



SZENT ISTVÁN EGYETEM  
GEORGIKON KAR  
FESTETICS DOKTORI ISKOLA  
KESZTHELY



## **Doktori disszertáció**

# **A foszfolipid-CBF jelátviteli út szabályozásának vizsgálata árpa modellnövényben**

DOI: 10.54598/001470

**Gierczik Krisztián György**

**Témavezetők**

Prof. Galiba Gábor

Dr. Vágújfalvi Attila



**ATK MGI**  
MEZŐGAZDASÁGI INTÉZET

Martonvásár

2021.

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Festetics Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudományok

**vezetője:** **Prof. Anda Angéla**  
Egyetemi tanár, DSc  
Szent István Egyetem, Georgikon Kar  
Meteorológia és Vízgazdálkodás Tanszék

**Témavezető:** **Prof. Galiba Gábor**  
tudományos osztályvezető, DSc  
Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet  
Növényi Molekuláris Biológia Osztály

**Témavezető:** **Dr. Vágújfalvi Attila**  
tudományos főmunkatárs, PhD  
Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet  
Növényi Molekuláris Biológia Osztály

.....  
Prof. Anda Angéla  
jóváhagyása

.....  
Prof. Galiba Gábor  
jóváhagyása

.....  
Dr. Vágújfalvi Attila  
jóváhagyása

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	5
<b>2</b>	<b>KIVONAT</b> .....	8
<b>3</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>4</b>	<b>AUSZUG</b> .....	12
<b>5</b>	<b>BEVEZETÉS</b> .....	14
<b>6</b>	<b>SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	15
6.1	Az alacsony hőmérsékleti stressz .....	15
6.2	A <i>CBF</i> gének általános jellemzése .....	16
6.3	A <i>CBF</i> gének kifejeződésének napi ritmusa.....	18
6.3.1	A cirkadián óra .....	19
6.4	A $Ca^{2+}$ jelátviteli útvonala és a foszfolipid jelátviteli útvonala .....	21
6.4.1	A foszfolipid jelátviteli útvonala vizsgálata a növényi stressztűrésben .....	22
6.5	A növényi fotoreceptorok .....	24
6.5.1	A fitokrómok jellemzése .....	24
6.5.2	A <i>PIF</i> gének jellemzése.....	24
<b>7</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	26
<b>8</b>	<b>ANYAGOK és MÓDSZEREK</b> .....	27
8.1	Cirkadián ritmus vizsgálata árpában.....	27
8.1.1	Felhasznált növényanyag és nevelésük körülményei .....	27
8.1.2	Távoli-vörös fénykezelés.....	28
8.1.3	Mintavétel periodicitás vizsgálathoz .....	28
8.1.4	Génexpressziós vizsgálat.....	29
8.2	<i>HvP1TP</i> és <i>HvPI4K</i> génfunkciós vizsgálatok .....	30
8.2.1	Transzformációs konstrukciók és transzgénikus növények előállítása .....	30
8.2.2	Transzgénikus növények molekuláris elemzése.....	31

8.2.3	Transzgenikus növények morfológiai jellemzése .....	32
8.2.4	Fotoszintetikus pigmentek meghatározása .....	33
8.2.5	Transzgenikus növények fagytűrésének tesztelése .....	33
8.2.6	Transzgenikus növények NaCl indukált sóstressz kezelése.....	35
8.2.7	Transzgenikus növények komplex stressztűrési vigor tesztje (CSVV).....	36
8.2.8	Statisztikai elemzések .....	36
8.3	PIF szekvenciák <i>in silico</i> azonosítása .....	37
8.3.1	bHLH domén szekvenciák szűrése az árpa proteomban .....	37
8.3.2	Szekvencia illesztések, filogenetikai elemzés és motívumkeresés .....	37
<b>9</b>	<b>EREDMÉNYEK</b> .....	<b>39</b>
9.1	Célgének cirkadián kifejeződésének vizsgálata .....	39
9.1.1	Óragének expressziós mintázatainak meghatározása.....	39
9.1.2	Foszfolipid jelátvitel géneinek expressziós vizsgálata.....	40
9.1.3	Ca <sup>2+</sup> jelátviteli útvonal géneinek expressziós vizsgálata .....	41
9.1.4	Az árpa <i>CBF</i> gén cirkadián ritmusának vizsgálata.....	43
9.2	<i>HvPITP</i> és <i>HvPI4K</i> túltermelő transzgenikus vonalak vizsgálata .....	46
9.2.1	A transzgenikus vonalak molekuláris elemzése.....	46
9.2.2	Fejlődési rendellenességek a túltermelő növényeknél .....	48
9.2.3	A <i>HvPITP</i> és <i>HvPI4K</i> vonalak fenotípusos jellemzése .....	50
9.2.4	Túltermelő vonalak fagytesztje .....	51
9.2.5	Transzgenikus vonalak sótesztje .....	54
9.2.6	Túltermelő növények CSVV tesztje .....	55
9.3	<i>HvPIF</i> szekvenciák <i>in silico</i> azonosítása.....	56
9.3.1	Az árpa bHLH fehérjecsald azonosítása.....	56
9.3.2	Az árpa bHLH fehérjék filogenetikai csoportosítása .....	57
9.3.3	<i>HvPIF</i> szekvenciák azonosítása, motívumkeresés .....	59
<b>10</b>	<b>AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</b> .....	<b>61</b>

10.1	Foszfolipid- és $Ca^{2+}$ jelátvitel, valamint <i>HvCBF</i> gének cirkadián ritmusa .....	61
10.2	<i>HvPITP</i> és <i>HvPI4K</i> túltermelő transzformáns növények .....	67
10.3	A <i>HvPIF</i> fehérjéket kódoló szekvenciák .....	75
<b>11</b>	<b>TÉZISEK</b> .....	<b>78</b>
<b>12</b>	<b>THESES</b> .....	<b>79</b>
<b>13</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>80</b>
<b>14</b>	<b>MELLÉKLETEK</b> .....	<b>83</b>
14.1	Irodalomjegyzék .....	83
14.2	Kiegészítő ábrák, táblázatok.....	94
<b>15</b>	<b>JELLEN DOKTORI DISSZERTÁCIÓHOZ KÖTHETŐ PUBLIKÁCIÓK</b> .....	<b>108</b>
<b>16</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>110</b>

# 1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5A <sup>m</sup> L	<i>Triticum monococcum</i> L. 5A kromoszómájának hosszú karja
5H	árpa ötös kromoszómája
AP2/ERFs	„APETALA2”/„Ethylene-responsive factors”
APA	active phytochrome A-binding motif (fitokróm A-kötő motívum)
APB	active phytochrome B-binding motif (fitokróm B-kötő motívum)
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> L. (lúdfű)
bHLH	basic helix-loop-helix (bázikus hélix-hurok-hélix)
BLAST	basic local alignment search tool
bp	bázispár
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cit.</sub>	citoplazmában lévő kalciumion koncentrációja
CAB	chlorophyll <i>a/b</i> -binding protein (klorofill <i>a/b</i> -kötő fehérje)
CaM	calmodulin (kalmodulin fehérjék)
CAMTA3	calmodulin-binding transcription activator 3 (kalmodulin-kötő transzkripciós aktivátor 3)
Cas9	CRISPR-associated 9 (CRISPR-t befolyásoló 9)
CBF	C-repeat binding factor (C-ismétlődés kötő faktor)
CBL	calcineurin B-like protein (calcineurin B-szerű fehérje)
CCA1	circadian clock-associated 1 (a cirkadián órát befolyásoló gén)
CCaMK	calcium/calmodulin-dependent kinase (kalcium/kalmodulin-függő kináz)
cDNS	komplementer (kiegészítő) DNS szekvencia
CDPK	calcium-dependent protein kinase (kalcium-függő fehérje kináz)
Cent	centroméra
CHE	„CCA1 hiking expedition” (a <i>CCA1</i> gén működését gátló transzkripciós faktor)
cM	centimorgan
CML	calmodulin-like protein (kalmodulin-szerű fehérje)
COPI	„constitutive photomorphogenic 1”
COR	cold-regulated (hideg által szabályozott)
C <sub>q</sub>	quantification cycle (kvantifikációs ciklus)
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats (halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések)

CRT/DRE	C-repeat/dehydration-responsive element (C-ismétlődés/dehidratációra érzékeny elem)
CSVT	complex stressing vigour test (komplex stressztűrési vigor teszt)
DAG	diacylglycerol (diacilglicerol)
DGK	diacylglycerol kinase (diacilglicerol-kináz)
DHN	dehydrin
DREB	dehydration-responsive element binding factor (dehidratációra érzékeny elem-kötő faktor)
E	expect (a véletlenszerű szekvencia-azonosságok mérőszáma)
EC	evening complex (éjszakai komplex)
ELF	early flowering (korai virágzás)
<i>Fr-2</i>	<i>frost resistance-2</i> (fagyállósági lókuszt)
<i>Fr-H2</i>	az árpa <i>Fr-2</i> lókusza
Fw	forward primer (5' – 3' orientációjú oligonukleotid)
GI	„gigantea”
<i>Gm</i>	<i>Glycine max</i> L. (szója)
GP	Golden Promise (árpa genotípus)
HLH	helix-loop-helix (hélix-hurok-hélix /fehérjecsald/)
HMM	hidden Markov-model (rejtett Markov-modell)
hpt	hygromycin phosphotransferase (higromicin foszfofotranszferáz)
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. (árpa)
IF	Impakt faktor
IP <sub>3</sub>	inositol 1, 4, 5-triphosphate (inozitol 1, 4, 5-trifoszfát)
KIN	cold-induced (hideg-indukált)
L	transgenic line (transzgénikus vonal)
LED	light emitting diode (fénykibocsátó dióda)
LHY	„late elongated hypocotyl”
LR	klónozási technika, mely során rekombináció jön létre az <i>attL</i> („attachment Left”) és <i>attR</i> („attachment Right”) szekvenciák között
LUX	„lux arrhythmo”
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
ND	nem detektálható
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> L. (ázsiai rizs)
PA	phosphatidic acid (foszfatidsav)

PATL1	„PATELLIN1”
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
P <sub>fr</sub>	far-red absorbing phytochrome (távoli-vörös fényt elnyelő fitokróm)
PI	phosphatidylinositol (foszfatidilinozitol)
PI4K	phosphatidylinositol 4-kinase (foszfatidilinozitol 4-kináz)
PI4P	phosphatidylinositol 4-phosphate (foszfatidilinozitol 4-foszfát)
PI5K	phosphatidylinositol 5-kinase (foszfatidilinozitol 5-kináz)
PIF	phytochrome interacting factor (fitokrómmal kölcsönhatásba lépő faktor)
PIL	PIF-like (PIF-hez hasonló)
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (foszfatidilinozitol 4, 5-biszfoszfát)
PITP	phosphatidylinositol transfer protein (foszfatidilinozitol transzfer fehérje)
PLC	phospholipase C (foszfolipáz C)
PLD	phospholipase D (foszfolipáz D)
P <sub>r</sub>	red absorbing phytochrome (vörös fényt elnyelő fitokróm)
PRR	„pseudo-responsive regulator”
qPCR	quantitative PCR (kvantitatív PCR)
QTL	quantitative trait locus (mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókuszt)
RD	responsive to desiccation (dehidratációra érzékeny)
Rev	reverse primer (3' – 5' orientációjú oligonukleotid)
SEC14-like	SEC14-like protein (SEC14-szerű fehérje)
SEC14p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> organizmusból izolált PITP-vel homológ fehérje
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i> L. (közönséges búza)
<i>Tm</i>	<i>Triticum monococcum</i> L. (alakor)
TOC1	„timing of CAB expression 1”
T <sub>x</sub>	X-edik transzgénikus nemzedék
UV	ultraviolet (ultraibolya)
UVR8	UV resistance 8 (UV rezisztens 8)
WCS	wheat cold-specific (búza hideg-specifikus)
X/Y°C	nappali/éjszakai hőmérséklet [°C]
<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i> L. (kukorica)



## 2 KIVONAT

### A FAGYTŰRÉST BEFOLYÁSOLÓ GÉNEK SZABÁLYOZÁSA

A növényi abiotikus stressztolerancia kialakításáért felelős transzkripciós faktorok közül az egyik leginkább tanulmányozott a CBF-eket kódoló géncsalád. Kulcsfontosságú szerepüket dehidratációval járó stresszek (elsősorban hidegstressz) elleni védelem kialakításában már számos növényfaj esetében bizonyították. A *CBF* gének átíródásának mértékét az alacsony hőmérséklet mellett a megvilágítás hossza, intenzitása, valamint a fény spektrális összetétele is befolyásolja. A géncsalád egyes tagjai hidegindukció nélkül is kifejeződnek, ráadásul némelyik expressziója a nap folyamán szabályszerűen változik, azaz cirkadián ritmust mutat, követve ezzel a környezeti körülmények napszakos ismétlődéseit.

Mivel az alacsony hőmérséklet befolyásolja magának a cirkadián órának is a működését, kutatásainkat az alacsony hőmérséklet induktív hatásának kizárásával végeztük. Megállapítottuk, hogy az árpa *CBF* gének három filogenetikai alcsoportja közül csak a *HvCBF4*-alcsoport tagjai mutatnak cirkadián ritmust, expressziójuk a késő délutáni, kora esti órákban éri el a maximumát. A fény spektrális összetételének módosításával, az alkonyati fényre jellemző alacsony vörös/távoli-vörös arányú megvilágítás esetén a *HvCBF4*-alcsoport tagjai számos esetben órákkal korábban, valamint magasabb expressziós maximummal reagáltak. A *CBF* gének kifejeződésére ható jelátviteli útvonalak közül a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek, a *PITP* és *PI4K* géneknek a vizsgálatával megállapítottuk, hogy génkifejeződésük cirkadián ritmust mutat, valamint, hogy az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény befolyásolja az expressziójukat.

A *PITP* és *PI4K* gének esetleges abiotikus stressztoleranciában betöltött szerepét transzgenikus növények létrehozásával vizsgáltuk meg. A túltermelő vonalak segítségével kimutattuk, hogy a *PITP* és *PI4K* gének kismértékben hozzájárulnak az árpa hideg-, valamint a hideggel kombinált oxigénhiányos stressz elleni védekezéséhez. Megállapítottuk azt is, hogy a jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek túltermeltetése számos tulajdonságot negatívan befolyásol, mivel – feltételezésünk szerint – e szignál molekulák más jelátviteli útvonalakra is (zavart okozó) hatással vannak.

A különböző hullámhosszúságú fény elnyelése fotoreceptorok segítségével történik. A kísérleteinkben alkalmazott távoli-vörös fénykiegészítést a fitokrómok érzékelik. E fotoreceptorokkal a PIF transzkripciós faktorok képesek kapcsolatot kialakítani, melyek így játszanak fontos szerepet a különböző jelátviteli útvonalak szabályozásában. Mindeztidáig kevés növényfaj esetében írtak le *PIF* géneket, ráadásul részletesebb funkcióvizsgálatok csupán az *Arabidopsis thaliana* modellnövényben történtek. Munkánk során *in silico* módszerekkel azonosítottuk a PIF-eket magába foglaló árpa bHLH fehérjecsaládot, majd filogenetikai elemzéssel huszonhat alcsoportba soroltuk őket. Megállapítottuk, hogy a már ismert *PIF* génekhez leginkább hasonlító, ráadásul egy filogenetikai alcsoportba sorolt kilenc szekvencia közül hat kódol olyan gént, amelyben ismert fitokróm-specifikus kötőhely(ek) helyezkednek el. Ennek alapján feltételezzük, hogy ezek a szekvenciák kódolják az árpa *PIF* géneket.

### 3 ABSTRACT

#### REGULATION OF FROST TOLERANCE RELATED GENES

One of the most studied transcription factors responsible for plant abiotic stress tolerance is the members of the *CBF* gene family. Their protective role against dehydration stresses (especially cold stress) has already been proven in many plant species. Apart from the main signal, i.e. the low temperature, the transcription level of the *CBF* genes is influenced by the length of illumination, the intensity, and the spectral composition of light as well. However, some members of the gene family are expressed without any cold induction. In addition, some of them are expressed regularly during the day, showing circadian rhythm according to the day-to-day repetitions in the environmental conditions.

Since the low temperature affects the regulation of the circadian clock itself, our research was done by excluding its inductive effect. We found that out of the three phylogenetic subgroups of *CBFs*, only the *HvCBF4*-subgroup genes showed circadian rhythm, being expressed in the late afternoon and early in the night. By modifying the spectral composition of the illuminating light to a low red/far-red ratio, which is typical for dusk, the members of the *HvCBF4*-subgroup were induced several hours earlier and with a higher expression level. The *PITP* and *PI4K* genes, the initial elements of the phospholipid signaling pathway affecting the expression of *CBF* genes were also examined and it was found that their gene expression shows circadian rhythm, and also that the low red/far-red light ratio affects their expression level too.

The role of *PITP* and *PI4K* genes in abiotic stress tolerance response was investigated by establishing transgenic plants. The transgenic overexpression lines showed that the *PITP* and *PI4K* genes contribute slightly to the protection of barley plants against cold stress or cold temperature combined with oxygen deficiency. It has also been found that the effect of overexpression of these early signaling elements negatively influences many phenotypic characteristics, therefore we assume that overexpression of these signal molecules also cause other (disruptive) effects through other signaling pathways.

Different wavelengths of the illuminating light are absorbed by different photoreceptors in plants. The supplemental far-red light, used in our experiments, is sensed by the phytochromes. The PIF transcription factors are capable of interaction with these

photoreceptors, thus playing an important role in the regulation of different signaling pathways. Until now, the *PIF* genes have been described for a few plant species only, and detailed functional assays have been performed only in the model plant species, *Arabidopsis thaliana*. In our *in silico* work we identified the barley bHLH protein family, containing the putative *PIF* sequences, then classified them into 26 subgroups with phylogenetic analysis. We found that out of the 9 sequences, which proved to be the most similar to the already annotated *PIF* gene sequences and were classified into one phylogenetic subgroup, 6 sequences encode the known phytochrome specific binding site(s). Based on these results, we assume that these 6 sequences encode the barley *PIF* genes.

## 4 AUSZUG

### REGULATION VON GENEN VERBUNDEB MIT FROSTTOLERANZ

Einer der am häufigsten untersuchten Transkriptionsfaktoren, der für die Toleranz gegenüber pflanzlichem abiotischem Stress verantwortlich ist, ist die *CBF*-Genfamilie. Ihre Schutzfunktion gegen Dehydratisierungsstress (insbesondere Kältestress) wurde bereits bei vielen Pflanzenarten nachgewiesen. Neben der niedrigen Temperatur wird der Transkriptionsgrad von *CBF*-Genen auch von der Beleuchtungsdauer, der Lichtintensität und der spektralen Zusammensetzung des Lichtes beeinflusst. Einige Mitglieder der Genfamilie exprimieren auch ohne Kälteinduktion, einige von ihnen exprimieren routinemäßig während des Tages, so Sie zeigen einen circadianen Rhythmus, der die tägliche Wiederholungen der Umgebungsbedingungen folgt.

Da die niedrige Temperatur die Regulierung der circadianen Uhr selbst beeinflusst, haben wir die induktive Wirkung der niedrigen Temperatur ausgeschlossen. Wir fanden heraus, dass von den drei phylogenetischen Untergruppen der *CBFs* nur die Gene der *HvCBF4*-Untergruppe einen circadianen Rhythmus zeigten und am späten Nachmittag und in der frühen Nacht exprimierten. Durch die Veränderung der spektralen Zusammensetzung des Lichtes für eines niedrige Rot/Fernrot Verhältnis, das für die Dämmerung typischen ist, reagierten die Mitglieder der *HvCBF4*-Untergruppe mit einem höheren Expressionsniveau einige Stunden früher. Aus den Signalwegen, die die Expression von *CBF*-Genen beeinflussen, untersuchten wir die Anfangselemente des Phospholipid-Signalweges, d.h. die *PITP*- und *PI4K*-Gene, und stellten wir fest, dass ihre Genexpression einen circadianen Rhythmus aufweist und das bei niedrigem Rot/Fernrot Lichtverhältnis beeinflusst ist.

Die Rolle von *PITP* und *PI4K* Genen in der abiotischen Stresstoleranz wurde durch Erzeugung transgener Pflanzen untersucht. Mit transgenen Überexpressionslinien haben wir gezeigt, dass *PITP* und *PI4K* Gene einen geringen Beitrag zum Schutz von Gerste gegen Kältestress und niedrige Temperatur in Kombination mit Sauerstoffmangel leisten. Es wurde auch festgestellt, dass der Effekt der Überexpression der Anfangselemente des Signalwegs viele phänotypische Merkmale negativ beeinflusst. So nehmen wir an, dass diese Signalmoleküle auch sonstige (störende) Effekte auf andere Signalwege haben.

Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen wird bei verschiedenen Photorezeptoren in Pflanzen absorbiert. Das Fernrote Licht, welches in diesen Experimenten zusätzlich verwendet wurde wird von den Phytochromen wahrgenommen. Mit diesen Photorezeptoren können die PIF Transkriptionsfaktoren wechselwirken, deshalb spielen sie eine wichtige Rolle in der Regulierung verschiedener Signalwege. Bislang wurden *PIF* Gene in wenigen Pflanzenarten beschrieben, und ein detaillierter Funktionstest wurde nur in der Modellpflanzenart *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. In dieser Arbeit identifizierten wir die Gerste-bHLH-Proteinfamilie, die mutmaßliche PIF Sequenzen enthielt, mit *in silico* Methoden und wir klassifizierten sie dann mit phylogenetischer Analyse in 26 Untergruppen. Wir fanden heraus, dass 6 der 9 Sequenzen, die zu den bereits beschriebenen *PIF* Gensequenzen am meisten gleichen und darüber hinaus in eine phylogenetische Untergruppe eingeteilt sind, bekannte Phytochrom-spezifische Bindungsstellen codieren. Anhand von diesen Ergebnissen nehmen wir an, dass diese 6 Sequenzen die *PIF* Gene der Gerste codieren.

## 5 BEVEZETÉS

A termesztett haszonnövények felhasználási területe széleskörű: élelmiszerként történő felhasználásuk mellett elengedhetetlenek a haszonállatok takarmányozásánál, de ipari és gyógyászati alapanyagként, sőt, élvezeti cikként való hasznosításuk is jelentős. A nemesített növényfajták stressztűrő képessége sok esetben elmarad a vadon élő rokon fajokétól, mivel évezredekken át a kultúrába vonás egyik fontos eleme az volt, hogy a növény igényeit minél jobban kielégítsük, így a stressztényezők kiküszöbölése mellett az ellenálló képesség megőrzésére, fokozására nem irányult kellő szelekciós nyomás. Kultúrnövényeink alacsonyabb stressztolerancia szintje mellett további problémát jelent, hogy a globális éghajlatváltozás következtében egyre gyakoribbá válnak a szélsőséges időjárási jelenségek, jelentősen csökkentve a mezőgazdaság éves termelését. Előrejelzések alapján 2050-re a Föld lakossága a jelenlegi 7,7 milliárdról körülbelül 9 milliárdra növekszik, míg élelmiszerszükséglete 85%-kal lesz több (Raza et al., 2019). Elkerülhetetlen lesz tehát a kultúrnövények éves termésmennyiségének folyamatos növelése. A gabonafélék a Föld legelterjedtebb és legrégebben termesztett növényfajai közé tartoznak, élelmiszer alapanyagként betöltött szerepük kiemelkedik a többi haszonnövény közül. A gabonaszemek sokoldalú emberi és állati fogyasztásán és felhasználásán túl a szalma takarmányként és ipari alapanyagként is felhasználható. Néhány fejlődő országban szinte csak a búza, a kukorica vagy a rizs teszi ki az ott élő emberek teljes étrendjét – termesztésük tehát nélkülözhetetlen, és a termésbiztonság növelése jelentős gazdasági megtakarítást eredményezhet.

A növények abiotikus stressztűrő képessége komplex folyamatok eredménye, melyek részletes ismerete kulcsfontosságú a magasabb termésbiztonság elérése érdekében. Az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében működő Növényi Molekuláris Biológia Osztály dolgozói évtizedek óta vizsgálják a gabonafélék környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodását és annak molekuláris hátterét, melynek során kiemelten foglalkoznak az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia kialakításáért felelős jelátviteli folyamatokkal.

Kutatásaink során a fagytűrés kialakításáért felelős jelátviteli folyamatok közül a „foszfolipid jelátvitel →  $Ca^{2+}$  jelátvitel → CBF transzkripciós faktorok” útvonalat, valamint rájuk ható molekuláris szabályozó mechanizmusokat tanulmányoztuk.

## 6 SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

### 6.1 Az alacsony hőmérsékleti stressz

A magasabb rendű növények helyhez kötött életmódjuk miatt folyamatos környezeti hatásoknak, gyakran stresszhatásoknak vannak kitéve, melyek jelentősen befolyásolják anyagcseréjüket, növekedésüket, reprodukciójukat és életképességüket is. Poikiloterm, vagyis változó (azaz a külső hőmérséklethez igazodó) testhőmérsékletű élőlények lévén, hőmérsékletük hasonló a környezetükéhez. A túlzottan alacsony, illetve a túlzottan magas hőmérséklet meghaladhatja alkalmazkodási képességüket, mely akár letalitást is okozhat. Nem meglepő tehát, hogy a környezeti tényezők közül a hőmérséklet jelentős mértékben meghatározza a természetes növénytársulások előfordulását, valamint a mezőgazdasági növények termesztetőségét, produktivitását (Luo, 2011). A hőmérsékleti stresszfaktorok közül – a jelen disszertáció témája miatt – a továbbiakban csak az alacsony hőmérsékleti stressz hatásáról nyújtok áttekintést.

A hagyományos növénynemesítési módszereknek hála, termesztett növényeink már jobb alacsony hőmérsékleti stressztoleranciával rendelkeznek, mint elődeik, azonban legtöbbjük továbbra is rendkívül érzékeny a fagy okozta sérülésekkel szemben (Pareek et al., 2017). Ha a hőmérséklet fokozatosan csökken, majd fagypont alá esik, elsőként az extracelluláris térben indul meg a jégkristályosodás, mivel az intracelluláris folyadék fagyáspontja általában alacsonyabb, mint a sejten kívüli térben lévő folyadéké. A sejtek közötti folyadék fagyása vízpotenciál különbség kialakulásával jár együtt, ami a sejten belüli víz részleges kiáramlását okozza, így a sejten belül dehidratációs stressz alakul ki. Ezzel szemben, a hirtelen bekövetkezett fagyás következménye az intracelluláris jégkristályosodás is lehet. Ez a plazmamembrán irreverzibilis sérülését okozhatja, ami legtöbbször letális a sejt számára (Levitt, 1980; Steponkus, 1984). A fagystressz kivédéséhez a mérsékelt égövi növényeknek szükségük van egy több héten át tartó hidegedződési időszakra, mialatt a sejten és a sejtközötti térben krioprotektív molekulák, különböző fehérjék, cukrok, egyszerűbb szerves vegyületek halmozódnak fel, melyek védelmet nyújtanak a membránsérülések, illetve a dehidratációs stressz okozta károsodások ellen (Thomashow, 1999; Raju et al., 2018).



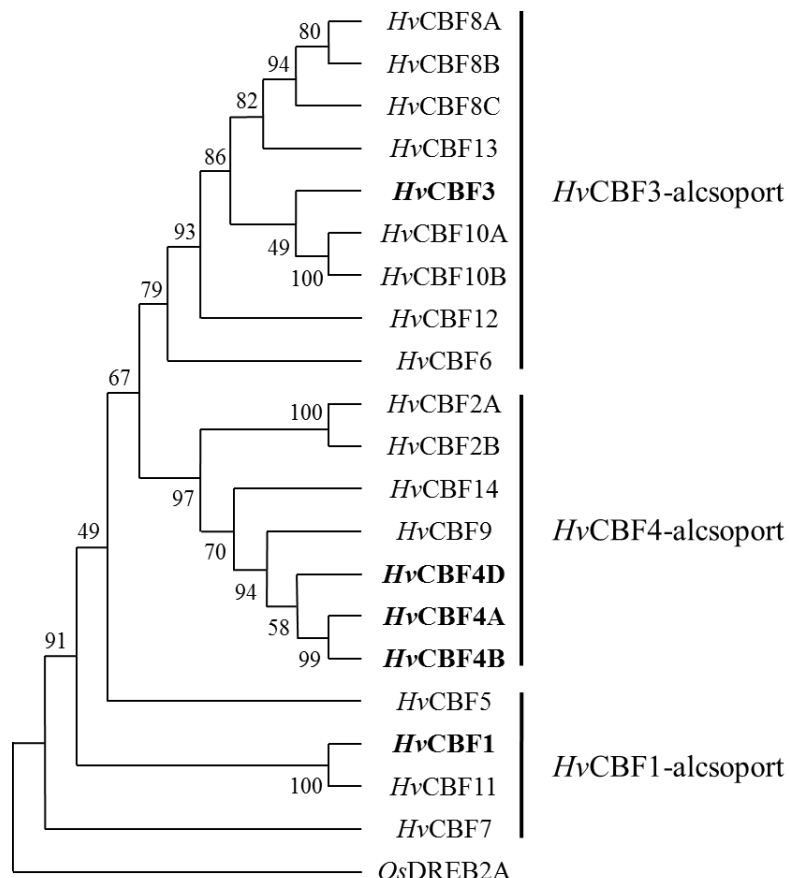
## 6.2 A CBF gének általános jellemzése

A dehidratációval járó stresszek elleni védelem (hideg- és szárazságstressz) kialakításáért felelős gének közül az egyik leginkább kutatott géncsalád a transzkripciós faktorokat kódoló *CBF* (C-repeat binding factor), vagy más néven *DREB* gének (Dehydration-responsive element binding factor) csoportja. Mivel két kutatócsoport szinte egyszerre írta le őket (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998), ezért ezek a gének kettős elnevezéssel rendelkeznek. Mivel a szakirodalomban a *CBF* elnevezés az elterjedtebb, ezért a továbbiakban ezt használom. A CBF fehérjék az AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) fehérjecsaládba tartoznak. Jellemző rájuk, hogy a hatvan aminosavból álló AP2 domént N-terminális irányban a PKK/RPAGR<sub>x</sub>KFxETRHP, illetve C-terminális irányban a DSAWR konzervált motívumok fogják közre; a család többi tagjától való megkülönböztetésük ezen a jellegzetességükön alapul (Jaglo et al., 2001). A CBF-ek az általuk szabályozott gének promóterében található CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) motívumhoz (RCCGAC) kötődnek (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994). Ez a szekvencia számos hideg- és szárazságstresszre indukálódó génben megtalálható, köztük az *AtRD29A* (*responsive to desiccation*), a *HvDHN1-HvDHN11* (*dehydrin*), az *AtKIN1* (*cold-induced*), a *TaWCS120* (*wheat cold-specific*), az *AtCOR15a* (*cold-regulated*) vagy az *AtCOR6.6* (Vazquez-Tello et al., 1998; Choi et al., 1999; Thomashow, 1999) génekben is.

