



Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

A TaCBF14, TaCBF15 és TaCBF16 TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK HATÁSA AZ ARABIDOPSIS FAGYTŰRÉSÉRE

Készítette:

Gierczik Krisztián

Belső témavezető:

Dr. Kiss Erzsébet

egyetemi tanár

SZIE MKK Genetika és Biotechnológiai Intézet

Külső témavezető:

Dr. Soltész Alexandra

tudományos főmunkatárs

MTA ATK Mezőgazdasági Intézet



MTA • ATK
Mezőgazdasági Intézet

Martonvásár

2014.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A stressz általános jellemzése.....	6
2.2. Hőmérsékleti stressz	7
2.2.1. Alacsony hőmérsékleti stressz.....	7
2.2.2. A fagy	8
2.2.3. Hidegedződés.....	9
2.3. Transzkripció faktorok	9
2.4. A CBF gének jellemzése.....	10
2.4.1. A CBF gének <i>Arabidopsis</i> -ban.....	11
2.4.2. A CBF gének gabonafélékben.....	12
2.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> mint modellnövény.....	13
3. Anyag és módszer	14
3.1. Növényanyag	14
3.2. Növénynevelés.....	14
3.3. Fagyasztási kísérletek	14
3.4. A fagy károsító hatásának vizsgálata – „bonitálás”	15
3.5. Génexpressziós vizsgálatokhoz nevelt növények	16
3.6. Génexpressziós vizsgálatok	16
3.6.1. RNS izolálás	16
3.6.2. Reverz transzkripció	16
3.6.3. A primerek vizsgálata.....	18
3.6.4. Real-Time RT-PCR	18
3.7. A primerek listája.....	19
4. Eredmények és értékelésük	22
4.1. Transzformáns növények fenotípusos változása.....	22
4.2. Fagyteszt	22
4.2.1. Edzés nélküli fagyteszt	23
4.2.1.1. Edzés nélküli fagyteszt -6°C-on.....	23
4.2.1.2. Edzés nélküli fagyteszt -7°C-on.....	24

4.2.2.	Fagytesztek hideg-edzési periódussal.....	26
4.2.2.1.	-9°C-os fagyteszt hideg-edzési periódussal	26
4.2.2.2.	-10°C-os fagyteszt hideg-edzési periódussal	27
4.3.	Génexpressziós vizsgálatok	28
4.3.1.	A cDNS minták koncentrációinak meghatározása	28
4.3.2.	Referenciagén választása	28
4.3.3.	A transzgén kifejeződésének vizsgálata	29
4.3.4.	A primerek specifikusságának vizsgálata.....	30
4.3.5.	Génexpressziós vizsgálatok Real-Time RT-PCR módszerrel	30
4.3.5.1.	A transzgén kifejeződésének vizsgálata	31
4.3.5.2.	A COR gének expressziós vizsgálata	33
4.3.5.3.	A gibberellinsav-jelátviteli úthoz tartozó gének expressziós vizsgálata	35
4.3.5.4.	RGL (<i>Resistance Gene Analog Like</i>) gének expressziós vizsgálata.....	40
5.	Következtetések és javaslatok	41
5.1.	Transzformáns növények fenotípusos változása.....	41
5.2.	Fagyteszt	41
5.3.	Génexpressziós vizsgálatok	43
5.3.1.	A transzgén kifejeződésnek vizsgálata	43
5.3.2.	A CBF regulonhoz tartozó gének expressziója	44
6.	Összefoglalás.....	46
7.	Köszönetnyilvánítás	48
8.	Nyilatkozat	49
9.	Irodalomjegyzék.....	50
10.	Mellékletek.....	55

Rövidítések jegyzéke

ABA	abscisic acid (abszizinsav)
ABF	ABA-binding factor
AN	Accession number (génbanki azonosító az NCBI adatbázisában)
AFP	Anti Freeze Protein
AREB	ABA-responsive element-binding protein
bp	bázispár
CBF	C-repeat binding factor
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
<i>COR</i>	<i>Cold-regulated</i> , hideg által indukált (gén)
cpDNS	kloroplasztisz DNS
CRT/DRE	C-repeat/dehydration-responsive element
Ct	threshold cycle
cv	cultivar/fajta
<i>DDF1</i>	<i>Dwarf and Delayed-Flowering 1</i> (gén)
DEPC	dietil-pirokarbonát
DNáz	dezoxiribonukleáz, DNS-t bontó enzim
DNS	dezoxiribonukleinsav
DREB	Dehydration-responsive element-binding factor
et al.	et alii (latin: „és mások”; dolgozatomban: „és munkatársai”)
FC	Fold Change
<i>Fr-A1</i>	„A” genomhoz kapcsolt <i>Frost-resistance 1</i> (gén)
Fwd	Forward primer
GA	gibberellinsav
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GAS	General Adaptation Syndrom, általános adaptációs szindróma

gDNS	genomi DNS
<i>HOS1</i>	<i>High expression of osmotically responsive genes 1</i>
<i>hpt</i>	<i>hygromycin phosphotransferase</i> (gén)
<i>ICE1</i>	<i>Inducer of CBF expression 1</i> (gén)
<i>KAO</i>	<i>ent-kaurenoic acid oxidase</i> (gén)
L.	Carl von Linné nevének rövidítése
MQ	Milli-Q
mRNS	messenger (hírvivő) RNS
mtDNS	mitokondriális DNS
<i>MYB</i>	<i>myeloblastosis oncogene</i>
<i>MYC</i>	<i>myelocytomatosis oncogene</i>
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
QTL	quantitative trait loci, mennyiségi tulajdonságot meghatározó lokusz
Real-Time RT-PCR	Valós idejű RT-PCR
Rev	reverse primer
<i>RGL</i>	<i>Resistance Gene Analog Like</i> (gén)
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
RT-PCR	reverz transzkripciót követő PCR
spp	subspecies/alfaj

Génnevek előtt álló rövidítések:

<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.
<i>Tm</i>	<i>Triticum monococcum</i> L.
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> L.

1. Bevezetés és célkitűzések

A molekuláris biológiai kutatások egyik célja azon gének működésének a felderítése, amelyek a növények abiotikus stressztűrését szabályozzák. E témakör egyik legintenzívebben kutatott területe az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia, ezen belül is a fagyűrész kialakulásának molekuláris háttere. Az egyik legfontosabb termesztett gabonanövényünk az őszi búza, melynek terméshozamában a tél viszonyosságai, a tavaszi hóolvadáskor fellépő vízzel való borítottság, illetve a felmelegedések után újra hirtelen beköszöntő lehűlések, talajmenti fagyok jelentős károkat okozhatnak.

A transzkripciós faktorok a génszabályozást teszik lehetővé, úgy, hogy a célgén promóteréhez kapcsolódva befolyásolják azoknak az átírását. Az abiotikus stressz-tolerancia kialakításában szerepet játszó transzkripciós faktorok közül az egyik legalaposabban vizsgált a *CBF* géncsalád. A génfunkciós vizsgálatok egyik lehetséges módja, ha egy gazda szervezetet transzformálnak a vizsgálandó génnel, majd a transzgén hatását a genetikailag módosított vonalak megváltozott tulajdonságai alapján vizsgálják. Számos esetben kimutatták, hogy adott *CBF* génnel transzformált növények megnövekedett hideg-, és/vagy fagyűrészrel rendelkeztek.

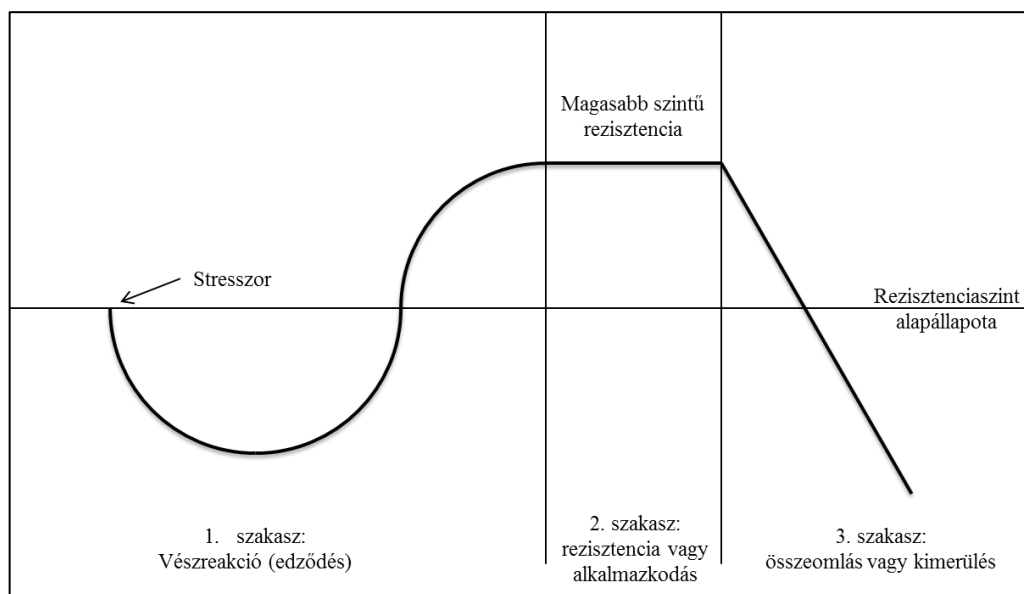
A diplomamunkám célkitűzései az alábbiak:

- Az őszi búzából származó *TaCBF14*-, *TaCBF15*- és *TaCBF16* géneket túltermelő *Arabidopsis* vonalakban a transzgén működésének igazolása.
- A transzgénikus vonalak fagyűrészének vizsgálata a vad típusú Columbia ökotípushoz hasonlítva.
- A fagytesztek alapján szelektált legellenállóbb vonalakban a CBF regulonhoz tartozó néhány gén expressziójának tanulmányozása kvantitatív Real-Time RT-PCR módszerrel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A stressz általános jellemzése

A növényeket is, mint a többi élőlényt, gyakran érik megterhelő események, amelyek hátrányosan befolyásolják fejlődésüket. Ezekkel a megterhelésekkel járó helyzetek leírására számos tudomány terület a „stressz” kifejezést használja, melyet elsőként Selye János endokrinológus használt az 1930-as években. Megfogalmazása szerint „a stressz a szervezet túlterhelt, túlerőltetett állapota”. Selye a stresszt az élőlények válaszának, a stresszort pedig a környezeti hatásoknak tekinti. Bevezette az „általános adaptációs szindróma” fogalmát is. Megfogalmazása szerint a környezetben gyakran előforduló stressz hatásokra az élő szervezetek hasonló módon reagálnak és egy tipikus tünetcsoport (szindróma) jegyei figyelhetők meg rajtuk. Ennek a tünet csoportnak a neve Általános Adaptációs Szindróma – General Adaptation Syndrom (GAS) (Selye 1936).



1. ábra: A Selye-féle Általános Adaptációs Szindróma (GAS) háromfázisú kinetikai modellje. (Selye 1975 nyomán)

A GAS kinetikai modelljét három részre osztjuk (1. ábra). A károsító eseményt (pl. hőmérsékleti stressz) követő első szakasz az általános vészreakció, amely a növény erőfeszítését jelenti a túlélés érdekében, s ekkor a rezisztencia szint az alapállapot alá csökken. Egy bizonyos küszöbértéket meghaladó stressz hatás a növény pusztulásához

vezethet. Ha ez nem letális hatás, de folytatódik, a növény élettani szempontból átlép a rezisztencia vagy akklimatizálódási szakaszba, melynek során adaptálódik a megváltozott életfeltételekhez. Ebben a fázisban a növény rezisztencia szintje a normál fölé emelkedik. Ugyanakkor, ha túl sokáig áll fenn a stressz hatása, akkor a növény élettani szempontból átlép a harmadik szakaszba, az összeomlási vagy kimerülési fázisba, ahol az alkalmazkodóképesség megszűnik, a növény öregedésnek indul és elpusztul (Galiba & Sutka 1997).

Biotikus környezeti stressznek az élő szervezetek által okozott károsító hatást értjük, beleértve a betegségeket, a tápanyagért és fényért folytatott versenyt, illetve a fizikai károsítást is. Az abiotikus környezeti stressz az élettelen tényezők (hőmérséklet, csapadék, szél stb.) olyan megváltozása, amely a növény számára káros vagy egyes esetekben letális (Galiba & Sutka 1997).

2.2. Hőmérsékleti stressz

A mezőgazdaságilag fontos növények termesztetőségének a hőmérséklet a legfőbb limitáló tényezője, amely a búza esetében nagymértékben befolyásolja annak fejlődését az egyre szélsőségesebben változó globális felmelegedés miatt (Porter 1999). Az őszi vetésű gabonafélék a hosszabb tenyészidő miatt közel 15-25%-kal produkálnak több termést a tavasziaknál. Korai érésük miatt elkerülik a nyári szárazságot és a legtöbb betegséget. A tél folyamán talajborítást nyújtanak, ezáltal csökkentik a talajeróziót. Hazánkban szinte kizárólag őszi búzát termesztünk, mivel termesztésük gazdaságosabb és több előnnyel jár, mint a tavaszi gabonaféléké (Galiba & Vágújfalvi 2006).

2.2.1. Alacsony hőmérsékleti stressz

A növényeknek nincs belső hőszabályzó rendszere, hőmérsékletük megegyezik a környezetükével (poikilothermek). Az alacsony hőmérséklet limitálhatja a növény fejlődését és korlátozhatja a produktivitást (Galiba & Vágújfalvi 2006). Hideg-stresszre érzékenynek tekinthetjük azokat a növényeket, amelyek 0°C és 15°C között súlyosan károsodnak vagy akár el is pusztulnak, de 0°C alatt semmilyen körülmények között nem maradnak életben. Hideg-rezisztensnek tekinthetjük azokat a növényeket, amelyek a 0°C közelében is megőrzik életképességüket. A hideg érzékenység meghatározó tényezője a növény genetikai adottságai,

de emellett fontos szerepet játszik a fejlettségi állapot és az anyagcsere aktivitás is. Általában a növények aktív állapotban, aktív fejlődési szakaszban, nappal vagy erős fényen, egyes tápelemek hiánya (kálium), illetve szárazság stressz esetén különösen érzékenyek a hidegre (Szigeti 1998). Ugyanakkor bizonyos esetekben az alacsony hőmérséklet fiziológiai szükségletet is jelenthet. Ilyen egyes növényeknél például a csírázás (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006), vagy ilyen az őszi búza vernalizációja is, amely a növény alacsony hőmérsékleti igénye a generatív fázisba való átlépéshez (Galiba & Vágújfalvi 2006, Schmitz & Amasino 2007).

2.2.2. A fagy

A 0°C alatt kialakuló jég az egyik legveszélyesebb tényező a növények számára a fagy-stressz során. A jég kialakulása két helyen történhet a növényben. Gyors lehűléskor a jég sejten belül (intercellulárisan) alakul ki, ehhez azonban valamilyen részecskének (például baktérium) kell a sejtben lennie, ami kristályosodási gócpontként szolgál. Az ilyen, intracelluláris jégképződés a sejt halálához vezet. A fagy eltűrésének mechanizmusa az, hogy a jégkristályok a sejten kívüli térben (extracelluláris) alakulnak ki. Ez úgy valósulhat meg, hogy az extracelluláris térben lévő szabadvíz fagyásnak indul 0°C alatti hőmérsékleten. A jégképződés miatt ozmotikus potenciálkülönbség alakul ki a sejten kívüli és a sejten belüli tér között. A potenciálkülönbségnek köszönhető, hogy a víz a sejtől kiáramlik az extracelluláris térbe, ami a sejtben belül dehidratációs stressz kialakulásához vezet (Galiba & Vágújfalvi 2006).

A fagystressz nagy részét a vízhiány okozza (Steponkus 1984), mivel a -10°C-nál az ozmotikusan aktív víz körülbelül 90%-a kiáramlik a sejtől (Thomashow 1999). A jég olvadásakor ellentétes folyamat játszódik le, a sejt visszanyeri eredeti vízkészletét (Lewitt 1980). Steponkus (1984) megállapította, hogy a hideg edzett növények sejthártyája elviseli az olvadáskor bekövetkező térfogatváltozást, az edzetleneké viszont nem. Alacsony hőmérséklet hatására AFP (Anti Freeze Protein) fehérjék termelődnek a sejtekben; ilyen fehérjék nem csak növényekben, hanem halakban és rovarokban is megtalálhatók. Ezek a proteinek meggátolják a jégkristályok növekedését, befolyásolják a kristályok alakját és meggátolják azok újbóli kialakulását (Galiba & Vágújfalvi 2006). Tekintettel arra, hogy a fagystressz „szárazságstressz állapottal” jár együtt, nem meglepő, hogy a növények génexpressziós

mintázatát vizsgálva hideg- és szárazságkezelés után olyan géneket találtak, amelyek mindkét stresszhatásra indukálódtak (Shinozaki et al. 2003).

2.2.3. Hidegedződés

Az alacsony hőmérsékleti stressz kivédéséhez a növényeknek szükségük van egy hosszabb ideig tartó edzési időszakra. A hideg edződés (hardening vagy cold acclimation) csökkenti a növényt ért károkat és növeli a fitneszt. Hazánkban, természetes körülmények között ez az időszak ősszel következik be, amikor rövidülnek a nappalok és a hőmérséklet fokozatosan csökken (Kocsy et al. 2001, Galiba & Vágújfalvi 2006).

2.3. Transzkripció faktorok

A transzkripció faktorok minden élőlényben megtalálhatóak, kiemelkedő szerepük van a génszabályozásban. Alapvető funkciójuk, hogy a transzkripcióhoz szükséges pre-iniciációs komplex kialakításában vesznek részt, míg más transzkripció faktorok a génszabályozást teszik lehetővé. Ezek a faktorok szekvencia specifikus DNS kötő fehérjék, tehát a szabályozott gén DNS-éhez való kötődésük specifikus; a célgén promóteréhez kapcsolódva befolyásolják azoknak az átírását. A transzkripció faktorokat kódoló génekben több alegység (domain) is megtalálható. Azoknak a géneknek a csoportját, amelyeket egy bizonyos típusú transzkripció faktor szabályoz, regulonnak hívjuk. A növények abiotikus stressz-válaszában legalább négy különböző regulont azonosítottak:

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

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

Dolgozatomban a búzából izolált *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* génekkel foglalkozom, ezért csak a CBF/DREB1 transzkripciós faktorok jellemzését írom le részletesen.

