot, majd az érzékelést követően továbbítani kell az információt. A növények a vízhiányt a gyökérükön keresztül érzékelik, hiszen a gyökér vízfelvétele lassul. Vízhiányos állapotban a sejtek növekedése korlátozódik, osztódásuk is fokozatosan leáll. Sejtszinten a vízhiány érzékelésében a plazmamembránnak van jelentős szerepe, hiszen a membránhoz kötődő receptorok, a transzportfehérjék és az ion-csatornák a sejt általános kommunikációs rendszerét képezik. Ezek mögött a folyamatok mögött azonban génexpressziós változások, (pl. hormon bioszintézis enzimek, stresszfehérjék, transzkripció faktorok, stb.) állnak. A célgén expressziójának módosításával a transzkripció faktorok megváltoztatják a sejt anyagcsere folyamatait, így módon lehetővé téve a vízhiányhoz való alkalmazkodást és a szárazság-stressz tolerancia kialakulását. A szárazság-stressz tolerancia sok gén által meghatározott, összetett tulajdonság. A vízhiány okozta stresszre adott válaszreakció kialakulása több független jelátviteli úton keresztül megy végbe, melyből kettő ABS függő és kettő ABS-től független folyamat.

Mivel a levél növekedését és méretét a sejtnövekedés határozza meg, ezért a sejtnövekedés gátlása a levelek növekedésének lassulását eredményezi, mint korai válaszreakciót a kialakuló szárazság-stressz hatására. A levél növekedési ráta befolyásolásával a hidraulikus tényezők nagymértékben befolyásolják a levelek méretét, továbbá a szklerenchima arányát, a sztómák számát és a kutikula vastagságát is. A szárazság-stressz károsító hatásának kivédése érdekében számos növényfajnál fontos szerepet töltenek be azok a szabályozó mechanizmusok, amelyek a levelek elhalásához, majd lehullásához vezetnek. A vízhiány indukálta levélhullatás folyamatában fontos szerepet töltenek be a szeneszcenciáért felelős növényi hormonok: az abszcizinsav és az etilén.

A korai válaszreakciók megjelenése után a következő védelmi rendszer a gyökernövekedés fokozása lehet. A gyökerek növekedése a szárazság-stressz fokozódása mellett is biztosított, mivel a vízhiány a tápanyag transzlokációt csak lényegesen később gátolja, a fotoszintézist csökkentő hatás után.

Ha a külső környezeti körülmények gyorsan változnak meg, és a levelek már elérték teljes méretüket, akkor a párologtatás mértékét sztómazárással lehet befolyásolni, melyben az abszcizinsavnak (ABS) kiemelkedő szerepe van. A talajszárazság hidraulikus válaszokat is kiválthat, mely megelőzheti az ABS-at a gyökér-hajtás kommunikációban. A sztómazáródás következtében a szárazság csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát.

A fotoszintézis folyamata ozmotikus stressz, vízhiány vagy talajszárazság esetén károsodhat. Azonban ez kevésbé érzékeny folyamat; a sztómazáródással a vízfelhasználás hatékonysága nőhet, mert az a párologtatást jobban gátolja, mint amennyire csökkenti a belső CO₂ koncentrációt. Erősebb stressz esetén már gátlódik a fotoszintézis, a sztómazáródás következtében az intercelluláris járatok CO₂ koncentrációjának az oxigénhez viszonyított csökkenése a C3-as növényekben fotolégzés serkentéséhez vezet és csökken a vízhasznosítás hatékonysága is.

A különböző abiotikus stresszre adott növényi válaszreakciók gyakran hasonló, vagy akár azonos utakon is haladnak. Ez azért lehetséges, mert a különböző kiindulópontú stresszek, mint például a szárazság-stressz, a magas hőmérséklet vagy a hideg stressz ugyanazt a végső következményt idézi elő, ami az ozmotikus stresszként ható vízhiány.

A szárazság elleni védekezési mechanizmusaik alapján három csoportba sorolhatjuk a növényeket. Az első csoportba tartozó növények képesek a sejtek hidratált állapotát megőrizni, ezeket izohidrikus növényeknek nevezzük. A második csoportba tartozó növények a szöveti deszikkációt képesek tolerálni, ezt a csoportot toleránsnak nevezzük. A harmadik kategória a szárazság elkerülő növények csoportja, melyek a száraz periódus bekövetkeztekor gyorsan befejezik az életciklusukat, gyors virágzással és magérleléssel (Tari et al. 2003, Christmann et al. 2007, Gaspar et al. 2002).

3.6. Vízhiányra indukálódó gének

Shinozaki et al. szerint (2003), a stresszindukálható géneket funkciójuk alapján két csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportba tartoznak a tolerancia kialakításáért felelős gének, amelyek termékei pl a chaperonok, LEA proteinek, az ozmotikumok bioszintézisében vagy a detoxifikálásban szerepet játszó fehérjék. A másik csoportba a stresszválaszok jelátvitelében és a génexpresszió szabályozásában szerepet játszó gének pl. protein kinázok vagy a foszfolipid metabolizmusban szerepet játszó enzimek génjei és transzkripciós faktorok tartoznak.

A vízhiány kiváltotta stressz molekuláris hátterének megismerése érdekében számos gént izoláltak. Ilyen a *rd* (responsive to dehydration), az *erd* (early responsive to dehydration), vagy a *LEA* géncsalád.

A stresszindukálódó gének szabályozó régióiban azonosítottak egy DNS szekvencia motívumot (DRE; dehydration-responsive element) is, mely számos, vízhiányra és hideg

stresszre aktiválódó gén, mint az *RD17*, *ERD10*, *KINI*, *COR15a* és *COR6.6*, promóter régiójában megtalálható. A *DRE* elem tartalmazza az 5 bp hosszúságú „core” (központi) szekvenciát, CCGAC, mely fontos szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában alacsony hőmérséklet, vízhiány és magas sótartalom esetében (Tsai-Hung Hsieh et al. 2002).

3.7. Transzkripció faktorok a génszabályozásban

Transzkripció faktorok minden élőlényben megtalálhatók, a génszabályozás nélkülözhetetlen résztvevői. Alapvető funkciójuk, hogy a transzkripció létrejöttéhez szükséges pre-iniciációs komplex kialakításában vesznek részt. Nem feltétlenül a szabályozott gén DNS-éhez kötődnek, előfordulhat, hogy csak az RNS polimerázzal kerülnek direkt kapcsolatba. A szabályozott gén DNS-éhez való kötődés specifikus, ugyanis a transzkripció faktorok szekvencia-specifikus DNS kötő fehérjék. A transzkripció faktorokat kódoló génekben több funkcionális alegység, más néven domain található. A DNS-kötő domain aminosavai lépnek kapcsolatba a szabályozott gén promóterének bázisaival. Így ez a szekvencia határozza meg, hogy az adott transzkripció faktor mely gének szabályozására képes. A DNS-kötő domain-ek alapján családokba, alcsoportokba sorolhatjuk a transzkripció faktorokat. Az azonos családba tartozó transzkripció faktorok DNS-kötő domain-je nagymértékben konzervált, azonban számos példa van arra is, hogy az egy családba tartozó transzkripció faktorok különböző folyamatok szabályozásában is részt vesznek. Ezt a többi domain működése, és az azokkal való kölcsönhatások teszik lehetővé. A transzkripció faktorok sok esetben homo- vagy hetero-oligomerként működnek (oligomerizációs domain), a ligandum-kötő, és főként a regulációs domain-ek, melyek más transzkripció faktorokkal való kapcsolódást biztosítanak, a génexpresszió finom szabályozását teszik lehetővé. Az egy bizonyos típusú transzkripció faktor által szabályozott gének csoportját regulonnak nevezzük. A növényekben legalább öt különböző regulont azonosítottak:

- *CBF/DREB1* (C-repeat/dehydration-response-element) regulon
- *NAC* (*NAM*, *ATAF* és *CUC*)
- *ZF-HD* (zinc-finger homeodomain) regulon
- *AREB/ABF* (ABA-responsive element-binding protein/ABA-binding factor) regulon
- *MYC* (myelocytomatosis oncogene)/*MYB* (myeloblastosis oncogene) regulon

Az első kettő az ABA-független, a második kettő pedig az abszcizinsav-függő jelátviteli úthoz kapcsolódik (Goodrich és Tjian 2006, Saibo et al. 2009).

3.8. A CBF gének jellemzése

A CBF gének transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek más gének promóter régiójához kapcsolódva indukálják azok expresszióját. E gének kettős elnevezéssel rendelkeznek, *CBF/DREB1*, mivel két kutatócsoport egymástól függetlenül, egy időben közölte eredményeit és nevezte el őket. Elnevezésüket onnan kapták, hogy a *CBF/DREB1* transzkripciós faktorok az általuk szabályozott gének promóterében található *CRT/DRE* (*CRT/DRE* Binding Factor) rövidítéssel jelölt szekvenciához kötődnek (Stockinger et al. 1997, Liu et al. 1998). Sok hideg-, és dehidratációs stresszre indukálódó gén promóterében megtalálható a *CRT/DRE* (C-repeat/dehydration-element) cisz-elem, amely egy CCGAC „core” szekvenciát tartalmaz.

A CBF fehérjék az AP2/ERF szupercsaládba tartoznak, az *APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR* (AP2/ERF) DNS kötő domain megléte miatt, ezen belül az *ERF* család *CBF/DREB1* alcsaládjába. A CBF fehérjéket az ún. „CBF signature” konzervált aminosav szekvencia mellett az attól N-terminális irányban elhelyezkedő (PKK/RPAGR_xKF_xETRHP), illetve C-terminális irányban található (DSAWR) szignál motívumok (signature motif) különböztetik meg a család többi tagjától (Jaglo et al. 2001).

Gilmour et al.(1998) szerint a CBF gének nem folyamatosan működnek a növényben, hanem hideg hatására tranziens módon expresszálódnak a hidegkezelés korai fázisában. Minél alacsonyabb a hőmérséklet, annál intenzívebb lesz a CBF gének transzkripciója.

A rendszer azonban ennél még bonyolultabb, ugyanis *Arabidopsis*-ban találtak egy olyan transzkripciós faktort, mely a CBF gének transzkripcióját szabályozza. Ez az *ICE1* (*Inducer of CBF expression 1*) gén, melyről azt állapították meg, hogy hidegkezelés hatására kerül aktív állapotba és kapcsolódik hozzá a CBF gének promóter régiójához a fehérje, mely normál hőmérsékleten inaktív állapotú.