Az *Arabidopsis thaliana* L. (*At*) kétszikű modellnövény genomja négy *CBF* gént kódol, melyek közül három, az *AtCBF1*, *AtCBF2* és az *AtCBF3*, tandem ismétlődésben a négyes kromoszómán lokalizált. E gének alacsony hőmérséklet hatására fejeződnek ki jelentős mértékben; célgénjeik működését szabályozva alakítják ki az alacsony hőmérsékleti stresszel szembeni fokozott toleranciát (Gilmour et al., 1998, 2004). Ezzel szemben az *AtCBF4* gén nem indukálódik hideg hatására, viszont jelentős mértékben fejeződik ki szárazság-, vagy sóstressz következtében (Haake et al., 2002; Sakuma et al., 2002). A gazdasági jelentőséggel bíró növényeink közül a hexaploid kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) genomja legalább 37 (Badawi et al., 2007), az alakor (*Triticum monococcum* L.) 13 (Miller et al., 2006), míg az árpa (*Hordeum vulgare* L.) legalább 20 (Skinner et al., 2005) *CBF* gént kódol.

Skinner et al. (2005, 2006) az árpa genomjában kódolt *CBF* gének vizsgálatok kimutatták, hogy azok három filogenetikai alcsoportba sorolhatók. A csoportok a nevüket

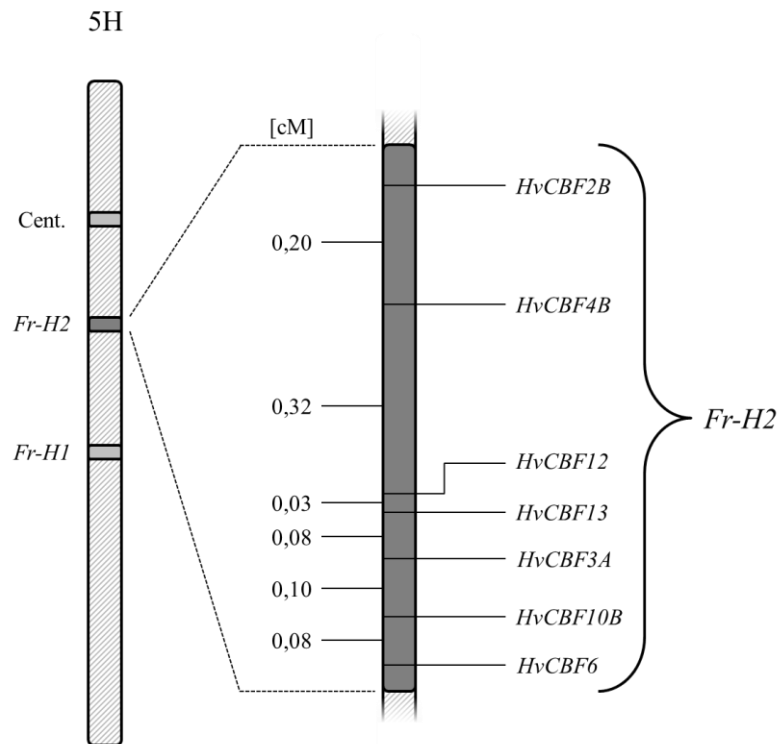
azok egy-egy jelentősebb tagjáról kapták, így *HvCBF1*-, *HvCBF3*-, valamint *HvCBF4*-alcsoporthoz különböztetünk meg (1. ábra). A *HvCBF3*-, valamint a *HvCBF4*-alcsoporthoz legtöbb tagja az árpa ötös kromoszómájának hosszú karján helyezkedik el, míg a *HvCBF1*-alcsoporthoz génjei más kromoszómán lokalizálódnak.



1. ábra: Az árpa CBF-ek filogenetikai csoportosítása Skinner et al. (2006) alapján. A függőleges sávok az azonos alcsoporthoz tartozó tagokat jelölik. Az alcsoporthoz elnevezése a félkövérrel jelölt tagoktól származik.

Árpa, alakor, valamint kenyérbúza térképezési populációin végzett kutatások kimutatták, hogy a gabonafélék hidegtűrésének kialakításáért leginkább az *Fr-2* (*Frost resistance*) QTL (quantitative trait locus) a felelős (Vágújfalvi et al., 2003, 2005; Miller et al., 2006; Francia et al., 2007; Knox et al., 2008). Megállapították, hogy az árpa ötös kromoszómájának hosszú karján legalább tizenegy *HvCBF* gén helyezkedik el (Skinner et al., 2006), ráadásul legalább hét *HvCBF* gén mindössze 0,8 cM távolságon belül (2. ábra) kódolt (Francia et al., 2007), míg alakor esetében legalább tizenegy *TmCBF* gén helyezkedik el az 5A<sup>m</sup>L kromoszómakar *Fr-2* lókuszon (Miller et al., 2006). A

valószínűleg génduplikációkkal kialakult *CBF* „sziget” szoros kapcsoltsága megmaradt az evolúció során, ezért kiemelkedő szerepű e régió a gabonafélék fagyűrésében. A génduplikációk azonban funkcionális polimorfizmus kialakulását tették lehetővé, amely a szabályozás finomhangolását eredményezte.



2. ábra: Az árpa ötös kromoszómáján (5H) lokalizált fagyállósági QTL-ek sematikus ábrázolása, valamint az *Fr-H2* lokusz genetikai térképe Francia et al. (2007) cikke alapján. Az *Fr-H2* hidegtűrésben betöltött fontos szerepét bizonyítja a 0,8 cM távolságon belül elhelyezkedő legalább hét *HvCBF* gén.

### 6.3 A *CBF* gének kifejeződésének napi ritmusa

Mesterséges körülmények között nevelt *Arabidopsis* növényeknél megfigyelték, hogy szobahőmérsékleten (tehát a hidegindukció kizárása mellett) egyes *CBF* gének a mesterséges fény bekapcsolását követően nagyjából 8 órával is kifejeződnek. Ez a fajta génműködésük hosszúnappalos (16 óra megvilágítás) és rövidnappalos (8 óra megvilágítás) körülmények között is állandónak bizonyul, viszont 8 órás megvilágítás esetén az expressziós szintek magasabbak (Franklin és Whitelam, 2007; Lee és Thomashow, 2012). Az ilyen, a nappalok és éjszakák ciklikus változásait követő génkifejeződést, mely megközelítőleg egy 24 órás ciklust eredményez, cirkadián, vagy napi ritmusnak nevezzük. A növény napszakokhoz való alkalmazkodása evolúciós

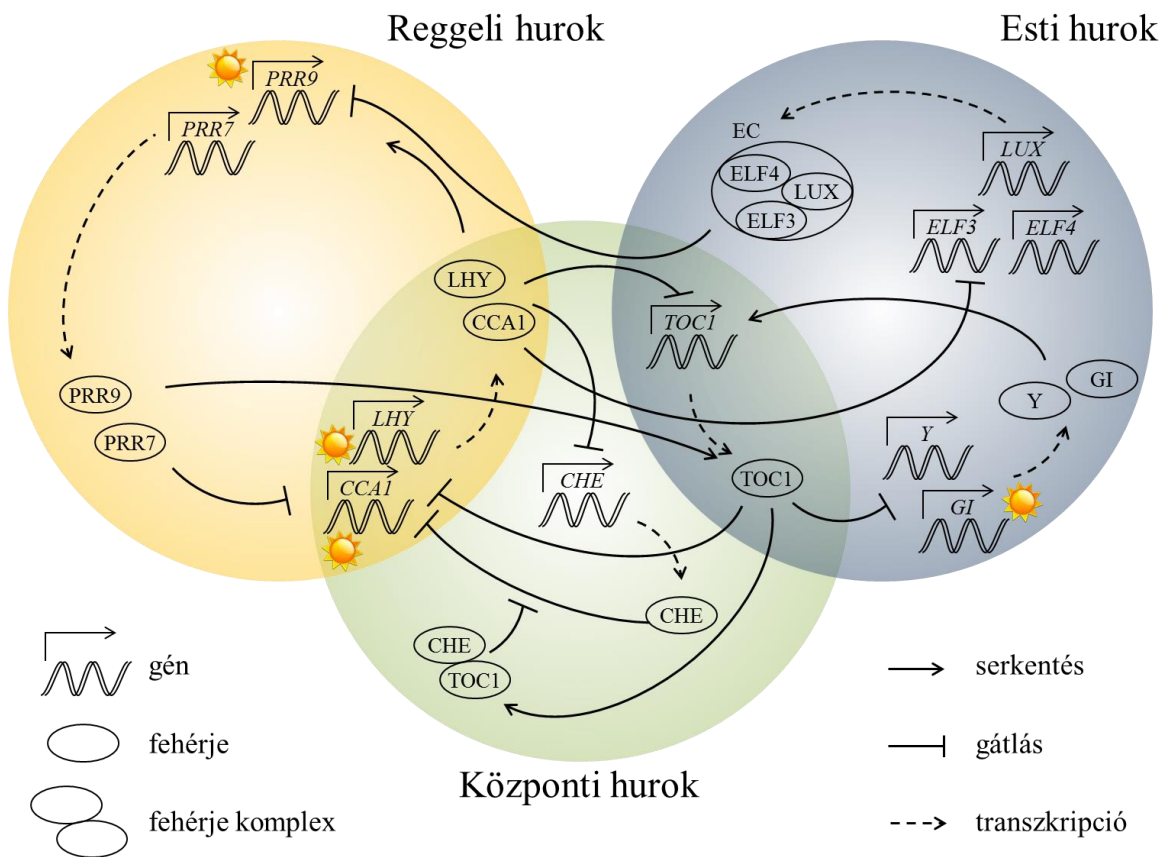
előnyvel jár, mivel így lehetősége nyílik arra, hogy előre jelezze a ciklikusan bekövetkező környezeti változásokat, és felkészüljön rájuk. Számos gén napi ritmusú kifejeződéséhez még arra sincs szükség, hogy a nappalok és az éjszakák váltsák egymást, mert a növény a saját biológiai ritmusát biztosító mechanizmusa, az úgynevezett cirkadián óra szabályozó funkciója végzi ezt a génszabályozást.

### 6.3.1 A cirkadián óra

A növények belső ritmusát adó cirkadián órát leginkább az *Arabidopsis* modellnövényben tanulmányozták. A jelenleg elfogadott modell szerint a cirkadián óra működésének az alapja egy önfenntartó, három negatív visszacsatoláson alapuló hurokból épül fel, melyet különböző fehérjék kölcsönös szabályozása működtet, külső környezeti hatások (fény, hőmérséklet) szinkronizálásával. A cirkadián ritmust biztosító központi oszcillátor bemutatása (3. ábra), valamint működésének leírása Haydon et al. (2011), Anwer és Davis (2013), Franklin et al. (2014), Grundy et al. (2015), valamint Nohales és Kay (2016) összefoglaló tanulmányai alapján készültek.

A cirkadián ritmust a „központi oszcillátor” eredményezi, ennek elemei az úgynevezett óragének. Ezek közül a *CCA1* (*Circadian clock-associated 1*) és az *LHY* (*Late elongated hypocotyl*) gének expressziója a reggeli órákban a legerősebb. A *CCA1* és *LHY* proteinek serkentik a *PRR9* (Pseudo-Responsive Regulator 9) és *PRR7* fehérjék bioszintézisét. A *CCA1* és az *LHY* gének működését a délutáni/esti órákban a *PRR9*, *PRR7* és *PRR1* (más néven *TOC1*, Timing of CAB Expression 1) fehérjék represszálják, ezek pár órással eltéréssel cirkadián ritmus szerint fejeződnek ki a nap folyamán. A központi hurokban a *CCA1* és *LHY* fehérjék közvetlenül a *TOC1* gén promóteréhez kapcsolódva gátolják annak átírását. A *CHE* (*CCA1* hiking expedition) fehérje közvetlenül köt a *CCA1* gén promóteréhez, gátolva ezzel annak kifejeződését. A *CHE* gén expresszióját a *CCA1* fehérje képes csökkenteni, meggátolva ezzel a fehérje képződését. A *TOC1* komplexet is képezhet a *CHE* fehérjével, megakadályozva ezzel a *CHE* fehérje kötését a *CCA1* gén promóteréhez. Az esti szabályozó hurok tagja – a *TOC1* mellett – egy eddig ismeretlen gén/fehérje (a szakirodalomban legtöbbször „Y elem”-ként szerepel), mely eddig ismeretlen módon serkenti a *TOC1* átírását; míg a *TOC1* – szintén eddig ismeretlen módon – gátolja ennek a génnek a kifejeződését. Annyi biztos, hogy e gátlásban a *GI* (*Gigantea*) fehérje is szerepet játszik, valószínűleg további, eddig ismeretlen faktorokkal együtt. Az esti hurok másik fontos lépése a *CCA1* és *LHY* gátlásának a részleges feloldása. Az *ELF3* (Early

Flowering 3), ELF4, valamint a LUX (Lux Arrhythmo) fehérjékből kialakuló, úgynevezett EC (Evening Complex) fehérje komplex represszálja a *PRR* gének működését – ezzel újra lehetővé válik az *LHY* és a *CCA1* átírása a reggeli órákban.



3. ábra: A cirkadián ritmust biztosító központi oszcillátor felépítése Haydon et al. (2011), Anwer és Davis (2013), Franklin et al. (2014), Grundy et al. (2015), valamint Nohales és Kay (2016) alapján. A jelenleg elfogadott modell szerint a cirkadián óra három, egymással kapcsolt szabályozó hurokból (reggeli, központi és esti) épül fel. Mivel a *CCA1* és *LHY*, *PRR9*, valamint a *GI* gének transzkripcióját a fény is szabályozza (az ábrán ☀ szimbólum), ezért mind a három szabályozó kör működésére hatással lehetnek különböző fotoreceptorok.

A cirkadián óra szinte az összes molekuláris mechanizmusra hat, a növényi gének működésének széles skáláját időzíti. A központi oszcillátor hatása számos folyamatot (jelátviteli útvonalak, metabolikus folyamatok) érint, így alapvető fiziológiai funkciókat is befolyásol. Ilyen például a magok csírázása, a fotoszintetikus aktivitás változása, a virágzás szabályozása vagy a gázcserenyílások működése (Webb, 2003; Seo és Mas, 2015).

#### 6.4 A $\text{Ca}^{2+}$ jelátviteli útvonal és a foszfolipid jelátviteli útvonal

A növényi sejt citoplazmájában lévő kalciumion koncentrációja ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$ ) is cirkadián ritmus szerint változik a nap folyamán, így az hatással van a kalcium-függő jelátviteli útvonalak szabályozására (Johnson et al., 1995; Martí Ruiz et al., 2018), valamint szerepet játszik különböző biotikus (Aldon et al., 2018) és abiotikus stresszek (só, alacsony hőmérséklet, ozmotikus, hipoxia) elleni védelemben is (Lindberg et al., 2012; Ranty et al., 2016; Yuan et al., 2018). A külső környezeti hatásokra változik a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$  (ezért fontos másodlagos hírvivő molekula), melyet az úgynevezett kalcium-kötő fehérjék érzékelnek (Yáñez et al., 2012). Ezek a fehérjék három csoportba sorolhatóak (Ranty et al., 2016): (1) calcineurin B-szerű fehérjék (CBLs, calcineurin B-like proteins), (2) kalmodulinok (CaMs, calmodulins) és kalmodulin-szerű fehérjék (CMLs, calmodulin-like proteins), valamint (3) kalcium-függő fehérje kinázok (CDPKs, calcium-dependent protein kinases) és kalcium/kalmodulin-függő kinázok (CCaMKs, calcium/calmodulin-dependent kinases).

Az *Arabidopsis* részletesebb vizsgálata során Day et al. (2002) megállapították, hogy annak genomja legalább kétszázötven kalcium-kötő fehérjét kódol. E nagy repertoár biztosítja a sejtek számára a különböző ingerekre adott megfelelő, finomhangolt választ. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ionok kötését követően konformáció változás megy végbe a kalcium-kötő fehérjék térszerkezetében. A kialakult új konformáció teszi lehetővé a különböző fehérjékkel való összekapcsolódást, vagy éppen transzkripciós faktorok szabályozását (Ikura et al., 2002; DeFalco et al., 2010; Galon et al., 2010). A kalcium jelátviteli útvonal és a CBF transzkripciós faktorok közötti kapcsolatot *Arabidopsis* modellnövényben bizonyították először. Ennek során kimutatták, hogy a CAMTA3 (CaM-binding transcription activator 3) képes szabályozni az *AtCBF2* gén működését (Doherty et al., 2009); így bizonyították a CaM-ok hidegtűrésben betöltött szabályozó szerepét.

A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$ -t befolyásoló jelátviteli útvonalak egyike a foszfolipid jelátviteli útvonal, amelynek jellemzése növényi rendszerekben még nem tekinthető kellően részletesnek. Annyi viszont ismert, hogy számos másodlagos hírvivő molekula felszabadítása mellett ioncsatornák szabályozásában is részt vesz (Xue et al., 2009), szerepet játszva ezzel abiotikus stresszek elleni védelemben (Xue et al., 2007). A foszfolipid jelátviteli útvonal első eleme a foszfatidilinozitol (PI), mely foszfolipidet a

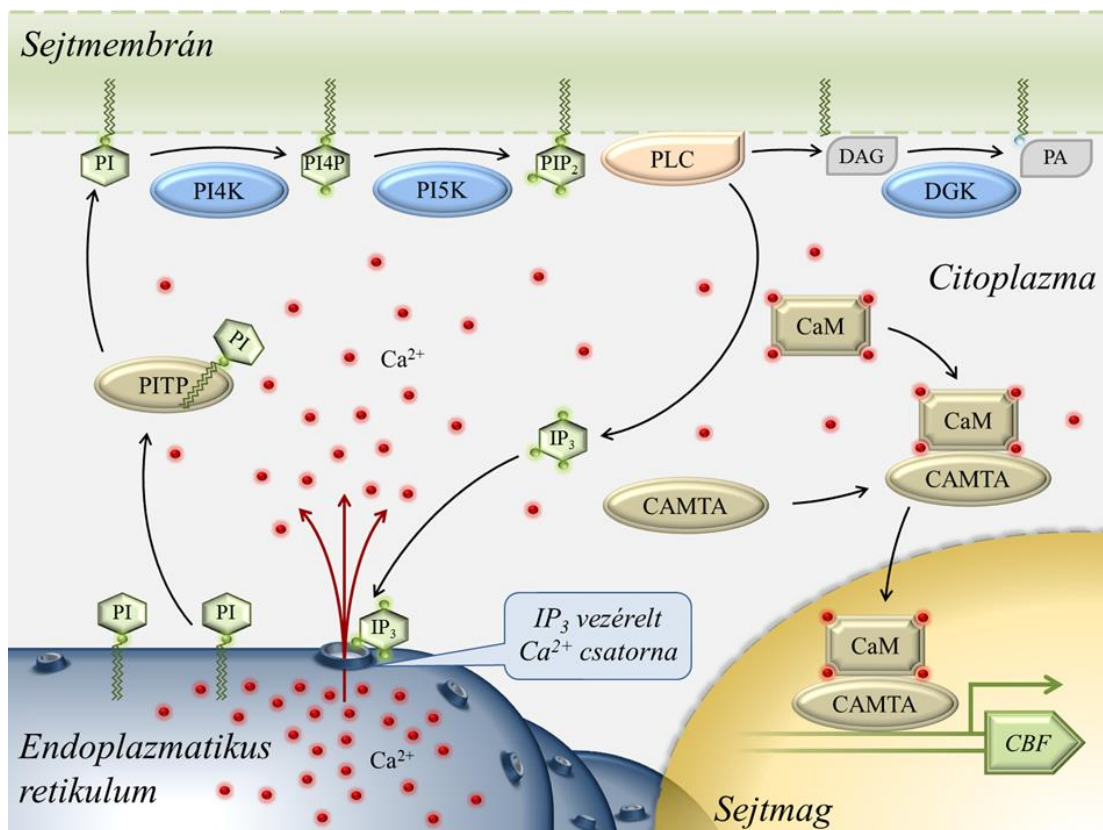
PI-specifikus transzfer protein (PITP) szállítja az endoplazmatikus retikulum és a sejtmembrán között.

A PI 4-kináz (PI4K) enzim katalizálja a PI molekula foszforilációját, biztosítva ezzel a sejtthártya PI 4-foszfát (PI4P) készletét. A PI4P molekula foszforilációját a PI 5-kináz (PI5K) enzim végzi, létrehozva ezzel a PI 4, 5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) foszfolipidet. A PIP<sub>2</sub> hidrolízisét a membránköthött foszfolipáz C (PLC) enzim katalizálja, mely reakció eredményei a diacil-glicerol (DAG) és az inozitol 1, 4, 5-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) másodlagos hírvivő molekulák. Ezek a jelet két különböző irányba viszik tovább. Az IP<sub>3</sub> – vízoldható molekula lévén – eljut az endoplazmatikus retikulum felszínén lévő IP<sub>3</sub> vezérelt Ca<sup>2+</sup> csatornához, ahol konformáció változást okoz, így téve lehetővé a szabad kalcium ionok felszabadítását. A DAG-kináz (DGK) katalizálja a DAG átalakulását foszfatidsavvá (PA), mely szerepet játszik különböző biotikus és abiotikus stresszválaszokban, valamint egyes anyagcsere útvonalakban is. A foszfolipid jelátviteli és Ca<sup>2+</sup> jelátviteli útvonalak bemutatása a 4. ábrán látható. A foszfolipid jelátviteli útvonal eredményeképpen IP<sub>3</sub> és PA szabadul fel. Az IP<sub>3</sub> vezérelt Ca<sup>2+</sup> csatornákon keresztül Ca<sup>2+</sup> áramlik ki az endoplazmatikus retikulumból, melyet a kalcium kötő fehérjék érzékelnek. Így például a kalmodulin a Ca<sup>2+</sup> kötés következtében, konformáció változás után kapcsolatot alakít ki a CAMTA fehérjével, mely fehérjekomplex már képes szabályozni a CBF-ek átírását (Testerink és Munnik, 2011; Delage et al., 2013; Ruelland et al., 2015; Hou et al., 2016; Dickson és Hille, 2019).

#### 6.4.1 A foszfolipid jelátviteli útvonal vizsgálata a növényi stressztűrésben

A Ca<sup>2+</sup> stressztűrésben betöltött kiemelkedő szerepe már régóta ismert; több növényfaj esetében is vizsgálták már a hidegtűrés kialakításában játszott szerepét. A foszfolipid jelátviteli útvonal felelős (részben) az IP<sub>3</sub> és a Ca<sup>2+</sup> másodlagos hírvivők felszabadításáért, azonban mindezidáig csak kevés tanulmány foglalkozott a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti génjeinek (*PITP* és *PI4K*) stressztűrésben betöltött szerepével. Az egyik ilyen tanulmányban egy hidegtűrőnek tekinthető kukorica beltenyésztett vonalból izolált *SEC14p* (a *PITP* génnel homológ) gén hatását vizsgálták *Arabidopsis* túltermelő növényekben. Wang et al. (2016b) kimutatták, hogy az előállított transzgenikus vonalak fokozott hidegtűréssel rendelkeztek a vad típushoz képest. Ezt a különbséget alacsony hőmérsékleti stressztoleranciában szerepet játszó gének (*AtPLC* gének, *AtCBF3*, *AtCOR*

gének), a kontroll genotípushoz képest szignifikánsan megnövekedett génexpressziós szintjeivel magyarázták.



4. ábra: A „foszfolipid jelátvitel → Ca<sup>2+</sup> jelátvitel → CBF-ek” útvonal összefoglaló ábrája (Testerink és Munnik, 2011; Delage et al., 2013; Ruelland et al., 2015; Hou et al., 2016; Dickson és Hille, 2019).

Egy másik tanulmányban Kielbowicz-Matuk et al. (2016) a *HvPITP* gén működését vizsgálták szárazságstressz, valamint sóstressz hatására a Saida (szárazságtűrő) és az Express (szárazságra érzékeny) árpa genotípusokban. Azt találták, hogy a *HvPITP* génexpressziós szintje a vegetatív szervekben jelentősen nagyobb értékeket mutatott stressz körülmények között. Ezen eredmény a gén stressztűrésben betöltött szerepére utal. Delage et al. (2012) *Arabidopsis pi4k* hiányos mutánsokkal bizonyították, hogy alacsony hőmérsékleten a vonalak lassabban csíráztak a vad típushoz képest, ami fokozott alacsony hőmérsékleti érzékenységre utal, felvetve ezzel az *AtPI4K* gén esetleges szerepét a növény hidegtűrésében. A bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonal szerepet játszik a növényi stressztűrés szabályozásában, azonban az egyes gének pontos szerepének bizonyításához részletesebb vizsgálatok szükségesek.



## 6.5 A növényi fotoreceptorok

Az alacsony hőmérséklet mellett a fény mint környezeti faktor is befolyásolja a *CBF* gének expresszióját: a fotoperiódus hossza mellett a fény intenzitása és a spektrális összetétele is hatással van a kifejeződésükre (Kim et al., 2002; Lee és Thomashow, 2012; Maibam et al., 2013; Novák et al., 2016; Wang et al., 2016a). A fény elnyelését különböző fotoreceptorok végzik, ezek segítségével érzékelik a növények a fény irányát, mennyiségét és minőségét (Jiao et al., 2007; Franklin et al., 2014; Li és Mathews, 2016). A vörös ( $\lambda_{\max} \sim 660$  nm) és a távoli-vörös ( $\lambda_{\max} \sim 730$  nm) fény elnyeléséért a fitokrómok felelősek, míg a kék és/vagy UV fény elnyelését a kriptokrómok, a fototropinok, valamint a ZEITLUPE és az UVR8 fotoreceptorok végzik (Casal, 2000; Kim et al., 2007; Sharrock, 2008; Demarsy et al., 2018).

### 6.5.1 A fitokrómok jellemzése

Az *Arabidopsis* modellnövény genomjában legalább öt (Clack et al., 1994), míg az egyszikűek közül a rizs és az árpa genomjában legalább három-három fitokróm gén kódolt (Mathews és Sharrock, 1996). E proteinek két típusát különböztetjük meg egymástól: a vörös fényt elnyelő biológiailag inaktív  $P_r$  típust, valamint a távoli-vörös fényt elnyelő biológiailag aktív  $P_{fr}$  típust. Vörös fény hatására a  $P_r$  forma  $P_{fr}$  formává alakul. A folyamat reverzibilis: a  $P_{fr}$  forma még sötétben is visszaalakul lassan a  $P_r$  formává, viszont távoli-vörös fényre a folyamat sokkal gyorsabban játszódik le (Rockwell et al., 2006). A biológiailag aktív  $P_{fr}$  forma legalább két jelátviteli útvonalban is szerepet játszik, ugyanis képes kapcsolatot kialakítani a COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1) fehérjével, valamint a PIF (Phytochrome Interacting Factor) proteinekkel is (Ni et al., 1998, 1999; Lu et al., 2015).

### 6.5.2 A *PIF* gének jellemzése

A *PIF* gének transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek a bázikus hélix-hurok-hélix (bHLH) fehérjecsaládba tartoznak. Fontos szabályozó szerepük van különböző fitohormonok metabolizmusában, valamint biotikus és abiotikus stressz indukált jelátviteli útvonalakban is (Paik et al., 2017). A bHLH fehérjestruktúra dimerizálható proteinekre jellemző, melyeknél két helikális domént egy hajlékony hurok köt össze (Toledo-Ortiz et al., 2003). A legtöbb HLH fehérje N-terminális részén egy

bázikus domén is található, melynek fontos szerepe van a specifikus DNS-kötés kialakításában (Jones, 2004). Az eddigi ismereteink alapján elmondható, hogy a PIF-ek N-terminális részükön egy fitokróm B-kötő motívumot (APB, active phytochrome B-binding motif) kódolnak, ráadásul némelyikük egy – az APB és a bHLH domén között lokalizált – fitokróm A-kötő motívummal (APA, active phytochrome A-binding motif) is rendelkezik.

Bizonyítottan fontos szerepük ellenére a *PIF* gének leírása és jellemzése csak az *Arabidopsis* modellnövény esetében mondható részletesnek, míg az agrónómiailag jelentős növényeknél a géncsalád leírása (és főleg jellemzése) meglehetősen hiányosnak mondható. Az *Arabidopsis* genomja legalább hét *PIF/PIL* (*PIF*-like, *PIF*-hez hasonlító) gént kódol (Lee és Choi, 2017; Pham et al., 2018). Rizsben (*Oryza sativa* L.) eddig hat *PIL* gént (Nakamura et al., 2007), míg kukoricában (*Zea mays* L.) kettő *PIF* gént (Kumar et al., 2016) azonosítottak. Tudomásunk szerint mindezidáig sem a kenyérbúza, sem az árpa esetében nem azonosítottak egy *PIF* (vagy *PIL*) szekvenciát sem.

## 7 CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoporthozunk egyik fő érdeklődési területe a gabonafélék alacsony hőmérsékleti stressztoleranciáját kialakító molekuláris mechanizmusok vizsgálata. Munkánk során a hidegstressz elleni védelem egyik fő komponensét, a CBF transzkripciós faktorokat kódoló géncsaládot, valamint a rájuk ható szabályozó mechanizmusokat vizsgáltuk.

A PhD értekezés fő célkitűzései:

- Az árpa *CBF* gének filogenetikai alcsoportok szerinti cirkadián kifejeződésének, valamint az alacsony vörös/távoli-vörös arányú spektrum génexpressziós mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- Annak vizsgálata, hogy a *HvCBF* génekre ható  $Ca^{2+}$ , valamint a foszfolipid jelátviteli útvonalak mely elemeinek expressziója mutat cirkadián ritmust, illetve mely komponens(ek)re van az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénynek hatása.
- A foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti lépéseit kódoló két gén, a *HvPITP* és *HvPI4K* gének szerepének tanulmányozása az árpa abiotikus stressztoleranciájának kialakításában, transzgénikus növények analízisével.
- A vörös és távoli-vörös tartományában elnyelő fitokróm fehérjékkel kapcsolatot kialakító PIF transzkripciós faktor szekvenciák *in silico* azonosítása, azok filogenetikai csoportosítása, valamint a fitokróm kötőhelyeket kódoló szekvenciák identifikálása.

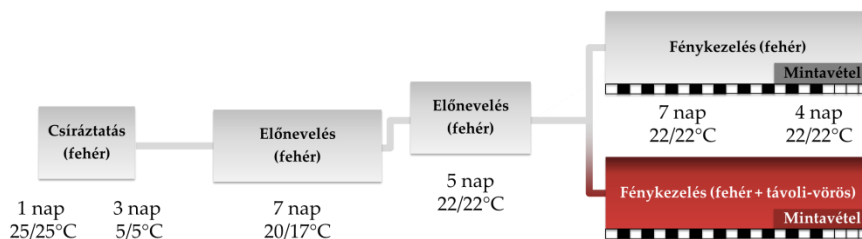
## 8 ANYAGOK és MÓDSZEREK

### 8.1 Cirkadián ritmus vizsgálata árpában

#### 8.1.1 Felhasznált növényanyag és nevelésük körülményei

A tanulmányozandó gének cirkadián ritmusának vizsgálataihoz az árpa (*Hordeum vulgare* spp. *vulgare*) egy őszi, kétsoros genotípusát, a Nure-t (Genomics Research Centre, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország) vontuk be a kísérleteinkbe, mely fajta kiemelkedő fagytűrővel rendelkezik. E tulajdonsága miatt az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia, így a *CBF* gének tanulmányozására „modellfajtaként” gyakran alkalmazzák. A gabonaszemek csíráztatását Petri-csészékben végeztük el, desztillált vízzel nedvesített szűrőpapír felhasználásával. A magokat egy napon keresztül 25/25°C-on (nappal/éjszaka) duzzasztottuk, majd három napon keresztül 5/5°C-on inkubáltuk, elősegítve ezzel a csíranövények egyenletes fejlődését. A csíráztatást követően százötven-százötven csíranövényt faládákba ültettünk (380×260×110 mm), 2:1:1 arányú kerti föld, homok és humusz természetközegbe.