2.4. A CBF gének jellemzése

Az abiotikus stressz-tolerancia kialakításért felelős gének közül a *CBF/DREB1* géncsaládhoz tartozóakat vizsgálták a legrészletesebben. Ezek a gének kettős elnevezéssel rendelkeznek (*CBF/DREB1*), mivel két kutatócsoport egymástól függetlenül, szinte egyszerre írta le őket (Stockinger et al. 1997, Liu et al. 1998). A mai elterjedtebb szóhasználat a szakirodalomban a géncsaládhoz tartozó egyes gének esetén a *CBF* elnevezést alkalmazza, ezért a dolgozatomban én is ezt az elnevezést használom. A *CBF* gének transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek az általuk szabályozott gének promóterének CRT/DRE (C-repeat/dehydration-element) szakaszához (CCGAC) kötődnek (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 1994, Stockinger et al. 1997, Liu et al. 1998). Alacsony hőmérséklet hatására aktiválódnak, expressziójuk a hideg akklimatizáció korai szakaszában nő meg (Gilmour et al. 1998). Zarka és munkatársai (2003) bebizonyították, hogy minél alacsonyabb a hőmérséklet, a *CBF*-ek transzkripciója annál intenzívebb. *Arabidopsis*-ban leírtak egy olyan transzkripciós faktort (ICE1: Inducer of CBF expression 1), amely konstitutívan expresszálódik, de csak hideg körülmények között kapcsolódik hozzá a *CBF* gének promóteréhez és szabályozza azok átírását (Gilmour et al. 1998, Zarka et al. 2003). A *CBF* gének expresszióját negatív regulátorként módosító ligázok (pl. HOS1) is befolyásolhatják (Chinnusamy et al. 2010). A *CBF* gének kifejeződése és a fagyállóság közötti összefüggést először *Arabidopsis*-ban bizonyították. Gilmour és munkatársai (1998) kapcsolatot mutattak ki egy hideg által indukálható gén (*COR15a*) expressziója és a fagyállóság kialakulása között. Bebizonyították azt is, hogy a *COR* gének regulációjában a *CBF* transzkripciós faktoroknak van a legfontosabb szerepük (Gilmour et al. 1998).

Több tanulmány is beszámol arról, hogy egy kis beavatkozás a genomban - akár csak egyetlen gén túltermeltetése is - jelentős problémákat idézhet elő. Különösen igaz lehet ez akkor, ha egy transzkripciós faktort kódoló gént expresszáltatunk túl, mivel az számos másik génre hathat. A *CBF/DREB1* típusú géneket konstitutív promóterrel túlvezérelve sikerült ugyan a növények fagytűrését fokozni, de ezek a növények egyes esetekben rendellenesen fejlődtek, később virágoztak, kevesebb magot érleltek, mint a kontroll egyedek (Thomashow

2010, Hussain 2011, Soltész et al. 2013). Ugyanakkor más kísérletekben nem volt ilyen jellegű negatív mellékhatása a transzgénnek (Jaglo-Ottosen et al. 1998, Oh et al. 2005, Wang et al. 2008).

Magome és munkatársai (2004) megállapították, hogy a *DDF1* (*dwarf and delayed-flowering 1*) gént túltermelő *Arabidopsis*-ban a bioaktív gibberellinek (GA) szintézise lecsökkent, ami törpességet és késői virágzást okozott. A *DDF1* gén és a *CBF* gének filogenetikailag nagyon közel állnak egymáshoz. Kísérleteikkel igazolták, hogy a *DDF1* gén indukálja a gibberellin deaktiváló géneket, így csökkentve a bioaktív gibberellinek szintjét. Ezzel párhuzamosan a DELLA fehérjék is felhalmozódtak, amelyek a növekedést korlátozó proteinekhez sorolhatóak. Ezzel szemben, a bioaktív gibberellinek normál szintje mellett a DELLA fehérjék inaktiválódnak, így a növény képes a növekedésre (Magome et al. 2004). Achard és munkatársai (2008) bebizonyították, hogy az *AtCBF1* gént túltermelő *Arabidopsis*-ban megnő a DELLA fehérjék szintje és ezzel párhuzamosan néhány, a bioaktív gibberellinnek inaktiváló *GA 2-oxidáz* gén expressziója is. Emellett a transzgénikus növényeken fejlődésbeli visszamaradottságot is megfigyeltek (Achard et al. 2008).

2.4.1. A *CBF* gének *Arabidopsis*-ban

A lúdfű genomja 6 *CBF/DREB* típusú gént kódol, melyek közül a *CBF1/DREB1A*, *CBF2/DREB1B* és *CBF3/DREB1C* gének indukálódnak hideg hatására (Sakuma et al. 2002). A *CBF4/DREB1D*, *DREB2A* és a *DREB2B* gének viszont vízhiány és só stressz hatására fejeződnek ki, de hideg hatására nem (Liu et al. 1998, Nakashima et al. 2000, Haake et al. 2002). Hideg stressznek kitett *Arabidopsis* növényekben a *CBF1/DREB1A*, *CBF2/DREB1B* és *CBF3/DREB1C* gének mintegy 15 percen belül indukálódtak 14°C-on vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten (Stockinger et al. 1997, Gilmour et al. 1998, Liu et al. 1998, Kasuga et al. 1999).

A *CBF*-ek kapcsolódása után válik lehetségessé a *COR* gének transzkripciója. Ezek közül a leginkább vizsgált gén a *COR15a*, mely a kloroplasztisban halmozódik fel (Crosatti 1999). Kísérletekkel bizonyították, hogy nem elég egyetlen *COR* gén működésének a megváltozása a fagyállóság eléréséhez (Galiba & Vágújfalvi 2006).

2.4.2. A CBF gének gabonafélékben

A CBF gének bizonyos csoportjai csak a perjefélékre (*Poaceae*) jellemzőek. Valószínűleg az alacsony hőmérsékleti toleranciájuk és a mérsékelt éghelyi élőhelyekre terjedésük során fejlődtek ki bennük, mivel ezeknek a géneknek az expressziója erőteljesebb az őszi gabonafélékben (Badawi et al. 2007). Az *Arabidopsis* mellett a legtöbb információnk a búza (*Triticum aestivum* L.), az alakor (*Triticum monococcum* L.) és az árpa (*Hordeum vulgare* L.) CBF génjeiről származó kutatási eredményekből vannak. Jelenlegi tudásunk szerint az alakor genomja legalább 13, a búza 15, árpa 20 és a rizs 10 CBF gént tartalmaz (Miller et al. 2006, Pearce et al. 2013, Badawi et al. 2007, Skinner et al. 2005). A *Triticum* nemzetségbe tartozó fajok genomja közötti hasonlóságok miatt a kísérletek eredményei egymást kiegészítik (Galiba et al. 2009).

A búza alacsony hőmérsékleti stressz toleranciájának vizsgálata a martonvásári MTA ATK MGI-ben több évtizedes múltat tekint vissza. A kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) hexaploid ($2n=6x=AABBDD$) genommal rendelkezik (Vasil 1999). Bebizonyították, hogy a búza 21 kromoszómapárjából legalább 10 pár részt vesz az abiotikus stressz tolerancia szabályozásában, melyek közül a legjelentősebb gének az 5-ös (5A, 5B, 5D) kromoszómán találhatóak (Galiba 2009). Kimutatták, hogy az 5A és 5B kromoszóma hosszú karján több fagyállósági gén (*Fr-A1* és *Fr-B1*, *Frost-resistance 1*) található, továbbá olyan lokuszokat is azonosítottak, amelyek a stressz adaptációban kiemelkedő szereppel bírnak (Galiba et al. 1995, Tóth et al. 2003). Vágújfalvi és munkatársai (2003) alakorban az 5A^m kromoszómán térképezték az *Fr-A2* lokuszt, a *CBF3* transzkripciósfaktort és egy hideg indukálható gén (*Cor14b*) expressziójáért felelős QTL-t is (Vágújfalvi et al. 2003). Miller és munkatársai (2006) 11 CBF gént térképeztek az alakor 5A^m kromoszóma *Fr-A2* régiójában. Vágújfalvi és munkatársai (2005) bizonyították, hogy ezek közül három (*CBF14*, *CBF15* és a *CBF16*) expressziója indukálódik hideg hatására kenyérbúzában. Knox és munkatársai (2008) a fagyűrő G3116 és a fagyérzékeny DV92 alakor genotípusokat keresztezve létrehoztak egy térképezési populációt, aminek az analízisével kimutatták, hogy a CBF gének közül három (*CBF12*, *CBF14* és a *CBF15*) járul hozzá a fagyállóság kialakításához. A két különböző fajon, két különböző kísérletben kapott eredmények is a *CBF14* és *CBF15* gének szerepét igazolták a fagyállóság kialakításában.

Ezt tovább bizonyítandó, Soltész és munkatársai (2013) az őszi búzából izolált *TaCBF14* és *TaCBF15* géneket tavaszi árpában túltermeltették, melynek eredményeként a

transzgénikus vonalak néhány Celsius fokkal alacsonyabb hőmérsékletet is túléltek, mint a vad típus.

2.5. *Arabidopsis thaliana* mint modellnövény

Az *Arabidopsis thaliana* a keresztesvirágúak rendjébe tartozó növény. Több előnyös tulajdonsága tette lehetővé, hogy biokémiai, patológiai, fejlődésbiológiai, élettani és genetikai kutatások modellje legyen (Kiss 2005). Az 1950-es években Rédei György (Martonvásár) kezdeményezte a genetikai analízisre való alkalmazását (Rédei 1975, Rédei et al. 1992). A magasabb rendű növények közül elsőként, 2000-ben fejeződött be a teljes genomjának nukleotid sorrend meghatározása (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

A kifejlett *Arabidopsis* kis helyigénye, rövid életsiklusa (8 hét alatt magot hoz) és jó magképző tulajdonsága (10.000-20.000 mag/egyed) teszi lehetővé laboratóriumi körülmények között akár nagyobb populációk vizsgálatát is. Évente akár 5-6 generáció is felnevelhető az egyes vonalakból. Öntermékenyíthető, könnyen keresztezhető diploid (a recesszív tulajdonságok is vizsgálhatóak) faj. Kromoszóma száma alacsony ($n=5$, $2n=10$) és genom mérete az egyik legkisebb a zárvatermő növények között ($C=125$ Mb) (Kiss 2005). Az *Arabidopsis* genomja kevés repetitív szekvenciát tartalmaz. A növény teljes DNS (gDNS, mtDNS, cpDNS) mennyiségének 10-14%-a magasan, 23-27%-a közepesen ismétlődő és 50-55%-a egy kópiájú szekvencia (Meyerowitz et al. 1992). Fizikai és kémiai mutagénekre jól reagál, *Agrobacterium*-os transzformációval genetikailag könnyen módosítható. A felsorolt előnyös tulajdonságai miatt lehetőséget nyújt arra, hogy az *Arabidopsis* mint modellnövény a rajta végzett növényi molekuláris biológiai alapkutatásokból származó, gyors eredményeket szolgáltatasson, melyeket a mezőgazdaság és ipar területén is alkalmazhatnak.

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

Az *Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia ökotípus, mint vad típus és a *TaCBF14*-, a *TaCBF15*-, illetve a *TaCBF16* génnel transzformált *Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia növényekkel végeztük a kísérleteinket. A transzgénikus növényi vonalakat a Budapesti Corvinus Egyetemen Dr. Papp István Professzor Úr kutatócsoportja és a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet Növényi Molekuláris Biológia Osztályának kutatói (Dr. Vágújfalvi Attila, Dr. Soltész Alexandra és Dr. Szira Fruzsina) állították elő egy többéves együttműködés keretében. A *TaCBF* géneket őszi kenyérbúzából (*Triticum aestivum* ssp. cv. Cheyenne) izolálták. A *TaCBF14* és a *TaCBF15* gént tartalmazó konstrukció előállításához a pMDC32-es vektort alkalmazták, ami tartalmazta a hygromycin rezisztenciáért felelős gént (*hpt*), valamint a transzgén folyamatos expresszióját biztosító 35S promótert két kópiában. A *TaCBF16*-os gént pCAMBIA típusú vektorba építették a hideg indukálható *COR15a* gén promóterével együtt.

3.2. Növénynevelés

Kísérleteinket kontrollált és zárt körülmények között, fitotroni növénynevelő kamrában (Conviron) végeztük el. A növényeket a csíráztatást követően 1 literes műanyag dobozba ültettük szét (Compo Sana Zöldnövény és Pálmaföld); mindegyik edénybe 12-12 növény került.

3.3. Fagyasztási kísérletek

A fagyteszt előtt a növényeket kontroll körülmények között három hétig neveltük: 21/20°C nappali/éjszakai hőmérséklet; rövidnappalos megvilágítás (10 óra fény 14 óra sötét); 240 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 60-70%-os relatív páratartalom mellett.

A fagyasztási kísérleteket két különböző megközelítésben végeztük el, 2-2 fagyasztási hőmérsékleten:

- Az első esetben kontroll körülmények közötti nevelés után a növényeket 5/5°C nappali/éjszakai hőmérsékleten edgettük tíz napig - a többi paraméteren nem

változtattunk - és az edzés után vetettük alá a növényeket a fagytesztnek. A fagyteszt legalacsonyabb hőmérsékleti pontja -9°C (6 órán keresztül) és -10°C (12 órán keresztül) voltak.

- A második esetben a növényeket a kontroll körülmények ($21/20^{\circ}\text{C}$, nappali/éjszakai) közötti nevelés után, hideg edzés nélkül fagyasztottuk -6°C (6 órán keresztül), illetve -7°C (6 órán keresztül) hőmérsékleten.

A fagyasztást 5 napig tartó regenerálódási időszak követte kontroll körülmények között. Mindegyik megközelítésben vonalanként 3 doboznyi, tehát 3×12 növényt tesztelését végeztük el.

3.4. A fagy károsító hatásának vizsgálata – „bonitálás”

A fagyasztást követően a növények regenerálódó képességét több paraméter szerint állapítottuk meg. A túlélés/regeneráció mértékét egy 0-tól (a fagyasztást nem élte túl) 5-ig (a fagyasztást károsodás nélkül túlélte) terjedő skálán (2. ábra) határoztuk meg az egyedek szintjén, ezt nevezzük bonitálásnak. Az értékelést 3 személy végezte el, egymástól függetlenül (Gierczik Krisztián, Dr. Soltész Alexandra, Dr. Vágújfalvi Attila). A vizuális értékelést rögtön a fagyasztást követően és 5 nap regenerációs periódus után is elvégeztük. A második bonitáláskor megszámoltuk az adott vonalak esetén az élő növényeket, és az eredetileg kísérletbe bevont növények száma alapján meghatároztuk az adott vonal túlélési százalékát is.



2. ábra: A fagyasztást követő regenerálódási osztályok (0-tól 5-ig terjedő skála).

Fotó: Gierczik Krisztián

3.5. Génexpressziós vizsgálatokhoz nevelt növények

A fagyteszthez történő előneveléskor alkalmazott kontroll körülményekkel azonos környezeti paraméterek között nevelt növények fejlődését követően a 21. napon gyűjtöttük az első mintákat a fény bekapcsolását követő 3 illetve 6 órával (3K illetve 6K). Ezután 5/5°C nappali/éjszakai hőmérsékleten tartottuk tovább a növényeket, a megvilágításon és a relatív páratartalommal nem változtattunk. Az 5/5°C nappali/éjszakai hőmérsékleti kezelés első napján a fény bekapcsolását követően szintén 3 illetve 6 órával (3H illetve 6H) vettük le a következő mintákat. Az ötödik mintavételi időpont a lehűlést követő huszonnegyedik órában (ami megegyezik a fény bekapcsolása utáni harmadik órával) történt (24H). Az utolsó, hatodik mintavétel az 5/5°C-os kezelés elindítása utáni tizedik napon történt, szintén a fény bekapcsolása utáni harmadik órában. A növények leveleiből a mintákat azonnal folyékony nitrogénbe tettük és -80°C-on tároltuk a későbbi vizsgálatokig.

3.6. Génexpressziós vizsgálatok

3.6.1. RNS izolálás

A mintavétel vonalanként 5-5 növény fiatal, kifejezett leveleiből, három ismételtesben történt. Az 5 növényből származó levéldarabokat folyékony nitrogénben porítottuk el és az így homogenizált mintákból 45-50 mg-ot mértünk ki. Az RNS kinyeréséhez Viogene RNS izoláló kit-et használtunk (Viogene® VioTotal™ Plant RNA Extraction Miniprep) a gyártó utasításait követve. Az esetleges DNS szennyezést a minták DNáz (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) kezelésével távolítottuk el. Az emésztést követően a minták koncentrációját NanoDrop UV-VIS spektrofotométerrel (ND 1000 Spectrophotometer) határoztuk meg (1. melléklet). Az RNS minőségét gélelektroforézissel is ellenőriztük, 1%-os agaróz gélen.

3.6.2. Reverz transzkripció

Az 1 µg RNS-t tartalmazó oldat térfogatát DEPC-kezelt vízzel egészítettük ki 10 µl-re (1. melléklet), majd 1 µl Oligo(dT)₁₅ (Promega) primert adtunk hozzá. Ezt 70°C-on inkubáltuk 5 percig, majd jégen hűtöttük, szintén 5 percig. A 1 µl templáthoz adtuk hozzá mintánként az 5 µl M-MLV RT puffert (Promega), az 1,25 µl dNTP-t [10mM] (Fermentas), a 6,75 µl DEPC-kezelt vizet és az 1 µl M-MLV RT enzimet (200 U/µl) (Promega). A reverz

transzkripció PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research) készülékkel történt, az 1. táblázatban található hőmérséklet-idő profil szerint.