A CBF gének expressziója és a fagyállóság közötti összefüggést elsőként lúdfüben bizonyították. Egyértelmű összefüggést mutattak ki egy hideg-indukálható gén, a *COR15a* expressziója és a fagyállóság között. Igazolták azt is, hogy a hideg-indukálható COR gének szabályozásában a CBF transzkripciós faktoroknak van kiemelkedő szerepük. A *CBF1* gén

túlvezérlésével a *COR* gének indukcióját, ezzel együtt a fagyállóság növekedését igazolták lúdfűben (Gilmour et al. 1998).

3.8.1. Az *Arabidopsis thaliana*-ban található *CBF* gének

A *CBF* géneket *Arabidopsis*-ban írták le először, azóta 54 növényfajban (31 kétszikű, köztük 13 fásszárú faj, és 23 egyszikű) azonosítottak *CBF* ortológ géneket (Navarro et al. 2009).

A lúdfűben a *CBF* szabályozás alatt álló *COR* gének négy géncsaládba szerveződnek, *COR6.6*, *COR15a*, *COR47* és *COR78*, melyek minden tagja két génből áll. Ezek a gének tandem elrendeződésben találhatók a kromoszómán. A két gén közül legalább az egyik hideg, vagy más olyan stresszel indukálható, amely a sejt vízvesztésével jár. Az egyik legjobban jellemzett gén ezek közül a *COR15a*, mely egy 15 kDa-os proteint kódol. E fehérje a kloroplasztiszban halmozódik fel. A gén fagyállóságban betöltött szerepét igazolja, hogy a nem edzett transzgenikus növényekben a gén konstitutív expressziója megemelte mind a kloroplasztisz, mind a levél protoplasztok fagyállóságát. A membránok károsodásának fő oka a lipidek lamelláris fázisból a hexagonális II fázisba való átmenete, a *COR15a* génről pedig kiderült, hogy éppen ezt akadályozza meg. A kísérletek azonban arra is rámutattak, hogy egyetlen *COR* gén működésének a megváltozása nem elégséges egy olyan komplex mennyiségi tulajdonság megváltoztatására, mint a fagyállóság. Ugyanis az intakt növény szintjén nem lehetett a fagyállóság szintjének emelkedését kimutatni a *COR15a* gén túlvezérlésével. A *COR* gének promoterében található egy regulátor szekvencia (CCGAC, C-repeat), melyhez specifikusan kötődnek a *CBF* transzkripciós faktorok. A kötődés után válik lehetővé az általuk szabályozott *COR* és más hideg-indukálható gének transzkripciója (Thomashow 2001, Thomashow és mtsai. 2001).

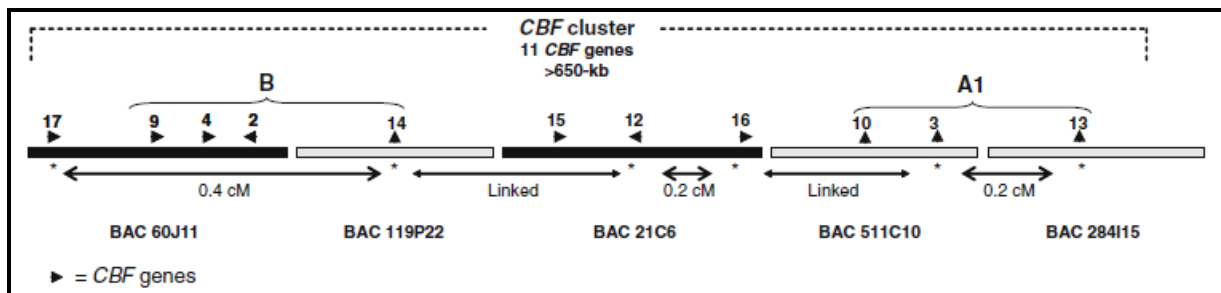
Az *Arabidopsis* genomja több *CBF* gént is kódol, melyek tandem ismétlődésben helyezkednek el a 4. kromoszómán. Ez a régió 6 *CBF/DREB1* és 8 *DREB2* típusú gént tartalmaz (Sakuma et al. 2002). Ezek közül a *CBF1*, *CBF2* és *CBF3* (*DREB1A*, *DREB1B* és *DREB1C*) gének hideg hatására indukálódnak, 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).

3.8.2. CBF gének a gabonafélékben

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. Megállapították, hogy a rizs genomja 5, az alakor genomja legalább 13, a kenyérbúza legalább 15, míg az árpa genomja 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 (Galiba et al. 2009).

A gabonafélék abiotikus stressz-toleranciájának genetikai kontrolljában kiemelkedő szerepe az 5-ös (5A, 5B, 5D és 5H) kromoszómáknak van (Francia et al. 2004, Tóth és et al. 2003). Kenyérbúzában (*Triticum aestivum*) bizonyították, hogy az 5A kromoszóma hosszúkarján egy fagyállósági gén, az *Fr-A1* (Frost -resistance1) lokalizált. Itt található olyan effektor gének is, amelyek a fagykár direkt kivédésében játszanak szerepet.

Diploid alakorban (*Triticum monococcum*) pedig úgy találták, hogy egy hideg-indukálható gén, a *COR14b* expressziójáért felelős gén lókusza egy újonnan azonosított fagyállósági gén lókuszt, az *Fr-A2* (Frost resistance2) és egy CBF gén azonos helyre térképeződik az 5A kromoszóma hosszúkarján. A CBF géncsalád 11 génjét sikerült az eddigiekben feltérképezni, melyek szorosan kapcsolatosak, mintegy 0,8 cM-os régióban lokalizáltak. A fagyűrő G3116 és a fagyérzékeny DV92 alakor genotípusokat keresztezve létrehoztak egy térképezési populációt, melynek fagytesztje során kimutatták, hogy a *TmCBF3*, 10, 14, 15, 16 és 17 transzkripciós faktorok indukálódnak hidegkezelés hatására, így az alakor fagyállóságának kialakításához hozzájárulnak. A CBF géncsaládból 3 gén, a *TmCBF14*, 15 és 16 gének expressziója pedig korrelál a fagyállóság mértékével (Knox et al. 2008, Miller et al. 2006).



2. ábra: A 0,8 cM-os régióban lokalizálódó *CBF* gének (Miller et al. 2006)

3.9. A transzformáció jelentősége

Számos eredményes kísérletet publikáltak az abiotikus stressz-toleranciában résztvevő gének funkciójának igazolásáról, transzgenikus növények analízisével. Transzgenikusnak akkor tekintünk egy növényt, ha az idegen gén stabilan integrálódott a növény genomjában. Kezdetben a stressz-adaptációban résztvevő gének szerepének igazolásához egyfunkciós géneket használtak. Ezek olyan gének voltak, melyek egy metabolit módosításáért voltak felelősek, pl. anyagcsere utak kulcsenzimeit.

Ugyanakkor, mivel a növényi abiotikus stressz-tolerancia egy komplex, sok gén által szabályozott rendszer, ahol a génregulációs hálózatok is kapcsolatban vannak egymással, az egyedi gének vizsgálatáról a hangsúly áthelyeződött a szabályozó gének tanulmányozására. Nagyszámú transzkripciós faktor szerepét bizonyították már transzformációval (Bhatnagar-Mathur et al. 2008).

A transzformáció sikerességét nagymértékben befolyásolja az is, hogy milyen típusú promótert alkalmaznak, azaz a transzformált transzkripciós faktor hogyan szabályozódik. Leggyakrabban állandó működésű promótert használnak, mint pl. a 35S promóter. Ennek nagy előnye az, hogy folyamatossá válik a génexpresszió, így a vizsgálni kívánt gén hatása erőteljesebb lesz, és nem függ a környezeti állapottól, vagy a fejlődési fázistól. Ugyanakkor a folyamatos működés hátrányosan is hathat a növényre, pl. lassabb növekedést, késői virágzást, törpülést és legrosszabb esetben letalitást is előidézhet. Ezt a problémát indukálható promóterekkel lehet kivédeni. Az ilyen promóterek indukálódhatnak kémiai anyagokra, vagy fizikai hatásokra, kifejeződhetnek az egész szervezetben, vagy biztosíthatnak csak szerv-, ill. szövet-specifikus génexpressziót. Így a géntermék csak a kívánt időben és helyen fejeződik ki, mint ahogy az egy természetes rendszerben is történik. Ilyen indukálható promotere van

például a *Cor15a* génnek, mely az eddig leírtak szerint, stressz hatására lép működésbe a növényben.

3.10. Transzformációval elért eredmények *CBF* gének esetében

Tsai-Hung Hsieh et al. (2002) paradicsom növénybe (*Lycopersicon esculentum*), egy 35 S promoterrel rendelkező *Arabidopsis thaliana* növényből származó *CBF1* cDNS szakaszt transzformáltak. A 35 S promoternek köszönhetően a növényben a *CBF1* transzkripciós faktor folyamatosan termelődött. Vizsgálataik szerint a transzgénikus növények ellenállóbbak voltak a vízhiánnyal szemben, mint a vad típusúak, ugyanis vízhiányos állapotban, vagy gibberellinsavas előkezelést követően a *CBF1* paradicsomok sztomái gyorsabban záródtak. Azonban a *CBF1* génnek jelentkeztek negatív hatásai is. A transzgénikus paradicsomok lassú növekedést és törpe fenotípust mutattak. A gyümölcs- és magszám kevesebb volt, valamint a hajtás friss tömege is alacsonyabb lett, mint a vad típusú növényeknél.

Annikki et al. (2008) négy *CBF* gént azonosított nyírfában (*Betula pendula*). Ezeket a géneket (*BpCBF1*- 4) lúdfűben a 35 S promoter által folyamatosan működtetve növelt a növények fagytoleranciája a vad típusúakhoz képest. Ugyanakkor, mint a transzgénikus paradicsomoknál is tapasztalták, a *BpCBF* transzkripciós faktorokat túltermelő *Arabidopsis*-ok mérete kisebb lett, valamint a virágzási idő is kitolódott, eltérve a vad típusútól. Vizsgálataik során azt is kimutatták, hogy hidegedzett nyírfában a fagy utáni olvadási periódus során szintén megnő a *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.