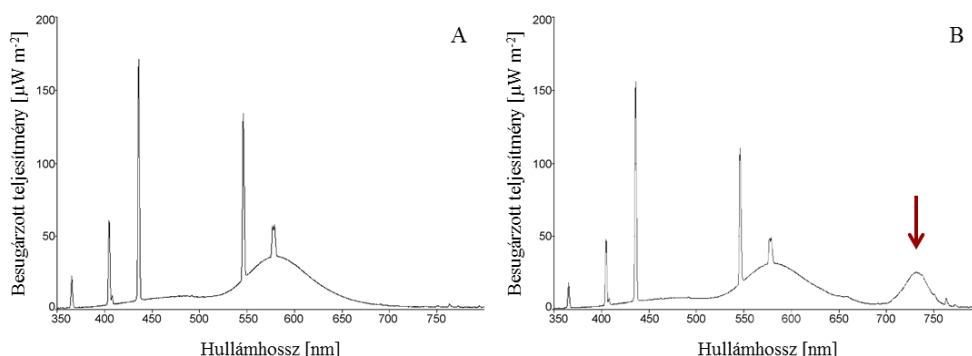
Ezek után a növényeket hét napon keresztül Convicon PGV36 (Controlled Environments Inc.) típusú klímakamrában, 12 órás megvilágítás mellett, 20/17°C hőmérsékleten, 70-75%-os relatív páratartalomban neveltük tovább. A növénynevelő kamrában beállított  $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitást fluoreszcens fénycsőek (Sylvania 215 W F96 T12) biztosították. Ezt követően a növénynevelő kamra hőmérséklete folyamatos 22/22°C-ra módosult, azonban a többi környezeti paraméter nem változott. A növényeket ezen a magasabb hőmérsékleten öt napig neveltük, mely periódus után a Z13-as fejlettségi állapotot érték el (Zadoks et al., 1974), amikor is a faládákat a fénykezeléshez két részre osztottuk el a kamrán belül. A növények fele továbbra is a fluoreszcens fénycsőek által kibocsátott fehér fény alatt nevelkedett tovább, melynek összetétele megegyezett az előnevelés során alkalmazott spektrummal, viszont a második csoport a fehér fény mellett távoli-vörös fénykiegészítést kapott (5. ábra). A két csoport közé fényvisszaverő fóliát helyeztünk el, megakadályozva ezzel az esetleges fényszennyezést.



5. ábra: A célgének cirkadián ritmusának vizsgálatához alkalmazott növénynevelési körülmények és mintavételezések sematikus összefoglalása. A fénykezeléseknél található fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat jelenti.

### 8.1.2 Távoli-vörös fénykezelés

A fehér fény mellett (6/A. ábra) a távoli-vörös fénykiegészítést 735 nm hullámhosszon emittáló 3W LED panelek (Shenzhen Justar Electronic Technology Co., Ltd., Kína) biztosították tizenegy napon keresztül (6/B. ábra). A fénykezelés a vörös/távoli-vörös fény arányát 0,4 - 0,5-re csökkentette, míg más környezeti paraméterek nem változtak.



6. ábra: A periodicitás vizsgálat során alkalmazott fénykezelések spektrális összetétele. Jól látható a távoli-vörös tartományban emittáló LED panelek hatása (B) a fehér fényt kibocsátó fluoreszcens fénycsővek által létrehozott spektrumra (A).

### 8.1.3 Mintavétel periodicitás vizsgálatához

A fénykezelés megkezdése utáni nyolcadik napon, közvetlenül a fény bekapcsolása után kezdtük meg a levélminták begyűjtését. A mintasorozat előállításához 4 napon keresztül, 4 óránként történt mintavételezés. Az első és a második mintavételi napon továbbra is 12 órás megvilágítást kaptak a növények, azonban a harmadik és a negyedik

napon folyamatos fény alatt neveltük őket tovább (5. ábra). Mind a huszonöt mintavételi időpontban három-három különálló növény legfiatalabb, de már kifejlett levelének középső harmadát szedtük le, mind a fehér, mind az alacsony vörös/távoli-vörös fénykezelést kapott növényekről, létrehozva ezzel egy biológiai ismétlést. A leveleket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 8.1.4 Génexpressziós vizsgálat

Az RNS izoláláshoz a Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research Corp., USA) kittet használtuk a gyártó protokollja szerint. Az RNS-minták koncentrációjának meghatározásához NanoDrop 2000 spektrofotométert alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), majd a minőségüket agaróz gélelektroforézissel igazoltuk. A reverz transzkripcióhoz  $1\ \mu\text{g}$  RNS-t, valamint M-MLV Reverse Transcriptase enzimet és oligo (dT)<sub>15</sub> primert (Promega Corp., USA) használtunk a gyártók protokolljai szerint. A vizsgált gének expressziós szintjét CFX96 Touch™ Real-Time („valós idejű”) qPCR (Bio-Rad Hungary Ltd., Hungary) készüléssel határoztuk meg, Kapa Sybr® Fast Universal qPCR (Kapa Biosystems Inc., USA) reagens segítségével. A szakirodalomban már korábban leírt, illetve saját tervezésű primerpárokat is használtunk a génkifejeződések meghatározásához (1. melléklet).

Mivel mindezidáig a *PITP*, a *PI4K*, a *PLC*, és a *CAMTA3* szekvenciák egyikét sem azonosították árpaiban, ezért más fajokban már leírt templát szekvenciákkal folytattunk kereséseket. Mindegyik esetben az NCBI-BLAST/blastn (Altschul et al., 1990) segítségével végeztünk kereséseket az árpa nukleotid adatbázisában (NCBI, Nucleotide collection). A találatok közül a kiindulási szekvenciákhoz leginkább hasonló, ismeretlen árpa szekvenciákat használtuk a génexpressziós vizsgálatokhoz (1. táblázat).

A primertervezéshez az NCBI (National Centre for Biotechnology Information, USA) adatbázist, valamint az Oligo Analyzer programot (fejlesztő: Teemu Kuulasmaa, 1.0.3-as verzió) használtuk fel. A primerek specifikusságát minden esetben az amplikonok olvadási görbéjének meghatározásával igazoltuk. A relatív génexpressziós szinteket  $\Delta\text{C}_q$  módszer segítségével határoztuk meg három technikai ismétlés alkalmazásával, biztosítva ezzel, hogy a kapott értékek kezelésként és génenként is összehasonlíthatóak legyenek. Referencia géneként a *HvCyclophilin*-t alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001).

1. táblázat: Az ismeretlen árpa célgének kereséséhez felhasznált templát szekvenciák, a BLAST keresések eredményeként kapott értékek, valamint a legjobb találatok NCBI azonosítója

Célgén	Templát szekvencia	Organizmus	Lefedettség	E érték	Hasonlóság	Legjobb találat
<i>HvPITP</i>	XM_020294916.1	<i>Hordeum</i> (taxid:4512)	83%	0,0	94%	AK374523.1
<i>HvPI4K</i>	AJ429217.1	<i>Hordeum</i> (taxid:4512)	89%	0,0	88%	AK360859.1
<i>HvPLC1</i>	HM754654.1	<i>Hordeum</i> (taxid:4512)	90%	0,0	92%	AK370341.1
<i>HvPLC2</i>	XM_003579013.3	<i>Hordeum</i> (taxid:4512)	74%	0,0	89%	AK360343.1
<i>HvCAMTA3</i>	XM_010230752.2	<i>Hordeum</i> (taxid:4512)	92%	0,0	88%	AK365210.1

## 8.2 *HvPITP* és *HvPI4K* génfunkciós vizsgálatok

### 8.2.1 Transzformációs konstrukciók és transzgénikus növények előállítása

Kutatócsoporthoz korábbi munkája során transzgénikus vonalak előállításához az általuk kiválasztott AK374523.1 (*HvPITP*), valamint az AK360859.1 (*HvPI4K*) szekvenciák (1. táblázat) amplifikálásához a Nure árpafajta csíranövényeiből DNase I (Promega, USA) enzimmel emésztett RNS-t izoláltak (TRIzol® Reagent, Invitrogen Corp., USA), majd M-MLV Reverse Transcriptase segítségével cDNS-t állítottak elő. A *HvPITP* és *HvPI4K* gének amplifikálását az AccuPrime™ Pfx DNA polimeráz segítségével végezték el a következő primerpárok felhasználásával:

„PITP Gateway Fw” (5’ CAC CAT GGT TCA GAT CAA GGA ATT CCG AAT C 3’)

„PITP Gateway Rev” (5’ CTA CGT GCA GCT CCC CAT GAC TGC 3’)

„PI4K Gateway Fw” (5’ CAC CAT GTC ACA AGG GAT GAA CAT GTT CGT G 3’)

„PI4K Gateway Rev” (5’ CTA TTT CTC AAT ACC TTG CTG CAA GTA TTG 3’).

A célgének kódoló részét a gabonafélék transzformálásához tervezett pBract214 vektorba klónozták be. A Fw primerek 5’ végén a CACC szekvenciák biztosították a beépülés megfelelő orientációját a klónozás során. Az ampikonokat a pENTR/D-TOPO® (Invitrogen Corp., USA) Gateway alapú klónozó vektorba építették, majd LR rekombinációt hajtottak végre a klónozó donor vektor és a pBract214 bináris recipiens vektor (John Innes Centre, UK) között. A recipiens vektorban a kukoricából származó

*ubikvitin* promóter, valamint az *Ubi-1* intron biztosítja a regenerálódott növényekben a *HvPITP* és *HvPI4K* gének konstitutív expresszióját.

Az így előállított pBract214-*HvPITP* és pBract214-*HvPI4K* konstrukciókat (2. melléklet) *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) segítségével, Bartlett et al. (2008), valamint Harwood et al. (2009) módszere alapján jutatták be az árpa egy tavaszi genotípusába, a Golden Promise fajtából izolált éretlen embriókba. E módszerek alapján végezték el a szövettenyésztési munkálatokat, valamint a növények regenerációját is. A szövettenyésztési munkák, valamint a regenerációt követően 15 független (külön-külön kallusztól regenerálódott) *HvPITP* és 13 független *HvPI4K* túltermelő egyedeket hoztak létre (T<sub>0</sub>). A transzgén beépülését és megfelelő orientációját PCR technikával igazolták: mind a 15 PITP és mind a 13 PI4K transzgénikus vonal tartalmazta a promóter + célgén, illetve a célgén + terminátor szekvenciákat, valamint a *hpt* szelekciós markergént is.

### 8.2.2 Transzgénikus növények molekuláris elemzése

E disszertáció keretei között, a transzgén jelenlétének igazolásához szükséges DNS-t a független kalluszokról regenerálódott növényekből a DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Németország) felhasználásával izoláltuk a gyártó utasításai szerint. A DNS minták minőségét gélelektroforézis technikával vizsgáltuk. A transzgén beépülését a *higromicin foszfortranszferáz* (*hpt*) szelekciós markergénre specifikus primerpárok segítségével igazoltuk (Stanley et al., 2011). A következő primerszekvenciák felhasználásával elvégeztük a promóter + célgén, illetve a célgén + terminátor szekvencia szakaszok amplifikálását is:

„*HvPITP Fw*” (5' CAC CAT GGT TCA GAT CAA GGA ATT CCG AAT C 3')

„*HvPITP Rev*” (5' CTA CGT GCA GCT CCC CAT GAC TGC 3')

„*HvPI4K Fw*” (5' TAC AGC TGG ACA GCG GTA TTC CTC TCC 3')

„*HvPI4K Rev*” (5' AAC TGG ATC CTT TTC TGG TGG TGC C 3').

Az amplifikáció után az 1214 bp (*HvPITP Fw* + terminátor), 1013 bp (*HvPITP Rev* + promóter), 1251 bp (*HvPI4K Fw* + terminátor) és a 1202 bp (*HvPI4K Rev* + promóter) nagyságú PCR termékeket gélelektroforézissel ellenőriztük (Soltész et al., 2013).



A transzgénikus vonalak kópiaszám meghatározását a  $T_0$  (kalluszköről regenerálódott növények) és  $T_1$  (a  $T_0$  öntermékenyítése következtében létrejött magok és az azokból csíráztatott növények) nemzedékek egyedeiből nyert DNS mintákon a g-Count™ (IDna Genetics Ltd., UK) szolgáltatóval végeztettük el. Referenciaként a *hpt* szelektációs markergént alkalmazták. A  $T_1$  vonalak zigócia állapotának meghatározását a  $T_0$  és  $T_1$  egyedek kópiaszám értékei alapján határoztuk meg. Ennek alapján állítottuk elő a genetikailag stabil, homozigóta  $T_2$  magokat.

A transzgének kifejeződésének mértékét Real-Time qPCR segítségével igazoltuk. Az RNS minták izolálásához genotípusonként a  $T_1$  nemzedék öt-öt egyedének legfiatalabb, de már kifejtett leveleit izoláltuk az RNeasy Plant Mini kit (Qiagen®, Németország) felhasználásával. A DNS szennyeződést a DNase I Set (Zymo Research Corp., USA) enzim használatával küszöböltük ki. Az RNS minták koncentráció meghatározását a NanoDrop 2000 Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) segítségével végeztük el. A minták integritását, valamint a DNS lebontásának sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük. A cDNS szintézis menete, valamint a génexpressziós szintek meghatározása megegyezik a 8.1.4 fejezetben leírtakkal. A relatív expressziós értékeket  $\Delta\Delta C_q$  módszer segítségével határoztuk meg (Livak és Schmittgen, 2001). Normalizáláshoz minden esetben a Golden Promise vad típusú, azaz a nem transzformált vonalban kapott expressziós értéket vettük alapul. A *HvPITP* és *HvPI4K* transzgénekre specifikus primerpárok szekvenciái megegyeznek a transzgének beépülésének igazolásához használt primerszekvenciákkal.

### 8.2.3 Transzgénikus növények morfológiai jellemzése

A transzgénikus vonalak hajtáscsúcsának fejlődési ütemét a  $T_0$  nemzedéken vizsgáltuk. A növények bokrosodási csomójából hajtáscsúcsot (apex) izoláltunk Zeiss Stemi 2000-C típusú sztereo mikroszkóp (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Németország), valamint szike és ékszercsipesz segítségével. Az apexek fejlettségi állapotát a Zadoks et al. (1974) által kidolgozott skála alapján határoztuk meg.

A transzgénikus vonalak fenotipizálását a homozigóta  $T_2$  nemzedéken végeztük el. A csíráztatási protokoll megegyezett a 8.1.1 fejezetben leírtakkal. A növények Z13-as fejlettségi állapotban vernalizációs kamrába kerültek, ahol a hőmérséklet  $0,9^\circ\text{C}$  és  $5,9^\circ\text{C}$  között változott. A megvilágítás  $20\text{-}25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitású volt 16 órán át.

Négyhetes hidegkezelés után genotípusonként 7-7 egyedet ültettünk el 2:1:1 arányú kerti föld, homok és humusz keveréket tartalmazó műanyag cserepekbe, majd Conviron PGR15 (Controlled Environments Ltd., Kanada) növénynevelő kamrába helyeztük el őket. Itt 18/15°C hőmérséklet, 220  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitás, 70-75%-os relatív páratartalom volt 16 órás megvilágítás mellett. Héthetes nevelés után a hőmérséklet 22/20°C-ra emelkedett, míg a többi paraméter nem változott.

A növények fejlődése során egyedenként feljegyeztük a kalászolási- és virágzási időpontokat, a teljes növénymagasságot, az elszáradás utáni biomassza tömeget, a kalászok betakarítása után pedig a főkalászok hosszát, tömegét, szemszámát, illetve a növényenkénti összes szemszámot, összes szemtömeget, mellékkalászok számát, és kiszámoltuk az ezermagtömeget is.

#### 8.2.4 Fotoszintetikus pigmentek meghatározása

A pigmentek mennyiségi meghatározásához a növények fejlődése során kétféle technikát alkalmaztunk. Az első mérést kilenches növényeken végeztük el SPAD-502 Klorofill mérő műszer (Minolta Co. Ltd., Japán) segítségével. Ekkor a növények Z51-52 fejlettségi állapotban, azaz korai kalászolási stádiumban voltak. A méréseket minden egyed esetében a zászlóslevél középső harmadában végeztük el, hét növényt mértünk genotípusonként.

A második mérési módszer alkalmazásához a transzgénikus vonalaktól csíranövény korban szedtük le a levélmintákat, vonalanként öt-öt egyedről. A levélmintákat folyékony nitrogén hozzáadása után porítottuk, majd a pigmenteket 80%-os acetonnal vontuk ki. A spektrofotometriás méréseket Cary 100 Scan UV-Visible készülékkel (Agilent Technologies, USA) határoztuk meg. A klorofill *a*, klorofill *b*, valamint a karotinoidok maximális fényelnyelését figyelembe véve 664 nm-en, 646 nm-en és 470 nm-en határoztuk meg a minták abszorbanciáját. Az eredményeket  $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  friss tömegként jelenítettük meg Lichtenthaler és Buschmann (2001) alapján.

#### 8.2.5 Transzgénikus növények fagytűrésének tesztelése

A transzgénikus növények fagytűrésre gyakorolt hatását két típusú kísérletben vizsgáltuk. Az egyiknél a fagyasztási hőmérséklet beállta előtt hidegdedzési periódust alkalmaztunk, míg a másikonál az előnevelés után – hidegdedzés nélkül – közvetlenül tettük ki a növényeket a

fagy károsító hatásának. A kísérleteket a  $T_1$  (hidegedzést követő fagyteszt) és a  $T_3$  (hidegedzés nélküli fagyteszt) nemzedékek egyedein végeztük el. Mind a két esetben a Golden Promise vad típust vettük viszonyítási alpnak. A magvak csíráztatása megegyezett a 8.1.1 fejezetben leírtakkal.

Genotípusonként 20-20 növényt ültettük faládákba, természetközegként 2:1:1 arányú kerti föld, humusz és homok keverékét használtuk. A ládákat növénynevelő kamrába helyeztük, ahol környezeti paraméterként 16 órás megvilágítást, 20/15°C nevelési hőmérsékletet, 220  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitást választottunk. A kísérletek teljes időtartama alatt a faládákat heti rendszerességgel randomizáltuk a kamrán belül, kiküszöbölve ezzel az esetleges környezeti inhomogenitást. A kétféle fagyasztási protokoll alkalmazását a növények tizenkilenc napos korában kezdtük el Z15-ös fejlettségi állapotban.

A hidegedzés megkezdéséhez a kamra hőmérséklete tizennégy napon keresztül folyamatosan csökkent, míg elérte a folyamatos 5/5°C-ot, (a további környezeti paraméterek nem változtak). A növényeket további 14 napon keresztül tartottuk ezen a hőmérsékleten, majd megkezdtük a 4 napig tartó fagyasztást. Ennek során a hőmérséklet -0,6°C/óra ütemben csökkent, egészen addig, míg a kamra elérte a legalacsonyabb -6°C-ot. A fagyasztás hőmérséklete, azaz a -6°C 24 órán át tartott, majd a hőmérséklet +0,6°C/óra ütemben emelkedett egészen 18°C-ig, amikor is a növényeket regenerációs kamrába helyeztük át, ahol a nevelési hőmérséklet 18/13°C volt (a többi környezeti paraméter megegyezett az előnevelésnél alkalmazottakkal).

A második típusú fagyasztási protokoll alkalmával a fiatal növényeket hidegedzési periódus nélkül tettük ki két különböző hőmérsékletű fagyhatásnak. A kamra hőmérséklete gyorsan, -3°C/óra ütemben csökkent -3°C és -5°C-ra.

Mind a két esetben a legalacsonyabb hőmérsékletet 16 órán keresztül alkalmaztuk. A fagyasztás befejezése után a növényeket 18/13°C hőmérsékletű regenerációs kamrába helyeztük el (a további környezeti paraméter megegyezett az előnevelésnél alkalmazottakkal).

Mind a két típusú fagytesztnél, amikor a kamrák hőmérséklete elérte a 0°C-os hőmérsékletet, desztillált vízzel permeteztük le a növények leveleit, segítve ezzel a jégkristályok kialakulását. A fagyasztások után a növények levelét visszavágtuk, majd

három hét regenerációs fázis után értékeltük az egyedek regenerációs képességét, túlélésének mértékét (Sutka, 1981).

### 8.2.6 Transzgenikus növények NaCl indukált sóstressz kezelése

A *HvPITP* és *HvPI4K* gének sótűrésben betöltött szerepét kétféle kísérletben vizsgáltuk. Az elsónél a NaCl csírázásra kifejtett hatását teszteltük, melyben a T<sub>3</sub> nemzedékből származó 6 PITP és 4 PI4K vonalat csíráztattunk. Kontrollként itt is a vad típusú Golden Promise-t használtuk. Vonalanként 10-10 szemet Petri-csészékbe helyeztünk, három biológiai ismétlésben (azaz 30 egyed genotípusonként). A szűrőpapírokat módosított ½ Hoagland oldattal (2. táblázat) nedvesítettük be (Hoagland és Arnon, 1950), valamint sókezelésként a ½ Hoagland oldatot egészítettük ki 150 mM NaCl-dal. A csíráztatást sötétben, 26°C hőmérsékletű inkubátorban végeztük el három napon keresztül. A kísérlet végén meghatároztunk a csírák gyökér- és hajtáshosszát.

2. táblázat: Módosított ½ Hoagland tápoldat összetétele, mely az eredeti recepthez képest (Hoagland és Arnon, 1950) fele mennyiségű makroelemet tartalmazott; az oldatok pH értékét minden esetben 5,8-ra állítottuk be

Makroelemek	
KNO <sub>3</sub>	2,50 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	2,50 mM
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	1,00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 mM

Mikroelemek	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,78 μM
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	2,29 μM
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,10 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,06 μM
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,04 μM

Fe-EDTA oldat	
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub>	0,11 mM

A második típusú kísérletnél is a T<sub>3</sub> nemzedékből származó hat PITP és négy PI4K transzgenikus vonal, valamint a vad típusú Golden Promise növények sótűrését vizsgáltuk hidropónikus körülmények között. Csíráztatást követően (a módszer megegyezik a 8.1.1 fejezetben leírtakkal) genotípusonként tíz-tíz egyedet műanyag edényekre helyeztünk,

500 ml  $\frac{1}{2}$  Hoagland oldat használatával (2. táblázat). Az edényeket POL-EKO ST 500 típusú (POL-EKO-APARATURA, Lengyelország) növénynevelő szekrénybe helyeztük. Környezeti paraméterként 16 órás megvilágítást, 22/20°C hőmérsékletet, valamint 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitást alkalmaztunk. Az előnevelés kilenc napig tartott, azután megkezdtük a növények felének sókezelését. A stresszkezelést 150 mM töménységű NaCl-ot tartalmazó  $\frac{1}{2}$  Hoagland oldat alkalmazásával valósítottuk meg, míg a kontroll növények változatlanul  $\frac{1}{2}$  Hoagland oldaton nevelkedtek tovább. A növények egységes fejlődése érdekében az oldatokat a teljes kísérlet alatt két naponta cseréltük, valamint a műanyag edények kamrán belüli helyzetét is változtattuk az inhomogenitás elkerülése miatt. A sókezelés megkezdése utáni nyolcadik napon fejeztük be a kísérletet, amikor is meghatároztuk az egyedek levelének SPAD értékét (lásd 8.2.4 fejezet), hajtáshosszát, hajtástömegét, gyökérhosszát, gyökértömegét, valamint Schonfeld et al. (1988) alapján a levelek víztartalmát is.

#### 8.2.7 Transzgenikus növények komplex stressztűrési vigor tesztje (CSVT)

A  $T_3$  nemzedékből származó magok, valamint a vad típusú Golden Promise genotípus kombinált hideg és hipoxiás stressztűrését Barla-Szabó és Dolinka (1988) alapján vizsgáltuk. A kombinált stresszt az alacsony hőmérséklet és a hipoxia együttes alkalmazása jelentette. A vizsgált vonalakból száz-száz szemet desztillált víz alá merítettünk, majd két napon keresztül szobahőmérsékleten tartottuk őket, azután a harmadik napon 5°C-os inkubátorba tettük a magokat. A négy napos stresszkezelés után huszonöt-huszonöt szemet szűrőpapírra helyeztünk, véletlenszerűen létrehozva így négy biológiai ismétlést. A szűrőpapírok feltekerése után függőleges helyzetbe állítottuk a tekercseket, majd 20°C-os inkubátorba helyeztük őket, és biztosítottuk a folyamatosan magas páratartalmat. A biológiai ismétlések kamrán belüli helyzetét két naponta változtattuk. Nyolc nappal később megmértük a csírák hosszát, valamint meghatároztuk a genotípusok túlélési százalékát és a nagy vigorral rendelkező csírák számát is. Ez azokat a csírákat jelenti, melyeknek hossza meghaladta az adott ismétlésben lévő három leghosszabb csíra átlaghosszúságának a kétharmadát.

#### 8.2.8 Statisztikai elemzések

Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 16.0 verziójú szoftver segítségével végeztük el. A normalitás vizsgálatához a Klomogorov-Smirnov tesztet használtuk, míg a

szórásnégyzetek egyezésének vizsgálatához Levene próbát alkalmaztunk. Az adatokat egytényezős varianciaanalízissel hasonlítottuk össze, majd LSD (Least Significant Difference) próbát, vagy Tukey's-b (szignifikancia szint egységesen  $\alpha = 0,05$ ) *post hoc* páronkénti összehasonlítást végeztünk az előfeltételek teljesülése esetén. Azoknál az adatértékeléseknél, ahol az előfeltételek nem teljesültek, nemparaméteres Mann-Whitney próbát alkalmaztunk. A szignifikáns eltérések jelölése: \*, \*\*, \*\*\*, ha  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

### 8.3 PIF szekvenciák *in silico* azonosítása

#### 8.3.1 bHLH domén szekvenciák szűrése az árpa proteomban

Az *in silico* vizsgálatokhoz a disszertáció írásakor elérhető legújabb verziójú (40. kiadás) árpa proteomot használtuk fel, melyet az Ensembl Plants (Kersey et al., 2018) honlapról töltöttünk le. Az adatbázis által használt 11+1 karakterű számkódokat használtuk a szekvenciák azonosítására. A feltételezett bHLH szekvenciák azonosítására a HMMER 3.0 verziójú programot (Eddy, 2009) és az ún. rejtett Markov-modell (HMM) módszerét alkalmaztuk a Pfam (Finn et al., 2016) HLH domén profil (PF00010) felhasználásával. A szoftver által prediktált bHLH szekvenciákat manuálisan szelektáltuk, csökkentve az ismétlődések számát és kizárva a hiányos találatokat. A szekvenciák illesztését a Clustal Omega (EMBL-EBI) webes program (Sievers et al., 2011) segítségével végeztük el. Ezt követően a WebLogo 2.8.2 verziójú programot (Crooks et al., 2004) használtuk a bHLH domén konzervált régiójának grafikus ábrázolásához.

#### 8.3.2 Szekvencia illesztések, filogenetikai elemzés és motívumkeresés

Az azonosított árpa bHLH szekvenciák filogenetikai csoportosításához, valamint az árpa *PIF* gének azonosításához már ismert *Arabidopsis thaliana* (*At*) és rizs (*Oryza sativa*: *Os*) bHLH fehérjék filogenetikai alcsoportjainak reprezentatív elemeit (Pires és Dolan, 2010), valamint különböző növényfajok már azonosított PIF szekvenciáit (NCBI adatbázis), úgy mint *AtPIF*, *AtPIL*, *OsPIF* és a szója (*Glycine max*: *Gm*) PIF szekvenciáit vontuk be az elemzésbe (3. táblázat). A szekvencia illesztéseket a Clustal Omega (EMBL-EBI), valamint a MEGA X szoftver (Kumar et al., 2018) felhasználásával készítettük el. A szekvenciák filogenetikai elemzéséhez a Simple Phylogeny (EMBL-EBI) Neighbor-Joining módszerét használtuk (Larkin et al., 2007), és a kapott fát bootstrap analízis segítségével (1000 ismétlés) ellenőriztük (Felsenstein, 1985). A filogenetikai fa

struktúra grafikus ábrázolásához a FigTree 1.4.3 verziójú programcsomagot (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), valamint a MEGA X szoftvert használtuk fel.

3. táblázat: Az árpa bHLH szekvenciák filogenetikai alcsoportjainak azonosítására felhasznált szekvencia azonosítók; az *AtbHLH*, az *OsbHLH*, az *AtPIL* és az *AtPIF* szekvenciákat Pires és Dolan (2010) alapján gyűjtöttük össze, míg az *OsPILlike13* (XP\_015618074.1), *OsPILlike15* (XP\_015619034.1) és *GmPIF3* (NP\_001340167.1) szekvenciák az NCBI adatbázisból származnak

bHLH alcsoport neve	bHLH szekvencia azonosítója		
Ia	<i>AtbHLH094</i>	<i>AtbHLH099</i>	<i>OsbHLH044</i>
Ib (1)	<i>AtbHLH095</i>	<i>OsbHLH146</i>	
Ib (2)	<i>AtbHLH118</i>	<i>AtbHLH162</i>	<i>OsbHLH168</i>
II	<i>AtbHLH089</i>	<i>AtbHLH091</i>	<i>OsbHLH142</i>
III (a+c)	<i>AtbHLH027</i>	<i>AtbHLH029</i>	<i>OsbHLH156</i>
IIIb	<i>AtbHLH061</i>	<i>AtbHLH116</i>	<i>OsbHLH004</i>
III (d+e)	<i>AtbHLH004</i>	<i>AtbHLH005</i>	<i>OsbHLH009</i>
III f	<i>AtbHLH002</i>	<i>AtbHLH012</i>	<i>OsbHLH016</i>
IVa	<i>AtbHLH018</i>	<i>AtbHLH025</i>	<i>OsbHLH018</i>
IVb	<i>AtbHLH011</i>	<i>AtbHLH047</i>	<i>OsbHLH061</i>
IVc	<i>AtbHLH105</i>	<i>AtbHLH115</i>	<i>OsbHLH059</i>
IVd	<i>AtbHLH041</i>	<i>AtbHLH092</i>	<i>OsbHLH026</i>
Va	<i>AtbHLH046</i>	<i>AtbHLH141</i>	<i>OsbHLH031</i>
Vb	<i>AtbHLH030</i>	<i>AtbHLH032</i>	<i>OsbHLH042</i>
VII (a+b)	<i>OsbHLH152</i> <i>AtPIL1 AtPIL2 AtPIF3 AtPIF4 AtPIL5 AtPIL6 AtPIF7</i> <i>OsPILlike13 OsPILlike15</i> <i>GmPIF3</i>		
VIIIa	<i>AtbHLH052</i>	<i>AtbHLH053</i>	<i>OsbHLH178</i>
VIIIb	<i>AtbHLH040</i>	<i>AtbHLH140</i>	<i>OsbHLH123</i>
VIIIc (1)	<i>AtbHLH083</i>	<i>AtbHLH086</i>	<i>OsbHLH127</i>
VIIIc (2)	<i>AtbHLH054</i>	<i>AtbHLH085</i>	<i>OsbHLH128</i>
IX	<i>AtbHLH122</i>	<i>AtbHLH128</i>	<i>OsbHLH111</i>
X	<i>AtbHLH110</i>	<i>AtbHLH112</i>	<i>OsbHLH073</i>
XI	<i>AtbHLH069</i>	<i>AtbHLH082</i>	<i>OsbHLH114</i>
XII	<i>AtbHLH060</i>	<i>AtbHLH062</i>	<i>OsbHLH095</i>
XIII	<i>AtbHLH156</i>	<i>AtbHLH157</i>	<i>OsbHLH149</i>
XIV	<i>AtbHLH143</i>	<i>AtbHLH145</i>	<i>OsbHLH138</i>
XV	<i>AtbHLH134</i>	<i>AtbHLH136</i>	<i>OsbHLH154</i>

A bHLH fehérjék filogenetikai alcsoportjainak részletesebb vizsgálatát, valamint az APA és APB motívumkeresést a Jalview 2.10.5 verziójú program (Waterhouse et al., 2009), a MEGA X szoftver (Kumar et al., 2018) és a MEME honlap FIMO algoritmusával (Bailey et al., 2009) segítségével végeztük el.