1. táblázat: A reverz transzkripció hőmérséklet-idő profilja.

Hőmérséklet	Időtartam
25°C	5:00
42°C	60:00
70°C	15:00
12°C	∞

A szintézis sikerességét PCR-rel ellenőriztük, két konstitutívan kifejeződő génre (18S és GAPDH) tervezett primerpár használatával. A primerek listáját a 3.7 fejezet tartalmazza. Az amplifikálódott termékek méretét gélelektroforézissel ellenőriztük, 1%-os agaróz gélen. A cDNS-ek tesztelésére összemért PCR reakció összetétele a következő:

2. táblázat: A cDNS-ek tesztelésére összemért PCR reakció összetétele.

Felhasznált anyag	Mennyiség (μl)
cDNS	2
Fwd primer	0,4
Rev primer	0,4
5xGoTaq puffer (Promega)	4
MgCl ₂ [25 mM]	1,2
dNTP [2,5 mM]	0,4
Steril MQ víz	11,45
GoTaq polimeráz enzim (Promega) 5 U/μl	0,15
Végtérfogató	20

A cDNS mintákon alkalmazott polimeráz-láncreakció programja a PCR készülékben a következő:

3. táblázat: A cDNS-ek tesztelésére alkalmazott PCR reakció hőmérséklet-idő profilja.

Esemény	Hőmérséklet	Időtartam
Taq-polimeráz hőaktiválás	95°C	2:00
Denaturálás	95°C	0:30
Primer tapadás – annealing	60°C	0:30
Lánchosszabbítás – extension	72°C	0:30
Végső polimerizáció	72°C	7:00
A reakció vége	12°C	∞

} 35 ciklus

A cDNS-ek koncentrációját Qubit fluoriméterrel, Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit-tel (Invitrogen) határoztuk meg, majd a mintákat egységesen a legkisebb koncentrációjú mintához igazítva hígítottuk ki DEPC-kezelt vízzel.

3.6.3. A primerek vizsgálata

A *TaCBF* transzformáns vonalakban a transzgén jelenlétét PCR reakcióval bizonyítottuk, valamint a fagytesztek során szelektált vonalak (14/2/2, 15/10/24 és 16/5/25) génexpressziós mintázatát RT-PCR módszerrel is megvizsgáltuk. A primerek listáját a 3.7 fejezet tartalmazza. A PCR reakciók összetétele megegyezett a cDNS-ek minőségi ellenőrzésénél leírtakkal, hőmérséklet-idő profilját az alábbi táblázat tartalmazza:

4. táblázat: A primerek tesztelésére alkalmazott PCR reakció hőmérséklet-idő profilja.

Esemény	Hőmérséklet	Időtartam	} 35 ciklus
Taq-polimeráz hőaktiválás	95°C	2:00	
Denaturálás	95°C	0:30	
Primer tapadás – annealing	60°C	0:30	
Lánchosszabbítás – extension	72°C	0:30	
Végső polimerizáció	72°C	7:00	
A reakció vége	12°C	∞	

3.6.4. Real-Time RT-PCR

A fagytesztek eredményei alapján szelektáltuk a legellenállóbb *TaCBF* transzformáns vonalakat (14/2/2, 15/10/24 és 16/5/25), amelyek génexpressziós vizsgálatát Real-Time RT-PCR módszerrel (BIORAD CFX96 Touch™ Real-Time PCR készülékkel) végeztük el, összehasonlítva a vad típusú Columbia ökotípussal. Minden esetben 3 technikai ismétlést alkalmaztunk. Kísérleteinkhez KAPA SYBR® FAST qPCR kittet használtunk. A reakció 1x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix-ből, 200 nM primerpárból, 0,6 ng/μl templát cDNS-ből és 10 μl végtérfogatra kiegészítve DEPC-kezelt vízből állt. A primerek listáját a 3.7 fejezet tartalmazza. Referencia génként a 18S riboszómális RNS-re tervezett primert használtuk az 5. táblázatban szereplő hőmérséklet-idő profil szerint.

5. táblázat: A Real-Time RT-PCR reakció hőmérséklet-idő profilja.

Hőmérséklet	Időtartam	
95°C	3:00	
95°C	0:03	
60°C	0:20	} 39 ciklus
Leolvasás		
65°C	0:31	
65°C	0:05	} 60 ciklus
+0,5°C/ciklus		
Leolvasás		

A műszer által mért Ct értékekből Bookout és Mangelsdorf (2003) szerint, $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki a Fold Change (FC) és a $\log_2 FC$ értéket.

3.7. A primerek listája

A *TaCBF* transzformáns vonalak expressziós vizsgálataihoz alkalmazott primerek listája:

A <i>TaCBF</i> transzgén expressziójának ellenőrzéséhez használt primerek listája (Soltész et al. 2013, Vágújfalvi et al. 2005)			Termék mérete
<i>OE TaCBF14</i> transzgén AN: HG939430 Soltész et al. 2013	Fwd	AACCGATGACGAGAAGGAAA	120 bp
	Rev	AACTCCGAGTAGCACGATCC	
<i>OE TaCBF15</i> transzgén AN: HG530932 Soltész et al. 2013	Fwd	GTCGTCCATGGAAAATACCG	143 bp
	Rev	ATGTGTCCAGGTCCATTTCC	
<i>Tm CBF16</i> transzgén AN: EU076384 Vágújfalvi et al. 2005	Fwd	GCGGCATGCCTCCAACAGCGCAG	200 bp
	Rev	ACGTGCCCAGGTCCATCTCCCCG	

Az <i>Arabidopsis thaliana</i> L. endogén CBF génjeire tervezett primerek listája (Wang & Hua 2009)			Termék mérete
AtCBF1 AN: AY667247 Wang & Hua 2009	Fwd	GTGACGTGTCGCTTTGGAGTTAC	182 bp
	Rev	GTGAAGCAAAGAAGTAGAAAACG	
AtCBF2 AN: AB013817 Wang & Hua 2009	Fwd	TCGAGGGAGATGATGACGTGTCC	226 bp
	Rev	TATTTTGATTTGTTGCTTATGG	
AtCBF3 AN: AF076155 Wang & Hua 2009	Fwd	CGACGGCGATGATGACGACGT	202 bp
	Rev	GCATTTAAGAATAGCCACAC	

A <i>TaCBF</i> transzgénikus növények expressziós vizsgálatához használt referenciagénekre tervezett primerek listája (Czechowski et al. 2004, Shu et al. 2013)			Termék mérete
GAPDH referenciagén AN: NM101214 Czechowski et al. 2004	Fwd	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA	62 bp
	Rev	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC	
18S referenciagén AN: GQ380689 Shu et al. 2013	Fwd	GTTGATCCTGCCAGTAGT	138 bp
	Rev	ATCCGAGTAGTAGTTACCATC	

A <i>TaCBF</i> transzgénikus növényekben a CBF regulonhoz tartozó gének expressziós vizsgálatára használt primerek listája (Rohde et al. 2004, Tyler et al. 2004, Shu et al. 2013)			Termék mérete
COR6.6 AN: NP197101 Rohde et al. 2004	Fwd	GAGACCAACAAGAATGCCTTCC	61 bp
	Rev	TGCTCTTCTCCTCAGCTTTGC	
COR15a AN: NM129815 Rohde et al. 2004	Fwd	AACGAGGCCACAAAGAAAGC	133 bp
	Rev	CAGCTTCTTTACCCAATGTATCTGC	
COR15b AN: NM129814 Rohde et al. 2004	Fwd	CAACGAAGCCACAAAGAAAGC	66 bp
	Rev	CCATCCGCCAAGGCCTCC	
COR47 AN: NM101894 Rohde et al. 2004	Fwd	ACAAGCCTAGTGTCATCGAAAAGC	67 bp
	Rev	TCTTCATCGCTCGAAGAGGAAG	

COR78 AN: NM124610 Rohde et al. 2004	Fwd	GCACCAGGCGTAACAGGTAAAC	81 bp
	Rev	AAACACCTTTGTCCCTGGTGG	
GA3 AN: AF047720 Shu et al. 2013	Fwd	GCATAAACGTAGACTCGCAGTG	309 bp
	Rev	AGACGATCTTGGACACTTGGAT	
GA20x8 AN: NM118239 Shu et al. 2013	Fwd	TCGGAATCAGAGGCATTAGCATATATGTTGGCAGAGG	140 bp
	Rev	GGTTTGGGACAAGGTGGATATCGGTTTCATCCTTAGATAAC	
GA30x1 AN: NM101424 Shu et al. 2013	Fwd	GGTCTAGCAGCTCATACCGACT	183 bp
	Rev	CAACACGCTTTTAAACAATCCA	
GA200x1 AN: NM118674 Shu et al. 2013	Fwd	TATCGAACGATAGATACAAGAGC	151 bp
	Rev	TATCTTCTTGATGTGATGCTGTC	
GA200x2 AN: NM124560 Shu et al. 2013	Fwd	GAGCAGTTTGGGAAGGTGTATC	186 bp
	Rev	TAACGTGAGATCTGGTGTCTGG	
GA200x3 AN: NM120802 Shu et al. 2013	Fwd	TCGTGGACAACAAATGGCA	72 bp
	Rev	TGAAGGTGTGCGCTATGTTTAC	
KA01 AN: NM100394 Shu et al. 2013	Fwd	GGAATTCTTATCGCAGGTTGTC	193 bp
	Rev	AGCAGGATCAAATTTTCTTGA	
KA02 AN: NM128803 Shu et al. 2013	Fwd	CAAAAGGCTGGAAGGTTCTGACTTG	140 bp
	Rev	TCCCAAACCAAAAGGAAGGAATGTG	
RGL1 AN: NP176809 Tyler et al. 2004	Fwd	CATCAATGACGACGGT	260 bp
	Rev	GTACTCTGAGTCAGGCTT	
RGL2 AN: NP186995 Tyler et al. 2004	Fwd	CCAAAACCACTACCAGC	326 bp
	Rev	TCCACACAACCTTCGGG	
RGL3 AN: NM121755 Shu et al. 2013	Fwd	ATGGATACAGAGTGGAGGAGAACG	73 bp
	Rev	GATGCAGCGATTAGAGGTTTCG	

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Transzformáns növények fenotípusos változása

A vad típusú Columbia ökotípushoz képest egyes transzgénikus vonalak esetében fejlődésbeli rendellenességet tapasztaltunk (3. ábra). Ezek kisebb leveleket hoztak és lassabban fejlődtek, mint a vad típus.



3. ábra Fenotípusos különbség az egy időben vetett Columbia, mint vad típus ("A" kép) és a 16/5/25 (*TaCBF16* gént túltermelő) transzformáns ("B") vonal között.

Fotó: Gierczik Krisztián

4.2. Fagyteszt

A fagy károsító hatásának vizsgálatakor arra voltunk kíváncsiak, hogy a különböző vonalak fagyállósága növekedett-e a transzgén működésének hatására. Az anyag és módszer című fejezetben leírtak alapján a fagyteszteket tehát két megközelítésben végeztük el, a fagyasztási hőmérséklet előtt alkalmazott hideg-edzéssel, illetve a nélkül. Mivel a transzformációhoz alkalmazott konstrukciók közül a *TaCBF14* és *TaCBF15* transzgének esetében a dupla 35S konstitutív promóter folyamatos kifejeződést biztosít (a *TaCBF16* transzgén esetén a transzformációhoz használt konstrukció hideg indukálható promóterrel rendelkezik), ezért feltételezzük, hogy a transzgénikus vonalak abban az esetben is jobban tűrik majd a fagyasztást, ha a növények nem kapnak (az őszi időjárást modellező) hidegedzést.

A két fagyasztási eredményt figyelembe véve bonitálás, illetve az egyes vonalak túlélési százaléka, valamint a regenerálódási képességük alapján azokat a transzformáns vonalakat szelektáltuk mind a három *CBF* transzkripciós faktor esetében, amelyekben a transzgén hatására megnőtt a fagyállóság.

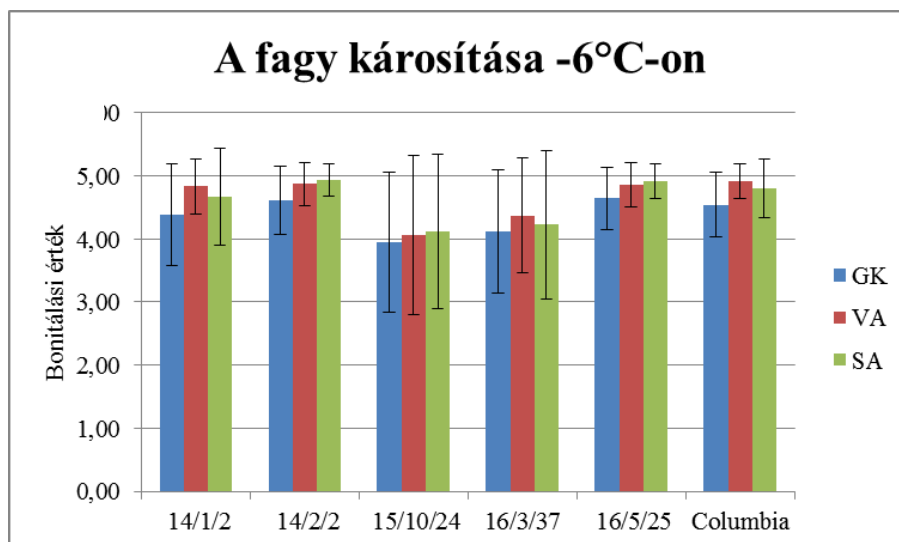
4.2.1. Edzés nélküli fagytesztek

4.2.1.1. Edzés nélküli fagyteszt -6°C-on

A hidegedzés nélkül fagyasztott növények közül -6°C-on jelentős különbséget nem tapasztaltunk a Columbia vad típus és a transzformáns vonalak között. A 4. ábrán látható fotók közvetlenül a fagyasztási protokoll után készültek. Láthatjuk, hogy a -6°C-os fagynak nem volt károsító hatása sem a vad típusú Columbia ökotípusra, sem a transzformáns vonalakra. Az 5. ábrán látható, hogy az értékelő személyek által adott szubjektív bonitálási pontszámok az adott vonal esetén szinte azonosak, a növények regenerálódó képessége közel maximális volt.



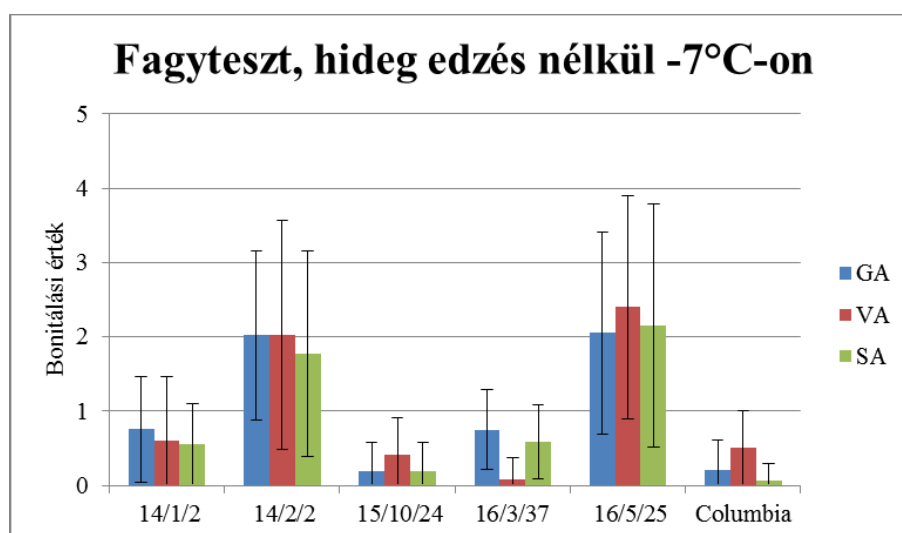
4. ábra: A -6°C-os fagyasztás hatása a Columbia vad típusra ("A" kép) és a transzformáns vonalakra ("B" kép: *TaCBF14*, "C" kép: *TaCBF15*, "D" kép: *TaCBF16* gént túltermelő vonalak). A fényképek közvetlenül a fagyasztás után készültek. Fotó: Gierczik Krisztián



5. ábra: A -6°C-os fagy károsításának mértéke a bonítási adatok alapján a fagyasztást követő első napon. A 14/1/2 és 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel transzformált, valamint a 16/3/37 és 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalakat jelöli (GK: Gierczik Krisztián; VA: Dr. Vágújfalvi Attila; SA: Dr. Soltész Alexandra; a bonítást végző személyek monogramja).

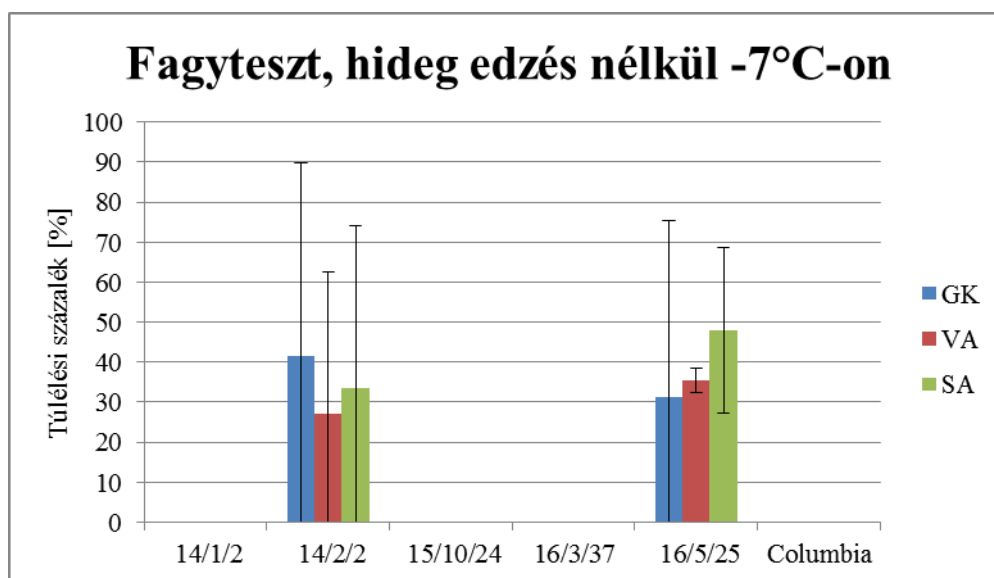
4.2.1.2. Edzés nélküli fagyteszt -7°C-on

A -7°C-os fagyasztásnál a 14/2/2 és a 16/5/25 vonalak kevésbé károsodtak, mint a vad típusú Columbia. A 14/1/2, a 15/10/24 és a 16/3/37 vonalak és a vad típus bonítási értékei között nem kaptunk különbséget (6. ábra).