Siddiqua és Nasuth (2011) szőlőből (*Vitis riparia*) 4 *CBF* gént izolált. Ebből kettőt, a *VrCBF1* és a *VrCBF4* gént vizsgáltak szintén *Arabidopsis thaliana* növénybe transzformálva. A két gén között különbségeket mutattak ki, miszerint a *CBF4* gént tartalmazó transzgénikus vonalak magasabb expressziós szintet mutattak, mint a *CBF1* gént tartalmazó vonalak. A fagytolerancia pedig korrelált a génexpresszióval, azaz a *CBF4* gént tartalmazó transzgénikus *Arabidopsis*-ok ellenállóbbak voltak a faggal szemben. Tanulmányukban megállapították azt is, hogy a különböző *CBF* gének nem azonos arányban találhatók meg a növény szerveiben és szöveteiben. *Vitis riparia* esetében a *CBF4* transzkriptumot a fiatal levelekben és a már jól kifejtett levelekben lehetett kimutatni, míg a *CBF2*, 3 és 4 transzkriptumokat csak a fiatal levelek és rügyek tartalmazták.

Chinnusamy et al. (2003) azt mutatta ki, hogy az *ICE1* génnel transzformált *Arabidopsis*-ban a gént konstitutívan túltermelve hidegben megnő a *CBF* regulonhoz tartozó gének átírása a vad típusához képest, továbbá nő a fagyállóság mértéke is.

Transzgénikus *Arabidopsis thaliana* 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).

3.11. Reverz-transzkripció PCR technika (RT-PCR)

Howard M. Temin és David Baltimore által 1970-ben felfedezett reverz-transzkriptáz enzim lehetőséget adott arra, hogy DNS helyett RNS minta alapján szintetizálódjon DNS. Az ilyen módon előállított DNS a komplementer-DNS (cDNS).

A reverz transzkriptáz enzim az mRNS 3'-végén lévő poli-A farokhoz anellált oligodT primeren el tudja kezdeni a cDNS szintézist. Primerként alkalmazhatóak továbbá random hexamer oligonukleotidok vagy génspecifikus primerek is (Sarkadi 2007).

Az elkészült cDNS-ről polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikálható fel a kiválasztott célszekvencia. A teljes folyamatot RT-PCR technikának nevezzük.

3.12. A fagytűrés meghatározásának lehetőségei

A növények fagytoleranciáját több különböző módszerrel lehet megállapítani. A direkt meghatározás mellett lehetőségünk van indirekt módon, a klorofil fluoreszcencia mérésével, konduktancia vizsgálatokkal is tanulmányozni.

- **Fagytűrés meghatározása indirekt módon, klorofil fluoreszcencia meghatározásával:**

A növények II. fotokémiai rendszerének (PSII) fagyás által okozott működésbeli változását a PSII maximális kvantumhatásfokának meghatározásával lehet megállapítani, mely a sötétadaptált növény levelén mért változó (Fv) és maximális (Fm) fluoreszcencia aránya (Fv/Fm) (Butler és Kitajima 1975). A klorofil fluoreszcens indukciós paraméterek (Fv/Fm arány és F0 érték) mérését a leveken fluorométerrel végzik, majd az Fv/Fm arányt és az F0,

azaz a minimális fluoreszcencia értékeket közvetlenül a fagyasztás előtt, a fagyasztás után, valamint 24 h, és 48 h-val a fagyasztást követően (Rizza et al. 2001).

- **Konduktancia vizsgálat:**

A konduktancia vizsgálat a növényi szövetekből kiszivárgó elektrolitok hatására bekövetkező vezetőképesség növekedésből következtet a fagytűrésre. A maximális konduktanciát forralás után állapítják meg. A minták relatív konduktanciáját a maximális konduktancia százalékos arányában adják meg a következő formula alapján:

$$\frac{\text{Minta konduktanciája} - \text{MQ víz konduktanciája}}{\text{Minta maximális konduktanciája} - \text{MQ víz konduktanciája}} * 100 = \text{Minta relatív konduktanciája (\%)}$$

- **Direkt fagytűrés meghatározása:**

A fagytűrés direkt meghatározása az egyik leggyakrabban és legkönnyebben alkalmazható módszer. Lényege, hogy a növények fagyasztása után, a regenerációs időszakban regenerációs kapacitást és/vagy túlélési százalékot számolnak.

3.13. A szárazság-stressz tolerancia mérésének lehetőségei

A szárazságstressz hatását a levelek relatív víztartalmának, vízpotenciáljának, a növekedési paraméterek meghatározásával, valamint a fotoszintetikus tulajdonságok (CO_2 asszimiláció mértéke, sztómazártság, fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok) vizsgálatán keresztül lehet nyomon követni.

- **Klorofil fluoreszcencia mérése:**

Mivel szárazság hatására a növények fotoszintetikus képessége romlik, a klorofill fluoreszcencia jelensége nyomán vizsgálható a fotokémia hatásfoka és működésének egyéb paraméterei ugyan úgy, mint a fagystressz esetében. Wright et al. (2009) levágott szőlőnövényeket vizsgáltak, hogy megtudják alkalmas-e a klorofill fluoreszcencia a növény kiszáradásának nyomon követésére. Az ozmotikus potenciállal és a súlyvesztéssel párhuzamosan a klorofill fluoreszcencia mért értékei is viszonylag érzékenyen reagáltak a kiszáradásra. Ugyanakkor azt is megállapították, hogy a gyakorlatban csak a lassú kiszáradást lehet jól nyomon követni ezen műszerek segítségével.

- **Termolumineszcencia mérése:**

Termolumineszcenciának nevezzük azt a jelenséget, amikor egy előzetesen fénnel gerjesztett fagyasztott minta sötétben történő felmelegítése során fényt bocsát ki. Az alacsony hőmérsékleten gerjesztett minta több fotokémiai komponense (QA, QB, S2, S3) képes az elnyelt energia tárolására. Mivel a gerjesztést követően a minta újra sötétbe kerül, ez az elraktározott energia nem vesz részt további fotokémiai reakcióban, a töltések az elektrontranszport lánc P680-hoz közelebb elhelyezkedő komponensein tárolódnak. A környezeti hőmérséklet növelésével töltés rekombináció idézhető elő ezekben a mintákban. Ez azt jelenti, hogy a tárolt energia visszavándorol a klorofillokra, és ott fény formájában kisugárzódik a környezetbe, vagy pedig hővé alakul (Sane és Rutherford, 1986).

- **Vízpotenciál mérése:**

Caruso et al. (2007) nyárfa vízpotenciálját és sztómakonduktanciáját vizsgálták PEG kezelés hatására, és a legérzékenyebb mutatónak a vízpotenciál értéket találták a szárazságstressz kimutatására. A vízpotenciál érték mérésére több módszert is kifejlesztettek. A leggyakrabban használt eszköz a Scholander bomba, mely egy zárt térben emeli meg a nyomást, így a benne elhelyezett növényi részből a nedv visszanyomódik a vágási felületre, melyet a gépen kívül lehet megfigyelni. A nedvcsepp megjelenésekor mért nyomás megegyezik a levágott szerv vízpotenciáljával.

- **Fotoszintetikus aktivitás mérése és porometria:**

A nyitott rendszerű infravörös gázanalizátorok (IRGA) használata a növényi gázcsere jellemzésében széles körben elterjedt. Segítségükkel meghatározható a levél belső CO_2 koncentrációja, a fotoszintetikus aktivitás, és a sztómakonduktancia is. Az infravörös gáz analizátorok mérési elve azon alapul, hogy a heteroatomos molekulák, mint a CO_2 , H_2O , NO adott hullámhossz sávban elnyelik az infra-vörös sugárzást. A műszer az áramlásvezető csőben haladó CO_2 és H_2O jelenlétét érzékeli oly módon, hogy a cső egyik végében infra-vörös érzékelő, a másik végében infra-vörös fényforrás van. Ezen molekulák jelenlétében az érzékelőn az azokra jellemző hullámhosszon a koncentrációtól és a cső hosszától függő fényelnyelési érték mérhető (Avola et al. 2008).

4. Anyag és módszer

4.1. Növényanyag

Vizsgálataimat *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *TaeCBF16* génnel transzformált *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia növényeken végeztem. Az *A. thaliana*, *TaeCBF16* cDNS-sel transzformált változatát konzulenseim, Dr. Papp István (Budapesti Corvinus Egyetem) és Dr. Vágújfalvi Attila (Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont) közös munkával hozták létre. A *TaeCBF16* gént egy fagytüdő genotípusú kenyérbúzából (*Triticum aestivum* ssp. cv. Cheyenne) izolálták és egy *Cor15a* indukálható promóterrel együtt pCambia 1300 típusú vektorba építették be. A transzformáció *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével történt, virág-infiltrációs módszerrel. Ezt követően a magokat kiszárították, sterilizálták, majd Hygromicin és Claforán tartalmú szelektív táptalajon csíráztatták.

4.2. Növénynevelés

A kicsírázott növényeket virágföldbe (Compo Sana, II. típus) ültettük át és 4 hétig rövidnappalos körülmények között (10 óra fény, 14 óra sötét), Conviron növénynevelő kamrában neveltük. Ezt követően átraktuk hosszúnappalos fitotronba (16 óra fény, 8 óra sötét), ahol a körülmények miatt virágzásra kényszerültek. A növénynevelő kamrákban kb. 65%-os relatív páratartalom mellett 21°C-os hőmérsékletet biztosítottunk, a fényerősség 120 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. A virágzást követően magot fogtunk róluk, melyeket már nem szelektív táptalajra, hanem földbe vetettünk és a növényeket az előbb leírt módon neveltük fel. Minden egyes növényvonal reprezentáns egyedeiből DNS-t vontunk ki és csak a transzgénikus egyedekből fogtunk magot. A T2-es nemzedéket pedig élettani, azaz fagyteszt és szárazság-stressz vizsgálatoknak vetettük alá.



3. ábra: *TaeCBF16* transzformáns *Arabidopsis thaliana* növények, a molekuláris vizsgálatok előtt.

4.3. Transzformáció ellenőrzése

DNS kivonás

A *TaeCBF16* gén jelenlétének kimutatásához minden transzformáns vonal egyedeiből genomi DNS-t vontunk ki, valamint a negatív kontroll érdekében az *A. thaliana* cv. Columbia növényekből is. A kivonást az Edwards et al. (1991) által leírt *Rapid DNA preparation* módszer módosított változata szerint végeztük. A vegyszereket a Sigma illetve a Reanal cégektől szereztük be.

A *Rapid DNA preparation* módosított változatának lépései:

1. 1,5 ml-es Eppendorf csövekben egy átlagos méretű levélmintát eldörzsöltünk.
2. 200 µl extrakciós puffert adtunk hozzá.
3. Szobahőmérsékleten fél percig vortexeltük.
4. A mintákat lecentrifugáltuk 23°C-on, 12 percig, 14500-as fordulatszámon.
5. A felülúszóból 140 µl-t leszívtunk és új Eppendorf csőbe helyeztük.
6. 140 µl izo-propanolt adtunk hozzá.
7. 10 percig centrifugáltuk 23°C-on, 14500-as fordulatszámon.
8. A felülúszót leöntöttük és 600 µl 75%-os etil-alkohollal átmostuk.