## 9 EREDMÉNYEK

### 9.1 Célgének cirkadián kifejeződésének vizsgálata

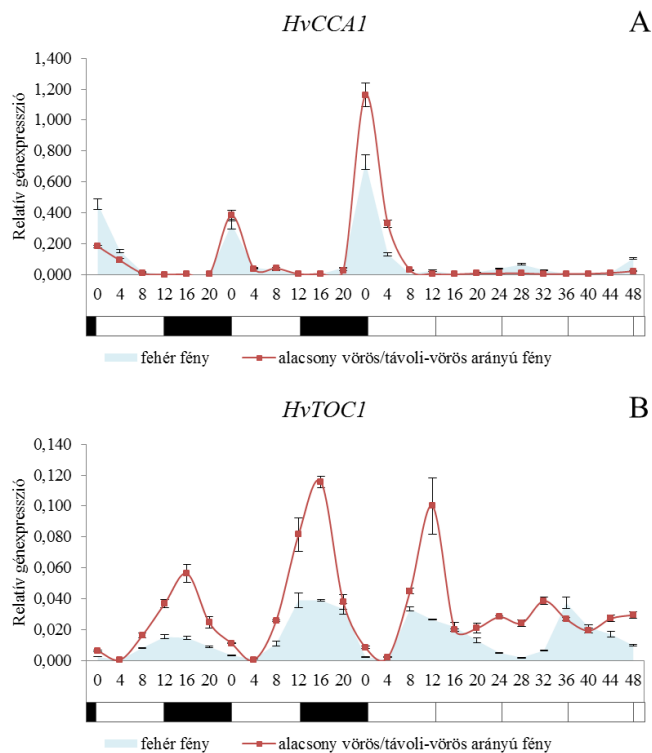
A foszfolipid és a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonalak egyes génjeinek, valamint a *HvCBF* transzkripciós faktorokat kódoló gének cirkadián ritmusának vizsgálata során kapott eredményeket az alábbiakban mutatjuk be. A génexpressziós vizsgálatok során referenciaként használt *HvCyclophilin* gén kezeléstől független megnyilvánulását a két fénykezelés összes mintáján ellenőriztük, három technikai ismétlés alkalmazásával. A  $C_q$  értékek átlaga a fehér fénykezelés esetében  $21,13 \pm 0,82$ , míg a távoli-vörös fénykiegészítés esetében  $21,68 \pm 0,57$  volt. A kapott eredmények alapján a *HvCyclophilin* gén megnyilvánulását stabilnak tekintettük, így referenciaként alkalmaztuk a génexpressziók normalizálásához.

#### 9.1.1 Óragének expressziós mintázatainak meghatározása

A *HvCCAI* gén expressziós vizsgálata során megállapítottuk, hogy annak kifejeződése a cirkadián óra hatása alatt áll (7/A. ábra), viszont folyamatos megvilágítás esetén a gén működése alig detektálható. Kifejeződése a mesterséges fény bekapcsolását követően – tehát „napkeltekor” – a legintenzívebb. Az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény nem befolyásolja jelentősen az expresszió ritmusát, valamint a mértékét sem.

A *HvTOC1* gén kifejeződése a mesterséges világítás lekapcsolását követő – tehát a „kora esti” – órákban a legintenzívebb, kifejeződését a központi oszcillátor szabályozza (7/B. ábra). Periodicitását és kifejeződésének intenzitását folyamatos megvilágítás esetén is megőrzi, azaz cirkadián ritmust mutat. A fény/sötét szakaszok váltakozása mellett a távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *HvTOC1* gén fokozott kifejeződést mutatott (a periodicitás megőrzése mellett). Folyamatos megvilágítás hatására, az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény mellett, egy folyamatos, periódus nélküli alacsony génexpressziós szintet figyeltünk meg.

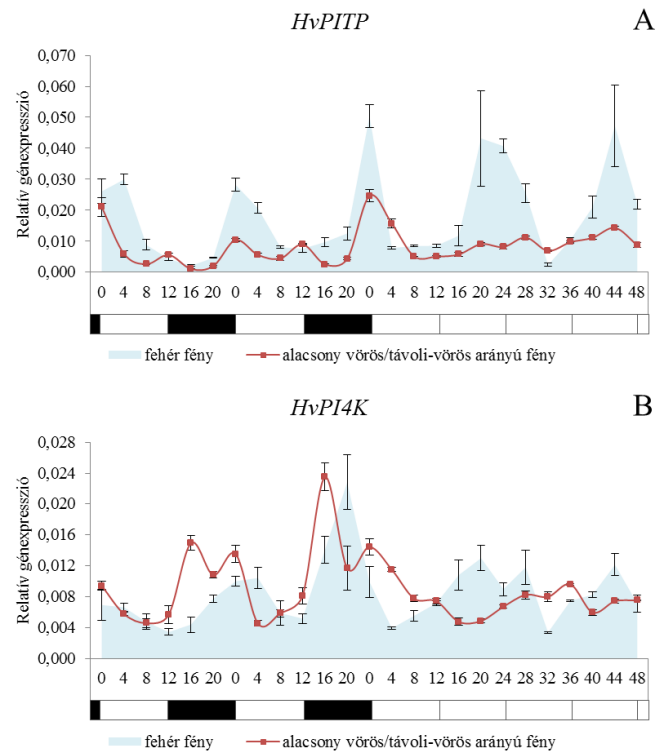




7. ábra: A *HvCCA1* (A) és *HvTOC1* (B) gének expressziós mintázata a fehér-, valamint az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénykezelés hatására. Az abszcissa értékei a mesterséges fény bekapcsolása óta eltelt órákat jelzi. A fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat reprezentálja.

### 9.1.2 Foszfolipid jelátvitel génjeinek expressziós vizsgálata

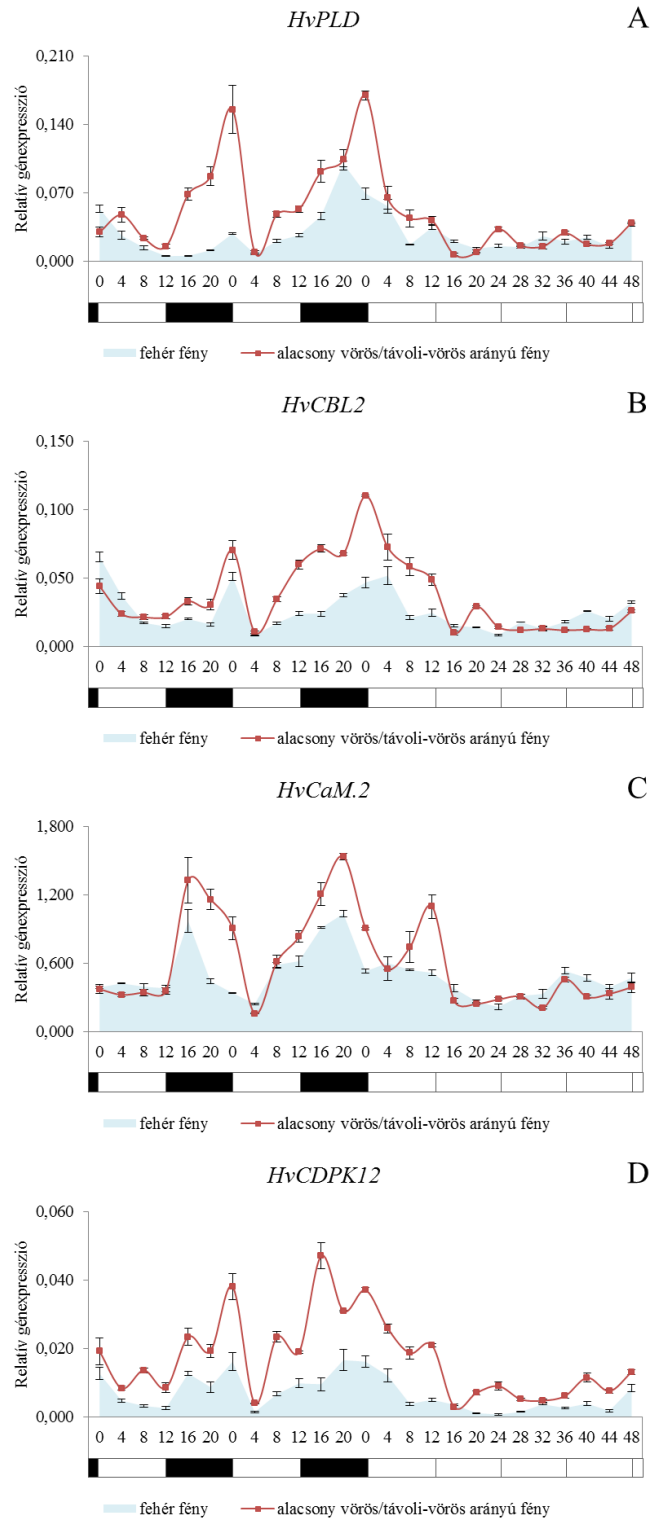
A foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti elemei közül a *HvPITP*, valamint a *HvPI4K* gének expressziós mintázatát határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy a *HvPITP* gén a központi oszcillátor hatása alatt áll, expressziója cirkadián ritmust mutat, melynek maximumai a reggeli órákban tetőznek (8/A. ábra). Távoli-vörös fénykiegészítés hatására a gén működése mérséklődik, folyamatos megvilágítás esetén periodicitását elveszíti. A *HvPI4K* gén expressziós vizsgálata során megállapítottuk, hogy az cirkadián ritmust mutat, mivel folyamatos megvilágítás esetén is megőrzi a fázisát (8/B. ábra). Kifejeződése az éjszakai/kora reggeli órákban éri el maximumát. Alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény hatására a *HvPI4K* expressziója fázistolódást mutat, órákkal korábban jelentkezik. Folyamatos megvilágítás és távoli-vörös fénykiegészítés esetén periodicitását elveszíti, állandó géneexpressziós értékeket mutat.



8. ábra: A *HvPITP* (A) és *HvPI4K* (B) géneexpressziós mintázat fehér fény, valamint távoli-vörös fénykiegészítés hatására. Az X tengely értékei a mesterséges megvilágítás kezdete óta eltelt időt jelenti, órákban kifejezve. A fekete/fehér színskála az éjszaka/nappal időszakokat jelzi.

### 9.1.3 $\text{Ca}^{2+}$ jelátviteli útvonal génjeinek expressziós vizsgálata

Vizsgálataink során a *HvPLC*, a *HvPLD*, valamint a kalcium-kötő fehérjéket kódoló gének expresszióját vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének expressziója nem mutat egységes mintázatot. A *HvPLD*, *HvCBL.2*, *HvCaM.2* és *HvCDPK12* gének kifejeződése követi a nappalok és éjszakák váltakozását, expressziójuk a sötét periódus végén éri el a maximumot (9. ábra). Állandó megvilágítás esetén ritmusukat elveszítik, folyamatos, alacsony szintű működést mutatnak. A távoli-vörös fénykiegészítés nincs hatással a periodicitásukra, azonban mind a négy gén esetében fokozott működést figyeltünk meg.



9. ábra: A *HvPLD* (A), *HvCBL.2* (B), *HvCaM.2* (C) és *HvCDPK12* (D) gének expressziós mintázata a fehér-, valamint az alacsony vörös/távoli vörös arányú fénykezelés hatására. Az abszcissa értékei a mesterséges fény bekapcsolása óta eltelt órákat reprezentálja. A fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat jelöli.

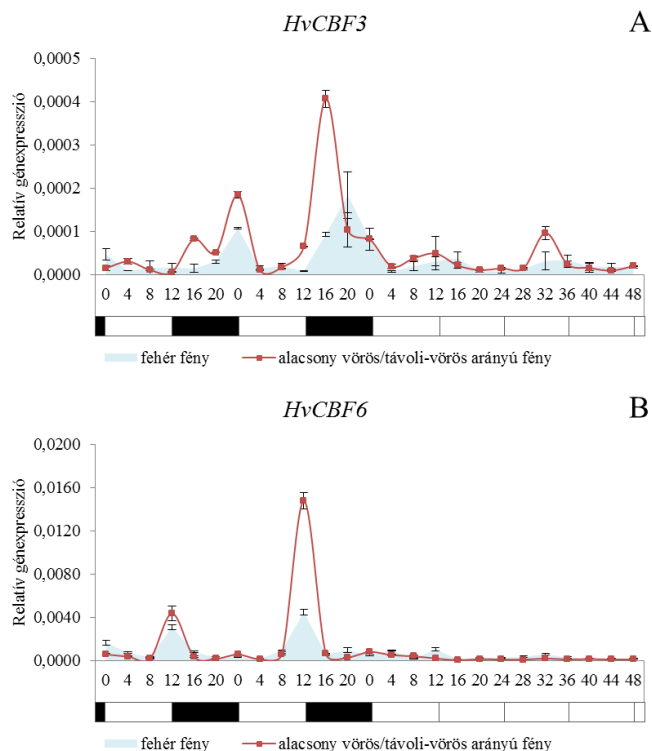
A *HvPLC.2* és a *HvCaM.1* gének expressziós mintázatának vizsgálata során megállapítottuk, hogy kifejeződésükre sem a cirkadián óra, sem a távoli-vörös fénykiegészítés nincs jelentős hatással (3/A. és 3/B. melléklet). A *HvPLC.1* és a *HvCAMTA3* gének tanulmányozása során megfigyeltük, hogy expressziójukat nem befolyásolja a cirkadián óra (3/C. és 3/D. melléklet). Folyamatos megvilágítás mellett kifejeződésük csökkent, viszont az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény fokozta a génexpresszió mértékét a 12 órás megvilágítás során.

#### 9.1.4 Az árpa *CBF* gének cirkadián ritmusának vizsgálata

Az árpa genomja legalább húsz *CBF* gént kódol, melyek három filogenetikai alcsoportba (*HvCBF1*-, *HvCBF3*-, valamint *HvCBF4*-alcsoport) sorolhatóak (1. ábra). Vizsgálatainkat mindhárom alcsoportból reprezentatív számú gén tanulmányozásával végeztük el.

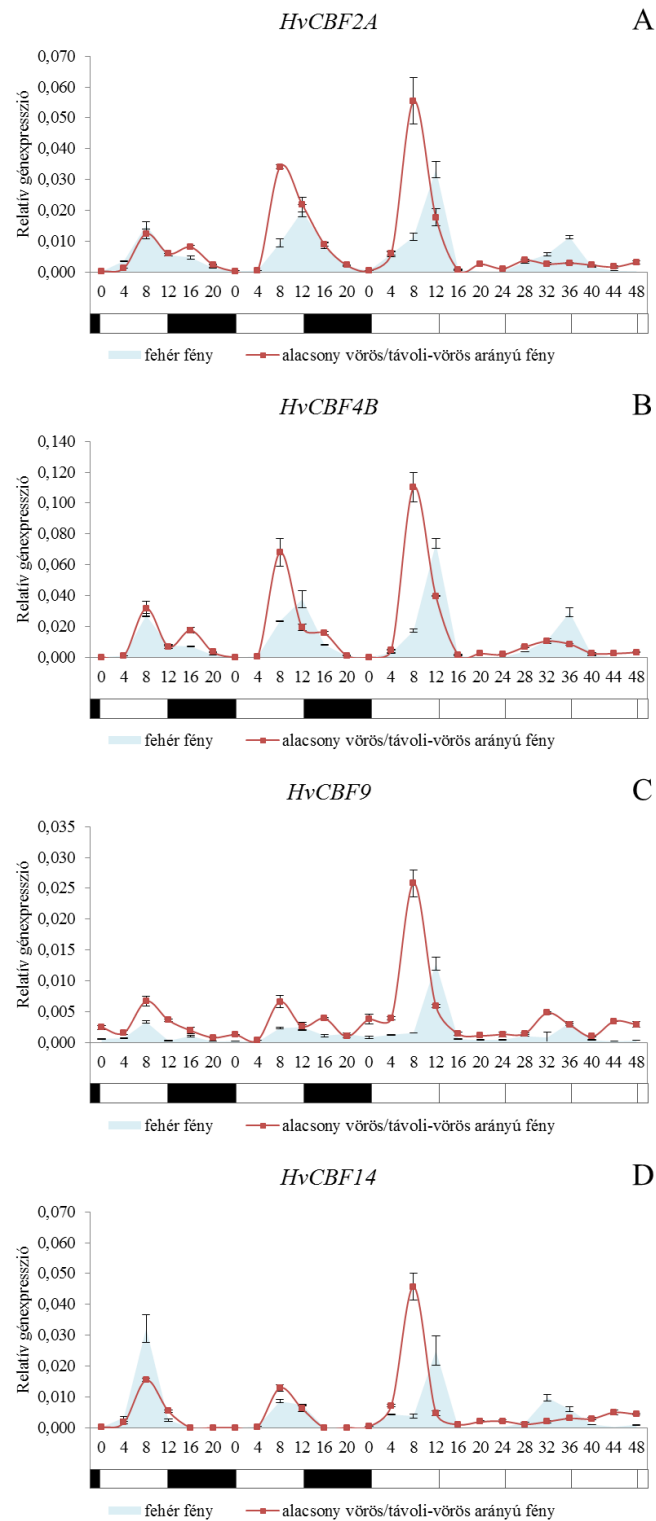
A *HvCBF1*-alcsoportba négy *CBF* gén tartozik, melyek közül a *HvCBF1*, valamint a *HvCBF11* gének expressziós mintázatát határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott 22°C-os nevelési hőmérséklet nem induktív ezekre a génekre.

A *HvCBF3*-alcsoport tagjai közül a *HvCBF3*, *HvCBF6*, *HvCBF10A*, *HvCBF12*, *HvCBF15*, valamint *HvCBF16* gének génexpressziós mintázatát vizsgáltuk meg. Ezek közül csupán a *HvCBF3* és *HvCBF6* gének indukálódtak 22°C-on. A *HvCBF3* gén alacsony szintű kifejeződést mutatott az éjszakai órákban, ráadásul a transzkriptumának mennyisége folyamatos megvilágítás esetén tovább csökkent (10/A. ábra). Távoli-vörös fénykiegészítés hatására a génexpresszió szintje fokozódott, valamint órákkal korábban is jelentkezett. A *HvCBF6* génkifejeződésének maximum értékeit a kora esti órákban figyeltük meg (10/B. ábra). Alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény nem befolyásolta a génkifejeződés periódushosszát, viszont nagyobb expressziós értékeket okozott. Folyamatos megvilágítás esetén – mind a fehér-, mind a távoli-vörössel kiegészített fehér fény – a *HvCBF6* gén expressziója teljes mértékben megszűnt.



10. ábra: A *HvCBF3*-alcsoporthoz tartozó *HvCBF3* (A) és *HvCBF6* (B) gének expressziós mintázata fehér-, valamint távoli-vörös fénykiegészítés hatására. Az abszcissa értékei a mesterséges megvilágítás bekapcsolása óta eltelt órákat jelöli. A fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat jelenti.

A *HvCBF4*-alcsoport hét tagja közül (1. ábra) a *HvCBF2A*, *HvCBF4B*, *HvCBF9*, valamint a *HvCBF14* gének expressziós mintázatát határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy a négy megvizsgált gén kifejeződése nagyfokú hasonlóságot mutat (11. ábra). Expressziójuk 8-12 órával a mesterséges fény bekapcsolását követően érték el a maximumaikat. Folyamatos megvilágítás esetén mind a négy gén megőrizte periodicitását, cirkadián ritmust mutattak. Alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény hatására 12 órás megvilágítás esetén a géneexpressziók maximum értékei sok esetben tovább fokozódtak, és órákkal korábban jelentkeztek. Folyamatosan megvilágítva, távoli-vörös fénykiegészítés mellett a *HvCBF4*-alcsoport tagjainak csökkentek az expressziós értékeik, ráadásul cirkadián ritmusukat is elveszítették.



11. ábra: A *HvCBF4*-alcsoporthoz sorolt *HvCBF2A* (A), *HvCBF4B* (B), *HvCBF9* (C) és *HvCBF14* (D) gének expressziós mintázata a fehér fény, valamint a távoli-vörös fénykiegészítés hatására. Az abszcissa értékei a mesterséges fény bekapcsolása óta eltelt órákat jelöli. A fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat jelzi.

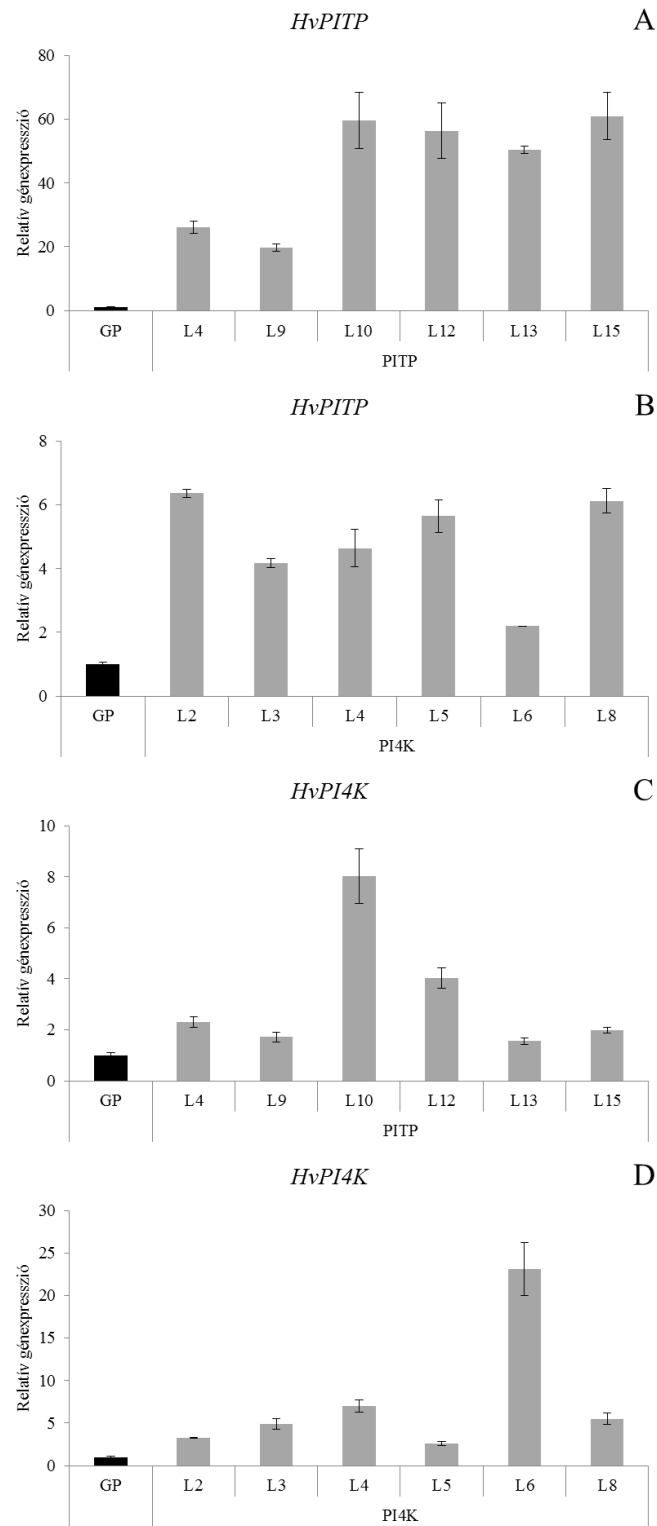
## 9.2 *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő transzgenikus vonalak vizsgálata

### 9.2.1 A transzgenikus vonalak molekuláris elemzése

A homozigóta transzgenikus egyedek szelektálásához a  $T_0$ , valamint a  $T_1$  nemzedékek kópiaszámát határoztuk meg. Negatív kontrollként a Golden Promise vad genotípust használtuk. Megállapítottuk, hogy a *PITP* túltermelő vonalak egy vagy két (egyetlen esetben hat) kópiában hordozták a *hpt* szelektációs markergént, csakúgy, mint a *PI4K* túltermelő vonalak (4. melléklet). Az előállított 15 *PITP* vonal közül 11 esetében (73%), míg a 13 előállított *PI4K* vonal közül 8 esetében (62%) mutattuk ki a *hpt* gént egy kópiában. A *PITP* esetében három, míg a *PI4K* esetében öt vonal kódolta a szelektációs markergént két kópiában. A 28 vizsgált egyed közül csupán egy (*PITP* L5) tartalmazta a *hpt* gént több mint két kópiában: összesen hat *hpt* gén beépülését figyeltünk meg.

A *PITP* és *PI4K* transzgenek működésének igazolásához kontroll – azaz nem induktív – körülmények között nevelt, szegregáló  $T_1$  populációból származó egyedek levélmintáit használtuk fel a Real-Time qPCR vizsgálathoz (12. ábra). Megállapítottuk, hogy a Golden Promise vad típushoz képest a transzgenikus vonalakban a célgének közül a *HvPITP* kifejeződése nagyobb értékeket mutat (20-60-szoros, 12/A. ábra), mint a *PI4K* génnél megfigyelt (3-7-szeres, 12/D. ábra) expresszió. Ez alól csak a *PI4K* L6 volt a kivétel, mivel ennél a vonalnál körülbelül 23-szoros *PI4K* túltermelést figyeltünk meg a vad típushoz képest (12/D. ábra).

A transzformáns vonalakban a *HvPITP* transzgén hatását az endogén *HvPI4K* expresszióra, valamint a *HvPI4K* transzgén hatását az endogén *HvPITP* expresszióra is megvizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a *HvPITP* expressziós szintje a *PI4K* transzgenikus vonalakban 2-6-szoros különbséget mutatott a vad típushoz képest (12/B. ábra), míg a *HvPI4K* expressziós szintje a *PITP* transzgenikus vonalakban 2-8-szoros mértékben fejeződött ki a Golden Promise genotípushoz viszonyítva (12/C. ábra).



12. ábra: A *HvPITP* expressziós értékei a PITP (A) és PI4K (B) túltermelő vonalakban, valamint a *HvPI4K* expressziós értékei a PITP (C) és PI4K (D) túltermelő vonalakban. Az ábra értékei a *HvCyclophilin* referencia génre, valamint a Golden Promise vad típusra normalizált ( $\Delta\Delta C_q$ ) értékeket mutatja. Mérésenként 5-5 független biológiai, valamint 3-3 technikai ismétlést alkalmaztunk.



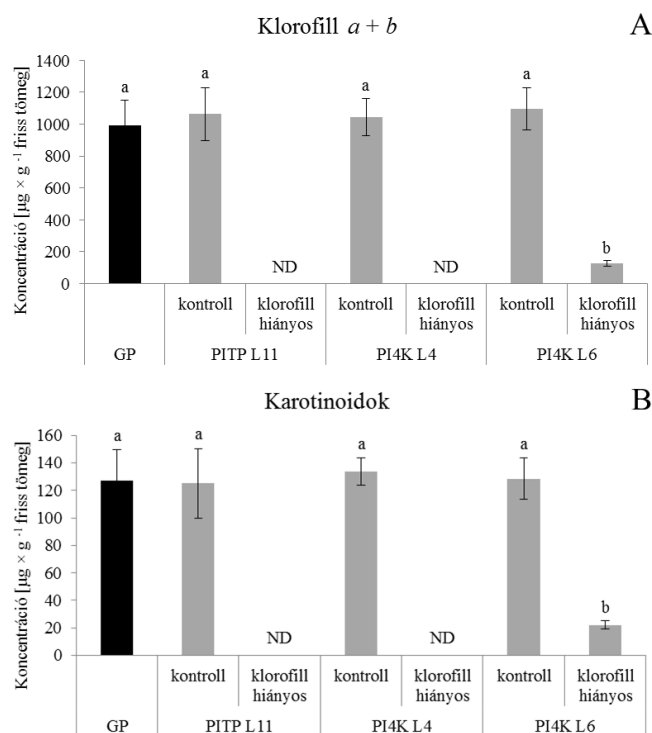
A kópiaszám és a *HvPITP*, valamint *HvPI4K* expresszió mértékének meghatározása után megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a transzgén beépülési gyakorisága, illetve kifejeződésének mértéke között (5. melléklet). A korrelációs vizsgálat kimutatta, hogy sem a *PITP* ( $R^2 = 0,4935$ ; 5/A. melléklet), sem a *PI4K* ( $R^2 = 0,0327$ ; 5/B. melléklet) esetében nincs összefüggés a transzgén integrálódása és kifejeződésének mértéke között. Ezt bizonyítják a *PITP* L9-es és a *PI4K* L6-os vonalak is. A *PI4K* L6-os vonal csupán egy kópiában kódolja a *HvPI4K* transzgént (4. melléklet), viszont kifejeződése messze meghaladja a többi *PI4K* vonalét (12/D. ábra). Ezzel szemben, habár a *PITP* L9-es vonal két kópiában kódolja a *HvPITP* transzgént (4. melléklet), expressziójának mértéke a legalacsonyabb a vizsgált *PITP* vonalak között (12/A. ábra).

### 9.2.2 Fejlődési rendellenességek a túltermelő növényeknél

A kalluszokról regenerált  $T_0$  növények fejlődése során azt tapasztaltuk, hogy néhány *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő egyed nem képes kalászatot fejleszteni. A hajtásmerisztéma mikroszkópos vizsgálata során megállapítottuk, hogy habár a hajtáscsúcsban bekövetkezik a vegetatív/generatív átmenet, fejlődése leáll a Zadok skála szerinti Z45-50-es fejlettségi állapotban (6/A. és 6/B. melléklet). Ezeknél a növényeknél nem fejlődtek ki a kalászkák/kalászkák, így nem hoztak magot, tehát fenntartani sem lehetett őket. A fent említett fejlődési rendellenességen kívül a  $T_0$  nemzedéknél megfigyeltük azt is, hogy egyes egyedek internódiumok nélkül fejlődtek (6/C. melléklet), vagy éppen nem tudtak belépni a Zadok skála szerinti Z30-as fejlettségi állapotba (ezt mind a *HvPITP*, mind a *HvPI4K* túltermelők esetében megfigyeltük) és folyamatosan csak bokrosodtak (6/D. melléklet). Ezek a növények szintén kalászképzés (és így magok) nélkül élték le teljes életciklusukat, ami fenntarthatóságukat lehetetlenné tette.