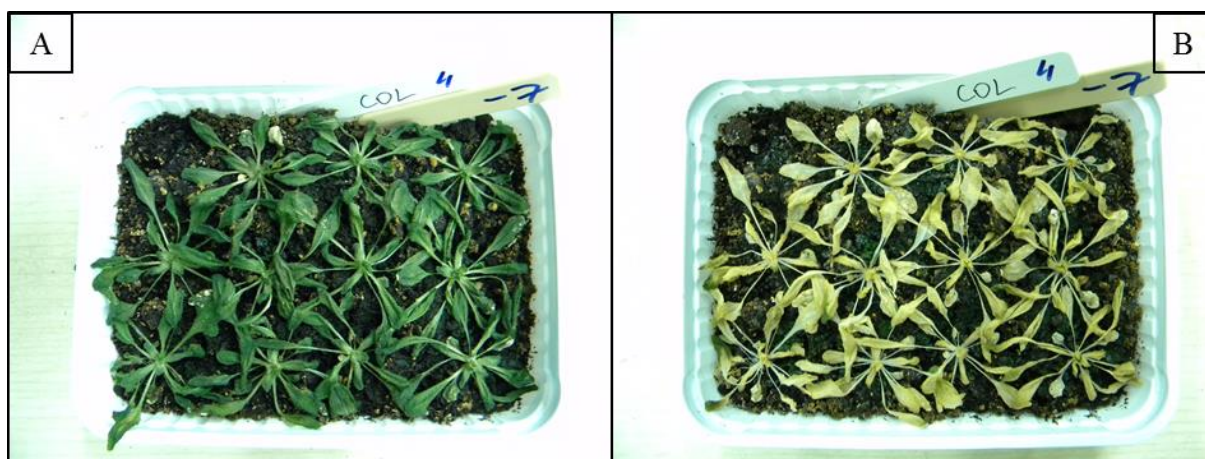


6. ábra: A fagyteszt károsító hatásának értékelése bonítással, 24 órával a fagyasztást követően a -7°C-on fagyasztott növények esetében. A 14/1/2 és 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel transzformált, valamint a 16/3/37 és 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalakat jelöli (GK: Gierczik Krisztián; VA: Dr. Vágújfalvi Attila; SA: Dr. Soltész Alexandra; a bonítást végző személyek monogramja).

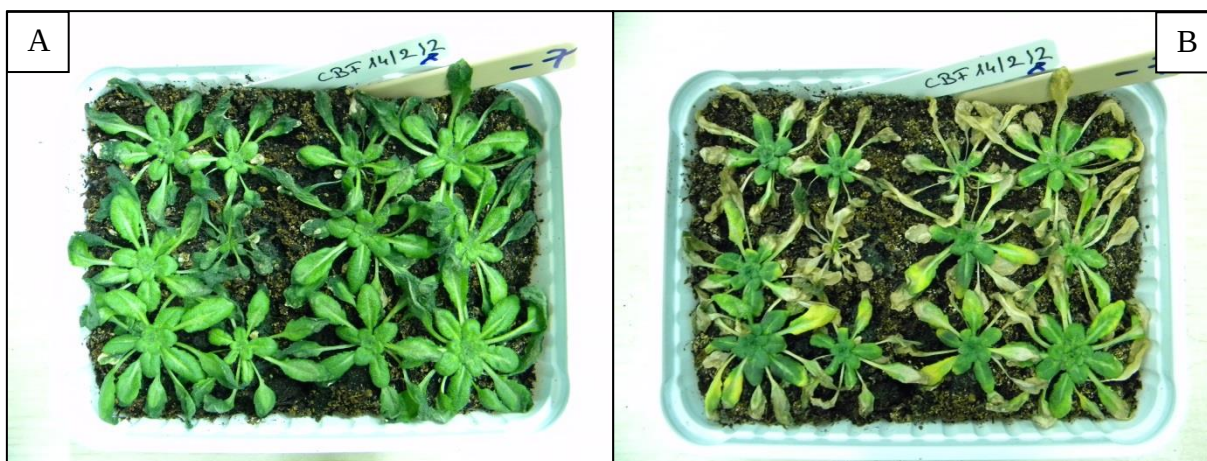
Öt nap regenerálódási idő elteltével az eredmények még jobban különböznek egymástól. A 14/2/2 és a 16/5/25 vonalak túléltek a -7°C -os fagyasztást, amely a kontroll Columbia ökotípus számára, valamint a 14/1/2, a 15/10/24 és a 16/3/37 vonalak esetén is már letálisnak bizonyult (7., 8. és 9. ábra).



7. ábra: Az öt napos regenerálódás utáni túlélési százalék. A 14/1/2 és 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel transzformált, valamint a 16/3/37 és 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalakat jelöli (GK: Gierczik Krisztián; VA: Dr. Vágújfalvi Attila; SA: Dr. Soltész Alexandra; a bonitálást végző személyek monogramja).



8. ábra: A -7°C -os fagyasztási hőmérséklet (hideg-edzés nélkül) hatása a vad típusú Columbia számára (az „A” fénykép közvetlenül a fagyasztás után készült, míg a „B” fénykép az öt nap regenerálódási periódus után). Fotó: Gierczik Krisztián



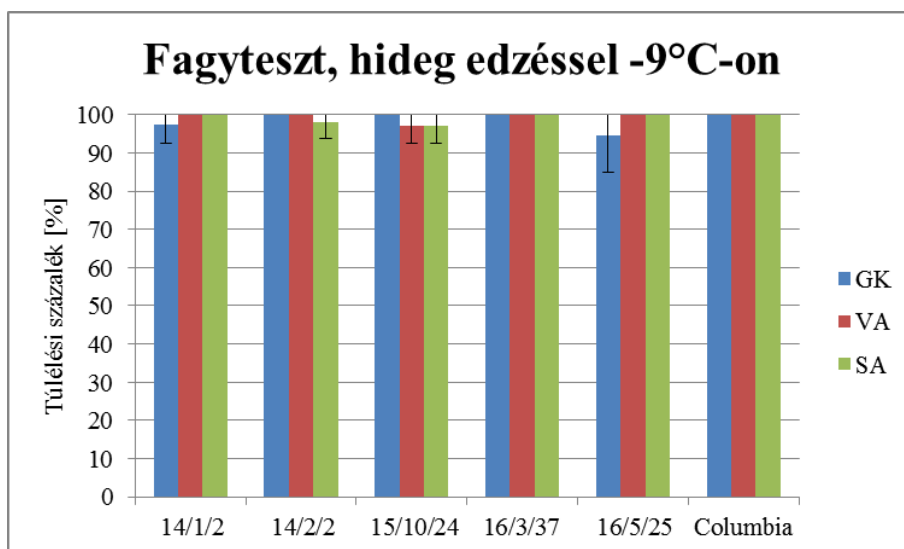
9. ábra: A -7°C -os fagyasztási hőmérséklet (hidegedzés nélkül) hatása a 14/2/2-es vonal esetén. Az „A” fénykép közvetlenül a fagyasztás után készült, míg a „B” fénykép az öt nap regenerálódási periódus után. Fotó: Gierczik Krisztián

4.2.2. Fagytesztek hideg-edzési periódussal

Hideg edzési periódust alkalmazva a vonalakat -9°C és -10°C hőmérsékleten fagyasztottuk.

4.2.2.1. -9°C -os fagyteszt hideg-edzési periódussal

A hidegedzés után fagyasztott növények közül -9°C után jelentős különbséget nem tapasztaltunk a Columbia vad típus és a transzformáns vonalak regenerálódó képessége között. A 10. ábrán látható, hogy a növények regenerálódó képessége közel maximális volt.



10. ábra: A fagy károsító hatásából számolt túlélési százalék a -9°C -on (fagyasztást követő 24 órával). A 14/1/2 és 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel transzformált, valamint a 16/3/37 és 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalakat jelöli (GK: Gierczik Krisztián; VA: Dr. Vágújfalvi Attila; SA: Dr. Soltész Alexandra; a bonitálást végző személyek monogramja).

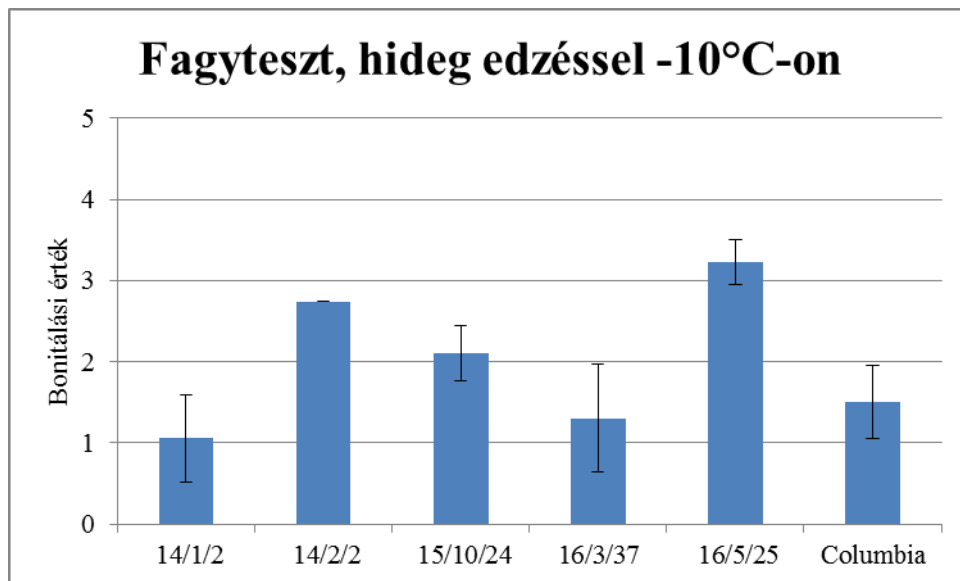
4.2.2.2. -10°C-os fagyteszt hideg-edzési periódussal

A hideg-edzett növények alacsonyabb hőmérsékleten való fagyasztása során a kontroll növényként használt Columbia ökotípus a -10°C-os fagyot is túlélte, de a leveleken látható a fagy károsító hatása (11. ábra).



11. ábra: A Columbia ökotípus a -10°C-os fagyasztást követő öt napos regenerálódási periódus után. A fényképen látható a fagy károsító hatása. Fotó: Gierczik Krisztián

A hideg-edzett vonalak közül a -10°C-os fagyasztásnál a 14/2/2, a 15/10/24 és a 16/5/25 kevésbé károsodott, mint a vad típus. A 14/1/2 és a 16/3/37 vonalak az átlagos bonitálási értékek alapján érzékenyebbnek bizonyultak a fagyra, mint a vad típus, de a szórások átfednek. A 12. ábrán az ábrázolt értékek a három értékelő személy (Gierczik Krisztián, Dr. Vágújfalvi Attila, Dr. Soltész Alexandra) által adott pontszámok átlaga.



12. ábra: A fagyasztást követő első nap bonitálási eredményei a -10°C -on fagyasztott növények esetében. A pontszámok három értékelő személy által adott pontok átlagai.

A vizsgált transzgénikus vonalak fagyasztási eredményei alapján a három *CBF* transzkripció faktor esetén a legellenállóbbakat (14/2/2, 15/10/24 és 16/5/25) kiválasztottuk. A génexpressziós vizsgálatainkat csak ezeken a vonalakon végeztük el.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok

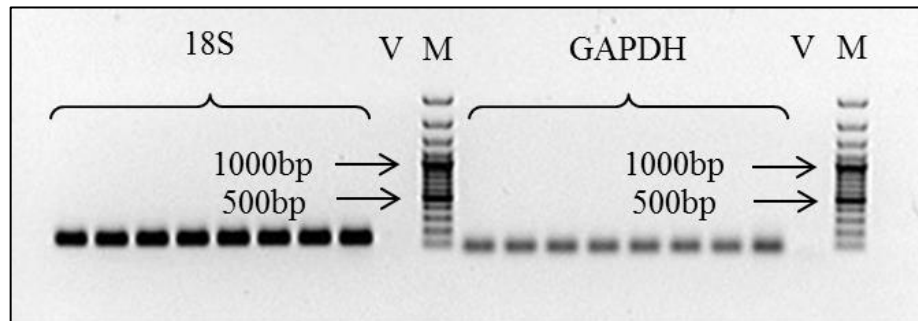
4.3.1. A cDNS minták koncentrációinak meghatározása

A génexpressziós vizsgálatokhoz a minták koncentrációit Qubit fluoriméterrel határoztuk meg. A mérési eredményeket a 2. melléklet tartalmazza. A fagyteszt alapján legellenállóbbnak bizonyult három transzgénikus vonal (14/2/2, 15/10/24 és 16/5/25) kettő mintavételi időpontjából (3K és 24H) származó mintákat teszteltük. A továbbiakban részletesebben vizsgált 14/2/2 vonal, valamint a Columbia ökotípus Qubit fluoriméterrel történt mérési eredményeit a 3. és a 4. melléklet tartalmazza.

4.3.2. Referenciagén választása

A Real-Time RT-PCR vizsgálatokhoz használt referenciagénekre tervezett primerpárokat először RT-PCR reakcióval teszteltük (13. ábra). A két vizsgált gén a 18S

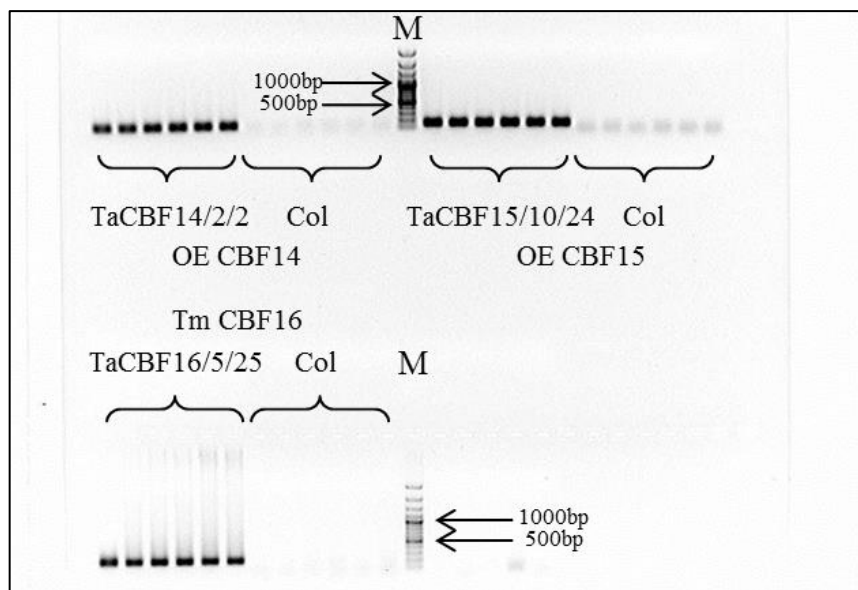
riboszómális RNS és a GAPDH volt. A gélekép alapján a 18S riboszómális RNS-re tervezett primerpár esetében erősebb jelet kaptunk, ezért ezt használtuk a későbbi génexpressziós vizsgálatainkhoz.



13. ábra: A referenciagénekre tervezett primerpárokkal amplifikált PCR-termékek gélelektroforézis képe néhány véletlenszerűen választott mintán. V: vak minta. M: marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Fotó: Gierczik Krisztián

4.3.3. A transzgén kifejeződésének vizsgálata

A reverz transzkripciót követően PCR módszerrel igazoltuk a transzgénikus vonalakban a transzgén működését. Templátként a 3 órás kontroll (3K) és az egy napig hideg-kezelt (24H) mintákat teszteltük. A gélelektroforézis eredményei alapján megállapítottuk, hogy minden egyes transzgénikus mintában a megfelelő transzgén fejeződött ki. Az eredmények megerősítése végett leteszteltük a Columbia ökotípust és a beépült transzgén mellett a másik két konstrukcióban használt *CBF* gént is. Ezekben az esetekben nem kaptunk terméket, tehát a transzgének kifejeződésére tervezett primerpárok specifikusak, csak a búzából származó transzgént amplifikálják fel és a vad típusú *Arabidopsis*-ban, ill. a más konstrukcióval transzformált vonalakban nem kötődnek szekvenciához (14. ábra).



14. ábra: A transzgén vizsgálata. A templát cDNS mind a három primerpárnál a három órás kontroll (3K) és az egy napig hideg-kezelt (24H) minták voltak. M: marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); Col: Columbia ökotípus. Fotó: Gierczik Krisztián

4.3.4. A primerek specifikusságának vizsgálata

A Real-Time RT-PCR használata előtt megvizsgáltuk a 3.7 fejezetben található primereket RT-PCR módszerrel, és a reakció után a termékeket gélelektroforézis módszerrel analizáltuk. Az eredményekből következtettünk arra, hogy az alkalmazni kívánt rövid oligonukleotid szekvenciák használatakor csak a primertervezés alapján várt termék keletkezik-e vagy amplifikálódnak nem specifikus fragmentumok is, illetve hogy egyáltalán amplifikál-e terméket a mi kísérleti rendszerünkben az adott primerpár a vizsgált vonalakban. Az eredmények alapján tíz primerpárt kizártunk a további expressziós vizsgálatokból (*AtCBF1*, *AtCBF2*, *AtCBF3*, *AtCBF4*, *COR15b*, *COR78*, *GA20ox3*, *GA3*, *RGL1*, *RGL3*) és csak tíz primerpárral folytattuk a génexpressziós vizsgálatainkat Real-Time RT-PCR módszerrel.