9. 5 perces centrifugálással beszáritottuk a csapadékot.

10. 60 µl MQ vízben feloldottuk a DNS-t.

Extrakciós puffer összetétele:

- 4ml 1M Tris HCl pH: 7,5
- 1ml 5M NaCl
- 0,5 ml 0,5M EDTA
- 0,5 ml 20% SDS
- 14 ml desztillált víz

PCR reakció

A kinyert DNS mintákat Perkin Elmer 9600 PCR készülékben amplifikáltuk a következő protokollt követve.

A PCR reakcióelegy:

- | | |
|---------------------------------------|-----------------|
| • 5x Go Taq Flexi puffer | 10 µl |
| • 25 mM MgCl ₂ | 6 µl |
| • 2,5 mM dNTP-mix | 4 µl |
| • DMSO | 2 µl |
| • Promega Go Taq Flexi DNA Polymerase | 0,35 µl |
| • Forward primer | 3 µl |
| • Reverz primer | 3 µl |
| • DNS templát | 6 µl |
| • <u>MQ víz</u> | <u>15,65 µl</u> |

Össztérfogat: 50,0 µl

A DNS mintákon alkalmazott polimeráz-lánreakció programja a PCR-készülékben:

- | | | | |
|-------------------------------|-------|---------------------|-------------|
| 1. Taq-polimeráz hőaktiválás | 95 °C | 2 perc 30 másodperc | |
| 2. Denaturálás | 95 °C | 30 másodperc | } 30 ciklus |
| 3. Primer tapadás – annealing | 60 °C | 30 másodperc | |
| 4. Polimerizáció – extension | 72 °C | 1 perc | |
| 5. Végső polimerizáció | 72°C | 7 perc | |

Gélelektroforézis

A PCR gépben felszaporodott DNS mintákat 1,3 %-os agaróz gélen futtattuk meg. Minden DNS mintához 5,5 µl minta-felvívő („loading dye”) festéket adtunk, majd az így kapott keverékből 10 µl-t vittünk fel az agaróz gél zsebeibe. Molekulatömeg markernek PstI enzimmel emésztett λ-fág DNS-t használtunk. A futtatás 0,5x TBE pufferben végeztük 120 V-os feszültség mellett.

1,3 %-os Agaróz gél összetétele:

- 1,56 g agaróz (Invitrogen)
- 210 ml 0,5x TBE
- 4,5 µl Ethidium-bromid

10x TBE puffer összetétele:

- 108 g Tris Ultrapure (Duchefa)
- 55 g bórsav

Loading dye festék összetevői:

- 3,3 ml 86 %-os Glicerín
- 25 mg bróm-fenolkék
- 6,6 ml desztillált víz

4.4. A *TaeCBF16* gén kifejeződésének kimutatása RT-PCR-rel

Annak érdekében, hogy bebizonyítsuk, a növényekbe bevitt új gén valóban működik, RNS kivonást, majd RT-PCR-t végeztünk. Ehhez 5 transzformáns vonal egyedeit és egy vad típusú Columbiát használtunk. Minden növényből kétszer vontunk ki RNS-t, egyszer normál állapotában, másodszor hidegkezelés után. A hidegkezelés 12 órán keresztül 6 °C-on történt, az abiotikus stressz hatásra indukálódó promóter aktiválása érdekében.

RNS izolálás TRI Reagenssel:

1. Körülbelül 100 mg levélmintát folyékony nitrogénnel eldörzsöltünk steril dörzsmozsárban, majd még fagyott állapotban Eppendorf csövekbe helyeztük őket.
2. Rápipettáztunk 1ml TRI Reagent-et.
3. Vortex segítségével homogenizáltuk, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.
4. 4°C-on, 10 percig centrifugáltuk 12000-es fordulatszámon.
5. A felülúszót óvatosan leszívtuk és új, 2 ml-es Eppendorf csövekbe raktuk át.
6. 200 µl kloroformot pipettáztunk rá és vortex segítségével összekevertük.
7. Szobahőmérsékleten hagytuk 10 percig, majd jégre raktuk 1-2 percig.
8. 15 percig centrifugáltuk 4°C-on 12000-es fordulatszámon.
9. A felülúszót óvatosan leszívtuk és új Eppendorf csövekbe pipettáztuk
10. 500 µl isopropanolt pipettáztunk rá, majd 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd kicsit összeráztuk.
11. 8 percig centrifugáltuk 4 °C-on 12000-es fordulatszámon.
12. Az egész Eppendorf csőben lévő folyadékot leöntöttük, majd az így üressé vált csőbe 1ml 75%-os etanolt öntöttünk.
13. 5 percig centrifugáltuk 4°C-on 12500-as fordulatszámon.
14. Újra leöntöttük a folyadékot és 1 ml 75%-os etanol hozzáadása után centrifugáltunk.
15. Az Eppendorf csőben lévő folyadékot ismét leöntöttük, majd centrifugában szárítottuk.
16. 60 µl RNáz mentes vizet adtunk hozzá.

Az RNS izolálást követően a minták koncentrációját NanoDrop készülékkel mértük meg, majd RNáz mentes vízzel 100 ng/µl-es koncentrációra hígítottuk őket. Ezt követően 1,4%-os agaróz gélen, mintánként 12 µl RNS-t 2µl festékkel összekeverve futtattunk 0,5x TBE pufferben.

Az RNS minták futtatásához használt 1,4%-os gél összetétele:

- 1,68g agaróz (Invitrogen)
- 0,5% TBE
- 3µl Gél Green festék

cDNS szintézis

Az izolált és azonos mennyiségre hígított RNS mintákból, *Fermentas first strand cDNA Syntesis #1612 kit* használatával cDNS-t szintetizáltunk.

cDNS szintézi lépései:

1. Összeállítottuk a templát-mixet.

- RNS 11 µl
- Oligo(dT)₁₈ Primer 1 µl

2. A templát-mixet 70°C-on 5 percig inkubáltuk, majd jégre raktuk.

3. Elkészítettük a reakcióelegyet és hozzáadtuk a templát-mixhez.

- Puffer 4 µl
- RiboLockTM ribonukleáz inhibitor (20U/ µl) 1 µl
- 10mM dNTP 2 µl

4. 37°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 1 µl Reverz transzkriptázt (200u/ µl) adtunk hozzá.

5. 42°C-on 60 percig inkubáltuk.

6. 70°C-on 10 percig inkubáltuk.

PCR reakció *TaeCBF16* specifikus primerrel és *beta-tubulin-4* primerrel

Mivel a cDNS szintézi során Oligo(dT)₁₈ Primert használtunk, ezért az összes mRNS-ből készült cDNS. Annak érdekében, hogy kimutathassuk, hogy a hidegkezelés hatására nagyobb mennyiségű-e a *TaeCBF16* cDNS, mint a kezeletlen mintáknál, a génre specifikus primerekkel PCR reakciót végeztünk. Ahhoz pedig, hogy meggyőződjünk az RNS izolálás tisztaságáról, azaz genomi DNS mentességéről, *Arabidopsis thaliana* *beta-tubulin-4* primerekkel hajtottunk végre PCR reakciót. A tubulin gén a növényben körülbelül állandó

erősséggel fejeződik ki, agaróz gélen pedig elkülöníthető a genomi tubulin DNS szakasz a cDNS szakasztól, mely az intronok miatt nagyobb méretű.

A PCR reakciók és a minták megfuttatása 1,3 %-os agaróz gélen a korábban már leírt protokoll és program alapján történtek.

A felhasznált primerek

A vizsgálatainkhoz felhasznált primereket és azok jellemzőit az **1. táblázatban** soroltuk fel.

1. táblázat.

Primer neve	T _m °	OD	Termék mérete	Szekvencia (5'-3')
<i>CBF16</i> sense	67,4	12,1	-intron=619bp	CGTACGAAGCTCATCAAGCCA
<i>CBF16</i> antisense	69,1	9,5		GTCCATCTCCCCGGACAAGTC
<i>A.thaliana</i> beta-tubulin-4 sense	60,3	1,5	+intron=645 bp	CAGGGAAACGAAGACAGCAAGT
<i>A.thaliana</i> beta-tubulin-4 antisense	60,3	4,6	-intron=426 bp	CGAAAGGTCATTACACCGAAGG

A *CBF16* sense és antisense primerpárt a Primer Premier 5 nevű program segítségével terveztük meg.

4.5. Élettani vizsgálatok

Fagyasztás

A fagyasztási kísérletre, a molekuláris vizsgálatokra pozitív eredményt mutató *Arabidopsis* vonalak utódnemzedékét és kontrollként Columbia típusú növényeket használtunk. Ez vonalanként két-három tenyészedényt jelentett, melyek mindegyike 12 darab növényt tartalmazott. A vizsgálat Dr. Vágújfalvi Attila vezetésével az MTA Martonvásári Kutatóintézetének fitotronjaiban történt.