A szegregáló  $T_1$  nemzedék közül három vonal csíranövényeinél megfigyeltük, hogy azok halványabbak voltak társaiknál, ráadásul némelyikük még fény hatására sem volt képes bezöldülni (6/E. melléklet). A *PI4K* L6-os vonal 6,5%-os gyakorisággal mutatott halványzöld fenotípust, míg a fehér színű levelek a *PITP* L11-es vonal esetében 5%-os, a *PI4K* L4-es vonalnál 6%-os valószínűséggel jelentek meg. Ezek a klorofill hiányos egyedek lassabban fejlődtek a Golden Promise-nál, valamint a zöld (azaz „normális”) fenotípust mutató transzformáns társaiknál is. A vizsgált abnormalis fenotípus minden esetben letálisnak bizonyult, a pigment hiányos egyedek (mind a három vonal esetében) a csírázást követően a harmadik héten elpusztultak.

A tapasztalt fenotípus kvantifikálása érdekében a klorofill  $a + b$  (13/A. ábra), valamint a karotinoidok (13/B. ábra) spektrofotometriás meghatározását is elvégeztük. Nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség ( $P \leq 0,05$ ) a szegregáló  $T_1$  nemzedék mindig „zöld levelű” (azaz „normális”) vonalai, valamint a Golden Promise vad típus között. Azoknál az egyedeknél is meghatároztuk a klorofill  $a + b$ , valamint a karotinoidok koncentrációját, melyek a fent említett három vonalból a „zöld levelű” fenotípust mutatták (13. ábrán: PITP L11 kontroll, PI4K L4 kontroll, PI4K L6 kontroll), de nem mutattunk ki szignifikáns különbséget. A halvány zöld levelű PI4K L6 egyedeiben jelentősen csökkent mind a klorofill  $a + b$ , valamint a karotinoidok koncentrációja a Golden Promise vad típushoz, valamint a vonal „zöld levelű” (PI4K L6 kontroll) egyedeihez viszonyítva is. A PITP L11 és PITP L4 vonalak fehér színű leveleikben a klorofill  $a + b$ , valamint a karotinoidok koncentrációja a spektrofotométer kimutatási határértékei alatt maradtak, így tehát ezek az egyedek albínóknak tekinthetők.



13. ábra: Klorofill  $a + b$  (A), valamint a karotinoidok (B) koncentrációja a PITP L11, PI4K L4, PI4K L6 és a Golden Promise genotípusok esetében. Az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól 5%-os szignifikancia szinten. ND: nem detektálható.

A homozigóta  $T_2$  vonalak egyedeinél megfigyeltük azt is, hogy néhány növény virágzatában a főtengelyen, vagyis a kalászorsón elhelyezkedő kalászkák helyett egy-egy

esetében egy másodlagos (esetleg később egy harmadlagos) kalászorsó is megjelent, létrehozva ezzel egy összetettebb kalázmorfológiát/virágzatot (6/F. melléklet). A transzformáns növények, valamint a Golden Promise fenotipizálása során (lásd a 9.2.3 fejezetben) megállapítottuk, hogy a vad típus kalászaiban csupán 2,9%-ban mutatnak összetett kalázmorfológiát. A transzsgének hatására a P1TP L13 esetében 16,1%, míg a PI4K L2 vonalnál 12,9% a másodlagos (vagy harmadlagos) kalászorsó előfordulása, mely fenotípusos eltérés szignifikánsan különbözik a vad típushoz képest (4. táblázat).

4. táblázat: Másodlagos vagy harmadlagos kalászorsó megjelenésének gyakorisága a *HvP1TP* és *HvPI4K* transzformáns vonalak, valamint a Golden Promise vad típus esetében; a táblázatban szereplő értékek hét-hét egyedről származó kalászok számát, valamint a közöttük előforduló deformáltak százalékos előfordulását jelölik; a Golden Promise vad típustól való eltérések jelölése: \*, \*\*, ha  $P \leq 0,05, 0,01$

	Golden Promise	P1TP						PI4K			
		L4	L9	L10	L12	L13	L15	L2	L3	L5	L6
Kalászok száma (db)	70	58	64	86	71	93	53	70	67	101	104
Kalászdeformitás [%]	2,9	3,4	6,3	10,5	4,2	16,1**	0,0	12,9*	3,0	0,0	7,7

### 9.2.3 A *HvP1TP* és *HvPI4K* vonalak fenotípusos jellemzése

A transzformáns vonalakból (homozigóta  $T_2$ ), valamint a Golden Promise vad típusból 7-7 egyeden részletes fenotipizálását végeztük el (5. táblázat). Megállapítottuk, hogy a vizsgált 10 vonal (6 P1TP és 4 PI4K) közül a vad típushoz képest csak a PI4K L3 esetében növekedett meg a mért SPAD érték. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a vizsgált két génnek nincs jelentős hatása a növény klorofill tartalmára. A növénymagasság a P1TP L13, valamint a PI4K L6 növények esetében szignifikánsan csökkent a Golden Promise genotípushoz képest, ráadásul a transzformáns vonalak közül csak ennél a két vonalnál figyeltünk meg rövidebb főkalászokat.

A kalászolási-, illetve a virágzási idő tekintetében nem tapasztaltunk jelentős eltérést a *HvP1TP* és *HvPI4K* transzsgének következtében, csupán a PI4K L5 (kalászolási időben) és a P1TP L13 (virágzási időben) esetében figyeltünk meg kisebb különbségeket a vad típushoz viszonyítva. A hajtás biomassza száraz tömege a Golden Promise genotípushoz képest a P1TP L10 esetében megemelkedett, míg a P1TP L15 és PI4K L2 vonalaknál lecsökkent. A megvizsgált tíz transzformáns vonal közül a P1TP L13, PI4K L5,

valamint a PI4K L6 esetében a növényenkénti kalászkok száma jelentősen megnőtt a vad típusához viszonyítva. A főkalászban lévő magok tömege jelentősen csökkent a P1TP L13, a PI4K L2, a PI4K L5, illetve a PI4K L6 vonalaknál, ráadásul a PI4K L5 és a PI4K L6 növényeknél jelentősen csökkent a főkalászban lévő magok darabszáma is. A P1TP L13, P1TP L15, PI4K L5 és PI4K L6 vonalaknál csökkent a növényenként összes szemszám (főkalász + mellékkalász), ráadásul ezek közül a P1TP L13, P1TP L15 és PI4K L5 vonalak esetében a növényenként szemek tömege is lecsökkent. A transzformáns vonalak között az ezerszemtömeg értékek is csökkentek a P1TP L13, PI4K L2 és PI4K L6 vonalak esetében a vad típusához képest.

A vizsgált transzformáns vonalak közül három (P1TP L4, P1TP 9, P1TP 12) esetében nem figyeltünk meg jelentős eltérést a mért paraméterekben a Golden Promise genotípushoz képest.

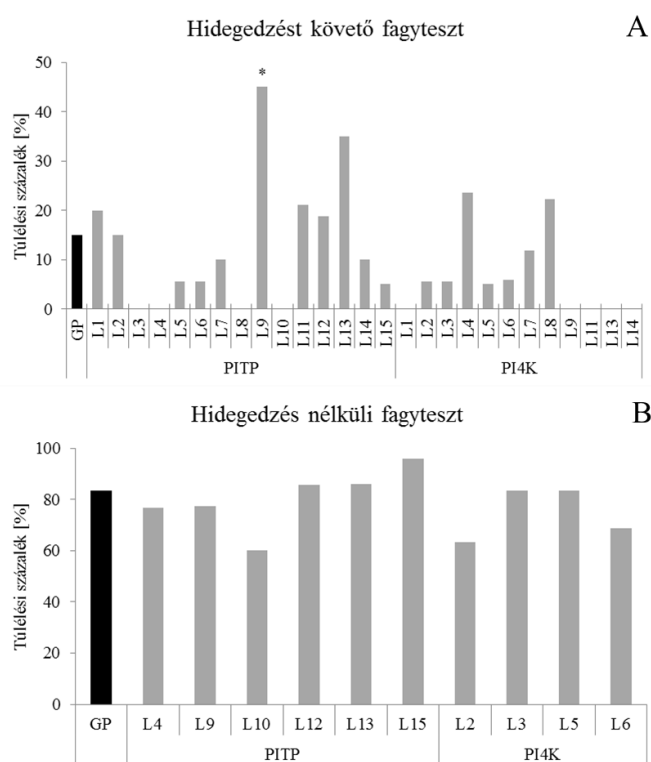
#### 9.2.4 Túltermelő vonalak fagytesztje

A transzgénikus P1TP és PI4K vonalak, valamint a Golden Promise vad típus alacsony hőmérsékleti stressztűrésének vizsgálatához Sutka (1981) alapján két különböző megközelítésben végeztünk fagyteszteket. Mivel a teszteket különböző időpontokban, valamint különböző nemzedékeken ( $T_1$  és  $T_3$ ) végeztük el, ezért a kísérletekben részt vevő vonalak száma eltér egymástól. Az első típusú kísérletben az előnevelést követően vonalanként húsz-húsz darab  $T_1$  szegregáló populációból származó transzformáns növényen, valamint a vad típuson hidegedzést végeztük. A négyhetes alacsony hőmérsékleti előkezelést követően kezdtük meg a növények fagyasztását, mely során a legalacsonyabb hőmérséklet  $-6^\circ\text{C}$  volt. A fagykezelést követően, majd a növények háromhetes regenerációja után értékeltük a fagyasztás károsító hatását. Megállapítottuk, hogy a P1TP L9, valamint a P1TP L13 vonalak bizonyultak a legellenállóbbnak a vizsgált huszonhét független transzformáns vonal (tizenöt P1TP és tizenkettő PI4K) közül, közel kétszer annyi transzformáns növény élte túl a  $-6^\circ\text{C}$ -os fagykezelést, mint amennyi a Golden Promise vad típus esetében (14/A. ábra). Az összes vizsgált vonal közül a P1TP L9 egyedei bizonyultak a legvitálisabbnak a fagyasztást követően: 45%-uk ( $P = 0,041$ ) volt képes a regenerációra. A vizsgált PI4K transzformánsok közül a PI4K L4 és PI4K L8 vonalak bizonyultak a legellenállóbbnak, melyek, habár nem szignifikáns, de kismértékű megemelkedett toleranciát mutattak a Golden Promise vad típusához hasonlítva.

5. táblázat: A PITP és PI4K transzformáns vonalak, valamint a Golden Promise fenotípezálása; a cellák értékei (átlag és szórás) genotípusonként hét-hét növényről (homozigóta T<sub>2</sub>) származnak; a vad típustól való eltérések jelölése: \*, \*\*, \*\*\*, ha  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ ; piros cella: szignifikánsan csökkent; zöld cella: szignifikánsan nőtt

	Golden Promise	PITP						PI4K			
		L4	L9	L10	L12	L13	L15	L2	L3	L5	L6
Klorofill tartalom [SPAD érték]	46,6 ± 4,9	49,7 ± 4,9	47,9 ± 4,3	50,5 ± 3,7	46,8 ± 3,4	44,0 ± 4,7	50,2 ± 5,4	44,0 ± 5,9	52,1* ± 6,5	45,9 ± 4,7	45,1 ± 5,7
Növénymagasság [cm]	45,4 ± 2,5	44,4 ± 1,7	46,0 ± 2,5	46,0 ± 1,5	46,1 ± 2,4	42,0* ± 2,6	48,1 ± 2,7	43,6 ± 3,5	45,1 ± 2,5	45,0 ± 2,9	42,0* ± 2,0
Kalászoslási idő (csíráztatás óta eltelt napok száma)	56,7 ± 1,8	56,1 ± 1,5	56,7 ± 2,1	56,0 ± 1,8	55,3 ± 2,1	57,7 ± 1,0	55,3 ± 1,4	55,4 ± 1,6	55,3 ± 1,0	54,7* ± 1,4	57,6 ± 1,3
Virágzási idő (csíráztatás óta eltelt napok száma)	59,1 ± 1,6	58,3 ± 1,0	58,9 ± 2,0	58,7 ± 1,8	58,4 ± 2,3	61,3* ± 1,5	58,7 ± 1,4	58,1 ± 1,3	57,9 ± 1,1	58,6 ± 1,0	59,9 ± 1,5
Hajtás biomassa száraz tömege [g]	14,5 ± 1,9	14,3 ± 2,5	13,4 ± 2,5	17,3* ± 2,5	13,4 ± 2,0	14,3 ± 2,6	11,5* ± 0,7	11,6* ± 2,5	12,4 ± 1,4	13,1 ± 2,1	13,1 ± 1,5
Növényenkénti kalászok száma (db)	10,0 ± 2,8	8,3 ± 1,5	9,1 ± 2,5	12,3 ± 1,7	10,1 ± 2,5	13,3* ± 4,1	7,6 ± 1,1	10,0 ± 2,0	9,6 ± 2,1	14,4** ± 3,7	14,9*** ± 2,5
Főkalász hossza [cm]	9,3 ± 0,8	9,1 ± 0,5	9,0 ± 0,4	9,6 ± 0,9	9,1 ± 1,2	8,2* ± 1,0	9,4 ± 0,6	8,8 ± 0,8	8,4 ± 0,9	8,4 ± 0,7	7,4*** ± 1,2
Főkalászban lévő magok tömege [g]	0,99 ± 0,2	0,91 ± 0,2	0,89 ± 0,1	0,89 ± 0,3	0,85 ± 0,2	0,46*** ± 0,3	0,77 ± 0,1	0,70* ± 0,3	0,90 ± 0,2	0,64** ± 0,1	0,44*** ± 0,2
Főkalász szemszáma (db)	28,4 ± 2,0	25,6 ± 4,6	24,6 ± 2,9	25,6 ± 6,6	24,0 ± 4,7	18,0 ± 11,0	24,1 ± 2,0	22,4 ± 6,6	26,9 ± 2,7	18,3** ± 3,4	16,9* ± 5,2
Növényenkénti szemszám (db)	164,0 ± 17,4	131,7 ± 46,6	130,6 ± 15,2	160,3 ± 42,3	128,0 ± 29,6	114,4** ± 42,4	113,6** ± 16,7	141,3 ± 50,4	147,3 ± 21,7	122,3* ± 17,6	107,1** ± 53,1
Növényenkénti szemek tömege [g]	4,96 ± 0,52	4,37 ± 1,58	4,40 ± 0,49	4,79 ± 1,46	3,95 ± 1,06	2,45** ± 0,95	3,34** ± 0,40	3,66 ± 1,30	4,31 ± 0,80	3,74* ± 0,49	2,59 ± 1,27
Ezerszemtömeg [g]	30,4 ± 3,4	33,2 ± 3,6	33,8 ± 2,3	29,5 ± 3,9	30,8 ± 3,6	21,2*** ± 3,0	29,7 ± 3,8	26,4* ± 4,1	29,3 ± 3,1	30,7 ± 2,6	24,4** ± 2,9

A második típusú fagytesztnél a homozigóta  $T_3$  populációból származó transzformáns vonalakat (6 P1TP és 4 P14K), valamint a Golden Promise vad típust hidegedzés nélkül vetettük alá a fagyasztásnak. A növényeket  $-3^\circ\text{C}$  és  $-5^\circ\text{C}$  hőmérsékleteken kezeltük 16 órán keresztül, majd három hét regenerációt követően értékeltük a fagy okozta károsodást, a túlélés mértékét. Megfigyeltük, hogy  $-3^\circ\text{C}$ -on fagyasztva a vizsgált transzformáns P1TP és P14K vonalakat, valamint a Golden Promise vad típus között nincs szignifikáns eltérés (14/B. ábra). Megállapítottuk azt is, hogy hidegedzés nélkül a  $-5^\circ\text{C}$  fagyasztási hőmérséklet letális az összes vizsgált genotípus számára, sem a transzformáns P1TP és P14K vonalakat, sem a Golden Promise vad típus nem élte túl az alkalmazott kezelést.



14. ábra: A transzgenikus P1TP és P14K vonalakat, valamint a Golden Promise vad típus  $-6^\circ\text{C}$  (A,  $T_1$  hasadó populációból) és  $-3^\circ\text{C}$  (B, homozigóta  $T_3$  populációból) fagyasztási hőmérsékleteket követő regeneráció mértéke túlélési százalékban kifejezve. A vad típustól való eltérés jelölése: \*, ha  $P \leq 0,05$ .

A CBF transzkripciós faktoroknak a növények fagyűrésében betöltött szerepe régóta ismert, részletesen tanulmányozott. Alacsony hőmérséklet hatására génkifejeződésük mértéke megnő, ezáltal célgénjeik szabályozásában kiemelkedő szerepet játszanak (lásd 6.2 fejezet). Az általunk alkalmazott, kifejezetten a gabonafélék

transzformálásához tervezett pBract214 vektorban az *ubikvitin* promóter biztosította a *HvPITP* és *HvPI4K* transzgénnek konstitutív működését (12/A. és 12/D. ábra). A fagytesztek alapján tapasztalt alacsony hőmérsékleti stressztolerancia eredmények alapján elhatároztuk, hogy a PITP és PI4K túltermelő vonalakban megvizsgáljuk a fagyűrész kialakításában bizonyítottan szerepet bíró néhány *HvCBF* gén (*HvCBF4B*, *HvCBF9*, *HvCBF12* és *HvCBF14*) expressziós profilját is. A Real-Time qPCR mérést a 8.2.2 fejezetben leírtak szerint végeztük el. Szakirodalomból származó, illetve saját tervezésű primerpárokat is használtunk a génexpressziós értékek meghatározásához (1. melléklet). A magas szintű *HvPITP* és *HvPI4K* expressziós értékek ellenére egyik transzformáns vonalnál sem tapasztaltunk a Golden Promise vad típushoz képest jelentős eltérést a vizsgált *HvCBF* gének működésében (7. melléklet).

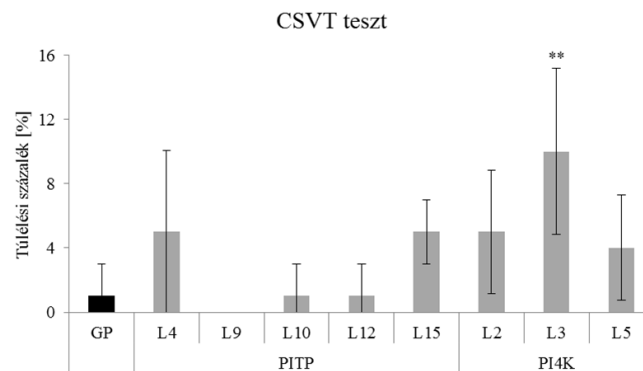
### 9.2.5 Transzgénikus vonalak sótesztje

Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint sóstressz hatására a *HvSEC14p* (*PITP* génnel homológ) kifejeződése különböző árpa genotípusok esetében fokozódott, mely hatás ráadásul fehérje szinten is megjelent (Kielbowicz-Matuk et al., 2016). E publikáció alapján kezdtük el a *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő növények sóstressz tűrésének vizsgálatait. A kísérletben hat PITP és négy PI4K homozigóta T<sub>3</sub> vonalat, valamint a Golden Promise vad típust vizsgáltuk, különböző fejlettségi állapotban, ½ Hoagland oldatot kontrollként, valamint 150 mM NaCl-dal kiegészített ½ Hoagland oldatot alkalmazva (2. táblázat).

Az első kísérletben a NaCl indukálta sóstressz csírázásra kifejtett hatását vizsgáltuk. Nem tapasztaltunk jelentős különbséget sem a hajtás- (8/A. melléklet), sem a gyökérhosszban (8/B. melléklet) a transzformáns vonalak, valamint a Golden Promise vad típus között. A második típusú NaCl tolerancia kísérletben fiatal transzformáns növényeket, valamint a vad típust hidropónikus körülmények között vizsgáltuk. A sókezelést követően meghatároztuk a növények hajtáshosszát, hajtástömegét (9/A. és 9/B. melléklet), gyökérhosszát, gyökértömegét (9/C. és 9/D. melléklet), a hajtások SPAD értékét (9/E. melléklet), valamint relatív víztartalmát (9/F. melléklet) is. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy egyik *HvPITP* vagy *HvPI4K* túltermelő vonal sem mutatott fokozott fiatalkori sótoleranciát a Golden Promise vad típushoz képest.

## 9.2.6 Túltermelő növények CSVT tesztje

A transzgenikus vonalak alacsony hőmérsékleti stressztoleranciáját tovább vizsgálva egy csírákori alacsony hőmérséklettel kombinált hipoxiás kezelést is alkalmaztunk. A kísérletbe öt PITP és három PI4K vonalat (homozigóta  $T_3$ ), valamint a Golden Promise vad típust vontuk be. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott stresszkezelés majdnem letális volt a vad típus számára, ezzel ellentétben néhány transzgenikus vonal kevésbé károsodott (15. ábra). A PITP L4, PITP L15, PI4K L2 és PI4K L5 vonalak közel azonos mértékben éltek túl a kezelést, kismértékű fokozott toleranciát tapasztaltunk a vad típushoz képest. A PI4K L3 vonal esetében jelentősen megnőtt ( $P = 0,005$ ) a túlélési százalék az alkalmazott stresszkezelést követően a Golden Promise genotípushoz képest, az alacsony hőmérséklettel kombinált hipoxia ellenére a transzgenikus magok 10%-a vitálisnak bizonyult és képes volt a csírázásra.



15. ábra: A transzgenikus PITP és PI4K vonalak, valamint a Golden Promise vad típus alacsony hőmérséklettel kombinált hipoxiás stresszkezelést követő regeneráció mértéke túlélési százalékban kifejezve. A vad típustól való eltérés jelölése: \*\*, ha  $P \leq 0,01$ .

A PI4K L3 vonal nem csupán nagyobb mértékben élte túl a stresszkezelést a vad típushoz képest, hanem e vonal esetében jelentősen megnőtt ( $P = 0,031$ ) a nagy vigorú csírák száma is (6. táblázat).



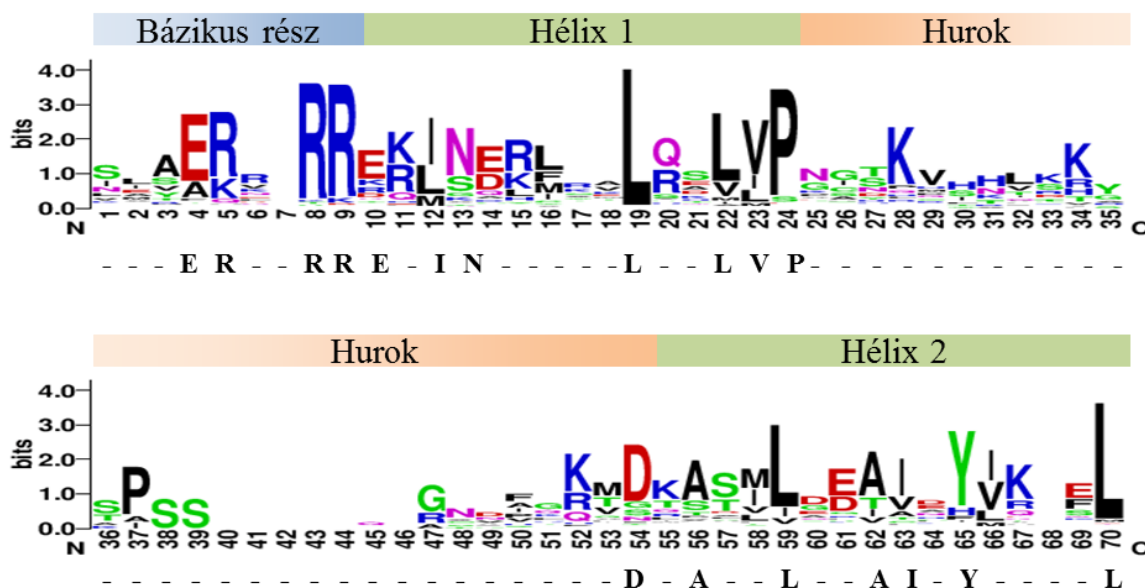
6. táblázat: CSVT kezelést követően nagy vigorú csírák száma a *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő transzformáns növények, valamint a Golden Promise vad típus esetében; a vad típustól való eltérés jelölése: \*, ha  $P \leq 0,05$ ; zöld cella: szignifikánsan nőtt

Golden Promise	PITP					PI4K		
	L4	L9	L10	L12	L15	L2	L3	L5
1,0 ± 2,0	4,0 ± 3,3	0,0 ± 0,0	1,0 ± 2,0	1,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	5,0 ± 3,8	7,0* ± 3,8	3,0 ± 2,0

### 9.3 *HvPIF* szekvenciák *in silico* azonosítása

#### 9.3.1 Az árpa bHLH fehérjecsald azonosítása

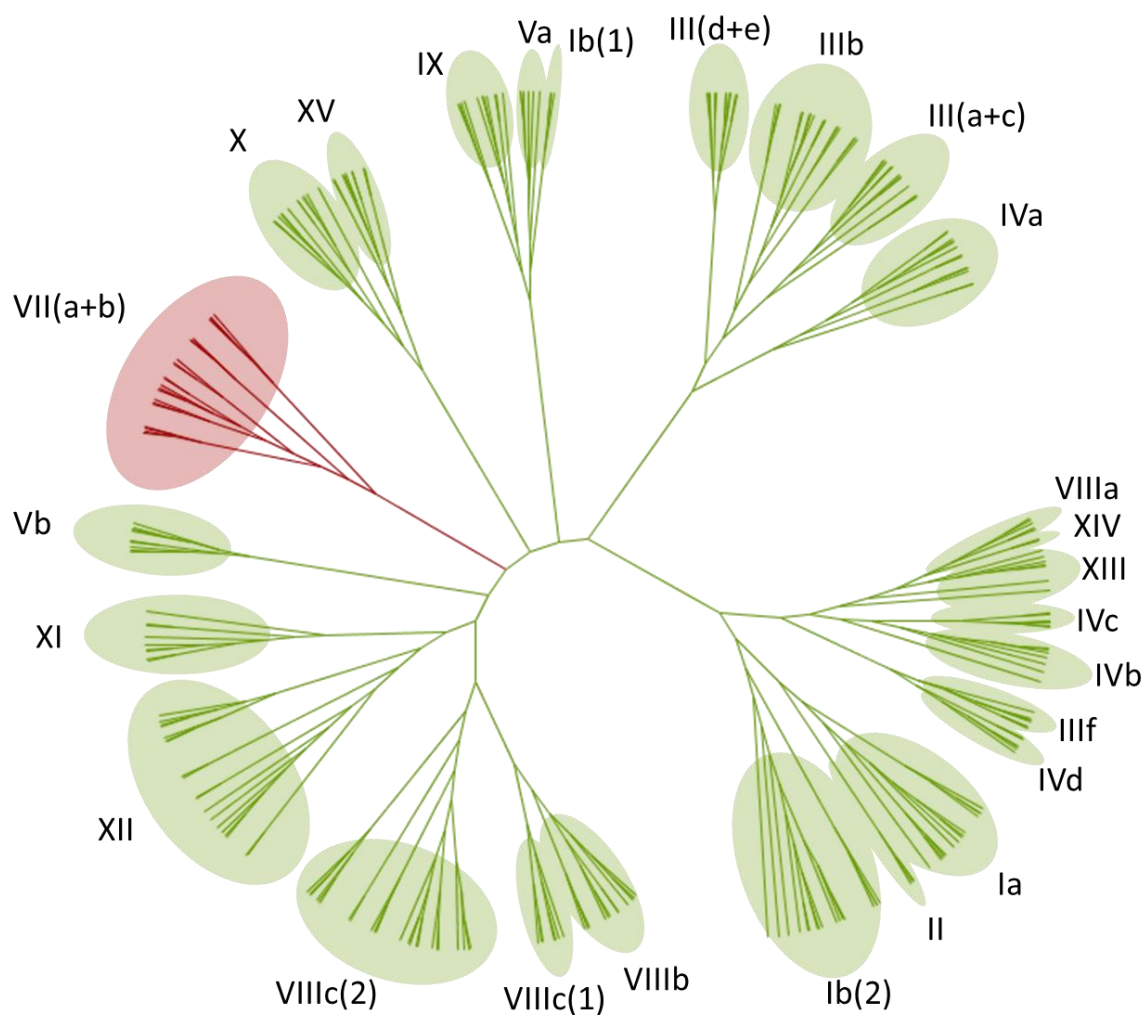
A gabonafélék jelátviteli útvonalai közül a távoli-vörös tartományába eső fény hatására aktiválódott útvonalak kevésbé tanulmányozottak. Jelen disszertáció egyik célja az volt, hogy *in silico* módszerekkel azonosítsuk az árpa fitokróm fehérjékkel kapcsolatot kialakító PIF transzkripciós faktorokat. Ehhez az aktuálisan elérhető legújabb verziójú árpa proteomot használtuk fel a HMM módszer, valamint a HLH domén profil felhasználásával. Összesen 1036 bHLH fehérjét kódoló szekvenciát azonosítottunk az árpa proteomban. A nem kívánt redundancia csökkentésével 183 aminosav szekvenciát vontunk be a filogenetikai elemzésekbe és homológia vizsgálatokba (mely esetében további szigorításokat végeztünk a génvariánsok manuális kizárásával). Megállapítottuk, hogy minimum 50%-os lefedettség mellett az árpa bHLH szekvenciák konszenzus része a bázikus régióban az E<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>; a Hélix 1-nél az E<sub>10</sub>, I<sub>12</sub>, N<sub>13</sub>, L<sub>19</sub>, L<sub>22</sub>, V<sub>23</sub>, P<sub>24</sub>; a Hurok régióban a D<sub>54</sub>; a Hélix 2-nél az A<sub>56</sub>, L<sub>59</sub>, A<sub>62</sub>, I<sub>63</sub>, Y<sub>65</sub> és az L<sub>70</sub> (16. ábra).



16. ábra: Az árpa bHLH fehérjét kódoló szekvenciák többszörös illesztése alapján készített grafikus ábrázolás. A betűk nagysága az adott aminosav konzerváltságát reprezentálja. Az ábra alatti félkövér betűk a szekvencia konszenzus részét jelölik – minimum 50%-os lefedettség mellett. A betűk színezése az aminosavak kémiai tulajdonsága alapján készült (zöld: poláros, kék bázikus, piros: savas, fekete: hidrofób, lila: hidrofil). Az aminosavak számozása a bázikus rész N-terminális részének egy általunk kijelölt helyéről indul.

### 9.3.2 Az árpa bHLH fehérjék filogenetikai csoportosítása

Az azonosított 183 árpa bHLH szekvencia alcsoportokba sorolásához, valamint az árpa *PIF* gének azonosításához filogenetikai elemzéseket végeztünk. Az elemzésbe már ismert, *Arabidopsis* modellnövényben (*At*) és rizsben (*Os*) azonosított bHLH fehérjék alcsoportjainak reprezentatív elemeit, valamint *At*, *Os* és szója (*Gm*) *PIF* szekvenciákat is bevontunk (3. táblázat). Megállapítottuk, hogy az árpa bHLH fehérjéi huszonöt alcsoportba sorolhatók (17. ábra és 10. melléklet). A filogenetikai elemzés során megfigyeltük továbbá azt is, hogy a XIV alcsoport nem tartalmaz egyetlen árpa bHLH szekvenciát sem.