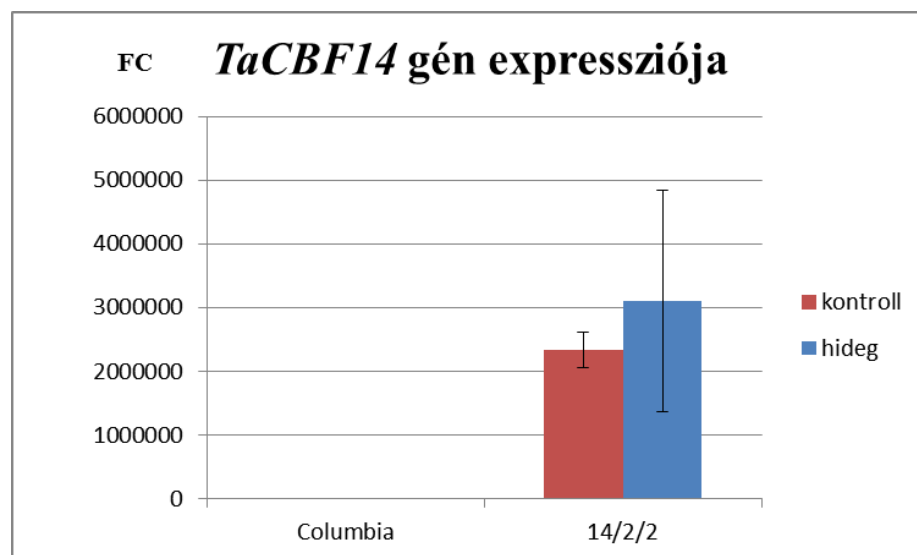
4.3.5. Génexpressziós vizsgálatok Real-Time RT-PCR módszerrel

Az adott transzgénre tervezett génspecifikus primert használtuk a transzformáns vonalak, valamint a vad típusú Columbia ökotípus Real-Time RT-PCR vizsgálatához. Referenciagénként a 18S riboszómális RNS-re tervezett primert használtuk. Az adatokat $\Delta\Delta C_t$ módszerrel értékeltük ki. A diagramokon ábrázoltuk a Fold Change értékeket,

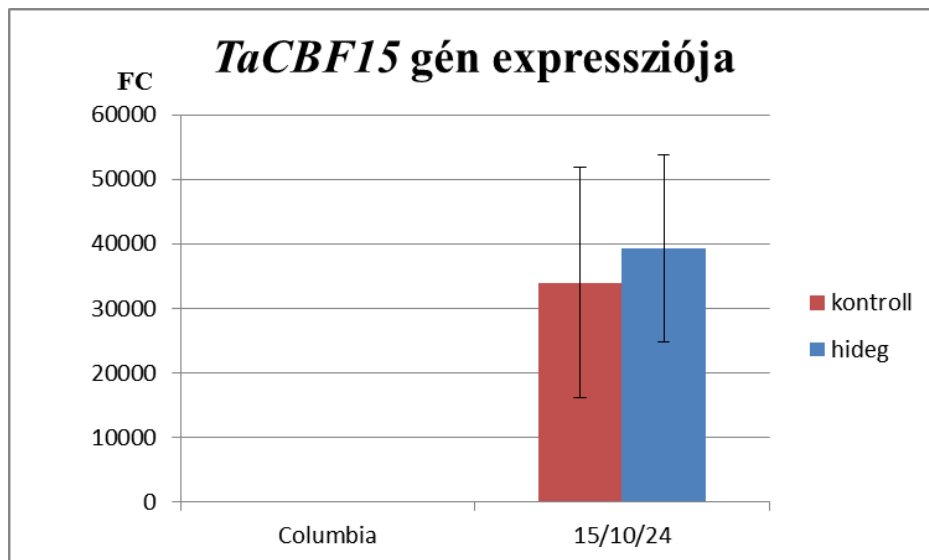
melyekből látszik, hogy relatíve hányszorosa az adott gén kifejeződése a transzformáns mintákban, ha a vad típus kontroll mintájában mért expressziót 1-nek tekintjük. Egyes ábrák a Log_2FC értékeit is bemutatják, mely az expresszióváltozás kettes alapú logaritmus értéke. Ezáltal a hidegindukált állapothoz képest kisebb léptékű, de kontroll körülmények között kimutatható néhány-szoros génexpresszióbeli különbségek is láthatóvá válnak a grafikonokon. Az expressziós vizsgálatoknál minden esetben a „három órás kontroll” (3K) és az „egy napos hideg-kezelt” (24H) mintákat használtuk.

4.3.5.1. A transzgén kifejeződésének vizsgálata

A *TaCBF14* és a *TaCBF15* transzgén már kontroll körülmények között is kifejeződött a konstitutív kifejeződést biztosító dupla 35S promóternek köszönhetően a transzgénikus vonalakban. Megállapítottuk, hogy hideg hatására a vizsgált gének expressziós szintje a kontroll mintáknál mért expressziós szinthez képest megnövekedett. A vad típusú Columbia ökotípusnál nem mértünk génexpressziót sem kontroll körülmények között, sem a hideg-kezelt mintákban, tehát a transzgenre tervezett primerpár nem kötődik semmilyen szekvenciához a vad típusban (15. és 16. ábra).

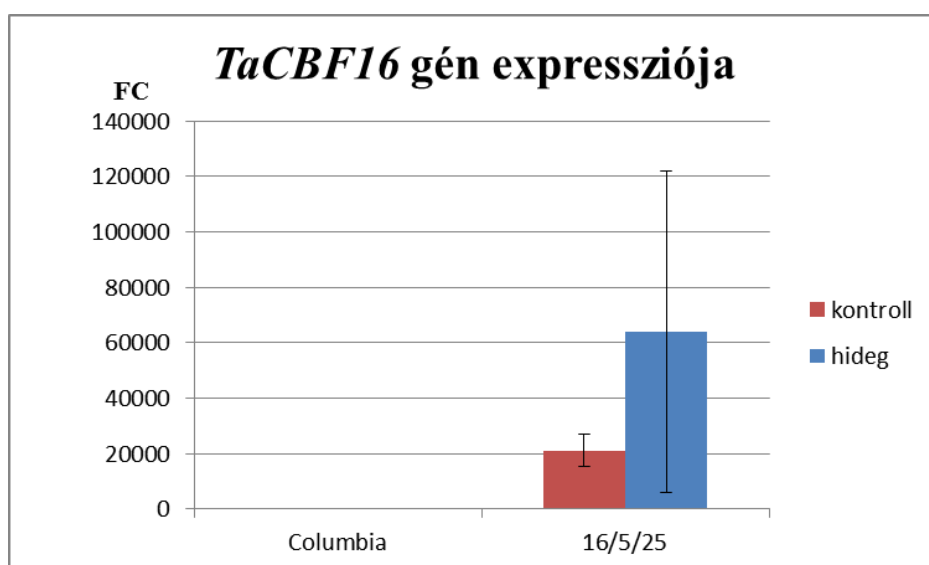


15. ábra: A *TaCBF14* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált vonalat jelöli.



16. ábra: A *TaCBF15* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel transzformált vonalat jelöli.

A *TaCBF16* transzgén esetén a hideg indukálható promóter kifejeződése miatt jelentős különbséget tudunk kimutatni a transzgénikus vonal kontroll és hideg körülmények között vett mintái között. Alacsony hőmérséklet hatására a transzgén kifejeződése a kontroll körülmények között mért expresszióhoz képest több mint háromszorosára nőtt. A vad típusú Columbia ökotípusnál nem mértünk génexpressziót sem kontroll körülmények között, sem a hideg-kezet mintákban, tehát a transzgénre tervezett primerpár nem kötődik semmilyen szekvenciához a vad típusban (17. ábra).

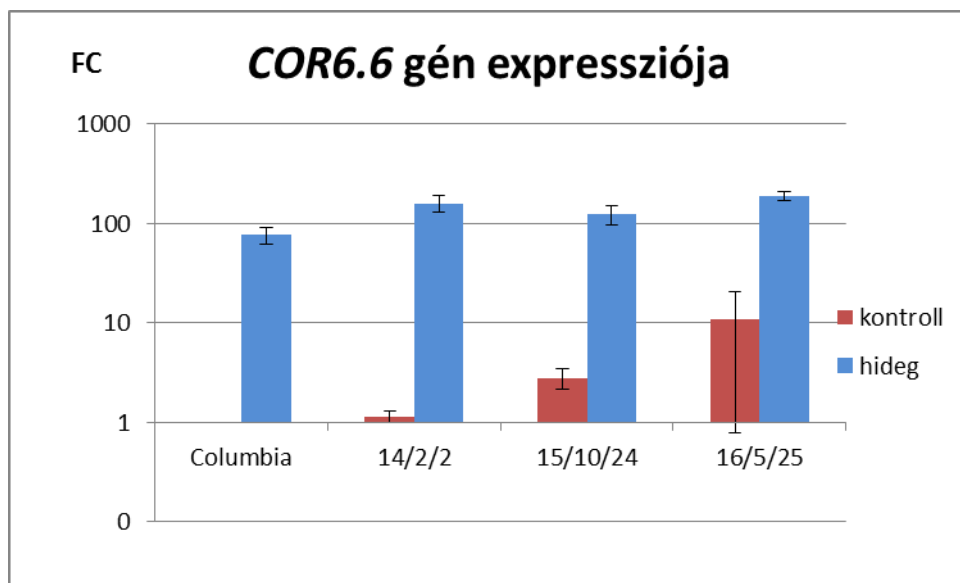


17. ábra: A *TaCBF16* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

4.3.5.2. A *COR* gének expressziós vizsgálata

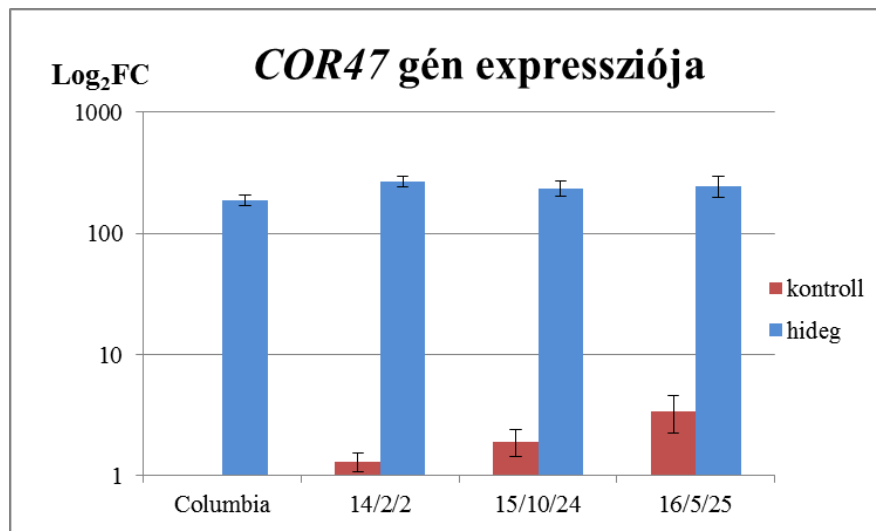
A hideg indukálható *COR* gének működése hozzájárul a növények alacsony hőmérsékleti stressz-toleranciájához. A *CBF* transzkripciós faktorok a *COR* gének promóteréhez kapcsolódva indukálják annak transzkripcióját.

A *COR6.6* gén expressziós vizsgálatainál kimutattuk, hogy a vad típusú Columbia-hoz képest a transzformáns vonalakban már kontroll körülmények között is expresszálódik, különösen a 16/5/25 vonal esetében. Hideg kezelés hatására jelentősen megnő a kifejeződésének a mértéke a vad típusban, míg a transzformánsokban ehhez képest is nagyobb expressziós szintet mértünk. (18. ábra).



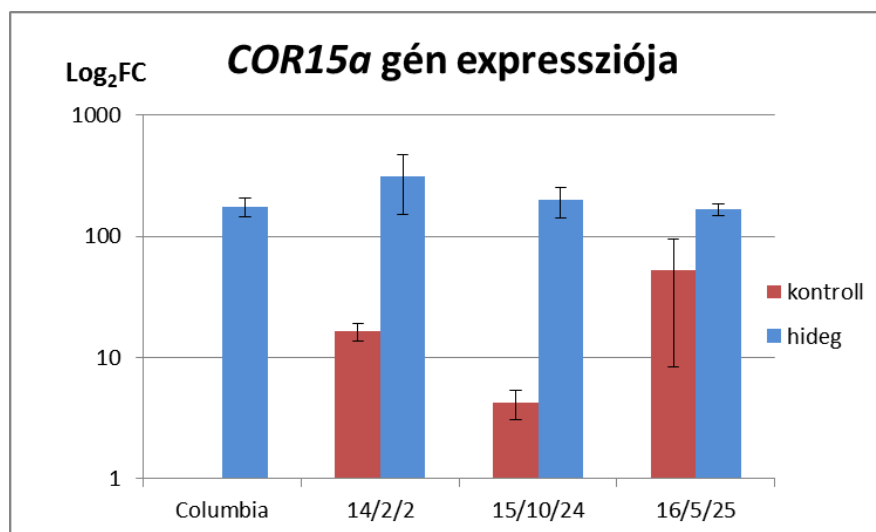
18. ábra: A *COR6.6* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

A *COR47* gén kifejeződése, hasonlóan a *COR6.6* génhez, a Columbia esetében csak a hideg-kezelt mintákon volt kimutatható, míg a transzformáns vonalakban már kontroll körülmények között is detektáltuk a gén kifejeződését. Különbséget mutattunk ki a kontroll minták és a hideg-kezelt minták között mind a három transzgénikus vonalban. A *COR47* gén expressziója a „24 órás hideg-kezelt” mintákban a három transzformáns vonalban itt sem mutatott jelentős különbséget a vad típushoz képest. Kontroll körülmények között ennél a génnél is a legnagyobb expressziót a *TaCBF16* vonalnál mértük (19. ábra).



19. ábra: A *COR47* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

Hasonlóan a fent említett két *COR* génhez, a *COR15a* gén expressziója a vad típusban csak hideg-kezelés hatására indukálódott. A Fold Change érték ábrázolásából látható, hogy a vad típussal ellentétben a *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* vonalakban már kontroll körülmények között is kifejeződött, és hideg-kezelés hatására expressziós szintje még inkább növekedett; de a „24 órás hideg-kezelt” mintákban a Columbia vad típusban mért génexpresszió mértéke közel azonos volt, mint a transzgenikus vonalakban detektált értékek (20. ábra).

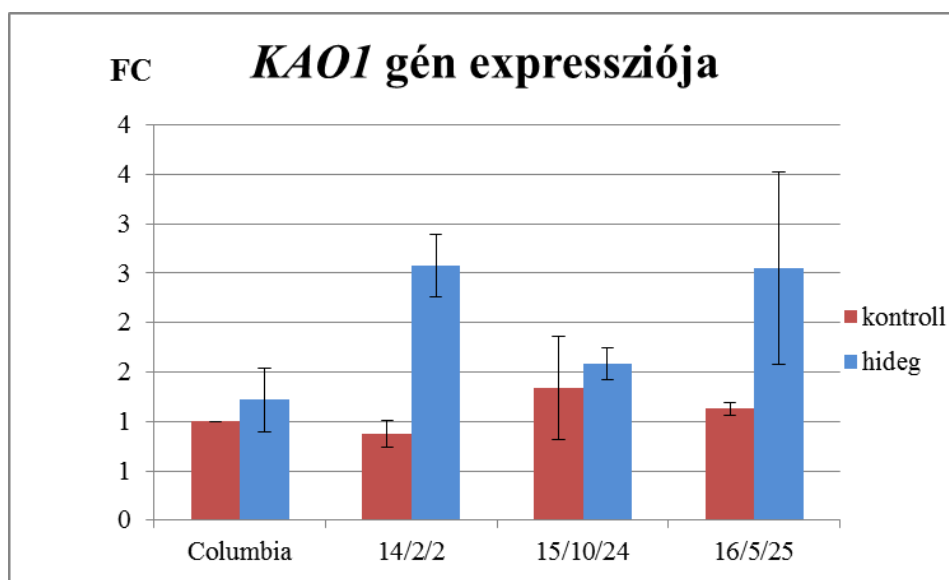


20. ábra: A *COR15a* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

4.3.5.3. A gibberellinsav-jelátviteli úthoz tartozó gének expressziós vizsgálata

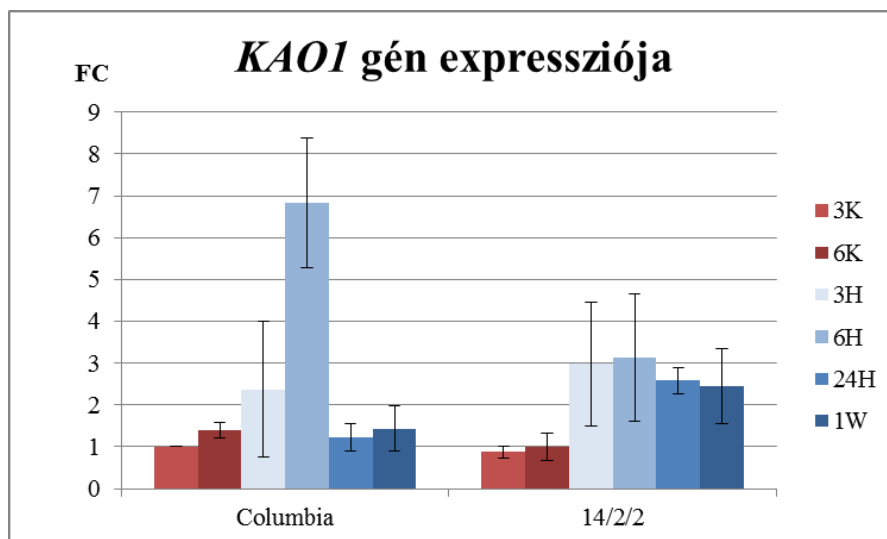
A fejlődést befolyásoló, gibberellinsav (GA) jelátviteli úthoz tartozó gének közül néhány *ent-kaurén sav oxidáz gén (KAO)*, a bioaktív gibberellinek szintéziséért felelős gének (*GA20-oxidáz* és a *GA3-oxidáz* gének) és a gibberellinek deaktivációjáért felelős gének (*GA2-oxidáz* gének) expressziós vizsgálatát végeztük el.