A fagyasztási kísérlet a téli hónapokra jellemző időjárási viszonyokat próbálja visszaadni. Ősszel, a nagyobb fagyok előtt fokozatos lehűlés figyelhető meg, ezért a

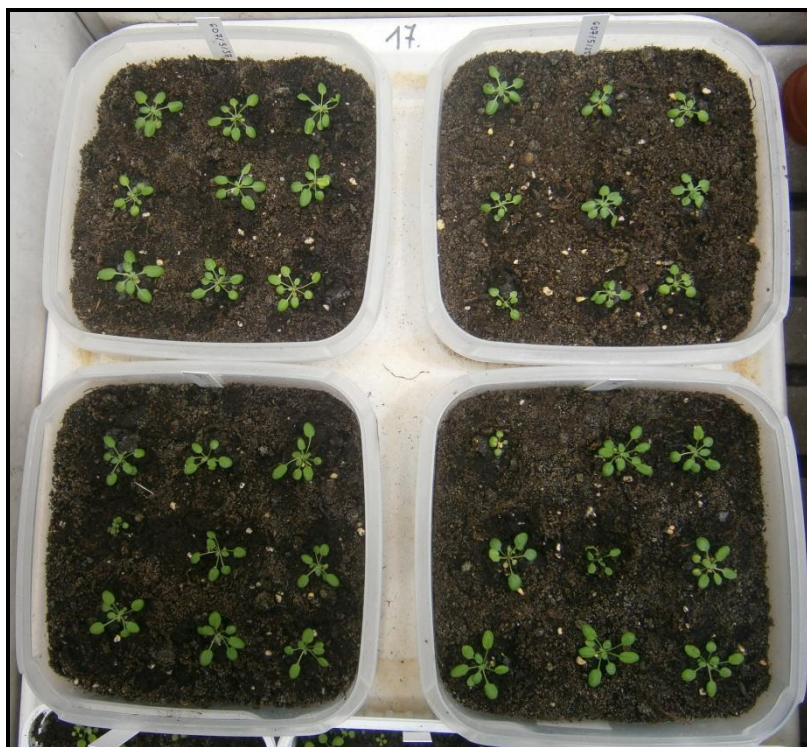
növényeknek van idejük edződni. Ezt a folyamatot utánozva, két fagyasztási kísérletet végeztünk. Az egyik során a növényeket először 1 hétig alacsony hőmérsékleten, +5°C-on edzettük és csak ez után helyeztük át őket a fagyasztó kamrába. A másik kísérlet során a tesztelni kívánt növényeket a kontroll körülmények (21/20°C) után, edzés nélkül, közvetlenül a fagyasztó kamrákba helyeztük. A fagyasztás mindkét esetben azonos körülmények között zajlott, azaz a hőmérsékletet fokozatosan csökkentettük, óránként 1 °C-kal. A hideg edzést nem kapott növények esetében +4 °C-ról -8°C-ra, míg a hideg-edzett minták esetében -10°C-ra csökkent a hőmérséklet. Ezt a fagyhőmérsékletet 6 órán keresztül tartottuk, majd újra óránként 1 °C-kal növelt a hőmérséklet +5°C-ig. A fagy után 1 hét regenerációs periódus következett, kontroll körülmények között.

A fagyűrész direkt meghatározása

A növények fagykárosodását a regenerálódó-képességük alapján határoztuk meg. A növények túlélésének mértékét a fagyasztás után egy-két nappal és egy héttel értékeltük egy 0-tól (a fagyasztást nem élte túl) 5-ig (a fagyasztást károsodás nélkül túlélő) terjedő skálán.

Szárazság-stressz vizsgálat

A vizsgálatához 4 transzformáns növényvonal egyedeit használtuk fel, melyeken előzőleg a molekuláris vizsgálatokat elvégeztük. Ezen növények magjait 1 hetes vernalizációnak vetettük alá, mely 6 °C-on történt. Kontrollnak Columbia típusú *Arabidopsis* növényeket használtunk, ezek nevelési módja nem tért el a transzformánsokétól. A vernalizált magokat földbe vetettük és a már korábban leírt körülmények között, 3 hétig rövidnappalos körülmények között fitotronokban neveltük. Ezt követően 9 növényt ültettünk át egy tenyészedénybe, melyekbe azonos mennyiségű, 450g földet raktunk. Egy tenyészedény csak egy növényvonal egyedeit tartalmazta.



4. ábra: A 9-9 növényt tartalmazó tenyészedények.

A növényeket alulról, 2 naponta locsoltuk, amíg el nem érték a kifejlett nagyságukat. Ezután, még mielőtt a virágzást megkezdték volna, teljes vízmegvonással szárítani kezdtük őket. A vízvesztés számán követése céljából 2 naponta mértük a tenyészedények tömegét. Mikor a kontroll növények elérték a kiszáradás állapotát, újra belocsoltuk az összes növényt, a rehidratációs képességük felmérése érdekében. Majd a mért adatokból relatív víztartalmat (RWC%) számoltunk a következő képlet alapján.

$$\text{RWC\%} = (\text{aktuális hidratáció} - \text{száraz súly} / \text{turgid súly} - \text{száraz súly}) * 100$$

Varianciaanalízis

Annak érdekében, hogy kimondhassuk, a mérési eredmények nem pusztán a véletlen műve, hanem az eltérések közötti különbségek statisztikailag is kimutathatóak, SPSS programmal varianciaanalízist, azon belül F próbát végeztünk a fagyasztott és hidegedzett növények eredményeivel. Mivel a 0-5-ig terjedő túlélésre vonatkozó értékeket magas mérési szintű változónak, a növényvonalakat pedig nominális változónak nevezhetjük, így a két változó összefüggéseinek elemzésére alkalmas a varianciaanalízis.

5. Eredmények

5.1. A *TaeCBF16* transzformáns növények

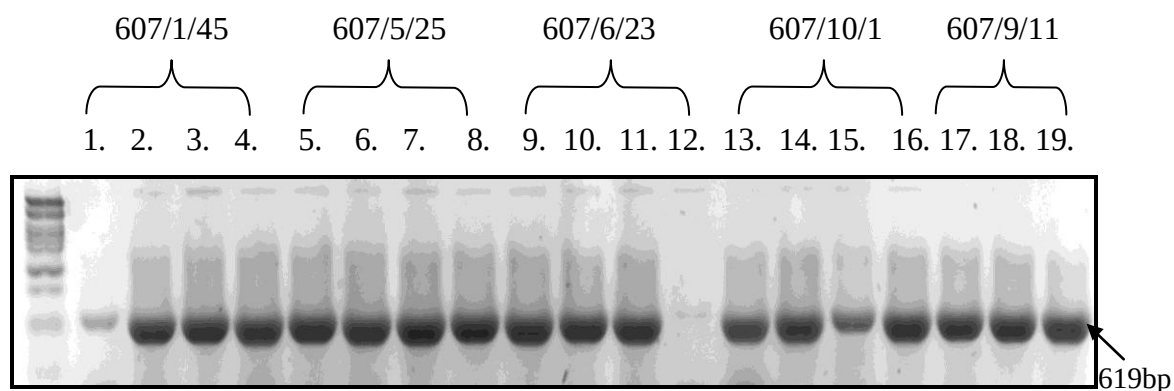
Ahogy azt már korábban említettem, a legtöbb transzformációs vizsgálatnál megfigyelték a transzformáns növények fejlődésbeli és fenotípusbeli különbségeit a vad típusú növényekkel szemben. Az általunk nevelt *TaeCBF16* transzformáns *Arabidopsis* növényeknél nagy különbséget nem tapasztaltunk a Columbia típuskoz viszonyítva. Ugyanakkor akadtak olyan egyedek, melyek a többinél lassabb növekedést mutattak, valamint törpe fenotípust (**5. ábra.**). A későbbi transzgén specifikus PCR és RT-PCR vizsgálatoknál azonban a vad fenotípusú növényvonalak is pozitív eredményt adtak.



5. ábra: Azonos korú, de eltérő méretű *TaeCBF16* transzformáns *Arabidopsis*-ok.

5.2. Transzformáció ellenőrzése

Annak érdekében, hogy az *Arabidopsis thaliana* növénybe transzformált gén jelenlétéről megbizonyosodjunk, a növényvonalak több egyedéből DNS kivonást végeztünk, és csak pozitív eredményt mutató, transzgénikus egyedekből fogtunk magot. A T2. nemzedék PCR eredményei a 6. ábrán láthatóak.



6. ábra Az *Arabidopsis* növények genomi DNS-eiről felszaporított *TaeCBF16* specifikus géntermék futtatási képe.

5.3. A *TaeCBF16* gén működésének tesztelése

RNS izolálás

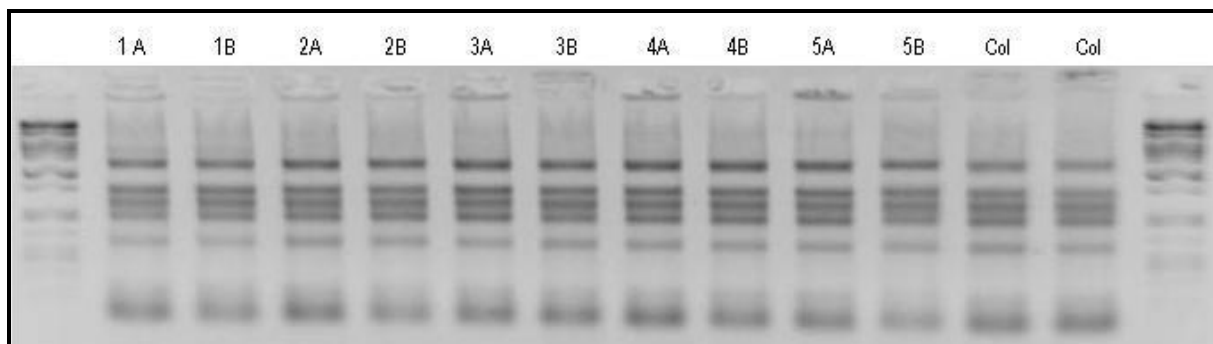
A transzgénikus vonalak reprezentatív egyedeiből hidegkezelés előtt és után TRI Reagens segítségével RNS-t tisztítottunk. Az izolált RNS-ek mennyiségét és minőségét NanoDrop készülékkel mértük és ellenőriztük (**2. táblázat**). A megfelelő minőséget és tisztaságot a 260 és 280 nm-en mért optikai denzitások aránya jellemzi. A kiemelkedően tiszta RNS esetében ez az arány az 1,9 – 2,1 értékhatáron belül van.

2. táblázat. Az izolált RNS-ek NanoDrop eredményei.

Növényegyedek sorszáma	ng/μl	260/280
607/1/45/4 A*	457	1,93
607/1/45/4 B*	332	2,03
607/5/25/5 A	372	1,99
607/5/25/5 B	326	1,92
607/6/23/11 A	440	1,99
607/6/23/11 B	311	2,05
607/10/1/15 A	287	2,08
607/10/1/15 B	165	2,04
607/9/11/19 A	108	1,92
607/9/11/19 B	102	1,93
Col A	322	2,01
Col B	242	1,97

* A= hidegkezelés előtt *B= hidegkezelt

A 100 ng/μl koncentrációra hígított RNS-ek mintázata agaróz gélen a **7. ábrán** látható.