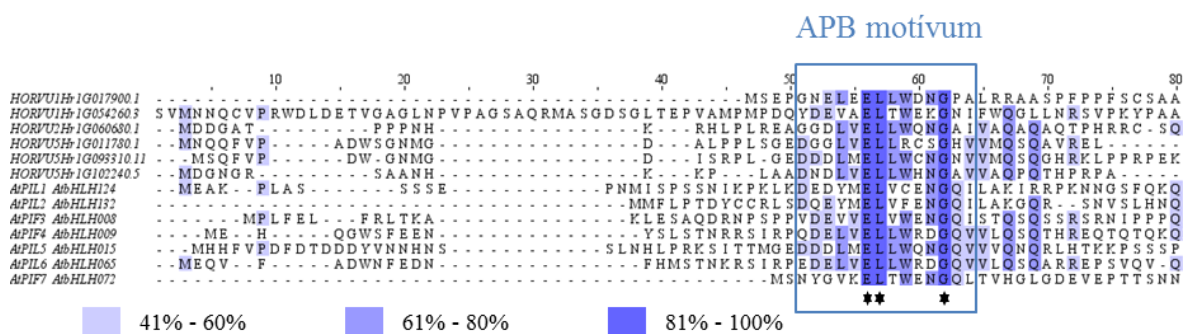


17. ábra: Az árpa bHLH fehérjéinek filogenetikai csoportosítása. A színes ellipszisek az árpa bHLH alcsoportokat reprezentálják, melyeket Pires és Dolan (2010) alapján neveztünk el. Az ismert *At*, *Os* és *Gm* PIF szekvenciákat tartalmazó alcsoportot piros háttérszín jelöli. A részletes topológiát a 10. melléklet tartalmazza.

A filogenetikai vizsgálat kimutatta, hogy a 183 szekvencia közül a VII(a+b) alcsoport 11 árpa bHLH szekvenciát tartalmaz (17. ábra, piros ellipszis), azonban ezek közül három (HORVU1Hr1G054260.3, HORVU1Hr1G054260.4 és HORVU1Hr1G054260.9) nem kódol egyedi gént; valószínűsíthető, hogy ezek génvariánsokat jelölnek. E három találat alaposabb vizsgálata során megállapítottuk, hogy közülük csupán egy (HORVU1Hr1G054260.3) tartalmazza (az N-terminális részén) teljes egészében a bHLH domént, ezért a másik két szekvenciát nem vizsgáltuk tovább. Összesen 9 egyedi árpa bHLH szekvenciát azonosítottunk a 183 közül, melyek a VII(a+b) alcsoportba sorolhatóak, ezek azok, amelyek feltehetően az árpa PIF fehérjét kódoló szekvenciákat is tartalmazzák.

9.3.3 *Hv*PIF szekvenciák azonosítása, motívumkeresés

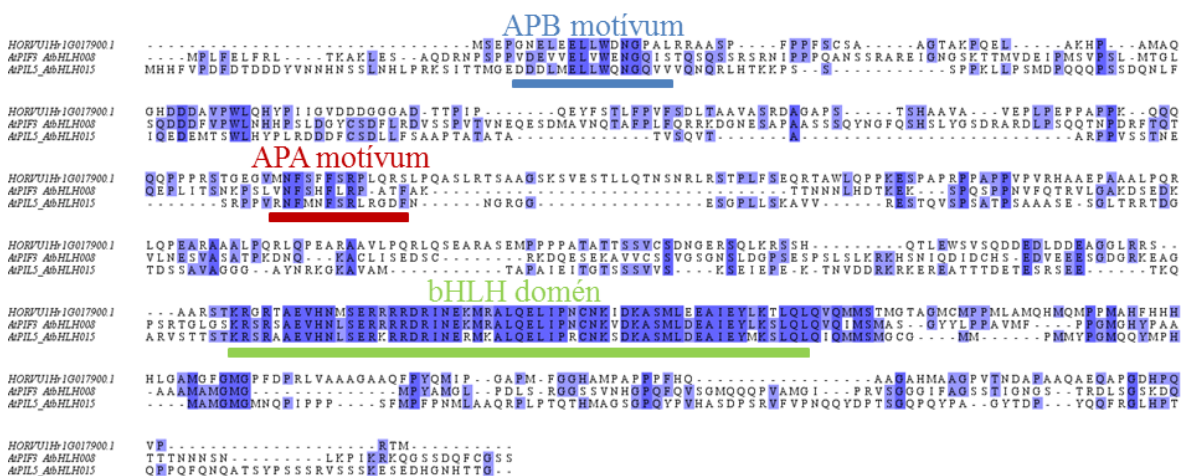
A VII(a+b) alcsoportba sorolt kilenc egyedi árpa bHLH szekvencia között motívumkeresés alapján határoztuk meg a feltételezhető *Hv*PIF szekvenciákat. Mivel az *At* és *Os* PIF szekvenciák mindegyike tartalmazta az APB motívumot (lásd 6.5.2 fejezet), ezért az általunk azonosított 9 bHLH szekvenciát, valamint az *At*PIF és *At*PIL szekvenciák N-terminális részét többszörös szekvencia illesztéssel hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy a 9 árpa szekvencia közül három (HORVU6Hr1G088020.4, HORVU2Hr1G104040.6 és HORVU7Hr1G026560.2) nem tartalmazza az APB (vagy ahhoz hasonló) motívumot. Ezzel szemben hat árpa bHLH esetében nagyfokú hasonlóságot mutattunk ki a szekvenciák N-terminális részében az *At* APB motívumával (18. ábra), ami arra enged következtetni, hogy az árpa genomja legalább 6 *PIF* szekvenciát kódol. A 6 feltételezett PIF szekvencia (*At*PIF és *At*PIL szekvenciák nélküli) többszörös illesztése alapján megállapítottuk, hogy az árpa APB motívuma 7 konzervált aminosavat tartalmaz (minimum 80%-os lefedettség mellett): L<sub>54</sub>, E<sub>56</sub>, L<sub>57</sub>, L<sub>58</sub>, W<sub>59</sub> és G<sub>62</sub>.



18. ábra: A hat feltételezett árpa PIF, valamint az *At*PIF és *At*PIL szekvenciák N-terminális részének többszörös szekvencia illesztése. A három különböző árnyalatú kék négyszög a konzerváltság mértékét mutatja különböző lefedettségi tartományon belül (világoskék: 41%-60%, kék: 61%-80%, sötétkék: 81%-100%). A „\*” 100%-os megegyezést mutató aminosav-helyeket jelöl. Az aminosavak számozása a leghosszabb szekvencia (HORVU1Hr1G054260.3) első aminosavának helyéről indul. A bekeretezett rész az APB motívumot reprezentálja (Khanna et al., 2004).

A hat feltételezett *Hv*PIF további vizsgálata során megállapítottuk azt is, hogy az egyik szekvencia (az APB motívum mellett) tartalmazza az APB és a bHLH domén között lokalizált APA motívumot (Al-Sady et al., 2006; Shen et al., 2008) is (19. ábra). Az *in silico* eredményeink összegzése alapján azt feltételezzük, hogy az árpa proteomból csak

egyetlen, a HORVU1Hr1G017900.1 fehérje képes kapcsolatot kialakítani (az APB és APA motívumok megléte miatt) mind a fitokróm B, mind a fitokróm A fehérjékkel.



19. ábra: A HORVU1Hr1G017900.1 fehérjét kódoló szekvencia, valamint APA motívumot kódoló *At* szekvenciák (*At*PIF3\_ *At*bHLH008 és *At*PIL5\_ *At*bHLH015) illesztése. A zölddel aláhúzott szekvencia rész a bHLH domént, a késsel aláhúzott rész az APB motívumot, a pirossal aláhúzott szekvencia rész az ismert *At* APA motívumot, valamint az ez alapján a feltételezett árpa APA motívumot jelöli. A három szekvencia illesztése alapján a konzervált aminosavak kettő egyezés esetén világoskék, három egyezés esetén sötétkék jelölést kaptak.

Az *in silico* módszerekkel azonosított, feltételezett *Hv*PIF-ek aminosav szekvenciái 341-547 közötti hosszúságúak, 4-7 exonból állnak, az 1H, 2H, vagy 5H kromoszómán lokalizáltak, kódoló részük pedig 1736-4871 bázispárból áll (7. táblázat).

7. táblázat: Az *in silico* módszerekkel azonosított, feltételezett árpa PIF-ek jellemzése

Ensembl Plants azonosító	Kromoszóma	Aminosav szekvencia hossza	Kódoló szekvencia (bp)	APB motívum	APA motívum
HORVU1Hr1G017900.1	1H	493	3463	✓	✓
HORVU1Hr1G054260.3	1H	464	1736	✓	-
HORVU2Hr1G060680.1	2H	362	2239	✓	-
HORVU5Hr1G011780.1	5H	341	4871	✓	-
HORVU5Hr1G093310.11	5H	547	2104	✓	-
HORVU5Hr1G102240.5	5H	396	3033	✓	-

## 10 AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 10.1 Foszfolipid- és $\text{Ca}^{2+}$ jelátvitel, valamint *HvCBF* gének cirkadián ritmusa

A növényi cirkadián óra elemei (óragének) egy negatív visszacsatoláson alapuló, három elemű, önfenntartó ritmust biztosító hálózatot alkotnak (3. ábra). A reggeli hurok egyik központi génje a *CCA1*, míg a *TOC1* az esti hurok kulcsfontosságú eleme (Huang és Nusinow, 2016). A foszfolipid jelátviteli útból megvizsgált *HvPITP* és *HvPI4K* gének határozott cirkadián ritmust mutattak a teljes kísérlet alatt, ami a központi oszcillátor megfelelő működésére utal.

Meglepő módon, a kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a *HvCCA1* gén működése folyamatos megvilágítás esetén alig érzékelhető, ezzel szemben a *HvTOC1* gén konstans fény mellett is megőrizte cirkadián ritmusát, de távoli-vörös kiegészítés hatására amplitúdója drasztikusan lecsökkent. A *HvCCA1* gén folyamatos megvilágítás melletti gyenge működése arra enged következtetni, hogy e gén erőteljes működése, vagy a róla átíródó fehérjének a jelenléte sem létfontosságú a központi óra megfelelő működéséhez, azaz a növény belső ritmusának fenntartásához. Deng et al. (2015) megállapították, hogy folyamatos fényben, vagy folyamatos sötétben csíráztatott árpák *HvCCA1* és *HvTOC1* óragénjei állandó hőmérséklet mellett periodicitás nélkül fejeződnek ki, bizonyítva ezzel a környezeti hatások (ebben az esetben a fényciklusok) elengedhetetlen szerepét a központi oszcillátor beállításában (finomhangolásában). Érdekes módon, a *HvCCA1* esetében egy folyamatos, nagyon alacsony génkifejeződést detektáltak konstans megvilágítás hatására, viszont a növényeket sötétben tartva a *HvCCA1* gén expressziós értékei megemelkedtek. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a fény mint környezeti faktor gátló hatással van a *HvCCA1* óragén működésére, mely feltevés magyarázhatja a mi eredményeinket is.

Ford et al. (2016) sötétben csíráztatott árpa növények esetében tanulmányozták a hőmérséklet napszakos változásának hatását a *HvCCA1* és *HvTOC1* gének kifejeződésére. Megfigyelték, hogy mind a két gén cirkadián ritmust mutat, viszont különbözően reagálnak a környezet hőmérsékletére. A *CCA1* gén 15°C-os hőmérsékleten alacsonyabb génextpressziós értékeket mutatott, mint 25°C-on, bizonyítva ezzel az alacsony hőmérséklet

*HvCCAI* génre kifejtett gátló hatását. Ezzel szemben a *HvTOCI* gén mind 25°C-on, mind 15°C-on hasonló expressziós szintet mutatott.

Endo et al. (2014) *Arabidopsis* modellnövény segítségével, az általunk árpánál használt nevelési körülményekhez hasonló beállítások mellett vizsgálták az *AtCCAI* és *AtTOCI* gének működését. Kísérletük során egy héten keresztül, folyamatos megvilágítás mellett nevelték a növényeket, majd vizsgálták az óragének expressziós mintázatát. Megállapították, hogy az *AtTOCI* gén az egyhetes fénykezelés ellenére is megőrizte cirkadián ritmusát, míg az *AtCCAI* gén nem, mivel az folyamatos, alacsony szintű expressziót mutatott. Az általunk vizsgált árpa *HvCCAI* és *HvTOCI* gének hasonlóképpen reagált a fénykezelésre (7. ábra); kifejeződésük nagyfokú hasonlóságot mutat, mellyel alátámasztottuk az *Arabidopsis* modellnövényénél kapott eredményeket az egyszikű árpa gabonanövény esetében is.

Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az *Arabidopsis*  $[Ca^{2+}]_{cit}$  a nap folyamán cirkadián ritmus szerint változik (Johnson et al., 1995), mely periodicitás érzékenyen reagál a fényintenzitásra és a megvilágítás időtartamára (Love et al., 2004) is. Vajon ez a ritmus közvetlenül az óragéneknek, tehát a központi oszcillátornak a hatása lehet? A  $[Ca^{2+}]_{cit}$  periodicitását befolyásoló környezeti tényezők, például a fent említett publikációkban a fény mint jel, hogyan befolyásolhatja a kalcium ionok sejten belüli – térbeli és időbeli – elhelyezkedését? Webb (2003) eredményei alapján a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  cirkadián ritmusát nem közvetlenül az óragének biztosítják. A szerző valószínűsíti, hogy a központi oszcillátor módosítja más gének napi ritmusát, melyek szerepet játszanak – akár közvetlenül, akár közvetett módon – a növényi  $Ca^{2+}$  csatornák aktiválásában vagy éppen represszáálásában, végső soron így befolyásolva ezzel a  $Ca^{2+}$  ionok mobilitását.

Munkánk kezdetén ezért meghatároztuk a *HvPITP* és *HvPI4K* gének napi ritmusát. Ennek során megállapítottuk, hogy e gének a központi oszcillátor irányítása alatt állnak, cirkadián ritmust mutatnak. A foszfolipid jelátviteli útvonalban szereplő ezen két gén kifejeződése a késő éjszakai, kora reggeli órákban éri el a maximumát, és mind a kettő reagál a fényminőség változására (esetünkben távoli-vörös fénykiegészítésre) is (8. ábra). Mivel szerepük a növényi jelátviteli útvonalban többek között az endoplazmatikus retikulumban tárolt  $Ca^{2+}$  ionok felszabadítása az  $IP_3$  vezérelt  $Ca^{2+}$  csatornák regulálása által (Ruelland et al., 2015), így feltételezhetjük, hogy e két gén napi ritmusa – illetve

valószínűleg a cirkadián óra foszfolipid jelátviteli útvonalra gyakorolt hatása – közvetett módon befolyásolhatja a növényi sejt  $[Ca^{2+}]_{cit}$  cirkadián ritmusát.

A citoplazmában lévő  $Ca^{2+}$  ionok koncentrációját meghatározó, azokkal közvetlenül vagy közvetve kapcsolatba hozható gének közül több *HvPLC*, *HvPLD*, valamint kalcium-kötő fehérjéket kódoló gén expresszióját is vizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy a *HvPLD* génexpressziója követi a nappalok és éjszakák váltakozását (9/A. ábra), mely eredmény arra utalhat, hogy a fény mint környezeti jel a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  periodikus változásának újabb szabályozó eleme. Számos kalcium-kötő fehérjét kódoló gén vizsgálata során megállapítottuk, hogy a *HvCBL2*, *HvCaM.2* és a *HvCDPK12* gének kifejeződése a nap folyamán periodikusan változik (9/B. - 9/D ábra). Valószínű, hogy e ritmus a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  periodikus változása és a kalcium-kötő fehérjék közötti közvetlen kapcsolat eredménye. Nagyon kevés szakirodalmi adat található, mely a kalcium-kötő fehérjéket kódoló gének és a cirkadián óra közötti kapcsolatot vizsgálja növényekben. Ezek egyikében (Wu és Jinn, 2012) leírták, hogy magas hőmérsékleti stressz esetén a rizs *CaMI-1* gén expressziós mintázatát a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  napi ritmusa és a periódusának amplitúdója is befolyásolja.

Kimutattuk továbbá, hogy a vizsgált  $Ca^{2+}$  jelátviteli útvonalban szereplő gének közül kettőnek (*HvPLC.1* és *HvCAMTA3*) a működését a távoli-vörös fénykiegészítés befolyásolja (3/C. és 3/D. melléklet), ami bizonyíthatja e két génnek a fényminőségtől függő szabályozó mechanizmusban betöltött lehetséges szerepét. Azonos környezeti körülmények mellett a vizsgált két *HvCaM* gén esetében mind ritmicitásuk, mind fényminőségre adott válaszuk alapján merőben eltérő expressziós mintázatot figyeltünk meg. A *HvCaM.1* kifejeződésére sem a cirkadián óra, sem a távoli-vörös fénykiegészítés nem volt hatással, míg a *HvCAM.2* napi ritmust, valamint fokozott génműködést mutatott az alkonyati fényösszetételhez hasonló spektrum hatására. E funkcionális divergencia magyarázatul szolgálhat arra, hogy hogyan képes a növényi genomban kódolt több száz kalcium-kötő fehérje (Day et al., 2002) oly szerteágazó válaszmechanizmust kiváltani (Ranty et al., 2016) különböző környezeti hatások során.

A növényi  $[Ca^{2+}]_{cit}$  változását különböző környezeti hatásokra/stresszekre számos tanulmányban vizsgálták már. Ilyen például Thomashow (1999) összefoglaló tanulmánya is, mely részletesen tárgyalja az alacsony hőmérséklet növényekre kifejtett hatását, a sejtműködés stresszhatásokkal szembeni molekuláris szabályozását. Hideg hatására a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  gyorsan megemelkedik, mely koncentrációemelkedés leginkább az extracelluláris



térből, vagy a vakuólumok membránján lévő csatornákon keresztül a sejtplazmába áramló  $\text{Ca}^{2+}$  ionoknak tulajdonítható (Knight et al., 1996). A  $\text{Ca}^{2+}$ , a kalcium-függő fehérjék, valamint az *AtCBF* transzkripciós faktorok közötti szoros kapcsolatot Doherty et al. (2009) szakcikke igazolja. A szerzők bizonyították, hogy alacsony hőmérsékleten az *AtCAMTA3* gén szerepet játszik az *AtCBF1* és *AtCBF2* gének (melyek számos hidegtűrésben fontos gént – például *AtCOR*-ok – szabályoznak) működésében, valamint, hogy az *AtCAMTA3* hiányos növények hideggel szembeni érzékenysége fokozottan megnő. Fontos azonban megemlíteni, hogy Marozsán-Tóth et al. (2015) eredményei arra is rámutatnak, hogy nem mindegyik árpa *CBF* gén szabályozásában játszik szerepet a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonal. Vizsgálataik során *HvPLC* és *HvPLD* útvonalakat, valamint különböző  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat inhibitorokkal blokkolták és kimutatták, hogy a *HvCBF4*-alcsoporthoz tartozó *HvCBF9* és a *HvCBF14* gének expressziója a kezelés hatására csökkent, míg a *HvCBF3*-alcsoporthoz tartozó *HvCBF12* és a *HvCBF6* gének kifejeződésében az inhibíció nem okozott változást.

Kétségtelen, hogy a *CBF* transzkripciós faktoroknak kiemelkedő szerepük az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia kialakításában van, ám Badawi et al. (2007) nem induktív körülmények között – tehát a hideg indukáló hatását kizárva – vizsgálva a búza *CBF*-ek napi kifejeződésének változásait, kimutatták, hogy számos *TaCBF* gén a mesterséges fény bekapcsolása után 8-14 órával éri el amplitúdójának maximumát. Emellett azt tapasztalták, hogy a vizsgált gének legintenzívebb működése a nap folyamán nem a leghidegebb időszakban következik be. Skinner et al. (2005) árpa modellnövényben vizsgálták a *HvCBF*-alcsoportok tagjainak hőmérsékletfüggő expresszióját. Megfigyelték, hogy hideg hatására ( $2^{\circ}\text{C}$ ) a *HvCBF4*-alcsoport tagjai 1-4 órán belül indukálódtak, és a legintenzívebb génműködés a 4. és 8. óra közötti időszakban jelentkezett. Bár a *HvCBF3*-alcsoport egyes tagjai működésbe léptek a hidegkezelés hatására, de a *HvCBF4*-alcsoport génjeivel összehasonlítva nagyon alacsony expressziós szintet mutattak.

Munkánk során kimutattuk, hogy  $22^{\circ}\text{C}$ -os nevelési körülmények között a *HvCBF3*-alcsoport tagjai közül csak a *HvCBF3* és a *HvCBF6* gének indukálódtak (10. ábra), míg a *HvCBF4*-alcsoport összes génje kifejeződött (11. ábra). Búzában végzett kísérletek során Stockinger et al. (2007) azt tapasztalták, hogy azonos körülmények között nevelt növényeknél a *TaCBF2*, *TaCBF9* és *TaCBF14* gének az őszi fajtákban magasabb génextpressziós értékeket mutatnak, mint a tavaszi fajtákban. Knox et al. (2010) molekuláris vizsgálataik során megfigyelték, hogy a *HvCBF2* és *HvCBF4* gének

(*HvCBF4*-alcsoport tagjai) a Nure, vagy a Dicktoo őszi árpa fajtákban több kópiában kódoltak, mint a tavaszi Tremois vagy a Morex árpa fajtákban. A szerzők a CBF transzkripciós faktorok magasabb kópiaszámával magyarázták a tavaszi és az őszi árpa fajták hidegtűrés/fagyűrés mértéke közötti különbségeket. Fontos megállapítás, hogy a *HvCBF9* és a *HvCBF14* gének (*HvCBF4*-alcsoport tagjai) – természetesen más *HvCBF* gének mellett – is az *Fr-H2* lókuszon helyezkednek el (Francia et al., 2007), mely régió bizonyítottan kiemelkedő szereppel bír a gabonafélék fagyállóságának kialakításában (lásd 6.2 fejezet). Wang et al. (2016c) az árpa CBF gének filogenetikai alcsoportjait és a növény fagyűrése közötti összefüggéseket vizsgálták részletesen. Génexpressziós eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy árpa esetében a *HvCBF4*-alcsoportnak sokkal nagyobb jelentősége van az alacsony hőmérsékleti stresszel szembeni védelemben, mint a *HvCBF3*-alcsoportnak.

A *HvCBF* gének három filogenetikai alcsoportjának fehérje szintű vizsgálatai során Skinner et al. (2005) arra az eredményre jutottak, hogy a *HvCBF1*- és *HvCBF3*-alcsoporthoz tartozó gének által kódolt proteinek mind alacsony, mind magas hőmérsékleten képesek célgénjeik CRT motívumához kapcsolódni, míg a *HvCBF4*-alcsoport tagjai csak alacsony hőmérsékleten képesek ugyanerre. Talán e hőmérséklet-függő képességük különbözteti meg a *HvCBF* gének alacsony hőmérsékleti stressztoleranciában betöltött szerepét más abiotikus stresszek elleni védelemben betöltött szerepétől. Az a hőmérsékleti „küszöbérték”, amely elég alacsony ahhoz, hogy indukálja a fagyűrésben fontos CBF transzkripciós faktorokat kódoló géneket, pozitív korrelációban áll a növény alacsony hőmérsékleti stressztolerancia mértékével: az extrém alacsony hőmérsékleten is túlélő Norstar őszi búzafajta esetében 5,4°C-kal magasabb ez a hőmérsékleti küszöbérték, mint a kevésbé toleráns Manitou búzafajtánál. Ráadásul, Galiba et al. (2009) megállapították azt is, hogy a hideg akklimatizációhoz szükséges idő lényegesen rövidebb a jobb hidegtűréssel bíró gabonafajták esetében, mint az arra érzékenyeknél, bizonyítva ezzel gyorsabb alkalmazkodási képességüket az alacsony hőmérséklettel szemben.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy sem a *HvCBF3*, sem a *HvCBF6* gének (*HvCBF3*-alcsoport tagjai) nem rendelkeznek cirkadián ritmussal (10. ábra), viszont az összes *HvCBF4*-alcsoport génje – melyek mindegyike hideg indukálható is – a központi oszcillátor hatása alatt áll, vagyis napi ritmussal rendelkezik (11. ábra). Az óragének és a CBF transzkripciós faktorok között fennálló közvetlen kapcsolatot molekuláris szinten is

bizonyították már. Megállapították, hogy a *CBF* gének indukciójában közvetlenül szerepet játszik a *CCA1* fehérje, mivel az képes kapcsolódni a *CBF* gének promóteréhez (Dong et al., 2011; Seo et al., 2012). E tény arra utal, hogy a *CCA1* (és valószínűleg az *LHY*) gének működése hozzájárul a *CBF* indukcióhoz. Az óragének és a *CBF* transzkripciós faktorok közötti bizonyított kapcsolat alapján Maibam et al. (2013) szerint a cirkadián óra azzal járul hozzá a megfelelő alacsony hőmérsékleti stressz elleni védelem kialakításához, hogy időzíti az olyan fontos gének kifejeződését, mint például a *CBF* géncsalád. Eredményeink alapján ez azonban – legalábbis a *HvCBF4*-alcsoport tagjai esetében – csak a nappalok és éjszakák váltakozása esetében igaz, folyamatos megvilágítás mellett nem, mivel ekkor a *HvCCA1* elveszíti periodicitását (7/A. ábra).

A *HvCBF4*-alcsoport tagjainak tanulmányozása során azt is megfigyeltük, hogy az alkonyati fényhez hasonló fényösszetétel esetén (távoli-vörös fénykiegészítés) sok esetben órákkal korábbi génkifejeződést detektáltuk. Ráadásul több esetben az expressziós maximumok is megemelkedtek a kontrollként alkalmazott fehér fény esetében mért értékekhez viszonyítva (11. ábra). Franklin és Whitlam (2007) tanulmányozták először az *Arabidopsis* modellnövény *CBF* génjeinek fényminőségtől függő szabályozását. Elsőként írták le, hogy a fényintenzitás mellett a fény spektruma is befolyásolja a *CBF* transzkripciós faktorok kifejeződését. Kim et al. (2002) kimutatták továbbá, hogy az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény a fitokróm jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja az *AtCBF*-ek expresszióját, valamint közvetve az *AtCOR15a* effektor gén működését is, végső soron így növelve a növény fagyűrését. Egy, a kutatócsoportunk által publikált cikkben (Novák et al., 2016) az alkonyati fényösszetételhez hasonlító spektrum – mely megegyezett a fent említett Franklin és Whitlam (2007) cikkében közölt fénykezeléssel – hatását vizsgálták a fagyállóság szempontjából az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró *HvCBF* gén működésére. Azt találták, hogy az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénykezelés a fitokróm jelátviteli útvonalon keresztül növeli a *HvCBF14* gén működését, valamint a növény fagyűrését, bizonyítva ezzel a korábbi *Arabidopsis* modellnövényen tapasztaltakat árpa esetében is.

Jelen disszertáció eredményeként egy átfogó tanulmányt készítettünk a *HvCBF* gének – filogenetikai alcsoportok – távoli-vörös fénykiegészítésre adott válaszaik alapján. Hasonlóképpen Franklin és Whitlam (2007) *Arabidopsis* modellnövényen kapott eredményeihez, árpa esetében is kimutattuk, hogy az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény növeli a *CBF* gének expresszióját. Azonban fontos különbség, hogy míg *Arabidopsis*

esetében e fénykiegészítés nem (vagy csak csekély mértékben) volt hatással az *CBF*-ek periódushosszára, árpánál több esetben is korábbi génexpressziós maximumokat detektáltunk. Az általunk vizsgált gének *HvCBF4*-alcsoport tagjai mind korábbi kifejeződést mutattak (ráadásul periódushosszuk változatlanul közel 24 óra volt) a kontrollként alkalmazott fehér fényhez viszonyítva. E korábbi (és sokszor erőteljesebb) génműködés – nem induktív hőmérsékleti körülmények között is – válaszreakció lehet a növény alacsony hőmérsékleti stressztűrésének fokozása érdekében, mivel az egy nap alatt bekövetkező spektrumbeli változások évezredek óta állandónak tekinthetőek, melyhez a szárazföldi növények alkalmazkodtak. Fontos környezeti jelet („információt”) jelent tehát számukra a spektrum összetétele és változása, melyre számtalan módon, így fiziológiailag is reagálnak. Elképzelhető tehát, hogy az alkonyati fényösszetételhez leginkább hasonló spektrum – tehát a távoli-vörös fénykiegészítés alkalmazása – arra „ösztönzi” a növényt, hogy „felkészüljön” az éjszakai alacsonyabb hőmérsékletre, azaz a kedvezőtlenebb körülményekre. E hipotézis magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért váltotta ki kísérletünkben az alkonyati fényösszetételhez hasonló spektrum a fagyűrésben fontos szereppel bíró *HvCBF4*-alcsoport génjeinek korábbi és erőteljesebb kifejeződését.

## 10.2 *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő transzformáns növények

Munkánk során megállapítottuk, hogy a *HvPITP* és *HvPI4K* gének a cirkadián óra hatása alatt állnak, továbbá, hogy a távoli-vörös fénykiegészítés is befolyásolta a működésüket (8. ábra). E kísérleti eredményeink, valamint a foszfolipid jelátviteli útvonalban kulcsszerepet játszó  $Ca^{2+}$  csatornák és további másodlagos hírvivő molekulák ( $IP_3$ , DAG) szerepével kapcsolatos irodalmi ismereteink alapján jutottunk arra az elhatározásra, hogy megvizsgáljuk a *HvPITP* és *HvPI4K* gének esetleges szerepét különböző abiotikus stresszek elleni védelem kialakításában. Kutatásaink kivitelezéséhez a Nure őszi árpából izoláltuk, és a Golden Promise tavaszi árpában túltermeltettük e két gént, majd ezt követően vizsgáltuk a transzgenikus vonalak stressztűrését.

A transzformációs technikák közül az *Agrobacterium*-közvetített módszerre esett a választásunk, mivel alkalmazása esetünkben több előnnyel jár, mint más technikák alkalmazása. Travella et al. (2005) a gabonaféléknél alkalmazott legnépszerűbb transzformációs módszerek összehasonlításakor azt találták, hogy a biolisztikus génátvitel esetében az előállított árpa transzformáns vonalak 60%-a több mint nyolc kópiában hordozta a szelekciós markergént. Az e fajta többszöri beépülés hátránnyal járhat, mivel

gyakran okoz alacsony szintű célgén kifejeződést, holott éppen ennek az ellentéte, annak jelentős túltermeltetése lenne a cél (Dahleen és Manoharan, 2007), ráadásul a homozigóta egyedek szelektálása is nehéz. Az *Agrobacterium*-közvetített módszer előnye, hogy ritka a transzgén többszöri beépülése a recipiens genomba. Egy részletes tanulmányban 260 független – szintén *Agrobacterium* segítségével előállított – transzgénikus árpa vonalat vizsgáltak. Megállapították, hogy az előállított vonalak közel fele kódolta a *luciferase* szelektációs markergént egyetlen kópiában, míg háromnál több beépülést csupán 8%-uknál figyeltek meg (Bartlett et al., 2008). E módszert hasonló sikerességgel transzgénikus rizs előállítására is alkalmazzák. Sallaud et al. (2003) több, mint kétszáz vonalat megvizsgálva azt tapasztalták, hogy az előállított növények az esetek 30-40%-ban hordozták a *hpt* szelektációs markergént csupán egy kópiában. Az általunk előállított független transzgénikus árpa vonalak kópiaszám meghatározása szerint, a *HvPITP* esetében a transzgénikus vonalak 73%-a, míg a *HvPI4K* esetében 62%-a egyetlen kópiában hordozza a *hpt* szelektációs markergént. Sokszoros transzgén beépülést (hat kópia) csupán egy vonal (PITP L15) esetében figyeltük meg, mely inkább a biolisztikus technikára jellemző. Megállapítottuk, hogy a kapott beépülési gyakoriságok a szakirodalmi tendenciákkal teljes mértékben megegyeznek.