A *KAO1 (ent-kaurenoic acid oxidase 1)* gén expressziós vizsgálatai során kimutattuk, hogy a vad típusú Columbia kontroll és hideg-kezelt mintái között nincs jelentős különbség a gén kifejeződésének szintjében. Kontroll körülmények között a vad típus és a transzgénikus vonalak között sem mértünk jelentős különbséget. Hideg hatására a 14/2/2 és 16/5/25 vonalak esetében jelentősen megnőtt a *KAO1* gén expressziós szintje. A több mint kétszeres különbség miatt a 14/2/2 vonalat részletesen is megvizsgáltuk az adott génre (21. ábra).



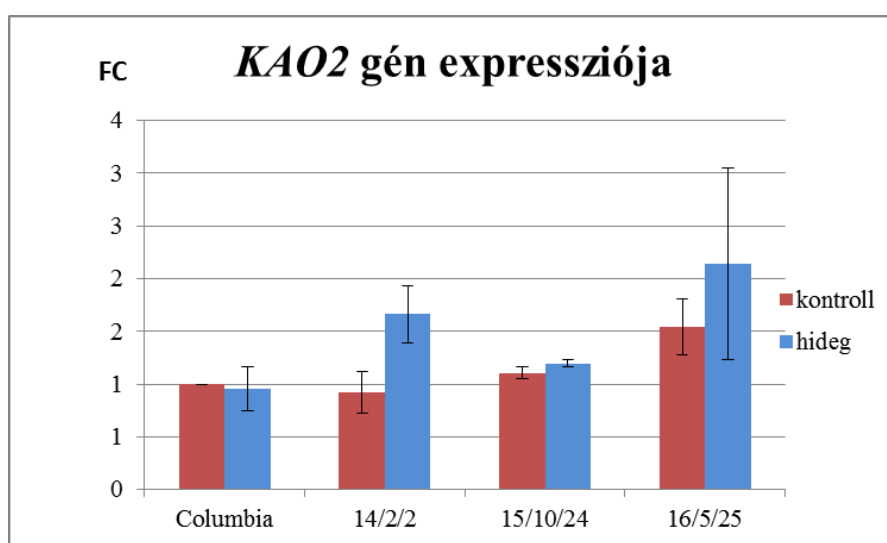
21. ábra: A *KAO1* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

Az *ent-kaurén sav oxidáz 1 (KAO1)* részletes génexpressziós vizsgálatából kimutattuk, hogy a vad típusú Columbia és a 14/2/2 vonal kontroll mintái között nincsen jelentős különbség. Hideg hatására a vad típusnál egy jelentős génexpresszió változást figyeltünk meg. Ez azonban az első napra már visszaesett a kontroll minták szintjére és a kísérlet végéig nem változott. Ezzel ellentétben, a transzgénikus *TaCBF14* vonalnál hideg hatására közel két-, háromszoros *KAO1* gén-kifejeződést mutattunk ki az összes hideg-kezelt mintából (22. ábra).



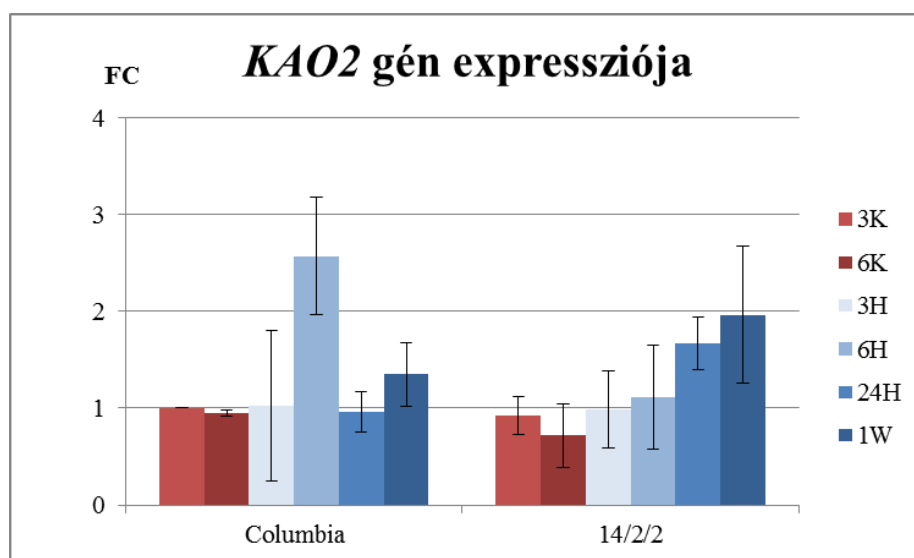
22. ábra: A *KAO1* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált vonalat jelöli. (3K: 3 órás kontroll-, 6K: 6 órás kontroll-, 3H: 3 órás hideg-kezelt-, 6H: 6 órás hideg-kezelt-, 24H: 1 napig hideg-kezelt-, 1W: 1 hétig hideg-kezelt minta).

A *KAO2* (*ent-kaurenoic acid oxidase 2*) vizsgálatakor kimutattuk, hogy kontroll körülmények között csak a 16/5/25 vonal esetében magasabb a gén expressziós szintje a vad típushoz képest. A másik két transzgénikus vonal (14/2/2 és 16/5/25) esetén a Columbia-ban mérthez képest közel azonos szintet mutattunk ki. Hideg hatására megnőtt a *KAO2* gén kifejeződése a 14/2/2 és a 16/5/25 vonalnál. Egyértelmű különbséget a vad típushoz képest csak az előbbinél tapasztaltuk, ezért azt részletesebben is megvizsgáltuk a *KAO2* génre (23. ábra).



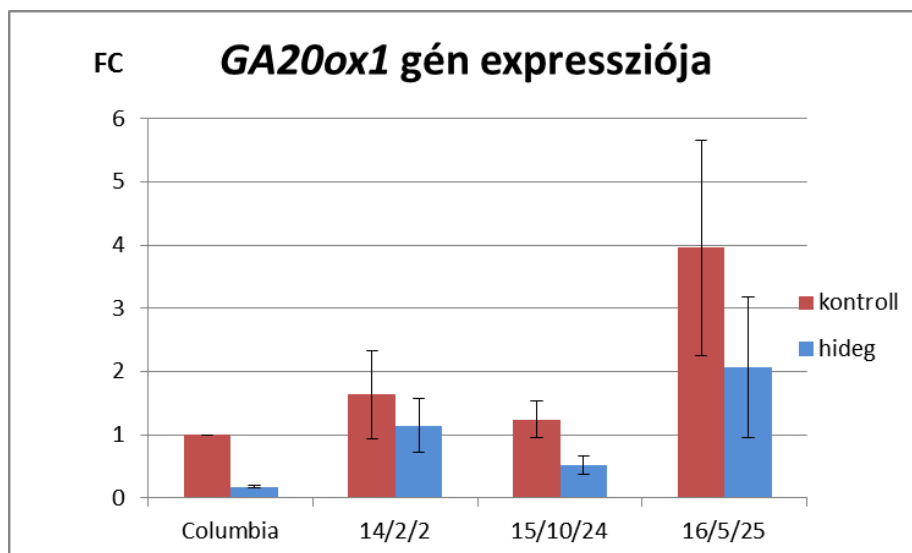
23. ábra: A *KAO2* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

A *KAO2* génexpressziós vizsgálatainál megállapítottuk, hogy a vad típusnál kontroll körülmények között nem változott a célgén kifejeződése. Alacsony hőmérséklet hatására a hat órás hideg-kezelt mintáin jelentős génkifejeződést mutattunk ki, viszont a 3H, 24H és 1W minták génexpressziós szintjei nem tértek el jelentősen a kontrollhoz képest. A vizsgált *TaCBF14* transzgénikus vonalnál kontroll körülmények között a *KAO2* génexpressziója közel azonos volt a Columbia ökotípushoz. A transzformáns vonal három és hat órás hideg-kezelt mintáin jelentős különbséget nem mutattunk ki a kontroll hőmérsékleten mért adatokhoz képest. Hideg hatására a *TaCBF14* vonal *KAO2* expressziós szintje fokozatosan emelkedik a kísérlet végéig, bár jelentős különbség csak egy nap hideg-kezelés után detektálható (24. ábra).



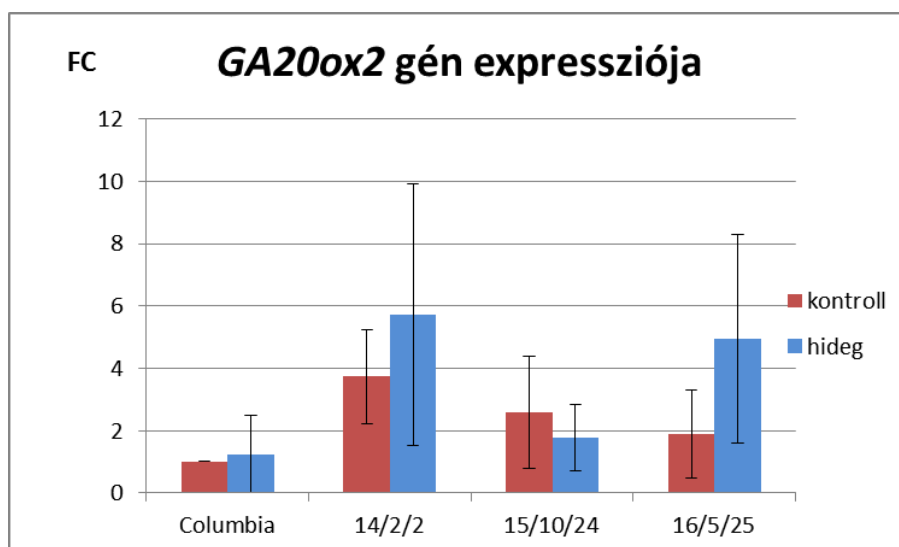
24. ábra: A *KAO2* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel transzformált vonalat jelöli. (3K: 3 órás kontroll-, 6K: 6 órás kontroll-, 3H: 3 órás hideg kezelt-, 6H: 6 órás hideg kezelt-, 24H: 1 napig hideg kezelt-, 1W: 1 hétig hideg kezelt minta).

A *gibberellinsav-20-oxidáz-1* (*GA20ox1*) gén esetében a 16/5/25 vonalnál közel négyszeres génexpressziót mértünk kontroll körülmények között a vad típusú Columbia ökotípushoz képest. A gén expressziója hideg hatására mind a négy vizsgált vonal esetében csökkent, de mindegyik transzgénikus vonal esetén magasabb volt, mint a vad típusnál mért értékek (25. ábra).



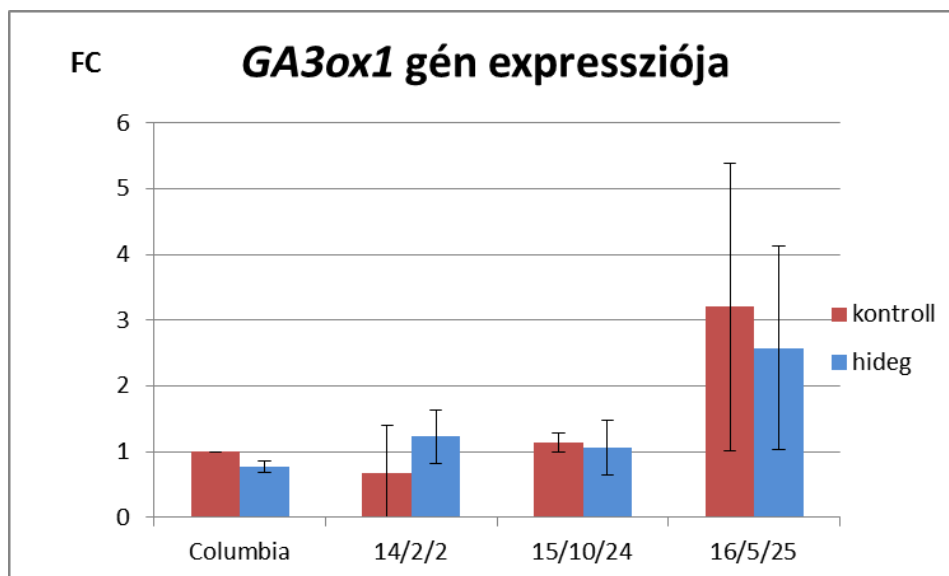
25. ábra: A *GA20ox1* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

A *gibberellinsav-20-oxidáz-2* (*GA20ox2*) gén esetében a vad típusú Columbia kontroll és hideg-kezelt mintái között génexpressziós szinten nem mutattunk ki különbséget. Kontroll körülmények között mind a három transzgénikus vonalnál növekedett a vizsgált gén kifejeződése. Hideg hatására a 14/2/2 és 16/5/25 vonalakban mutattunk ki jelentős génexpressziós növekedést a *GA20ox2* esetében. A 15/10/24 vonalnál hideg hatására a *gibberellinsav-20-oxidáz-2* gén expressziója lecsökkent (26. ábra).



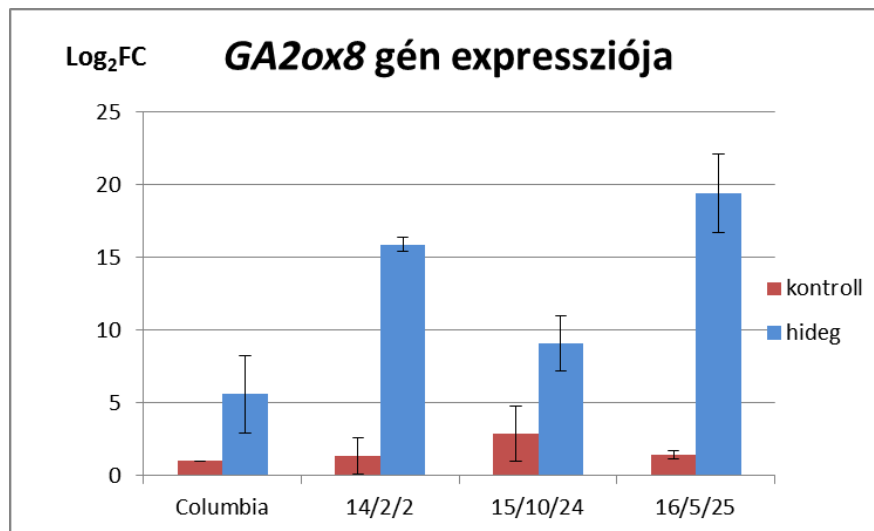
26. ábra: A *GA20ox2* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

A *gibberellinsav-3-oxidáz-1* (*GA3ox1*) gén vizsgálatakor kimutattuk, hogy a Columbia vad típus és a 15/10/24 esetében nem mutatkozott jelentős különbség a kontroll és a hideg-kezelt minták között. A 16/5/25 vonalban háromszor, illetve két és félszer nagyobb a génexpresszió mértéke a kontroll és a hideg-kezelt mintákhoz képest, mint a Columbia vad típus esetében. Megállapítottuk, hogy a 14/2/2 vonalon kívül a 15/10/24 és a 16/5/25 vonalaknál alacsony hőmérséklet hatására a génkifejeződés mértéke nem változott, és a szórások átfednek (27. ábra).



27. ábra: A *GA3ox1* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

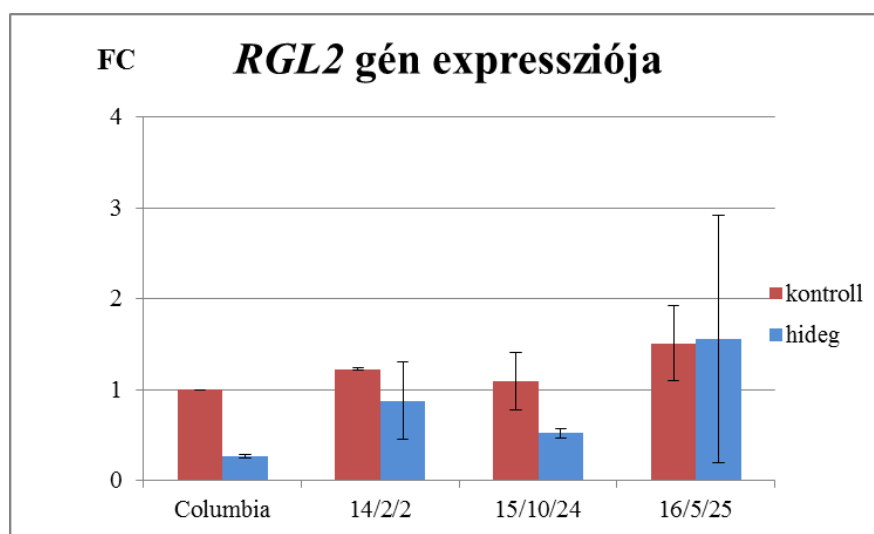
A *gibberellinsav-2-oxidáz-8* (*GA2ox8*) gén esetében kontroll körülmények között közel azonos mértékű génexpressziót mutattunk ki mind a négy vonalnál. Hideg hatására a vadban is és a transzformánsokban is megnőtt a vizsgált gén expressziója, de a legnagyobb növekedést a kezelés hatására a 14/2/2 és a 16/5/25 vonalaknál mértük (21. ábra).