7. ábra: Kiegészített RNS-ek

A: hidegkezelés nélküli

B: hidegkezelt

1: 607/1/45/4

2: 607/5/25/5

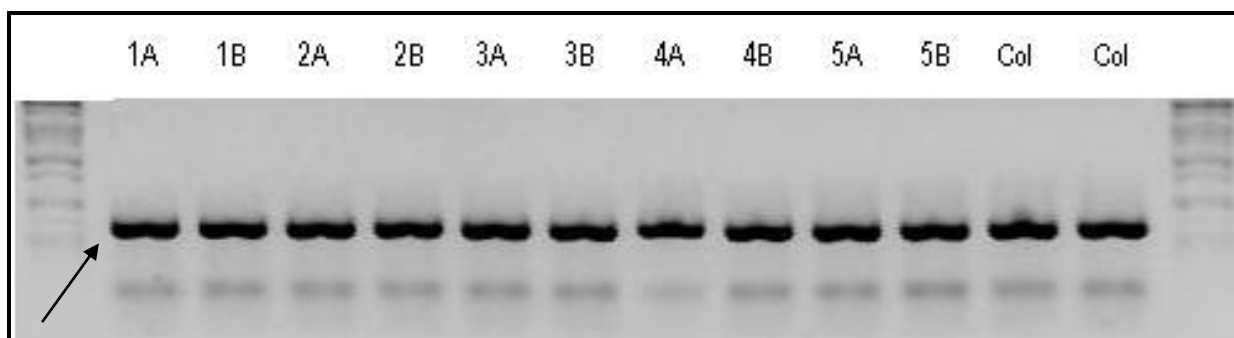
3: 607/6/23/11

4: 607/10/1/15

5: 607/9/11/19

RT-PCR tubulin és *TaeCBF16* primerekkel

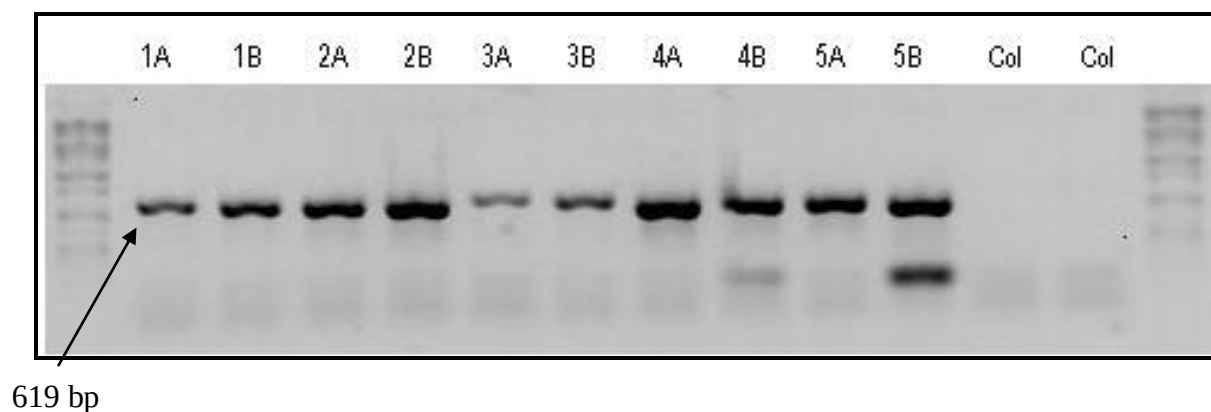
Az izolált cDNS-ek beta-tubulin primerrel történő polimeráz láncreakciója az agaróz gélképen csak a 426 bp nagyságú tartományban adott terméket az összes minta esetében. 645 bp-os termék, mely az intronokat tartalmazó tubulin gén mérete, nem volt látható a gélen. A képen jól látható, hogy a mennyiségük is azonos, nagyobb eltérés nem tapasztalható. (**8. ábra.**)



426bp

8. ábra: Beta-tubulin-4 gén expressziós mintázata.

A *TaeCBF16* primerekkel elvégzett PCR reakció utáni gélképen (9. ábra) megfigyelhető, hogy a nem hidegkezelt növényekből származó cDNS-ek mennyisége kevesebb, mint a hidegkezelt növények esetében. Egy növényvonalban tapasztalunk ellentétes irányú változást (4A/4B).



9. ábra: *TaeCBF16* gén expressziós mintázata hidegkezelés előtt és után.

5.4. Az élettani vizsgálatok eredményei

Fagyasztás hidegedzéssel

Az alacsony hőmérsékleten edzett növények fagyasztása után két nappal készített fényképeken (10-11. ábra) különbségek mutatkoztak a vad típusú Columbia és a transzformáns vonalak között.

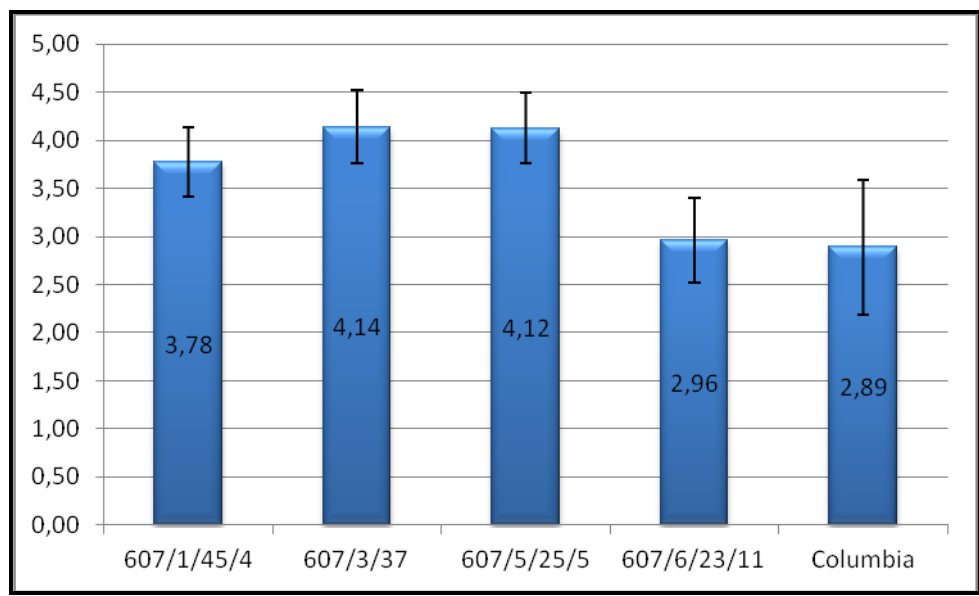


10. ábra: A hidegedzett Columbia növények a fagyasztás után 2 nappal.



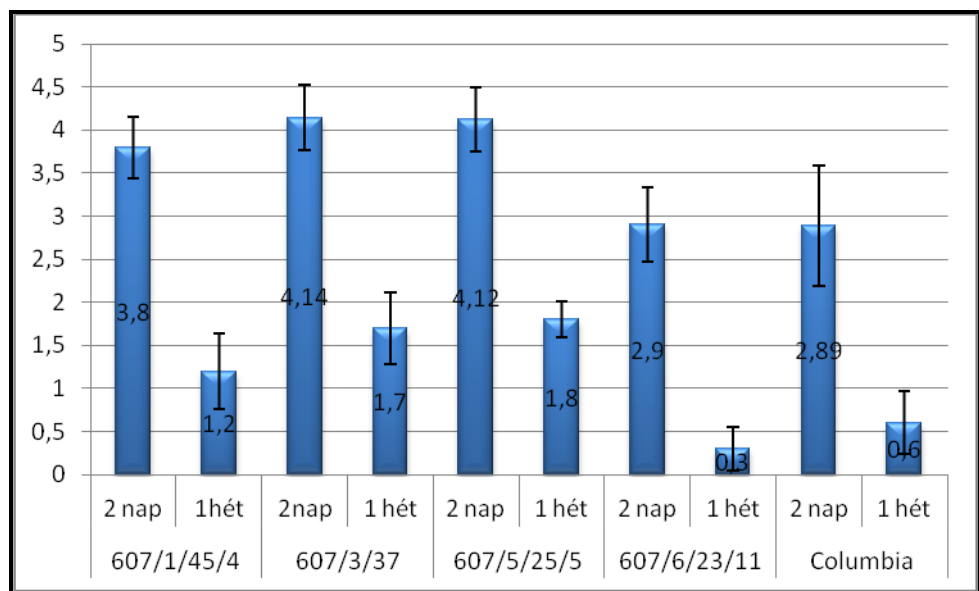
11. ábra: A hidegedzett *TaeCBF16* transzformáns vonalak a fagyasztás után 2 nappal.

A fagyteszt utáni regeneráció mértékére vonatkozó 0-5-ig terjedő értékeket hozzárendelve és vonalakon belül átlagolva szintén eltérés érzékelhető. A két napos értékelés után a transzformáns vonalak magasabb bonitálási értéket értek el, mint a kontroll növények (12. ábra).

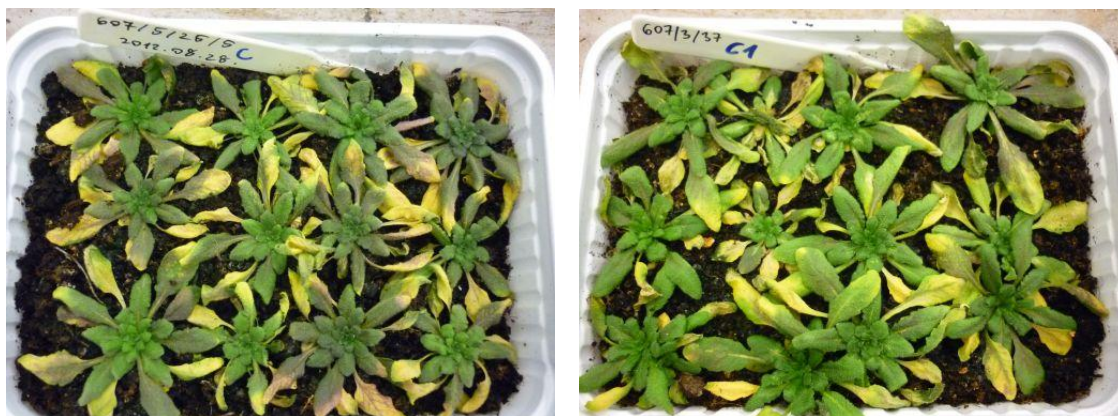


12. ábra: A hidegedzett növények fagyűrésre vonatkozó értékei a fagyasztás után két nappal.

1 hét eltelte után azonban a fagy hatására károsodott növények túlélési mértéke csökkent, de a transzformáns növényvonalak közül 3 még így is magasabb értékeket ért el, mint a vad típus (**13. ábra**).



13. ábra: Hidegedzett növények fagytolerancia és szórás értékei a fagyasztás után 2 nappal és 1 héttel.



14. ábra: Hidegedzett transzformás *Arabidopsis*ok a fagyasztás után 1 héttel.



15. ábra: Hidegedzett Columbia típusú *Arabidopsis*-ok a fagyasztás után 1 héttel.