A transzgének génexpressziós értékeit Real-Time qPCR felhasználásával határoztuk meg (12. ábra). Megállapítottuk, hogy nincs összefüggés a beépülés gyakorisága és a transzgén kifejeződése között (5. melléklet), mely nem meglepő, hiszen tudomásunk szerint nincs olyan tanulmány, mely pozitív korrelációt mutatott volna ki a transzgén kópiaszáma és kifejeződésének mértéke között. E kérdéskört vizsgálva az igazolódott, hogy a növényi genomba beépült transzgén kifejeződésének mértéke leginkább a kromoszómán belüli beépülésének helyétől függ (Matzke és Matzke, 1998), melyre a szakma – mivel gyakori jelenségről beszélünk – az ún. „pozíció hatás” kifejezést alkotta meg.

Számos tanulmányban leírták már, hogy a transzformációs esemény sok esetben „hátrányt” jelent a növény számára, ami főként fenotípusos abnormalitás(ok)ban jelentkezik; e témakörrel Vyrubalová et al. (2011) összefoglaló tanulmányt is közöltek. Jelen disszertáció során felhasznált *HvPITP* és *HvPI4K* transzformáns növények vizsgálata során is feljegyeztünk fenotípusos abnormalitásokat, sőt azt tapasztaltuk, hogy ezek előfordulása jóval gyakoribb a korábbi munkáink során tapasztaltaknál, illetve a szakirodalomban közölt adatoknál is. Egyik ilyen fenotípusos rendellenesség – melyet

tudomásunk szerint a Golden Promise vad típus esetében még nem írtak le – a klorofill hiányos növények megjelenése (6/E. melléklet). Egy, a kutatócsoportunk nevéhez fűződő publikációban a transzformáns növények előállításához a jelen disszertációnál alkalmazott technikával pontosan megegyező metodikát alkalmazva (bináris vektor, transzformációs protokoll, recipiens genotípus) a búza *CBF14* és *CBF15* gének fagyűrészben betöltött szerepét vizsgálták (Soltész et al., 2013). A szerzők az előállított transzformáns növényeket több nemzedéken keresztül vizsgálták, de egyszer sem tapasztaltak klorofill hiányra utaló jelet (szóbeli közlés), így azt gondoljuk, hogy az általunk tapasztalt klorofill hiány a jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek (*HvPITP* és *HvPI4K*) túltermeltetése, vagy esetleg a korábban említett pozíció hatás eredménye.

A klorofill *a + b* spektrofotometriás meghatározása után számított klorofill *a / b* arányszám kiválóan tükrözi a levélszegmens zöld színének árnyalatát, tehát azt, hogy „mennyire zöld a levél”. Alacsonyabb arányszám (2,5-3,5) jellemző az egészséges, sötétzöld levelekre, míg a magasabb klorofill *a / b* értékek (4,0-10,0) etiolált hajtásokban fordul elő (Lichtenthaler és Buschmann, 2001). A transzformáns egyedek, valamint a Golden Promise esetében a vad típus, valamint a „zöld levelű” transzformáns egyedek klorofill *a / b* arányszáma 2,9-3,3 közötti értékeket mutat, míg a halványzöld fenotípusú PI4K L6 vonalnál kaptuk a legmagasabb értéket (3,8), igazolva ezzel a klorofill *a* és klorofill *b* közötti felborult egyensúlyt és az ennek következtében kialakult, általunk tapasztalt halványabb színt.

Közismert, hogy albinizmus a növényi transzformálás során előfordulhat mint fejlődési rendellenesség, melynek megjelenését számos faktor befolyásolhatja. Elsősorban genetikai okok miatt fordul elő (fajtára/genotípusra jellemző jelleg), de akár a transzgenikus konstrukciónak a beépülése is okozhatja. Ezek mellett a sejt- és szövettenyésztési munkák során alkalmazott táptalaj és a nevelési körülmények is hozzájárulhatnak az albínó növények kifejlődéséhez. Egy albinizmust vizsgáló részletes tanulmányban biolisztikus technika segítségével a Golden Promise genotípust tanulmányozták. A szerzők leírták, hogy az előállított kilencvenegy független transzgenikus vonal közül negyvenegynél (45%) figyeltek meg rendellenességet a klorofill szintézisében, melynek előfordulása nagyban függött a kalluszok eredetétől. Az éretlen embriókból regenerált kalluszok 55%-a, míg a mikrospórákból regenerált kalluszok 25%-a mutatott csak normál fenotípust, az albínókkal szemben (Wan és Lemaux, 1994). Egy másik cikk a Bobwhite búzafajta biolisztikus transzformálással előállított transzgenikus

vonalaik tanulmányozása során azt a megállapítást tette, hogy néhány egyed halványabb zöld fenotípust mutat a vad típus sötétzöld fenotípusához képest, mely rendellenesség a transzgenikus vonalaknál csak a pollenszóródás (antézis) fenológiai fázisa után volt megfigyelhető; ráadásul ezek az egyedek keskenyebb, csavarodott levélmorfológiát is mutattak (Bregitzer et al., 2006). Shu et al. (2002) transzgenikus rizs vizsgálata során a T<sub>3</sub> és T<sub>4</sub> nemzedékeknél figyelték meg, hogy egyes vonalak halványzöld fenotípust mutatnak. E rendellenes fenotípusú növényeknél lassabb növekedést, kevesebb beérett kalászt, és 80%-kal alacsonyabb növénymagasságot is leírtak a Xiushui 11 vad típushoz képest.

A transzgenikus növények vizsgálata során több kutatócsoport a vad típus mellett egy második, ún. transzgenikus kontroll vonalhoz is viszonyította az eredményeit (például: Wang et al., 2008; Luo et al., 2012; Ku et al., 2013; Shen et al., 2015). E kontroll vonalak csupán egy kereskedelmi forgalomban kapható, módosítatlan vektort tartalmaztak, azaz ezek a vonalak csak a szelekciós markergént tartalmazták, de a transzformálandó célgént nem. Ez a metodika az azonos kísérleti körülmények miatt a transzformációs technikák hatásának a tanulmányozására alkalmasak (sejt- és szövettenyésztés, táptalaj, környezeti hatások, stb.). Ezekben a tanulmányokban a szerzők leírták, hogy a transzgenikus kontroll vonalak nem mutattak jelentős különbséget sem fejlődésbeli, sem stressztolerancia tekintetében a vad típushoz képest. Kutatócsoportunk korábbi munkája során, a jelen disszertációnál alkalmazott technikával pontosan megegyező transzformálási módszert alkalmaztak Soltész et al. (2013), amikor előállították a transzgenikus kontroll vonalaikat. Ők is arra az eredményre jutottak, miszerint nem tapasztalható jelentős különbség a Golden Promise vad típus és a transzgenikus kontroll vonal között, sem a növények fejlődésében, sem a fagyűrésében. Ezekre a publikációkra alapozva döntöttük úgy, hogy jelen kísérleteinkbe csak a Golden Promise vad típust vonjuk be, és az e genotípus által mutatott értékeket vesszük kontroll eredménynek. Így a különböző kísérletek alatt tapasztalt, a vad típus és a transzgenikus vonalak között kapott bármilyen fenotípusos különbséget a célgének – *HvPITP* vagy *HvPI4K* – hatásának tulajdonítottuk, és nem az alkalmazott transzformációs technikának vagy a transzformációs eseménynek.

Habár a hagyományos növényi transzformációs technikák alkalmazása több tíz évre nyúlik vissza, a mai napig sem tervezhető előre, vagy befolyásolható a célgén pontos beépülési helye, vagy kifejeződésének mértéke. Napjainkban egyre szélesebb körben vált elérhetővé egy újabb és „precízebb” genomszerkesztési módszer a CRISPR-Cas9 (Ricroch et al., 2017), mely már tervezhetőbb megoldást nyújt a molekuláris biológusok számára a

célgén beépülési helyének pontos meghatározásában, bár e technika alkalmazása során is előfordulhatnak – a korábbi hagyományos módszerekhez hasonlóan – fenotípusos rendellenességek a módosított növény fejlődése során.

Az *Arabidopsis* modellnövény esetében alkalmazott virág infiltrációs transzformáció során ritkábban fordulnak elő fenotípusos rendellenességek a transzformáns növények között, mint azoknál a technikáknál, amelyeknél sejt- és szövettenyésztési munkafolyamatok is szükségesek (például a gabonafélék esetében). Az egyszikű transzformáns növények (például búza vagy árpa) esetében előforduló fejlődési rendellenességeket kiváltó okokat Filipecki és Malepszy (2006) szerint három csoportba sorolhatjuk: (1) célgén pleiotróp hatása, (2) az integráció helye és a célgén kifejeződésének hatása, valamint (3) az alkalmazott technika által előidézett stressz mellékhatása. A fenotípusban megjelenő mellékhatások e három okra történő visszavezetése nehézkes, a legtöbb publikációban csak spekulációként diszkutálják. Ilyen például Bregitzer et al. (2006) cikke, melyben a szerzők transzgenikus búza vonalak esetében írták le, hogy a célgént túltermelő egyedek esetében csökkentek az agronómiailag fontosabb paraméterek értékei (például termésmennyiség), mely gazdasági hasznosíthatóságukat tette lehetetlenné. Annak ellenére, hogy molekuláris vizsgálatokat nem végeztek, e rendellenesség okaként a szerzők a szelekciós markergén hatását vagy a szomaklonális variabilitást nyilvánították ki.

Soltész et al. (2013) a *TaCBF14* és *TaCBF15* túltermelő vonalai tanulmányozása közben a fokozott fagyűrész mellett megfigyelték, hogy a transzformáns növények lassabban fejlődtek és később virágoztak, mint a Golden Promise vad típus. Ebben a cikkben a szerzők molekuláris vizsgálatokkal igazolták, hogy a megemelkedett célgén expressziója hatással volt a katabolikus gibberellinsav 2-oxidáz enzimet kódoló gén kifejeződésére is, melynek következménye volt a bioaktív giberellinsavak inaktiválása és a DELLA proteinek felhalmozódása. Tehát, ebben az esetben bizonyították egy transzkripciós faktor túltermeltetésének hatását egy – hormon bioszintézisben szerepet játszó – effektor génre, mely végső soron nem várt fenotípusos következményhez, fejlődési rendellenességhez, azaz lassabb növekedéshez és késői virágzáshoz vezetett. Ráadásul Hoang et al. (2017) előtérbe helyezik a konstitutív promóterek fenotípusra gyakorolt esetleges kedvezőtlen pleiotróp hatását (növekedési rendellenesség, késői virágzás, alacsony termésmennyiség) is. Megoldásként ajánlják a szerzők a stresszindukált promóterek alkalmazását, mely megoldást jelenthet a fent említett problémák kiküszöbölésére, és a transzgenikus növények gyakorlati felhasználására.



Jelen munkánk során kimutattuk, hogy a *HvPITP* és *HvPI4K* gének kismértékű megnövekedett abiotikus stressztűrést okoznak számos transzformáns vonal esetében, viszont elképzelhető az is, hogy emellett e két gén – melyek egy jelátviteli útvonal korai elemeinek tekinthetők, ezáltal számos más útvonalra hatással lehetnek – hatása az általunk feljegyzett, fenotípusosan is megjelenő fejlődésbeli rendellenességek is.

A *HvPITP* és *HvPI4K* transzformáns növények fenotípusos jellemzése során a legkülönbözőbb fejlődési rendellenességeket tapasztaltunk (lásd 9.2.3. fejezet), melyek valószínűleg a foszfolipid jelátviteli út korai, szerteágazó hatása miatt olyan diverzek. Több, nemrégiben megjelent összefoglaló tanulmány (Hoang et al., 2017; Baillo et al., 2019) hívja fel a figyelmet arra, hogy fontos kérdés az is, hogy egy-egy transzkripciós faktor túltermeltetése milyen hatással van a növény szántóföldi körülmények között produkált termésére, és a laborkísérletekkel nem csak az alap kutatás szempontjából fontos kérdésekre kellene válaszokat keresni. Az agronómiailag fontos tulajdonságaikat vizsgálva jelen kutatás keretében megállapítottuk (5. táblázat), hogy egyik vonal esetében sem okoztak a transzgenek jelentős előnyt a vad típushoz képest. Inkább az a tendencia látható, hogy a *HvPITP* és *HvPI4K* gének hátrányosan befolyásolták a növények agronómiailag fontos tulajdonságait. Hasonló eredményt kaptak Horvath et al. (2001) Golden Promise tavaszi árpa transzformálása után végzett vizsgálatuk során. A szerzők egy kétéves szántóföldi fenotipizálás utána megállapították, hogy a transzformánsok ezerszemtömege 30-40%-kal csökkent a vad típushoz képest. A transzformáns vonalak öntözés melletti hozamát meghatározva azt találták, hogy a Golden Promise 7,7 t/ha termésmennyisége helyett átlagosan csupán 6,0 t/ha hozamot produkáltak.

Az általunk végezett fenotipizálás eredményeit tovább elemezve, a PITP L12 és PITP L13 vonalakat összehasonlítva érdekes megállapítást tettünk. A PITP L13 vonal alacsony növénymagassága mellett késői virágzást is mutatott, viszont jelentősen több kalászt nevelt. Mindemellett e transzformáns vonal több rendellenes kalászt is hozott (16,1%;  $P=0,006$ ). Fontos megjegyezni, hogy ezek a kalászok – habár több kalászorsóval rendelkeztek – sokkal rövidebbek és termékenyülésük sok esetben elmaradt a megszokottól. A PITP L13 vonal főkalászainak szemtömege fele volt a PITP L12 vonalhoz viszonyítva. E transzformáns vonal növényenkénti szemszáma és szemtömege, ezerszemtömege is elmaradt a PITP L12 vonalhoz képest. A két vonal közötti legfőbb hasonlóság molekuláris szinten, hogy mind a két esetben egy-egy kópiában hordozzák a *HvPITP* transzgent, ráadásul a Real-Time qPCR eredmények alapján megtudtuk, hogy

génkifejeződésükben sincs jelentős különbség (12/A. ábra). Mindezek alapján a pontos molekuláris okok, melyek a fenotípusban tapasztalt különbségeket okozzák, tisztázatlanok maradtak. Egy lehetséges magyarázat e két vonal között mért jelentős eltérésekre a transzgenek beépülése következtében okozott molekuláris különbségek miatti pozíció hatás, viszont ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Az általunk fenotipizált PI4K vonalak vizsgálata során a PI4K L3 esetében érdekes megállapítást tettünk. Megfigyeltük, hogy a tizenkét vizsgált paraméter közül csupán a klorofill tartalomban (SPAD értékben) mutatott jelentős növekedést a Golden Promise genotípushoz képest. Ráadásul az összes vizsgált transzformáns vonal közül egyedülként a PI4K L3 vonal esetében mértünk szignifikáns eltérést e paraméterben a vad típushoz képest, sem a *HvPITP*, sem a *HvPI4K* túltermelése nem befolyásolta jelentősen a transzformáns növények klorofill tartalmát.

A *HvPITP* és *HvPI4K* transzformáns vonalak stressztűrésben betöltött szerepét vizsgálva megállapítottuk, hogy e gének – és valószínűleg a foszfolipid jelátviteli útvonal – kismértékben hozzájárulnak a növény alacsony hőmérsékleti stressztolerancia mértékének fokozásában (lásd 9.2.4 fejezet). Sajnos csak kevés kutatócsoport foglalkozik a növényi foszfolipid jelátviteli útvonal abiotikus stressztűrésben – különösen a fagyűrésben – betöltött szerepével. Munkánk során megvizsgáltuk e két gén fagyűrésben betöltött szerepét, és megállapítottuk, hogy csupán túltermeltetésük nem elegendő a növény fagyűrésének fokozásához. Azt tapasztaltuk, hogy az alacsony hőmérséklet – mint környezeti jel – szükséges a fokozott hidegtűrés elérése érdekében, mivel hidegedzés nélkül nevelt növények esetében nem mutatkozott különbség a transzformáns vonalak és a Golden Promise vad típus között.

Vajon miért szükséges a hideg, mint jel a transzformánsok fokozott fagyűréséhez? Felvetésünk szerint – más molekuláris magyarázat hiányában – talán a *HvPITP* és *HvPI4K* gének túltermeltetése e molekulák sejten belüli „túlkínálatához” vezetett, melyek ezáltal – szükség esetén – könnyebben elérhetővé váltak a sejtben. E „felesleg” teheti szükségtelessé a PITP és PI4K fehérjék *de novo* szintézisét, ezáltal csökkentve a környezeti jelekre adott válaszok reakcióidejét, mely végső soron fokozhatja a transzformáns egyedek stressztűrését a vad típushoz képest.

Az alacsony hőmérséklet hatására hirtelen megemelkedő intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció már régóta ismert. A CBF transzkripciós faktorok fagystressz elleni védelem

kialakításában betöltött szerepét – több növényfaj esetében is – rengeteg publikáció bizonyítja, azonban a jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek szerepe e folyamatban még alig ismert. A kapocs, mely összeköti a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonalat a CBF transzkripciós faktorokkal, és ezáltal az általuk szabályozott effektor génekkel, *Arabidopsis* esetében már ismert, ugyanis Doherty et al. (2009) leírták, hogy a CAMTA3 képes az *AtCBF2* promóteréhez kötődni. Jelen munkánk során megállapítottuk, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonal (mely befolyásolja a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  mennyiségét) elemeinek túltermeltetése árpaiban kismértékű pozitív hatással van a növény fagyűrűzésére. Kimutattuk továbbá, hogy ez a fokozott alacsony hőmérsékleti stressztolerancia nem jár együtt a fagyűrűzésben fontos *HvCBF* gének indukciójával (7. melléklet), tehát e fenotípus nem a CBF transzkripciós faktorok effektor génekre gyakorolt hatásának következménye. Hasonló eredményre jutottak Chu et al. (2018) az *Arabidopsis PATELLINI (PATL1)* gén – mely egy SEC14-like fehérjét (egy P1TP homológ) kódol (Peterman et al., 2004) – vizsgálata során. *In vivo* bizonyították, hogy az *AtPATL1* és az *AtCaM4* fehérjék közös jelátviteli útvonalon helyezkednek el, és pozitívan befolyásolják a növény alacsony hőmérsékleti stressztoleranciáját. Deléciós mutáns vonalakban fokozott expressziót tapasztaltak számos CBF-ek által szabályozott gén (*AtKINI*, *AtCOR15b* és *AtCOR8.6*) esetében is, mely arra enged következtetni, hogy az *AtPATL1* – *AtCaM4* útvonal független az *AtCBF* útvonaltól. Ezt a megállapítást erősítik meg a mi eredményeink is árpa esetében.

A *HvP1TP* és *HvP14K* vonalak sóstressz elleni védelem kialakításában betöltött esetleges szerepét is megvizsgáltuk, mivel szakirodalmi adatok arra utalnak (Kielbowicz-Matuk et al., 2016), hogy a *P1TP* génnel homológ *HvSEC14p* gén kifejeződése NaCl hatására fokozódik. Vizsgálataink során nem mutattunk ki jelentős különbséget sem a *HvP1TP*, sem a *HvP14K* túltermeltetés hatására a Golden Promise vad típushoz képest (lásd 9.2.5 fejezet). Azt gondoljuk, hogy a két szemben álló állítás háttérében a különböző kísérleti beállítások, mint például a más árpa genotípusok, eltérő NaCl koncentrációk, vagy különböző fejlődési stádiumok állhatnak, melyek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A *HvP1TP* és *HvP14K* vonalak jellemzése során tanulmányoztuk a transzformáns vonalak csírákori hideggel kombinált hipoxia tűrését is (lásd 9.2.6 fejezet). Megállapítottuk, hogy a túltermeltetés következtében a növények fokozott stressztűrését mutattak a vad típushoz képest. Az árpa – és az összes gabonaféle – obligát aerob élőlény, tehát az oxigén hiányos (hipoxiás) körülmény, vagy annak teljes hiánya (anoxia)

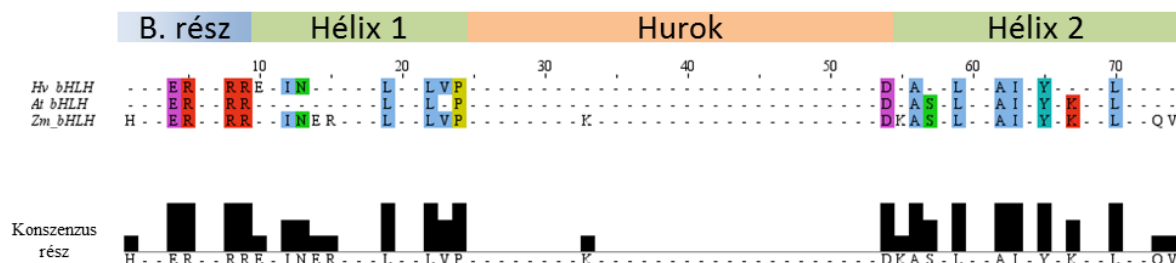
stresszhatásnak minősül a növény számára. Ennek következtében, a Magyarországon is évről-évre előforduló tavaszi áradások és belvizek komoly veszteségeket okozhatnak a gabonatermesztés számára, mely leginkább a fiatalabb növényeket veszélyezteti. A hipoxia következtében bekövetkező termés kiesés elérheti az akár 50%-ot is, ráadásul a termesztett árpa az egyik legérzékenyebb gabonanövényünk (Dennis et al., 2000).

A  $\text{Ca}^{2+}$  másodlagos hírvivő molekula szerepe az oxigén hiányos körülmények között is fontos jelentőséggel bír, ráadásul, a növényi sejt anoxia hatására rendkívül gyors válaszreakcióval védekezik. Kukorica vizsgálata során Subbaiah et al. (1998) kimutatták, hogy a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$  már az első percben megemelkedik oxigén hiány hatására. Ezen információk alapján döntöttünk úgy, hogy mivel a foszfolipid jelátviteli útvonal befolyásolja  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$  változását, megvizsgáljuk a *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő vonalak hipoxiás körülmények közötti stressztűrését a vad típushoz viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy a transzformáns vonalak fokozottabb stressztűrő képességgel bírnak, mint a Golden Promise genotípus. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az általunk előállított túltermelő vonalak és a vad típus között tapasztalt stresszel szemben mutatott különbségek az intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit.}}$  megnövekedett szintjének, esetleg könnyebb mobilitásának, vagy gyorsabb felszabadításának köszönhető, bár hipotéziseink bizonyítása (vagy cáfolása) további, részletesebb vizsgálatokat igényel.

### 10.3 A *HvPIF* fehérjéket kódoló szekvenciák

Az általunk tanulmányozott jelátviteli útvonalak közül a távoli-vörös tartományba eső fény hatására aktiválódó fitokróm jelátviteli útvonalat vizsgáltuk meg részletesebben. Munkánk során az árpa feltételezett PIF fehérjéit kódoló szekvenciák *in silico* azonosítását végeztük el, melyhez először a *HvPIF*-ek ún. bHLH fehérjecsaldóját identifikáltuk. A HMM módszert alkalmazva 183 egyedi bHLH szekvenciát azonosítottunk az elérhető legújabb verziójú teljes árpa proteomban. Hasonló módszert alkalmazva Pires és Dolan (2010) közel azonos méretű bHLH fehérjecsaldót azonosított más növényfajok esetében is. Az *Arabidopsis* proteomban 158, míg a rizs proteomban 173 bHLH-t kódoló szekvenciát írtak le. Az általunk leírt 183 árpa bHLH fehérje konszenzus részének azonosításához többszörös illesztést végeztünk (16. ábra). A kapott eredményeink nagyfokú hasonlóságot mutatnak Toledo-Ortiz et al. (2003) *Arabidopsis* esetében, valamint Kumar et al. (2016) kukorica esetében azonosított bHLH domén konszenzus szekvenciáival. Az *Arabidopsis*-nál (20. ábra, *AtbHLH*) tizenhat aminosav, míg a

kukoricánál (20. ábra, *ZmbHLH*) huszonhat aminosav vesz részt legalább 50%-os lefedettség mellett a bHLH domén konszenzus részének kialakításában. Munkánk során tizennyolc aminosavat azonosítottunk, melyek hasonló, 50%-os lefedettség mellett vesznek részt az árpa bHLH domén konszenzus részének képzésében (20. ábra).



20. ábra: Az árpa, az *Arabidopsis* (Toledo-Ortiz et al., 2003), valamint a kukorica (Kumar et al., 2016) bHLH domének kialakításában minimum 50%-os lefedettség mellett részt vevő aminosavaik többszörös szekvencia illesztése. Az azonos aminosavak azonos színkódolással szerepelnek az ábrán. A fekete oszlopok magassága az adott aminosav konzerváltságát mutatja az adott pozícióban. Az aminosavak számozása a bázikus rész N-terminális részének egy általunk kijelölt helyéről indul. „B. rész”: Bázikus rész.

Valószínűsíthető, hogy a bHLH szekvenciák általunk azonosított konzerválódott aminosavai (minimum 50%-os lefedettség mellett) fontos funkcionális szereppel bírnak árpa, *Arabidopsis* és kukorica esetében is. Ha részletesebben megvizsgáljuk azokat az aminosav helyeket, amelyek az *Arabidopsis* és a kukorica esetében is megegyeznek, de az árpánál eltérnek egymástól (S<sub>57</sub> és K<sub>67</sub>), akkor azt találjuk, hogy az árpa esetében is konzerválódott pozíciókról van szó, csupán alig maradtak el az alkalmazott 50%-os lefedettségi küszöbértéktől (S<sub>57</sub>: 45,6% és K<sub>67</sub>:49,4%). Azt gondoljuk, hogy e két aminosav szintén fontos szerepet tölt be az árpa bHLH fehérjéknél, és azok az árpa bHLH domén konszenzus szekvenciájának részét képezik. Csupán egyetlen aminosavat találtunk (E<sub>10</sub>), amely csak az árpa esetében bizonyult konzerválódottnak, viszont az *Arabidopsis* és a kukorica esetében nem. Az, hogy ez az E<sub>10</sub> aminosav milyen szerepet tölt be az árpa bHLH fehérjék funkciójában, vagy hogy egyáltalán van-e valamilyen fontos jelentősége, avagy csupán egy fajra jellemző molekuláris bélyeg, további *in silico* és funkcionális növénybiológiai vizsgálatokat igényel.

Ahhoz, hogy az általunk azonosított 183 bHLH szekvencia közül kiválogassuk a feltételezhetően *HvPIF* szekvenciákat, már ismert *Arabidopsis*, rizs és szója bHLH

szekvenciákkal (3. táblázat) együtt végeztünk filogenetikai elemzést. Az így kapott filogenetikai fa struktúrája alapján megállapítottuk, hogy az árpa bHLH fehérjéi huszonöt alcsoportba sorolhatók. Az általunk felhasznált *Arabidopsis*, rizs és szója bHLH „referencia” szekvenciák lehetővé tették, hogy a korábban már közölt filogenetikai fákkal összehasonlítást végezzünk, valamint, hogy a szakirodalommal konzisztens alcsoport elnevezéseket használjunk. E csoportosítás nagyfokú hasonlóságot mutatott a korábban már Pires és Dolan (2010) által közölt *Arabidopsis* és rizs, valamint Kumar et al. (2016) által közölt kukorica bHLH fehérjék filogenetikai fák topológiáival.

Annak ellenére, hogy a XIV alcsoport *Arabidopsis* esetében négy taggal is képviselteti magát (Pires és Dolan, 2010), nem tartalmaz árpa fehérjét. Valószínű, hogy ez az alcsoport nem tartozik az erősen konzervált bHLH alcsoportok közé a különböző növényfajokban. Ezt az állítást támaszthatja alá az is, hogy a szakirodalomban csupán egy publikáció ismert, melyben Imai et al. (2006) az XIV alcsoport egyik tagjának funkcionális elemzését végezték el.

*In silico* vizsgálataink végső célja az volt, hogy azonosítsuk az árpa bHLH fehérjéi közül azokat a szekvenciákat, amelyek a legnagyobb valószínűséggel *HvPIF* proteinek kódolnak. Ehhez az általunk azonosított 183 bHLH fehérjét kódoló szekvenciát és a szakirodalomból már ismert PIF szekvenciákat (*Arabidopsis*, rizs, szója) vontunk be az analízisbe. Azt feltételeztük, hogy a PIF fehérjéket kódoló szekvenciák hasonlósága alapján a filogenetikai analízis egyazon alcsoportba sorolja az összes referenciaként használt PIF-et, valamint azokat az ismeretlen árpa szekvenciákat, melyek PIF fehérjéket kódolnak. Az elemzésből kiderült, hogy az összes *Arabidopsis*, rizs és szója PIF szekvencia a VII (a+b) alcsoportba sorolható, mely eredményt Pires és Dolan (2010) cikke alapján prediktálható is volt, ezzel is megerősítve az árpa bHLH filogenetikai fa pontosságát, és a levont következtetéseinket is. Összességében kilenc egyedi árpa bHLH fehérjét kódoló szekvenciát azonosítottunk a VII (a+b) alcsoportból, melyek nagy valószínűséggel a *HvPIF* fehérjéit kódolják (7. táblázat). Ahhoz, hogy hipotézisünket igazoljuk, és megállapítsuk, hogy e kilenc szekvencia közül, melyek tartoznak valójában az árpa PIF transzkripció faktorok családjához, *in vivo* funkcionális vizsgálatok szükségesek. Az általunk elért eredmények megalapozhatják korábbi kutatások folytatását vagy kibővítését, melyek a továbbiakban is ígéretes eredményeket nyújthatnak.

## 11 TÉZISEK

1. Kimutattuk, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonalban szereplő *HvPITP* és *HvPI4K* gének a cirkadián óra hatása alatt állnak, továbbá, hogy távoli-vörös fénykiegészítésre a *HvPI4K* gén korábbi expressziós maximummal reagál.
2. Megállapítottuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének nem mutatnak cirkadián ritmust. Expressziós mintázatuk a cirkadián óra, az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény, vagy a hőmérséklet hatására három jól elkülönülő csoportra osztható.
3. Kimutattuk, hogy az árpa *CBF* gének filogenetikai alcsoportjai közül a *HvCBF1*-alcsoport tagjai „szobahőmérsékleten” (22°C-on) nem fejeződnek ki. Bizonyítottuk, hogy a *HvCBF3*-alcsoport génjei nem állnak a cirkadián óra hatása alatt.
4. Bebizonyítottuk, hogy hidegindukció nélkül az árpa *CBF* gének közül csak a *HvCBF4*-alcsoport tagjai fejeződnek ki, expressziójuk cirkadián ritmust követ, működésük a késő délutáni/kora esti órákban a legintenzívebb.
5. Kimutattuk, hogy távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *HvCBF4*-alcsoport génjei sok esetben nagyobb expressziós maximummal reagálnak, ráadásul órákkal korábban is kifejeződnek.
6. Bebizonyítottuk, hogy a *HvPITP* és *HvPI4K* gének kis mértékben járulnak hozzá az árpa alacsony hőmérsékleti stressztoleranciájának növeléséhez.
7. Megállapítottuk, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek túltermeltetése megnöveli a transzformáns növények egyes fejlődési rendellenességeinek gyakoriságát.
8. *In silico* azonosítottuk az árpa bHLH fehérjéit, filogenetikai alcsoportokba soroltuk azokat, majd meghatároztuk a *HvPIF* szekvenciákat.