28. ábra: A *GA2ox8* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

4.3.5.4. *RGL* (*Resistance Gene Analog Like*) gének expressziós vizsgálata

A DELLA fehérjék csoportjába tartozó *RGL* gének az *Arabidopsis*-ban is a növekedést korlátozó proteinekhez sorolhatóak; közülük az *RGL2* gén vizsgálatát végeztük el Real-Time RT-PCR módszerrel. Megállapítottuk, hogy a vad típusnál hideg hatására a gén represszálódik. Hasonló eredményt kapunk a 14/2/2 és a 15/10/24 vonalnál is. Habár nagyobb léptékű expresszióbeli csökkenés csak a vad és a 15/10/24 vonal esetében áll fenn, a 14/2/2 vonalnál is kimutatható kisebb eltérés a kontroll körülmények között mért szinthez képest, bár nagyok a szórások és részben átfednek (29. ábra).



29. ábra: A *RGL2* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. A diagramon a 14/2/2 jelölés a *TaCBF14* génnel, a 15/10/24 jelölés a *TaCBF15* génnel és a 16/5/25 jelölés a *TaCBF16* génnel transzformált vonalat jelöli.

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Transzformáns növények fenotípusos változása

A kísérleteink során a Columbia ökotípushoz képest egyes esetekben fejlődésbeli rendellenességet tapasztaltunk a transzformáns vonalakban. A szakirodalomban számos olyan esetet tárgyalnak, amikor a *CBF* transzgénikus növényben bizonyos fokú fejlődési visszamaradottságot, akár törpeséget és/vagy megkésett virágzást figyeltek meg (Liu et al. 1998, Gilmour et al. 2004, Thomashow 2010, Hussain et al. 2011, Soltész et al. 2013). Ugyanakkor találunk ellenpéldát is, amikor a bevitt *CBF* transzgénnek nem volt ilyen jellegű hatása (Jaglo-Ottosen et al. 1998, Oh et al. 2005, Wang et al. 2008).

5.2. Fagyteszt

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a *CBF14*, *CBF15* és *CBF16* gének fagytürésben betöltött szerepét, a transzformáns vonalakat a vad típusú Columbia ökotípussal együtt fagytesztnek vetettük alá.

Az edzés nélküli fagyteszt során kimutattuk, hogy a -6°C -ot valamennyi vizsgált vonal - a vad típus is károsodás nélkül túlélte. Tehát a -6°C még nem megfelelő arra, hogy a vonalak fagytürés képessége között különbséget tegyünk. A -7°C a vad típus számára már letálisnak bizonyult, de a 14/2/2 és a 16/5/25 vonalak közel 40%-a képes volt túlélni ezt a hőmérsékletet és regenerálódtak. Ezek szerint a *TaCBF14* és *TaCBF16* géneknek szerepük van a fagytürés kialakításában a transzgénikus *Arabidopsis*-ban, míg az őszi búzából származó *CBF15* génnek ebben a kísérleti megközelítésben nem volt ilyen hatása.

A hideg-edzésen átesett növények közül az összes vonal, beleértve a vad típust is, károsodás nélkül túlélte a -9°C hőmérsékletű fagyasztást. Kimutattuk, hogy a vad típusú Columbia a -10°C -os fagyasztás is túlélte, de a leveleken látható a fagy károsító hatása. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a 14/2/2, a 15/10/24 és a 16/5/25 vonalak kevésbé károsodtak, mint a vad típus. Ezáltal igazoltuk az *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* gének hatását az *Arabidopsis* fagyállóságának kialakításában.

Morran és munkatársai (2011) a *CBF/DREB1* génekhez filogenetikailag közel álló *TaDREB2* és *TaDREB3* génekkel transzformáltak tavaszi árpát és búzát. Kísérleteikkel bizonyították, hogy a kontroll körülmények között előnevelt transzformáns árpa 25-55 %-a túlélte a -6°C-os edzés nélküli fagykezelést. Soltész és munkatársai (2013) is hasonló eredményt kaptak a *TaCBF14* és *TaCBF15* géneket túltermelő árpavonalak tesztelésekor. Kísérleteiket -10°C, -11°C és -13°C hőmérsékleten, hideg-edzéssel is elvégezték. Bizonyították, hogy ezek a transzkripció faktorok fokozzák a tavaszi Golden Promise árpa fagyűrését. Jeknic és munkatársai (2014) a *HvCBF2A* gén túltermeltetésével fokozták a fagyűrést árpában. Ők kontroll körülmények között, 18°C-os előnevelést követően egy napon keresztül -3°C-on tartották a növényeket. A túlélési százalék meghatározása alapján megállapították, hogy a Golden Promise-hoz képest, a vizsgált vonalak fagyűrése jelentősen jobbnak bizonyult.

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a *TaCBF* transzformáns vonalak megnövekedett fagyűrést mutattak a vad típushoz képest; a Columbia ökotípus számára letális fagyasztási hőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékletű fagyasztás után is regenerálódtak. Ezáltal igazoltuk az őszi búzából származó *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* transzkripció faktorok hatását az *Arabidopsis* fagyállóságának kialakításában.

Az eredmények alapján azt is megállapítottuk, hogy a fagyasztást megelőzően alkalmazott hideg-edzéssel kevesebb fagykárosodást és magasabb túlélési százalékot lehet elérni mindegyik vonalnál, mint edzés nélkül. Hasonló tendenciát mutattak ki *CBF*-túltermelő növények ugyanezen két megközelítésben elvégzett fagytesztjei között (Soltész et al. 2013, Jeknic et al. 2014).

Ezen kísérletek eredményei alapján szelektáltuk a fagyűrésben ellenállóbb vonalakat, melyek nevezetesen a 14/2/2, a 15/10/24 és a 16/5/25; a jelölés a *TaCBF14* génnel, a *TaCBF15* génnel és a *TaCBF16* génnel transzformált vonalakat jelöli (azonos sorrendben). Ezeket további vizsgálatoknak vetettük alá, génexpressziós szinten.

5.3. Génexpressziós vizsgálatok

5.3.1. A transzgén kifejeződésnek vizsgálata

Már bizonyították, hogy a *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* gének az *Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia növényekbe beépültek. Az általunk elvégzett Real-Time RT-PCR eredmények alapján megállapítottuk, hogy minden egyes vonalnál ki is fejeződött a kívánt transzgén. Kísérleteinkkel tehát bizonyítottuk, hogy egy egyszikű növényből származó génnel transzformált kétszikű növényben a transzgén sikeres beépülése után kifejeződik. Hasonló eredményt írtak le Baldoni és munkatársai (2013) rizsből izolált, *Arabidopsis*-ba transzformált génről.

Kimutattuk, hogy a *TaCBF14* és *TaCBF15* transzgén már kontroll körülmények között is indukálódott a 2*35S konstitutívan működő promóter miatt. Hideg hatására mind a két gén esetében megnövekedett a génexpresszió. A *TaCBF16* vonalnál a hideg indukálható promóternek köszönhetően megnövekedett génexpressziós szintet mutattunk ki alacsonyabb hőmérséklet hatására, mint kontroll körülmények között. Már RT-PCR reakcióval kimutattuk, hogy a hideg-indukció miatt az egyes mintáknál olyan mértékű az expresszió növekedés, hogy szemmel is könnyen észlelhető a termék mennyiség-beli különbsége a gélképen.

A *TaCBF16* vonal esetében tehát magát a transzgént vezérlő *cor15a* hideg-indukálható promóter alacsony hőmérséklet hatására indukálódott. Ugyanakkor egy alap szintű génexpressziót mutattunk ki már kontroll körülmények között is, mivel a transzgén nem induktív körülmények között is - kis mértékben - kifejeződött. Vannini és munkatársai (2007) paradicsom növényekben mutattak ki hasonló jelenséget (Vannini et al. 2007), illetve transzgénikus árpan végzett kísérletekben is leírtak hasonló esetet (Soltész et al. 2012). Vannini a jelenséget a promóter „szivárgásával” magyarázta. Egy másik lehetséges magyarázat, amit Yoo és munkatársai (2005) írtak le, miszerint a konstrukcióban jelen lévő szelekciós markergén expresszióját biztosító konstitutív promóter is hathat a transzgén működésére. Ezen kívül más endogén gének promóterének erősítő hatása is befolyásolhatja a transzgént.

5.3.2. A CBF regulonhoz tartozó gének expressziója

Az általunk vizsgált, hideg-indukálható *COR6.6*, *COR47* és *COR15a* gének esetében az alacsony hőmérsékleti kezelés hatására hasonló léptékű génexpresszió növekedést mutattunk ki a három transzgénikus vonalban és a Columbia ökotípusban. Jelentős eltérés a kontroll minták között volt. A vad típusban kontroll körülmények között a vizsgált *COR* gének nem expresszálódtak, míg a transzformáns vonalakban igen. Ez a különbség részben magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért tűrték jobban a transzformáns vonalak a fagyasztást, mint a vad típusú Columbia ökotípus. Ugyanezek a fent vizsgált transzkripciók faktorok transzgénikus árpában is indukálták a *COR* gének kifejeződését már kontroll körülmények között, szemben a vad típussal (Soltész et al. 2013). Az általunk mért, hideg hatására bekövetkezett *COR* gének indukálódása megegyezik Rohde és munkatársai (2004) által publikált eredményekkel is. Jeknic és munkatársai (2014) szintén kimutatták, hogy már kontroll körülmények között expresszálódik a *COR15b* gén a HvCBF2A transzkripciók faktor túltermeltetése esetén.

A bioaktív GA-k szintéziséért felelős gének közül a *KAO1* gén kifejeződésének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy jelentősen megnőtt az expressziója a 14/2/2 és a 16/5/25 vonalakban a vad típushoz képest, viszont a *KAO2* gén expressziós szintje csak a 14/2/2 vonalban növekedett meg jelentősen alacsony hőmérséklet hatására. A *KAO1* részletes vizsgálata során kimutattuk, hogy a vad típusú Columbia-ban egy napos hideg hatására nő meg jelentősen a vizsgált gén expressziója, utána annak szintje visszaáll a kontroll minták szintjére. Ezzel ellentétben, a *TaCBF14* gént túltermelő transzformáns 14/2/2 vonalban hideg hatására egy sokkal egyenletesebb, a kísérlet végéig fennmaradó nagyobb *KAO1* génexpressziós szintet mutat. A *KAO2* gén esetében a Columbia vad típus szinte ugyanúgy reagál a hidegre, mint a *KAO1* esetében, azonban a transzgénikus 14/2/2 vonalnál egy hosszan tartó, folyamatosan emelkedő tendenciát figyelhetünk meg. A *GA20ox1* gén vizsgálatakor megállapítottuk, hogy hideg hatására mind a három transzgénikus vonalban és a vad típusban is kisebb expresszió mérhető, mint kontroll körülmények között, de az expressziós szintek a vad típusban alacsonyabbak. A *GA20ox2* gén vizsgálatakor a vad típusú Columbia esetén nem mutattunk ki jelentős különbséget a hideg-kezelés hatására, a transzgénikus vonalakban pedig a nagy szórások miatt nem tudunk egyértelmű tendenciáról beszélni. A *GA3ox1* gén vizsgálatakor nem tudtuk kimutatni határozott különbséget a transzformáns vonalakban a hőmérséklet csökkenés hatására, azonban a vad típusban a gén kis mértékű represszálódását mutattunk ki hideg-kezelés után. Ezek az eredmények azonban elgondolkoltattak minket

azon, hogy vajon miért nőtt meg a bioaktív GA-k szintéziséért felelős génekhez sorolható *KAO* és *GA20-oxidáz* gének expressziós szintje a fejlődésében enyhén visszamaradt transzformáns vonalban a vad típushoz képest, és ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A *GA2ox8* gén hideg hatására mind a három transzgénikus vonalban és a vad típusban is fokozott génkifejeződést mutatott. Mivel a *GA2-oxidáz* gének csökkentik a bioaktív gibberellinek szintjét, ezért a transzformáns vonalakban mért nagyobb *GA2ox8* expresszió magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért fordulhatnak elő fejlődési rendellenességek a *CBF* génnel transzformált növények esetén. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, már Achard és munkatársai (2008) is bizonyították, hogy *AtCBF1* gént túltermelő *Arabidopsis*-ban a bioaktív gibberellineket inaktiváló *GA2-oxidáz* gének magasabb szinten expresszáálódtak, s ezzel párhuzamosan megemelkedett a DELLA fehérjék mennyisége is. Kimutatták, hogy a bioaktív gibberellinek gátlása megnövelte a törpeség és a késői virágzás gyakoriságát. Az általunk vizsgált *RGL2* gén egy DELLA fehérjét kódol, és kisebb mértékben represszálódtott a *TaCBF*-túltermelő *Arabidopsis* vonalainkban alacsony hőmérséklet hatására, mint a vad Columbia ökotípusban.

6. Összefoglalás

Az egyik legfontosabb termesztett gabonanövényünk az őszi búza, melynek termés hozamában a téli fagyok jelentős károkat okozhatnak. Ezért a növény nemesítők számára az egyik fő szempont a télállóság növelése. A molekuláris biológiai kutatások egyik célja azon gének működésének a felderítése, amelyek szabályozzák a növények abiotikus stressztűrését. Ennek egyik legintenzívebben kutatott területe az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia, ezen belül is a fagytűrés kialakulásának molekuláris háttere.

A génfunkciós vizsgálatok egyik lehetséges módja, ha egy gazda szervezetet transzformálnak a vizsgálandó génnel, majd a transzgén hatását a genetikailag módosított vonalak megváltozott tulajdonságai alapján vizsgálják.

A transzkripció faktorok a génszabályozást teszik lehetővé, úgy, hogy a célgén promóteréhez kapcsolódva befolyásolják annak az átírását. Az abiotikus stressz tolerancia kialakításában szerepet játszó transzkripció faktorok közül az egyik leginkább vizsgált a *CBF* géncsalád. Számos esetben kimutatták, hogy adott *CBF* génnel transzformált növények megnövekedett hideg-, és/vagy fagytűréssel rendelkeztek. Munkánk során az őszi kenyérbúzából (*Triticum aestivum* spp. cv. Cheyenne) izolált *TaCBF14*, *TaCBF15* és *TaCBF16* gének funkcionális vizsgálatát végeztük el transzgénikus *Arabidopsis* vonalakban. Élettani és molekuláris módszerekkel bebizonyítottuk a vizsgált gének fagytűrésben betöltött szerepét, melynek során a transzgénikus vonalak stressz tűrését a vad típusú Columbia ökotípushoz hasonlítottuk.

Kísérleteinkben konstitutívan kifejeződő és hideg indukálható promóterrel szabályozott vonalakat is vizsgáltunk. A transzformáns növények fagytűrését kétféle módon teszteltük; a természetben lejátszódó folyamatokhoz hasonlóan edzési periódussal (-9°C és -10°C on), valamint edzési periódus nélkül is (-6°C és -7°C -on). A regenerálódás mértéke, illetve a túlélési százalék alapján szelektáltuk a legellenállóbb vonalakat. Két *TaCBF* túltermelő vonal (a *TaCBF14* transzgént túltermelő 14/2/2 és a *TaCBF16* transzgént túltermelő 16/5/25 vonalak) fagyállósága kiemelkedően jobbnak bizonyult a vad típusú Columbia ökotípushoz képest.

A fagytesztek alapján szelektált legellenállóbb vonalakban molekuláris vizsgálatokkal tanulmányoztuk a transz gének és néhány általuk szabályozott hideg-indukálható gén, továbbá a gibberellinsav jelátviteli úthoz tartozó néhány gén expresszióját kvantitatív Real-Time RT-PCR módszerrel.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Bedő Zoltán Főigazgató Úrnak, az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetnek és a kapcsolódó pályázati forrásoknak (OTKA K75528, valamint az FP7-KBBE-2011-5 ADAPTAWHEAT - project kód: 289842) a támogatását.

Köszönettel tartozom Dr. Galiba Gábor Osztályvezetőnek, aki lehetőséget adott arra, hogy az MTA ATK MGI Növényi Molekuláris Biológia Osztályon folyó kutatásokba bekapcsolódjak.

Köszönettel tartozom Dr. Soltész Alexandrának, aki elvállalta témavezetésemet. Mindvégig számíthattam hasznos tanácsaira, iránymutatására. Türelemmel és hozzáértéssel vezette munkámat.

Köszönöm Dr. Kiss Erzsébet Tanárnőnek, mint belső témavezetőmnek a diplomamunkám gondos és alapos áttekintését, segítő észrevételeit.

Köszönök minden segítséget és tanácsot, valamint a diplomadolgozatom alapos átnézését Dr. Vágújfalvi Attilának, aki munkám elején bevezetett a „laboratóriumi életbe”.

Szeretném megköszönni a kísérleteinkben használt transzformáns vonalak előállításában való együttműködését Dr. Papp István Professzor Úrnak.

8. Nyilatkozat

Alulírott Gierczik Krisztián György, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági biotechnológus MSc. szak levelező tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy a diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar/Intézet/Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátum) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásban, a jogi és etikai szabályok teljes betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot nem tartalmaz.

Gödöllő, 2014.10.14.

Gierczik Krisztián
Hallgató

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot záróvizsgára történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot nem tartalmaz.

Gödöllő, 2014.10.15.