Varianciaanalízis

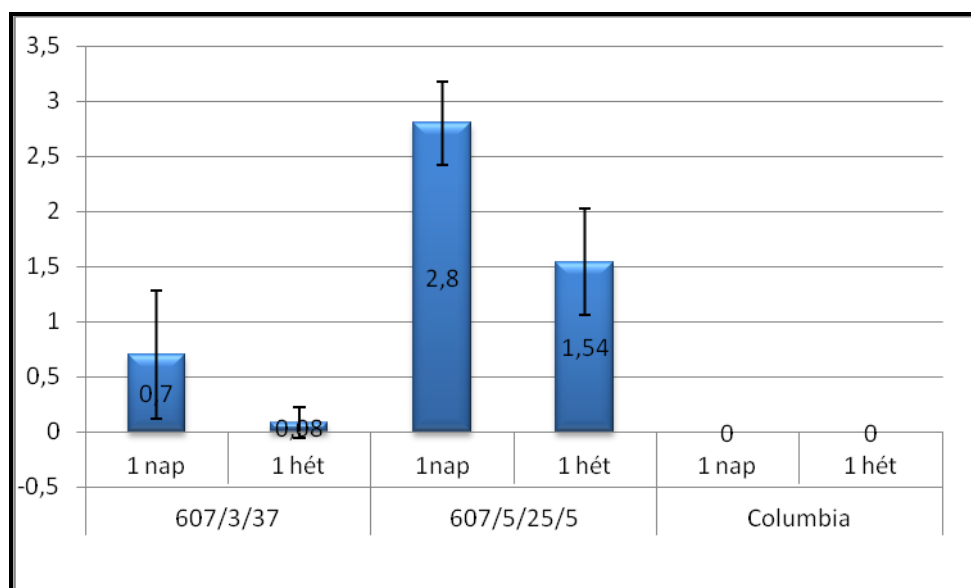
A fagyasztás utáni egy napos és az egy hetes változók között van összefüggés, hiszen az F-próba szignifikanciája 0,000, amely kisebb, mint 0,05, ezzel a hipotézisünk beigazolódott (5 % - os elsőfajú hibavalószínűség mellett), tehát az átlagok szignifikánsan különböznek növényvonalanként.

Az egy napos változók közti összefüggést 0,593-es Eta-val jellemezhetjük, a növény típusa független változó, a túlélési értékek heterogenitásának 35,2%-át magyarázza.

Az egy hét után kapott változók közti összefüggést pedig 0,648-as Eta-val tudjuk jellemezni, a növény típusa független változó a túlélésre vonatkozó értékek heterogenitásának 42%-át magyarázza.

Edzés nélküli fagyteszt

Az edzés nélküli fagytesztről elmondható, hogy sokkal nagyobb terhelést jelentett a növények számára, mint az edzést követő fagyasztás. A Columbia típusú lúdfüvek mind elpusztultak és a fagyasztás befejezte után egy héttel sem tértek magukhoz. A transzformáns vonalak között a túlélést illetően eltérések mutatkoztak, a négy vonal közül kettőnél az összes egyed elpusztult és egy hét után sem történt változás. Viszont két transzformáns vonalnál a fagyasztás után 1 nappal még maradtak életképes növények, Ekkor a túlélési arány az egyik vonal esetében 100%, a másik vonalnál pedig 36% volt, azonban ez 1 hét elteltével lecsökkent 79 és 5 %-ra. E két vonal fagyasztásának értékelése 0-5-ös skálán a következő eredményt adta (16. ábra).

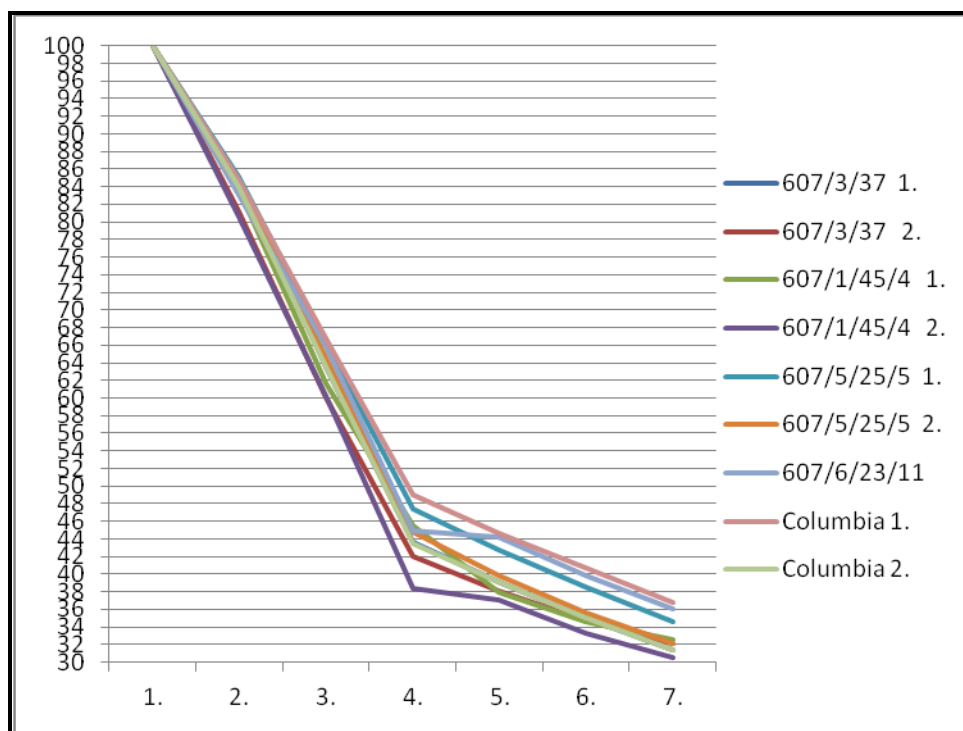


16. ábra: Edzés nélküli növények fagyasztás után 1nappal és 1 héttel.

Szárazság-stressz vizsgálat

A teljes vízmegvonásnak köszönhetően folyamatos vízvesztés, ezáltal tömeg csökkenés volt megfigyelhető a tenyészedényekben. A vízvesztéséből adódó tömegcsökkenésből következtetni lehet a növények vízvisszatartó képességére, élettani állapotukból pedig a szárazsággal szembeni toleranciájukra. A különböző növények vízvesztését az eltelt napok függvényében a 17. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a

vízvisszatartásban nincs mérvadó különbség a kontroll növények és a transzformáns lúdfüvek között.



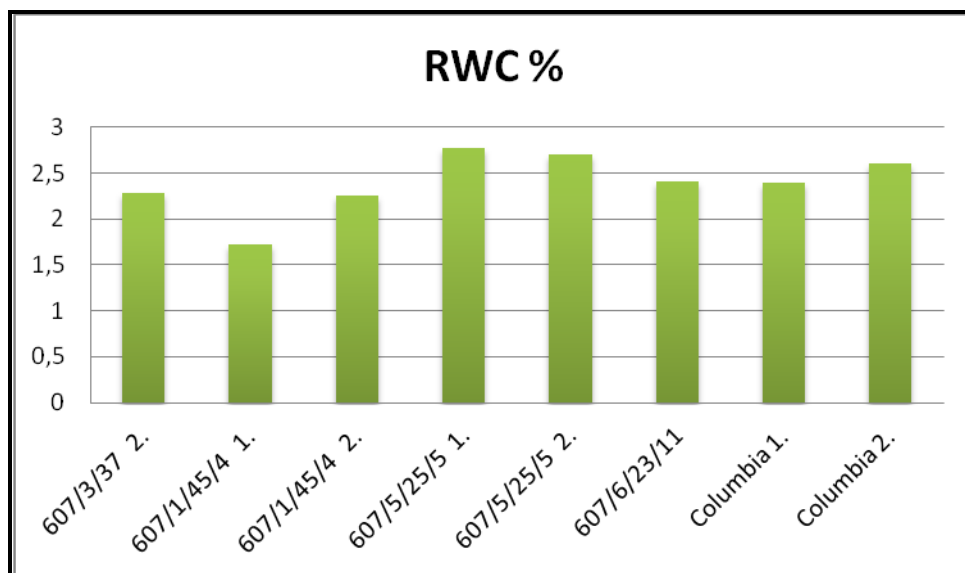
17. ábra: *Arabidopsis* növényvonalak vízvesztése %-ban kifejezve.

A növények a vízhiány következtében egységesen elszáradtak, különbséget nem tapasztaltunk a transzformáns vonalak és a Columbia típusúak között. Belocsolás után sem tértek magukhoz (**18. ábra**).



18. ábra: Kiszáradt *TaeCBF16* transzformáns lúdfű

A különböző transzformáns vonalak egyedeinek és a vad típus relatív víztartalmának összehasonlítását a következő diagram szemlélteti (**19. ábra**). A relatív víztartalomra (RWC: Relative Water Content) vonatkozó értékek is azt mutatják, hogy jelentős különbség nem tapasztalható a különböző vonalak között.



19. ábra: A vizsgált növények relatív víztartalma (RWC%)

6. Következtetések

6.1. Transzformáció

A *TaeCBF16* gén *Agrobacterium tumefaciens* által, virág-infiltrációs transzformációval sikeresen beépült *Arabidopsis thaliana* növényekbe és ezáltal stabil transzformáns vonalakat eredményezett. Ezt a nemzedékenkénti DNS kivonás és pozitív PCR eredmény támasztja alá. Valószínű, hogy az alkalmazott promóternek a sikeres transzformációban kulcsszerepe volt. A konstitutív 35S promóterhez kapcsolt *TaeCBF16* génnel ugyanis ismételt próbálkozások után sem sikerült elegendő számú transzformáns növényt létrehozni (Vágújfalvi és Papp, személyes közlés).

6.2. Transzformáns növények

Morfológiailag a transzformáns vonalak többsége nem tért el a kontroll növénytől, azonban egy vonalnál mégis törpülés volt megfigyelhető. Ennek oka lehetett a *TaeCBF16* gén többi vonaltól eltérő működése, törpítő hatása. Lehetséges azonban az is, hogy a transzgén olyan helyre épült be a növény genomi DNS-ébe, ahol megváltoztathatta annak működését, így befolyásolva a növény növekedését.

6.3. Génműködés

Egy új gén beépülése a növénybe nem mindig hozza meg a kívánt hatást, előfordulhat, hogy a növény szabályozó rendszere nem engedi a gén működését, géncsendesítés (silencing) lép fel. Esetünkben a génműködés könnyen kimutatható, mivel a *TaeCBF16* gént egy stressz hatásra indukálódó promóterrel együtt transzformáltuk *Arabidopsis*-ba, a *TaeCBF16* transzkripció faktor termelődését pedig indukálni lehet hidegkezeléssel. A hideg-indukció után molekuláris vizsgálatokkal ki lehet mutatni a *TaeCBF16* génről expresszálandó mRNA termelődést. Az RT-PCR eredménye azt igazolta, hogy a hidegkezelt minták többségében az izolált RNS-ről átíródott *TaeCBF16* cDNS mennyisége agaróz gélen láthatóan több, mint a kezeletlen minták esetében. Ez bizonyítja a beépített gén működését, valamint azt, hogy hidegkezelés hatására nő a génműködés, a kezeletlen mintákhoz képest. Egy növényvonalban

a géntermék mennyisége az indukciós körülmények között csökkent. Ebben az esetben valószínűleg a géncsendesítés jelenségét figyelhettük meg.

6.4. Fagytolerancia

A fagytoleranciára vonatkozóan két vizsgálat folyt párhuzamosan: fagyasztás hidegedzéssel és edzés nélküli fagyasztás. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a fagyasztást megelőző hidegedzéssel magasabb túlélési átlagot lehet elérni, mint edzés nélkül. Mindkét vizsgálat esetében, a fagyasztás után 1 nappal és egy héttel a kontrollként használt Columbiánál magasabb volt a transzformáns növények túlélési százaléka és a fagytoleranciára vonatkozó 1-5-ig adható értékük is. Mindezen eredmények a *TaeCBF16* gén fagy-tűrésben betöltött szerepére enged következtetni.

A kapott adatok és értékek a varianciaanalízis alapján nem a véletlen eredménye, mivel az átlagok szignifikánsan eltérőek.

Mivel arra vonatkozóan nem végeztünk vizsgálatokat, hogy a bevitt gén homozigóta állapotban volt-e jelen a növényekben, illetve hogy hány kópiában épült be a lúdfű genomjába, ezért a továbbiakban ezt tartanám fontosnak megállapítani. A transzformáns növényvonalak fagy-tűrése közötti eltérés akár adódhat ebből az okból is.

6.5. Szárazság-stressz tolerancia

Egyes *CBF* géneknél bizonyították, hogy a fagy-tűrés mellett a vízhiány okozta károsodás kivédésében is szerepet játszanak. Ezt a tulajdonságot reméltük a *TaeCBF16* géntől is. Azonban a teljes vízmegvonás során egyik transzformáns vonal sem mutatott jobb szárazságtűrő képességet a Columbia típusú lúdfűvekhez képest. Újra beöntözés után pedig egyik növény sem tért magához. Ezen eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *TaeCBF16* gén nem játszik szerepet a szárazság-stressz toleranciában, vagy ha szerepet is játszik, akkor csak kis mértékben vesz részt a bonyolult és komplex szabályozó folyamatokban, egymagában nem okoz szárazság-stressz toleranciát.

A fagy során a növényi sejtekben relatív vízhiány lép fel, ezért a fagyállóság kialakulásának egyik fontos feltétele a sejtek vízháztartásának stabilizálása. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a *TaeCBF16* gén hozzájárul a fagy-tűrés kialakulásához, továbbá azt is, hogy ezt a hatást nem a vízháztartás regulációján keresztül fejti ki.

7. Összefoglalás

A klímaváltozással járó szélsőséges időjárási viszonyok arra készítetik a növénynemesítőket, hogy olyan növényeket hozzanak létre, melyek abiotikus stressz tűrésüknek köszönhetően jobban alkalmazkodnak a környezethez. Ennek érdekében számos gént azonosítottak, melyek részt vesznek az abiotikus stressz-tolerancia kialakításában. E gének közül dolgozatomban egy fagytűrő genotípusú kenyérbúzából (*Triticum aestivum* ssp. cv. Cheyenne) izolált *TaeCBF16* gén funkcióját próbáltuk meghatározni lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) növénybe való transzformálással, majd a transzformánsok molekuláris és élettani vizsgálataival. A *TaeCBF16* transzformáns *Arabidopsis* növényeket Dr. Papp István (Budapesti Corvinus Egyetem) és Dr. Vágújfalvi Attila (Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont) közös munkával hozták létre. A transzgén a lúdfű hidegindukálható *Cor15a* promóterének irányítása alatt működött.

A DNS kivonást követő PCR igazolta a *TaeCBF16* gén jelenlétét a transzformáns lúdfűekben, az RNS kivonást követő RT-PCR pedig a fokozott génexpressziót hideg stressz hatására.

Az élettani vizsgálatok, a teljes vízmegvonás és a fagyasztási kísérletek, a környezetben végbemenő szélsőséges időjárási viszonyokat próbálták modellezni. A fagyasztási kísérletek eredményeiből azt a következtetést vonhattuk le, hogy a *TaeCBF16* gén részt vesz a fagytolerancia kialakításában, mivel mind a hidegedzést követő fagyasztás, mind az edzés nélküli fagyasztás után magasabb volt a transzformáns növények túlélési százaléka és a fagytoleranciát kifejező 0-5-ig terjedő értékük, a Columbia típusú vad lúdfűvekhez képest.

A teljes vízmegvonást követő relatív víztartalom meghatározása azt az eredményt hozta, hogy a transzformáns növények és a vad típus között nincs lényeges különbség, tehát a *TaeCBF16* transzkripciós faktor *Arabidopsis thaliana* növényben nem okozott szárazságtoleranciát.

Fagy és szárazság hatására a növényi sejtekben relatív vízhiány lép fel, ezáltal a védekezési reakciók részben átfedők lehetnek mindkét abiotikus stressz folyamatban. Mivel a *TaeCBF16* gén nem okozott szárazság toleranciát, a fagytolerancia kialakulását feltehetőleg nem a sejtek vízháztartásának stabilizálásán keresztül éri el.

A *TaeCBF16* gén további vizsgálatainál fontosnak tartom a transzformáns növények részletesebb vizsgálatát a beépült gén kópiaszámát illetően, mivel két transzformáns növényvonal kimagasló fagytűrési értékeket mutatott.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Lukács Noémi tanszékvezető asszonynak, hogy a BCE Növényélettan és Növényi Biokémia tanszéken végezhettem a TDK dolgozatom és a diplomamunkám alapjául szolgáló kísérleteket.

Köszönöm Dr. Galiba Gábornak, hogy a vezetése alatt álló MTA ATK Mezőgazdasági Intézet Növényi Molekuláris Biológiai Osztályával együttműködésben dolgozhattunk.

Köszönettel tartozom Dr. Papp István Tanár Úrnak, hogy részt vehettem ennek a témának a kidolgozásában, hogy munkámat irányította, és számtalan hasznos tanáccsal, valamint irodalmi anyaggal látott el.

Szeretném megköszönni külső konzulensemnek, Dr. Vágújfalvi Attilának, hogy annyi észrevétellel és tanáccsal látott el a dolgozatom megírása során.

Miskó Andrásnak is köszönettel tartozom, amiért a laboratóriumi munkámat segítette, nélküle ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Végezetül köszönöm Soltész Alexandrának segítségét a fagytesztekkel kapcsolatban, továbbá hogy irodalmi anyagokkal látott el, és amiért kérdéseimmel fordulhattam hozzá.

9. Irodalomjegyzék

1. ANDREA K. MILLER É GABOR GALIBA É JORGE DUBCOVSKY (2006) : A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum aestivum*. *Mol Gen Genomics*, 275: 193–203 p.
2. ANNIKKI WELLING, E. TAPIO PALVA (2008): Involvement of CBF Transcription Factors in Winter Hardiness in Birch, *Plant Physiology*, 147 (3): 1199-1211. p.
3. AVOLA G., CAVALLAROA V., PATANÈA C., RIGGIA E. (2008): Gas exchange and photosynthetic water use efficiency in response to light, CO₂ concentration and temperature in *Vicia faba*. *Journal of Plant Physiology*, 165 (8): 796-804.
4. 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.
5. BUTLER W.L., KITAJIMA M. (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 376 (1): 116-125. p.
6. CARUSO A, CHEFDOR F, CARPIN S, DEPIERREUX C, DELMOTTE FM, KAHLEM G, MORABITO D. (2007): Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165 (9): 932-41.
7. 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.
8. CHRISTMANN A, WEILER EW, STEUDLE E, GRILL E (2007): A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* 52:167-174

9. EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. THOMPSON, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysys. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 6 1349.

10. 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) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 670–680.

11. GALIBA G., VÁGÚJFALVI A(2006).: A fagyállóság élettana és genetikája. In: Dudits D. A búza nemesítésének tudománya, MTA SZBK, Szeged, 230-245

12. 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.

13. GASPAR T., FRANCK T., BISBIS B., KEVERS C., JOUVE L., HAUSMANN J. F., DOMMES J., (2002): Concept in plant stress physiology. Application top lant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37:263-285.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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
18. 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.
19. 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-Am2 in *Triticum aestivum*. *Plant Molecular Biology*, 67, 257-270.
20. KOCSY G., GALIBA G., BRUNOLD C. (2001): Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 113, 158–164.
21. 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 lowtemperature- responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10 (8): 1391- 1406. p.
22. MAHBUBA SIDDIQUA, ANETTE NASUTH (2011): *Vitis* CBF1 and *Vitis* CBF4 differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. *Plant, Cell & Environment*, 34 (8):1345-59. p.
23. 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.

24. 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.
25. RIZZA F., PAGANI D., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (2001): Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding*, 120 (5): 389-396. p.
26. 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.
27. SANE P.V.; RUTHERFORD A.W. (1986): Thermoluminescence from photosynthetic membranes. Academic Press, Orlando, Fla. (USA).
28. 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
29. SARKADI L.(2007): Biokémia mérnök szemmel. Typotex kiadó, Budapest
30. SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SEKI M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, (6) 410-417. p.
31. STOCKINGER E.J., GILMOUR S.J., THOMAS M.F. (1997): *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cisacting 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.

32. SZIGETI Z. (1998): Növények és a stressz. In: Láng F. (szerk.), Növényélettan. A növényi anyagcsere. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest
33. TARI I, CSISZÁR J, GALLÉ Á, BAJKÁN SZ, SZEPESI Á, VASHEGYI Á.(2003): Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Bot Közlem* 90:113-132.
34. 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 Geneteics*, 107, 509–514.
35. TSAI-HUNG HSIEH, JENT-TURN LEE, YEE-YUNG CHARNG, AND MING-TSAIR Chan (2002): Tomato Plants Ectopically Expressing Arabidopsis CBF1 Show Enhanced Resistance to Water Deficit Stress¹, *Plant Physiology*, Vol. 130, pp. 618–626
36. 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.
37. WRIGHT H., DELONG J., LADA R., PRANGE R. (2009): The relationship between water status and chlorophyll a fluorescence in grapes (*Vitis* spp.). *Postharvest Biology and Technology*, 51 (2): 193-199.