Dr. Kiss Erzsébet
Belső témavezető

Dr. Soltész Alexandra
Külső témavezető

9. 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: 2117-2129.
- 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.
- Baldoni, E., Genga, A., Medici, A., Coraggio, I. & Locatelli, F. (2013): The *OsMyb4* gene family: stress response and transcriptional auto-regulation mechanisms. *Biologia Plantarum*, 57(4): 691-700.
- 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
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K. & Sunkar, R. (2010): Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639: 39-55.
- 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: 671–680.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R. & Udvardi, M.K. (2004): Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, 38(2): 366-379.
- Finch-Savage, W.E. & Leubner-Metzger, G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.
- Galiba, G. & Sutka, J. (1997): A termesztett növények abiotikus stresszrezisztenciája. Martonvásár-Gödöllő, SZIE Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Egyetemi jegyzet. 1-3.
- Galiba, G. & Vágújfalvi, A. (2006): A fagyállóság élettana és genetikája. In: Dudits, D. (Szerk.): A búza nemesítésének tudománya. MTA Szegedi Biológiai Központ-Winter Fair Kft., Szeged 230-243.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: 104-106.
- Jeknic, Z., Pillman, K.A., Dhillon, T., Skinner, S.J., Veisz, O., Cuesta-Marcos, A., Hayes, P.M., Jacobs, A.K., Chen, T.H.H. & Stockinger, E.J., (2014): Hv-*BF2A* overexpression in barley accelerates *COR* genetranscript accumulation and acquisition of freezing tolerance during cold acclimation. *Plant Molecular Biology* 84: 67-82
- 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.
- Kiss, E. (2005): Molekuláris növénynevelés. In: Heszky, L., Fésüs, L. & Hornok, L. (Szerk.): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest. 203.
- 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.
- 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.
- Levitt, J. (1980): Responses of plants to environmental stresses. Második kiadás, Academic Press, New York, 607.
- 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.

- 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.
- Meyerowitz, E.M., Koncz, C., Chua, N.H. & Schell, J. (1992): Introduction to the *Arabidopsis* genome. *Methods in Arabidopsis Research*, Singapore, Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 101-118.
- Miller, A.K., Galiba, G. & Dubcovsky J. (2006): A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A^m2* in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(2): 193-203.
- 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.
- 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.
- 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: 341-351.
- Pearce, S., Zhu, J., Boldizsár, Á., Vágújfalvi, A., Burke, A., Garland-Campbell, K., Galiba, G. & Dubcovsky, J. (2013): Large deletions in the CBF gene cluster at the Fr-B2 locus are associated with reduced frost tolerance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2683-2697
- Porter, J.R., & Gawith, M., (1999): Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European Journal of Agronomy*, 10: 23-36.
- Rédei, G.P., (1975): *Arabidopsis* as a Genetic Tool. *Annual Review of Genetics*, 9: 111-127.
- Rédei, G.P., Koncz, C., Chua, N.H. & Schell, J. (1992): A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. *Methods in Arabidopsis research*, 1-15.
- Rohde, P., Hinch, D.K., & Heyer, A.G., (2004): Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia-0 and C24) that show differences in non-acclimated and acclimated freezing tolerance. *The Plant Journal*, 38 (5): 790-799.
- 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.
- 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.
- Schmitz, R.J. & Amasino, R.M. (2007): Vernalization: A model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochimica Biophysica Acta*, 1769: 269-275.
- Selye, H. (1975): *Stress without distress*. Signet Books, New York. 193.
- Selye, J. (1936): A syndrome produced by various noxious agents. *Nature*, 138: 32-34.
- 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.
- Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., Liu, C., Feng, Y., Cao, X. & Xie, Q. (2013): ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 9(6):e1003577. doi: 10.1371/journal.pgen.1003577. Epub 2013 Jun 20.
- Skinner, J.S., Von Zitzewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Thomashow, M.F., Chen, T.H. & Hayes, P.M. (2005): Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Molecular Biology*, 59:533-551.
- Soltész, A., Smedley, M., Vashegyi, I., Galiba, G., Jones, H.D., Harwood, W. & Vágújfalvi A. (2013): Transgenic barley lines prove the involvement of *TaCBF14* and *TaCBF15* in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 64: 1849-1862.
- Soltész, A., Vágújfalvi, A., Rizza, F., Kerepesi, I., Coraggio, I., Galiba, G., Cattivelli, L. & Crosatti, C. (2012): The rice *OsMyb4* gene enhances tolerance to frost and anoxia in transgenic barley plants. *Journal of Applied Genetics*, 53: 133-143.
- Steponkus, P.L. (1984): Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 543-584.
- 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.
- Szigeti, Z. (1998): Növények és a stressz. In: Láng, F. (Szerk.): *Növényélettan – A növényi anyagcsere 2*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. 950-968.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
- Thomashow, M.F. (1999): Plant cold acclimation: freezing tolerance genes regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 571-599.

- 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.
- 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.
- Tyler, L., Thomas, G.S., Hu, J., Dill, A., Alonso, M.J., Ecker, J.R. & Sun, T. (2004): DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(2): 1008-1019.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vasil I.K. (1999): Molecular improvement of cereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 5: 133-147.
- Wang Y. & Hua J. (2009): A moderate decrease in temperature induces COR15a expression through the CBF signaling cascade and enhances freezing tolerance. *The Plant Journal*, 60: 340-349.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

10. Mellékletek

Minta azonosító			Az RNS minták koncentrációja (ng/μl)	Összes RNS mennyisége (μg)	Ennyi (μl) RNS oldat tartalmaz 1 μg RNS-t	A hozzáadott víz térfogata (μl)
1.	14/1/2	3KA	382,65	19,1325	2,61	7,39
2.	14/1/2	3KB	179,86	8,993	5,56	4,44
3.	14/1/2	3KC	133,62	6,681	7,48	2,52
4.	14/1/2	6KA	198,67	9,9335	5,03	4,97
5.	14/1/2	6KB	176,75	8,8375	5,66	4,34
6.	14/1/2	6KC	406,62	20,331	2,46	7,54
7.	14/1/2	3HA	173,60	8,68	5,76	4,24
8.	14/1/2	3HB	298,19	14,9095	3,35	6,65
9.	14/1/2	3HC	122,81	6,1405	8,14	1,86
10.	14/1/2	6HA	163,16	8,158	6,13	3,87
11.	14/1/2	6HB	167,00	8,35	5,99	4,01
12.	14/1/2	6HC	228,07	11,4035	4,38	5,62
13.	14/1/2	24HA	198,72	9,936	5,03	4,97
14.	14/1/2	24HB	411,57	20,5785	2,43	7,57
15.	14/1/2	24HC	118,82	5,941	8,42	1,58
16.	14/1/2	1WA	100,71	5,0355	9,93	0,07
17.	14/1/2	1WB	119,04	5,952	8,40	1,60
18.	14/1/2	1WC	238,50	11,925	4,19	5,81
19.	14/2/2	3KA	184,17	9,2085	5,43	4,57
20.	14/2/2	3KB	199,03	9,9515	5,02	4,98
21.	14/2/2	3KC	157,32	7,866	6,36	3,64
22.	14/2/2	6KA	152,45	7,6225	6,56	3,44
23.	14/2/2	6KB	209,37	10,4685	4,78	5,22
24.	14/2/2	6KC	190,21	9,5105	5,26	4,74
25.	14/2/2	3HA	349,91	17,4955	2,86	7,14
26.	14/2/2	3HB	433,89	21,6945	2,30	7,70
27.	14/2/2	3HC	142,57	7,1285	7,01	2,99
28.	14/2/2	6HA	134,98	6,749	7,41	2,59
29.	14/2/2	6HB	154,91	7,7455	6,46	3,54
30.	14/2/2	6HC	208,90	10,445	4,79	5,21
31.	14/2/2	24HA	148,09	7,4045	6,75	3,25
32.	14/2/2	24HB	311,07	15,5535	3,21	6,79
33.	14/2/2	24HC	156,61	7,8305	6,39	3,61
34.	14/2/2	1WA	106,70	5,335	9,37	0,63
35.	14/2/2	1WB	127,40	6,37	7,85	2,15
36.	14/2/2	1WC	143,97	7,1985	6,95	3,05
37.	15/3	3KA	216,55	10,8275	4,62	5,38
38.	15/3	3KB	141,73	7,0865	7,06	2,94

39.	15/3	3KC	190,20	9,51	5,26	4,74
40.	15/3	6KA	114,75	5,7375	8,71	1,29
41.	15/3	6KB	268,62	13,431	3,72	6,28
42.	15/3	6KC	377,72	18,886	2,65	7,35
43.	15/3	3HA	464,86	23,243	2,15	7,85
44.	15/3	3HB	450,12	22,506	2,22	7,78
45.	15/3	3HC	416,91	20,8455	2,40	7,60
46.	15/3	6HA	154,21	7,7105	6,48	3,52
47.	15/3	6HB	303,64	15,182	3,29	6,71
48.	15/3	6HC	166,30	8,315	6,01	3,99
49.	15/3	24HA	286,77	14,3385	3,49	6,51
50.	15/3	24HB	178,08	8,904	5,62	4,38
51.	15/3	24HC	154,83	7,7415	6,46	3,54
52.	15/3	1WA	155,60	7,78	6,43	3,57
53.	15/3	1WB	113,07	5,6535	8,84	1,16
54.	15/3	1WC	152,45	7,6225	6,56	3,44
55.	15/10/24	3KA	180,79	9,0395	5,53	4,47
56.	15/10/24	3KB	203,79	10,1895	4,91	5,09
57.	15/10/24	3KC	273,30	13,665	3,66	6,34
58.	15/10/24	6KA	286,93	14,3465	3,49	6,51
59.	15/10/24	6KB	166,54	8,327	6,00	4,00
60.	15/10/24	6KC	155,37	7,7685	6,44	3,56
61.	15/10/24	3HA	268,14	13,407	3,73	6,27
62.	15/10/24	3HB	191,43	9,5715	5,22	4,78
63.	15/10/24	3HC	276,95	13,8475	3,61	6,39
64.	15/10/24	6HA	326,57	16,3285	3,06	6,94
65.	15/10/24	6HB	154,61	7,7305	6,47	3,53
66.	15/10/24	6HC	180,18	9,009	5,55	4,45
67.	15/10/24	24HA	206,80	10,34	4,84	5,16
68.	15/10/24	24HB	232,49	11,6245	4,30	5,70
69.	15/10/24	24HC	362,87	18,1435	2,76	7,24
70.	15/10/24	1WA	131,34	6,567	7,61	2,39
71.	15/10/24	1WB	170,87	8,5435	5,85	4,15
72.	15/10/24	1WC	168,08	8,404	5,95	4,05
73.	16/3/37	3KA	168,18	8,409	5,95	4,05
74.	16/3/37	3KB	205,30	10,265	4,87	5,13
75.	16/3/37	3KC	161,39	8,0695	6,20	3,80
76.	16/3/37	6KA	185,62	9,281	5,39	4,61
77.	16/3/37	6KB	232,73	11,6365	4,30	5,70
78.	16/3/37	6KC	449,21	22,4605	2,23	7,77
79.	16/3/37	3HA	220,72	11,036	4,53	5,47
80.	16/3/37	3HB	434,86	21,743	2,30	7,70
81.	16/3/37	3HC	310,89	15,5445	3,22	6,78
82.	16/3/37	6HA	203,28	10,164	4,92	5,08
83.	16/3/37	6HB	158,94	7,947	6,29	3,71

84.	16/3/37	6HC	176,76	8,838	5,66	4,34
85.	16/3/37	24HA	226,58	11,329	4,41	5,59
86.	16/3/37	24HB	403,61	20,1805	2,48	7,52
87.	16/3/37	24HC	289,60	14,48	3,45	6,55
88.	16/3/37	1WA	257,83	12,8915	3,88	6,12
89.	16/3/37	1WB	185,55	9,2775	5,39	4,61
90.	16/3/37	1WC	101,42	5,071	9,86	0,14
91.	16/5/25	3KA	198,71	9,9355	5,03	4,97
92.	16/5/25	3KB	246,18	12,309	4,06	5,94
93.	16/5/25	3KC	213,73	10,6865	4,68	5,32
94.	16/5/25	6KA	236,23	11,8115	4,23	5,77
95.	16/5/25	6KB	334,87	16,7435	2,99	7,01
96.	16/5/25	6KC	173,40	8,67	5,77	4,23
97.	16/5/25	3HA	155,45	7,7725	6,43	3,57
98.	16/5/25	3HB	172,12	8,606	5,81	4,19
99.	16/5/25	3HC	170,86	8,543	5,85	4,15
100.	16/5/25	6HA	171,81	8,5905	5,82	4,18
101.	16/5/25	6HB	222,70	11,135	4,49	5,51
102.	16/5/25	6HC	172,22	8,611	5,81	4,19
103.	16/5/25	24HA	129,49	6,4745	7,72	2,28
104.	16/5/25	24HB	183,14	9,157	5,46	4,54
105.	16/5/25	24HC	175,35	8,7675	5,70	4,30
106.	16/5/25	1WA	132,52	6,626	7,55	2,45
107.	16/5/25	1WB	128,63	6,4315	7,77	2,23
108.	16/5/25	1WC	219,10	10,955	4,56	5,44
109.	Col	3KA	206,74	10,337	4,84	5,16
110.	Col	3KB	175,03	8,7515	5,71	4,29
111.	Col	3KC	236,49	11,8245	4,23	5,77
112.	Col	6KA	214,24	10,712	4,67	5,33
113.	Col	6KB	216,86	10,843	4,61	5,39
114.	Col	6KC	259,51	12,9755	3,85	6,15
115.	Col	3HA	272,61	13,6305	3,67	6,33
116.	Col	3HB	212,68	10,634	4,70	5,30
117.	Col	3HC	104,27	5,2135	9,59	0,41
118.	Col	6HA	215,59	10,7795	4,64	5,36
119.	Col	6HB	192,40	9,62	5,20	4,80
120.	Col	6HC	166,53	8,3265	6,00	4,00
121.	Col	24HA	318,80	15,94	3,14	6,86
122.	Col	24HB	449,23	22,4615	2,23	7,77
123.	Col	24HC	344,42	17,221	2,90	7,10
124.	Col	1WA	288,25	14,4125	3,47	6,53
125.	Col	1WB	122,53	6,1265	8,16	1,84
126.	Col	1WC	150,91	7,5455	6,63	3,37

1. melléklet: Az RNS koncentráció mérési eredményei, valamint a reverz transzkripció előtt a templát összeméréséhez szükséges térfogatok összefoglaló táblázata

Minta azonosító			Mérés 1 (ng/μl)	Mérés 2 (ng/μl)	Mérés 3 (ng/μl)	Átlag	Szórás
19.	14/2/2	3KA	1,540	1,630	1,610	1,593	0,047
20.	14/2/2	3KB	0,917	1,050	1,020	0,996	0,070
21.	14/2/2	3KC	1,050	1,270	1,230	1,183	0,117
31.	14/2/2	24HA	1,290	1,440	1,380	1,370	0,075
32.	14/2/2	24HB	0,572	0,736	0,673	0,660	0,083
33.	14/2/2	24HC	0,580	0,849	0,791	0,740	0,142
55.	15/10/24	3KA	1,030	1,090	1,030	1,050	0,035
56.	15/10/24	3KB	0,591	0,753	0,681	0,675	0,081
57.	15/10/24	3KC	1,350	1,260	1,240	1,283	0,059
67.	15/10/24	24HA	1,540	1,600	1,530	1,557	0,038
68.	15/10/24	24HB	1,280	1,340	1,260	1,293	0,042
69.	15/10/24	24HC	1,160	1,140	1,090	1,130	0,036
91.	16/5/25	3KA	1,220	1,220	1,170	1,203	0,029
92.	16/5/25	3KB	1,320	1,270	1,210	1,267	0,055
93.	16/5/25	3KC	1,230	1,380	1,360	1,323	0,081
103.	16/5/25	24HA	1,160	1,300	1,250	1,237	0,071
104.	16/5/25	24HB	1,810	1,540	1,480	1,610	0,176
105.	16/5/25	24HC	0,595	0,797	0,738	0,710	0,104
109.	Col	3KA	1,200	1,210	1,150	1,187	0,032
110.	Col	3KB	1,010	1,260	1,200	1,157	0,131
111.	Col	3KC	1,300	1,250	1,180	1,243	0,060
121.	Col	24HA	1,940	1,530	1,480	1,650	0,252
122.	Col	24HB	1,560	1,970	1,910	1,813	0,221
123.	Col	24HC	2,710	2,760	2,720	2,730	0,026

2. melléklet A Qubit fluoriméterrel történt mérési eredmények

Minta azonosító			Mérés 1 (ng/μl)	Mérés 2 (ng/μl)	Átlag	Szórás
22.	14/2/2	6KA	1,650	1,520	1,585	0,092
23.	14/2/2	6KB	1,590	1,380	1,485	0,148
24.	14/2/2	6KC	1,470	1,310	1,390	0,113
25.	14/2/2	3HA	1,700	1,540	1,620	0,113
26.	14/2/2	3HB	5,810	5,330	5,570	0,339
27.	14/2/2	3HC	1,760	1,620	1,690	0,099
28.	14/2/2	6HA	2,450	2,240	2,345	0,148
29.	14/2/2	6HB	1,640	1,480	1,560	0,113
30.	14/2/2	6HC	1,300	1,130	1,215	0,120
34.	14/2/2	1WA	1,560	1,440	1,500	0,085
35.	14/2/2	1WB	1,300	1,160	1,230	0,099
36.	14/2/2	1WC	1,390	1,260	1,325	0,092

3. melléklet A *TaCBF14/2/2* vonal cDNS koncentrációi

Minta azonosító			Mérés 1 (ng/μl)	Mérés 2 (ng/μl)	Átlag	Szórás
112.	Col	6KA	0,939	0,926	0,933	0,009
113.	Col	6KB	0,745	0,747	0,746	0,001
114.	Col	6KC	0,704	0,670	0,687	0,024
115.	Col	3HA	0,473	0,518	0,496	0,032
116.	Col	3HB	0,959	0,974	0,967	0,011
117.	Col	3HC	0,890	0,888	0,889	0,001
118.	Col	6HA	0,747	0,762	0,755	0,011
119.	Col	6HB	0,794	0,845	0,820	0,036
120.	Col	6HC	0,663	0,711	0,687	0,034
124.	Col	1WA	0,509	0,460	0,485	0,035
125.	Col	1WB	0,551	0,557	0,554	0,004
126.	Col	1WC	0,603	0,609	0,606	0,004

4. melléklet A Columbia ökotípus cDNS koncentrációi