## 12 THESES

1. We have shown that the *HvPITP* and *HvPI4K* genes from the phospholipid signaling pathway have circadian rhythm, and that the *HvPI4K* gene responds to supplemental far-red light with an earlier expression levels.
2. We found that genes involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway do not show circadian rhythms. Their expression pattern can be divided into three subgroups according to their response to the circadian clock, low red/far-red light, or temperature.
3. We have shown that among the barley *CBF* genes, members of the *HvCBF1*-subgroup are not expressed at 'room temperature' (at 22°C). We demonstrated that the genes of the *HvCBF3*-subgroup have no circadian rhythm.
4. We demonstrated that without cold induction, only members of the *HvCBF4*-subgroup have circadian rhythm, and their expression levels are most intense in the late afternoon or in the early evening hours.
5. We have shown that under the influence of supplemental far-red light the genes of the *HvCBF4*-subgroup responds with higher expression levels in many cases, and, in addition, they are expressed hours earlier.
6. We have shown that the *HvPITP* and *HvPI4K* genes slightly increased the low-temperature stress tolerance of barley.
7. We have found that the overexpression of the initial elements of the phospholipid signaling pathway increases the frequency of certain developmental abnormalities in the transgenic plants.
8. We have determined barley bHLH proteins *in silico*, classified them into phylogenetic subgroups, and finally *HvPIF* sequences were identified in the barley genome.



## 13 ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban összefoglalt munkánk fő célja az volt, hogy az árpa mint gabona modellnövény felhasználásával (1) a foszfolipid jelátvitel, (2) a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel, valamint (3) a CBF transzkripciós faktorok közvetítette jelátviteli útvonalra ható szabályozó mechanizmusokat tanulmányozzuk.

Kísérleteink során mesterséges körülmények között nevelt Nure genotípus segítségével meghatároztuk a fent említett útvonalakhoz kapcsolódó gének cirkadián ritmusát. Vizsgálataink során fehér és távoli-vörössel kiegészített fehér fényt alkalmaztunk, így megállapíthattuk az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény génexpresszióra kifejtett hatását is. Első lépésként – a kísérlet „hitelesítéseként” – megvizsgáltuk a cirkadián óra két alapvető tagjának, a *HvCCA1* és *HvTOC1* gének kifejeződését. Megfigyeltük, hogy a vizsgált óragének cirkadián ritmus szerint fejeződtek ki, valamint hogy a távoli-vörös fénykiegészítés a *HvCCA1* génre csekély, míg a *HvTOC1* génre jelentős hatással bírt: a fénykezelés hatására a transzkriptumok mennyisége jelentősen megnőtt.

A tanulmányozni kívánt jelátviteli útvonal első szakaszát, a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti génjeit vizsgáltuk meg először. Megállapítottuk, hogy a *HvPITP* és a *HvPI4K* gének cirkadián ritmus szerint expresszálódtak, és a távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *HvPI4K* expressziója fáziseltolódást mutatott. A  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelben szerepet játszó gének átfogó vizsgálata során megfigyeltük, hogy azok nem mutattak egységes expressziós mintázatot. Egyes vizsgált gének kifejeződése az esti órák végén tetőzött, bár azok folyamatos megvilágítás esetén alacsony szintű, konstans kifejeződést mutattak, és a távoli-vörös fénykiegészítés nem befolyásolta e gének működését. Más génekre sem a cirkadián óra, sem a fénykezelés nem volt hatással. Egy harmadik csoport génkifejeződését csupán az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény befolyásolta, a cirkadián óra azonban nem. Mindezek az eredmények jól mutatják a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének rendkívül komplex rendszerét, hiszen kísérleteink során az azonos körülményekre eltérő válaszmechanizmusokkal reagáltak.

Az általunk vizsgálni kívánt útvonal utolsó „szereplője” a CBF transzkripciós faktorok családja. Az ezeket kódoló gének három filogenetikai alcsoportja közül csupán kettő, a *HvCBF3*-, valamint a *HvCBF4*-alcsoport tagjai fejeződtek ki az alkalmazott 22°C-os nevelési hőmérsékleten. Ez azt jelenti, hogy valószínűleg nem értük el azt a

hőmérsékleti küszöbértéket, mely kellően alacsony lett volna a *HvCBF1*-alcsoport tagjainak indukciójához.

A *HvCBF*-ek közül a növény fagyűrése szempontjából jelentős szereppel bíró gének alcsoportja, a *HvCBF4*-alcsoport tagjai cirkadián ritmus szerint fejeződtek ki, ráadásul az alkonyati fényösszetételre jellemző spektrum hatására expressziójuk sok esetben fokozódott, valamint a kifejeződés maximuma órákkal korábban jelentkezett. Elmondhatjuk tehát, hogy az általunk tanulmányozott foszfolipid és  $Ca^{2+}$  jelátviteli útvonal, valamint a *CBF* gének molekuláris szabályozásában az általunk vizsgált három „kísérleti változó”, vagyis a cirkadián óra, a fény spektrális összetétele, és a hőmérséklet is befolyásoló szereppel bírt.

A vizsgált *HvPITP* és *HvPI4K* gének cirkadián ritmusa, valamint a foszfolipid útvonal jelátvitelben betöltött jelentős szerepe (melynek eredménye különböző másodlagos hírvivő molekulák felszabadulása) miatt tanulmányoztuk e két gén stressztűrésben betöltött esetleges szerepét is. Az előállított túltermelő transzformáns árpa vonalak segítségével megállapítottuk, hogy *HvPITP* és *HvPI4K* gének kismértékben hozzájárultak az árpa alacsony hőmérsékleti stressztolerancia fokozásához. Kísérleteink során azonban számos esetben fejlődési/morfológiai rendellenességet (abnormális kalászfejlődést, rendellenes kalászorsó kialakulást, vegetatív stádiumban ragadt növényt, klorofill hiányt) tapasztaltunk a transzformáns vonalak esetében. Elméletünk szerint a jelátviteli útvonal korai szabályozó elemeinek túltermeltetése a jelátviteli utak divergenciája miatt szerteágazó, (súlyos) negatív hatással van a transzformáns növények egyes élettani folyamataira.

Munkánk során számos esetben kimutattuk az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénykezelés egyértelmű hatását különböző gének kifejeződésére. Mivel ismereteink eléggé hiányosak a távoli-vörös tartományába eső fény hatására aktiválódó jelátviteli útvonalokról és az azokat szabályozó mechanizmusokról, így célul tűztük ki a fitokróm fehérjékkel kapcsolatot kialakító *HvPIF* transzkripció faktorok *in silico* azonosítását. Munkánk során azonosítottuk az árpa bHLH fehérjéit, majd filogenetikai módszerek segítségével alcsoportokba soroltuk azokat. Ismert PIF szekvenciák felhasználásával, valamint a fitokróm-kötőhely motívumának keresésével sikerült azonosítanunk azokat a szekvenciákat, melyek árpa PIF géneket kódolnak. Eredményeink alapot biztosíthatnak arra, hogy segítségükkel részletesen megismerhessük a vörös és távoli-vörös fény hatására

aktiválódott PIF transzkripció faktorok jelátviteli útvonalakra, más transzkripció faktorokra, vagy akár egyedi génekre gyakorolt hatásait.

## 14 MELLÉKLETEK

### 14.1 Irodalomjegyzék

- Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schäfer E. és Quail P.H., 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell*. 23, 439–446.
- Aldon D., Mbengue M., Mazars C. és Galaud J.-P., 2018. Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 665.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. és Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403–410.
- Anwer M.U. és Davis S.J., 2013. An overview of natural variation studies in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 24, 422–429.
- Badawi M., Danyluk J., Boucho B., Houde M. és 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, 533–554.
- Bailey T.L., Boden M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi L., Ren J., Li W.W. és Noble W.S., 2009. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*. 37, 202–208.
- Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z. és Xu P., 2019. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*. 10, 771.
- Baker S.S., Wilhelm K.S. és Thomashow M.F., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*. 24, 701–713.
- Barla-Szabó G. és Dolinka B., 1988. Complex stressing vigour test: a new method for wheat and maize seeds. *Seed Science and Technology*. 16, 63–73.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W. és Harwood W.A., 2008. High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods*. 4, 22.
- Bregitzer P., Blechl A.E., Fiedler D., Lin J., Sebesta P., De Soto J.F., Chicaiza O. és Dubcovsky J., 2006. Changes in high molecular weight glutenin subunit composition can be genetically engineered without affecting wheat agronomic performance. *Crop Science*. 46, 1553–1563.
- Burton R.A., Shirley N.J., King B.J., Harvey A.J. és Fincher G.B., 2004. The *CesA* gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology*. 134, 224–236.
- Casal J.J., 2000. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology*. 71, 1–11.

- Choi D.W., Zhu B. és Close T.J., 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: Sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 *Dhn* genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics*. 98, 1234–1247.
- Chu M., Li J., Zhang J., Shen S., Li C., Gao Y. és Zhang S., 2018. AtCaM4 interacts with a Sec14-like protein, PATL1, to regulate freezing tolerance in *Arabidopsis* in a CBF-independent manner. *Journal of Experimental Botany*. 69, 5241–5253.
- Clack T., Mathews S. és Sharrock R.A., 1994. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Molecular Biology*. 25, 413–427.
- Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M. és Brenner S.E., 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*. 14, 1188–1190.
- Dahleen L.S. és Manoharan M., 2007. Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 43, 493–506.
- Day I.S., Reddy V.S., Shad Ali G. és Reddy A., 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology*. 3, research0056.1–0056.24.
- DeFalco T.A., Bender K.W. és Snedden W.A., 2010. Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling. *The Biochemical Journal*. 425, 27–40.
- Delage E., Puyaubert J., Zachowski A. és Ruelland E., 2013. Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: Convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. *Progress in Lipid Research*. 52, 1–14.
- Delage E., Ruelland E., Guillas I., Zachowski A. és Puyaubert J., 2012. *Arabidopsis* Type-III Phosphatidylinositol 4-Kinases  $\beta 1$  and  $\beta 2$  are Upstream of the Phospholipase C Pathway Triggered by Cold Exposure. *Plant and Cell Physiology*. 53, 565–576.
- Demarsy E., Goldschmidt-Clermont M. és Ulm R., 2018. Coping with ‘Dark Sides of the Sun’ through Photoreceptor Signaling. *Trends in Plant Science*. 23, 260–271.
- Deng W., Clausen J., Boden S., Oliver S.N., Casao M.C., Ford B., Anderssen R.S. és Trevaskis B., 2015. Dawn and dusk set states of the circadian oscillator in sprouting barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *PLOS ONE*. 10, e0129781.
- Dennis E.S., Dolferus R., Ellis M., Rahman M., Wu Y., Hoeren F.U., Grover A., Ismond K.P., Good A.G. és Peacock W.J., 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*. 51, 89–97.
- Dhillon T., Morohashi K. és Stockinger E.J., 2017. *CBF2A-CBF4B* genomic region copy numbers alongside the circadian clock play key regulatory mechanisms driving expression of *FR-H2 CBFs*. *Plant Molecular Biology*. 94, 333–347.
- Dickson E.J. és Hille B., 2019. Understanding phosphoinositides: rare, dynamic, and essential membrane phospholipids. *Biochemical Journal*. 476, 1–23.
- Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J. és Thomashow M.F., 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and

- Freezing Tolerance. *The Plant Cell*. 21, 972–984.
- Dong M.A., Farre E.M. és Thomashow M.F., 2011. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 7241–7246.
- Eddy S.R., 2009. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Informatics.*, 205–211.
- Endo M., Shimizu H., Nohales M.A., Araki T. és Kay S.A., 2014. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*. 515, 419–422.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783–791.
- Filipecki M. and Malepszy S., 2006. Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight. *Journal of Applied Genetics*. 47, 277–286.
- Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., Salazar G.A., Tate J. és Bateman A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*. 44, D279–D285.
- Ford B., Deng W., Clausen J., Oliver S., Boden S., Hemming M. és Trevaskis B., 2016. Barley (*Hordeum vulgare*) circadian clock genes can respond rapidly to temperature in an *EARLY FLOWERING 3*-dependent manner. *Journal of Experimental Botany*. 67, 5517–5528.
- Francia E., Barabaschi D., Tondelli A., Laidó G., Rizza F., Stanca A.M., Busconi M., Fogher C., Stockinger E.J. és Pecchioni N., 2007. Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus *Fr-H2* in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 115, 1083–1091.
- Franklin K.A., Toledo-Ortiz G., Pyott D.E. és Halliday K.J., 2014. Interaction of light and temperature signalling. *Journal of Experimental Botany*. 65, 2859–2871.
- Franklin K.A. és Whitelam G.C., 2007. Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 39, 1410–1413.
- Galiba G., Vágújfalvi A., Li C., Soltész A. és Dubcovsky J., 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science*. 176, 12–19.
- Galon Y., Finkler A. és Fromm H., 2010. Calcium-regulated transcription in plants. *Molecular Plant*. 3, 653–669.
- Gilmour S.J., Fowler S.G. és Thomashow M.F., 2004. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology*. 54, 767–781.
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M. és 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, 433–442.
- Grundy J., Stoker C. és Carré I.A., 2015. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*. 6, 648.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F. és Zhang J.Z., 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 130, 639–648.
- Harwood W.A., Bartlett J.G., Alves S.C., Perry M., Smedley M.A., Leyland N. és Snape J.W., 2009. Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In: Huw DJ., Shewry PR, eds. *Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology<sup>TM</sup> (Methods and Protocols)*. Humana Press, 137–148.
- Haydon M.J., Bell L.J. és Webb A.A.R., 2011. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of Experimental Botany*. 62, 2333–2348.
- Hoagland D.R. és Arnon D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*. 347, 1–32.
- Hoang X.L.T., Nhi D.N.H., Thu N.B.A., Thao N.P. és Tran L.-S.P., 2017. Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses. *Current Genomics*. 18, 483–497.
- Horvath H., Jensen L.G., Wong O.T., Kohl E., Ullrich S.E., Cochran J., Kannangara C.G. és von Wettstein D., 2001. Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 102, 1–11.
- Hou Q., Ufer G. és Bartels D., 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 39, 1029–1048.
- Huang H. és Nusinow D.A., 2016. Into the evening: complex interactions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Genetics*. 32, 674–686.
- Ikura M., Osawa M. és Ames J.B., 2002. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *BioEssays*. 24, 625–636.
- Imai A., Hanzawa Y., Komura M., Yamamoto K.T., Komeda Y. és Takahashi T., 2006. The dwarf phenotype of the *Arabidopsis acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene. *Development*. 133, 3575–3585.
- Jaglo K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T. és Thomashow M.F., 2001. Components of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology*. 127, 910–917.
- Jiao Y., Lau O.S. és Deng X.W., 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*. 8, 217–230.
- Johnson C.H., Knight M.R., Kondo T., Masson P., Sedbrook J., Haley A. és Trewavas A., 1995. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*. 269, 1863–1865.

- Jones S., 2004. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*. 5, 226.
- Kersey P.J., Allen J.E., Allot A., Barba M., Boddu S., Bolt B.J., Carvalho-Silva D., Christensen M., Davis P., Grabmueller C., Kumar N., Liu Z., Maurel T., Moore B., McDowall M.D., Maheswari U., Naamati G., Newman V., Ong C.K., Paulini M., Pedro H., Perry E., Russell M., Sparrow H., Tapanari E., Taylor K., Vullo A., Williams G., Zadissia A., Olson A., Stein J., Wei S., Tello-Ruiz M., Ware D., Luciani A., Potter S., Finn R.D., Urban M., Hammond-Kosack K.E., Bolser D.M., De Silva N., Howe K.L., Langridge N., Maslen G., Staines D.M. és Yates A., 2018. Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*. 46, D802–D808.
- Khanna R., Huq E., Kikis E. a, Al-Sady B., Lanzatella C. és Quail P.H., 2004. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific Basic Helix-Loop-Helix transcription factors. *The Plant Cell*. 16, 3033–3044.
- Kielbowicz-Matuk A., Banachowicz E., Turska-Tarska A., Rey P. és Rorat T., 2016. Expression and characterization of a barley phosphatidylinositol transfer protein structurally homologous to the yeast Sec14p protein. *Plant Science*. 246, 98–111.
- Kim W.-Y., Fujiwara S., Suh S.-S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H.G. és Somers D.E., 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 449, 356–362.
- Kim H.-J., Kim Y.-K., Park J.-Y. és Kim J., 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 29, 693–704.
- Knight H., Trewavas A.J. és Knight M.R., 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell*. 8, 489–503.
- Knox A.K., Dhillon T., Cheng H., Tondelli A., Pecchioni N. és Stockinger E.J., 2010. *CBF* gene copy number variation at *Frost Resistance-2* is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. *Theoretical and Applied Genetics*. 121, 21–35.
- Knox A.K., Li C., Vágújfalvi A., Galiba G., Stockinger E.J. és Dubcovsky J., 2008. Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus *Fr-A<sup>m2</sup>* in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology*. 67, 257–270.
- Ku Y.-S., Koo N.S.-C., Li F.W.-Y., Li M.-W., Wang H., Tsai S.-N., Sun F., Lim B.L., Ko W.-H. és Lam H.-M., 2013. GmSAL1 hydrolyzes inositol-1,4,5-trisphosphate and regulates stomatal closure in detached leaves and ion compartmentalization in plant cells. *PLoS ONE*. 8, e78181.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. és Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35, 1547–1549.
- Kumar I., Swaminathan K., Hudson K. és Hudson M.E., 2016. Evolutionary divergence of



- phytochrome protein function in *Zea mays* PIF3 signaling. *Journal of Experimental Botany*. 67, 4231–4240.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., Mcgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. és Higgins D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947–2948.
- Lee N. és Choi G., 2017. Phytochrome-interacting factor from *Arabidopsis* to liverwort. *Current Opinion in Plant Biology*. 35, 54–60.
- Lee C.-M. és Thomashow M.F., 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 15054–15059.
- Levitt J., 1980. Chilling, freezing, and high temperature stresses. In: *Responses of Plants to Environmental Stress*. New York, NY: Academic Press, 145–153.
- Li F.-W. és Mathews S., 2016. Evolutionary aspects of plant photoreceptors. *Journal of Plant Research*. 129, 115–122.
- Lichtenthaler H.K. és Buschmann C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., F4.3.1-F4.3.8.
- Lindberg S., Kader A. és Yemelyanov V., 2012. Calcium signalling in plant cells under environmental stress. In: Ahmad P., Prasad MNV, eds. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer-Verlag New York, 325–360.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. és Shinozaki K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 10, 1391–1406.
- Livak K.J. és Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 25, 402–408.
- Love J., Dodd A.N. és Webb A.A.R., 2004. Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16, 956–966.
- Lu X.D., Zhou C.M., Xu P.B., Luo Q., Lian H.L. és Yang H.Q., 2015. Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1-SPA1 dissociation and photomorphogenic development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 8, 467–478.
- Luo Q., 2011. Temperature thresholds and crop production: a review. *Climatic Change*. 109, 583–598.
- Luo M., Ding L.-W., Ge Z.-J., Wang Z.-Y., Hu B.-L., Yang X.-B., Sun Q.-Y. és Xu Z.-F., 2012. The characterization of SaPIN2b, a plant trichome-localized proteinase inhibitor from *Solanum americanum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 15162–15176.

- Maibam P., Nawkar G.M., Park J.H., Sahi V.P., Lee S.Y. és Kang C.H., 2013. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 11527–11543.
- Marozsán-Tóth Z., Vashegyi I., Galiba G. és Tóth B., 2015. The cold response of *CBF* genes in barley is regulated by distinct signaling mechanisms. *Journal of Plant Physiology*. 181, 42–49.
- Martí Ruiz M.C., Hubbard K.E., Gardner M.J., Jung H.J., Aubry S., Hotta C.T., Mohd-Noh N.I., Robertson F.C., Hearn T.J., Tsai Y.C., Dodd A.N., Hannah M., Carré I.A., Davies J.M., Braam J. és Webb A.A.R., 2018. Circadian oscillations of cytosolic free calcium regulate the *Arabidopsis* circadian clock. *Nature Plants*. 4, 690–698.
- Mathews S. és Sharrock R.A., 1996. The phytochrome gene family in grasses (*Poaceae*): A phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot *Angiosperms*. *Molecular Biology and Evolution*. 13, 1141–1150.
- Matzke A.J.M. és Matzke M.A., 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*. 1, 142–148.
- Miller A.K., Galiba G. és Dubcovsky J., 2006. A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A<sup>m</sup>2* in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 275, 193–203.
- Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P. és Lopato S., 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*. 9, 230–249.
- Nakamura Y., Kato T., Yamashino T., Murakami M. és Mizuno T., 2007. Characterization of a set of Phytochrome-Interacting Factor-Like bHLH proteins in *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71, 1183–1191.
- Ni M., Tepperman J.M. és Quail P.H., 1998. PIF3, a Phytochrome-Interacting Factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic Helix-Loop-Helix protein. *Cell*. 95, 657–667.
- Ni M., Tepperman J.M. és Quail P.H., 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*. 400, 781–784.
- Nohales M.A. és Kay S.A., 2016. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural & Molecular Biology*. 23, 1061–1069.
- Novák A., Boldizsár Á., Ádám É., Kozma-Bognár L., Majláth I., Bága M., Tóth B., Chibbar R. és Galiba G., 2016. Light-quality and temperature-dependent *CBF14* gene expression modulates freezing tolerance in cereals. *Journal of Experimental Botany*. 67, 1285–1295.
- Paik I., Kathare P.K., Kim J. Il és Huq E., 2017. Expanding roles of PIFs in signal integration from multiple processes. *Molecular Plant*. 10, 1035–1046.
- Pareek A., Khurana A., Sharma A.K. és Kumar R., 2017. An overview of signaling regulons during cold stress tolerance in plants. *Current Genomics*. 18, 498–511.

- Peterman T.K., Ohol Y.M., McReynolds L.J. és Luna E.J., 2004. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiology*. 136, 3080–3094.
- Pham V.N., Kathare P.K. és Huq E., 2018. Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant Physiology*. 176, 1025–1038.
- Pires N. és Dolan L., 2010. Origin and diversification of basic-Helix-Loop-Helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*. 27, 862–874.
- Raju S.K.K., Barnes A.C., Schnable J.C. és Roston R.L., 2018. Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Science*. 276, 73–86.
- Ranty B., Aldon D., Cotelle V., Galaud J.-P., Thuleau P. és Mazars C., 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*. 7, 327.
- Raza A., Razzaq A., Mehmood S.S., Zou X., Zhang X., Lv Y. és Xu J., 2019. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*. 8, 34.
- Ricroch A., Clairand P. és Harwood W., 2017. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*. 1, 169–182.
- Rockwell N.C., Su Y.-S. és Lagarias J.C., 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57, 837–858.
- Ruelland E., Kravets V., Derevyanchuk M., Martinec J., Zachowski A. és Pokotylo I., 2015. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*. 114, 129–143.
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K. és 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, 998–1009.
- Sallaud C., Meynard D., Van Boxtel J., Gay C., Bès M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B.F., Rueb S., Delseny M. és Guiderdoni E., 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics*. 106, 1396–1408.
- Schonfeld M.A., Johnson R.C., Carver B.F. és Mornhinweg D.W., 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*. 28, 526–531.
- Seo P.J. és Mas P., 2015. STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends in Plant Science*. 20, 230–237.
- Seo P.J., Park M.-J., Lim M.-H., Kim S.-G., Lee M., Baldwin I.T. és Park C.-M., 2012. A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 24, 2427–2442.

- Sharrock R.A., 2008. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biology*. 9, 230.
- Shen H., Zhong X., Zhao F., Wang Y., Yan B., Li Q., Chen G., Mao B., Wang J., Li Y., Xiao G., He Y., Xiao H., Li J. és He Z., 2015. Overexpression of receptor-like kinase *ERECTA* improves thermotolerance in rice and tomato. *Nature Biotechnology*. 33, 996–1003.
- Shen H., Zhu L., Castillon A., Majee M., Downie B. és Huq E., 2008. Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *The Plant Cell Online*. 20, 1586–1602.
- Shu Q.Y., Cui H.R., Ye G.Y., Wu D.X., Xia Y.W., Gao M.W. és Altosaar I., 2002. Agronomic and morphological characterization of *Agrobacterium*-transformed Bt rice plants. *Euphytica*. 127, 345–352.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. és Higgins D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 7.
- Skinner J.S., Szűcs P., von Zitzewitz J., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Stockinger E.J., Thomashow M.F., Chen T.H.H. és Hayes P.M., 2006. Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics*. 112, 832–842.
- Skinner J.S., von Zitzewitz J., Szűcs P., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Amundsen K., Stockinger E.J., Thomashow M.F., Chen T.H.H. és 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., Harwood W. és 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.
- Stanley D., Rejzek M., Naested H., Smedley M., Otero S., Fahy B., Thorpe F., Nash R.J., Harwood W., Svensson B., Denyer K., Field R.A. és Smith A.M., 2011. The role of  $\alpha$ -glucosidase in germinating barley grains. *Plant Physiology*. 155, 932–943.
- 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. és Thomashow M.F., 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional 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*. 94, 1035–1040.
- Stockinger E.J., Skinner J.S., Gardner K.G., Francia E. és Pecchioni N., 2007. Expression levels of barley *Cbf* genes at the *Frost resistance-H2* locus are dependent upon alleles

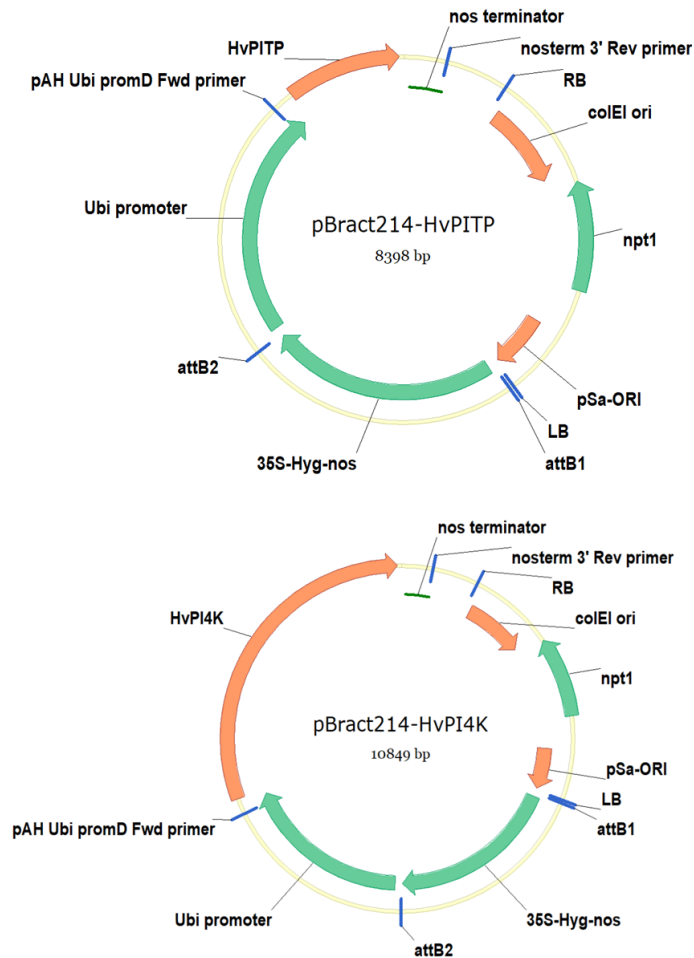
- at *Fr-H1* and *Fr-H2*. *The Plant Journal*. 51, 308–321.
- Subbaiah C.C., Bush D.S. és Sachs M.M., 1998. Mitochondrial contribution to the anoxic  $\text{Ca}^{2+}$  signal in maize suspension-cultured cells. *Plant physiology*. 118, 759–771.
- Sutka J., 1981. Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 59, 145–152.
- Testerink C. és Munnik T., 2011. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62, 2349–2361.
- Thomashow M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50, 571–599.
- Toledo-Ortiz G., Huq E. és Quail P.H., 2003. The *Arabidopsis* basic-Helix-Loop-Helix transcription factor family. *The Plant Cell*. 15, 1749–1770.
- Travella S., Ross S.M., Harden J., Everett C., Snape J.W. és Harwood W.A., 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*. 23, 780–789.
- Vágújfalvi A., Aprile A., Miller A., Dubcovsky J., Delugu G., Galiba G. és Cattivelli L., 2005. The expression of several *Cbf* genes at the *Fr-A2* locus is linked to frost resistance in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*. 274, 506–514.
- Vágújfalvi A., Galiba G., Cattivelli L. és 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, 60–67.
- Vazquez-Tello A., Ouellet F. és Sarhan F., 1998. Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of *Wcs120*, a cold-specific gene in wheat. *Molecular and General Genetics*. 257, 157–166.
- Vyroubalová Š., Šmehilová M., Galuszka P. és Ohnoutková L., 2011. Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biologia Plantarum*. 55, 213–224.
- Wan Y. és Lemaux P.G., 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*. 104, 37–48.
- Wang F., Guo Z., Li H., Wang M., Onac E., Zhou J., Xia X., Shi K., Yu J. és Zhou Y., 2016a. Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling. *Plant Physiology*. 170, 459–471.
- Wang X., Shan X., Xue C., Wu Y., Su S., Li S., Liu H., Jiang Y., Zhang Y. és Yuan Y., 2016b. Isolation and functional characterization of a cold responsive phosphatidylinositol transfer-associated protein, *ZmSEC14p*, from maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*. 35, 1671–1686.
- Wang E., Wang J., Zhu X., Hao W., Wang L., Li Q., Zhang L., He W., Lu B., Lin H., Ma H., Zhang G. és He Z., 2008. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*. 40, 1370–1374.

- Wang X., Wu D., Yang Q., Zeng J., Jin G., Chen Z.-H., Zhang G. és Dai F., 2016c. Identification of mild freezing shock response pathways in barley based on transcriptome profiling. *Frontiers in Plant Science*. 7, 106.
- Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M. és Barton G.J., 2009. Jalview version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 25, 1189–1191.
- Webb A.A.R., 2003. The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytologist*. 160, 281–303.
- Wu H.-C. és Jinn T.-L., 2012. Oscillation regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and heat-stress related genes in response to heat stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Signaling & Behavior*. 7, 1056–1057.
- Xue H., Chen X. és Li G., 2007. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 483–489.
- Xue H.-W., Chen X. és Mei Y., 2009. Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal*. 421, 145–156.
- Yamaguchi-Shinozaki K. és 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, 251–264.
- Yáñez M., Gil-Longo J. és Campos-Toimil M., 2012. Calcium binding proteins. In: Islam S, ed. *Calcium Signaling*. Springer Netherlands, 461–482.
- Yuan P., Yang T. és Poovaiah B.W., 2018. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 3896.
- Zadoks J.C., Chang T.T. és Konzak C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14, 415–421.

## 14.2 Kiegészítő ábrák, táblázatok

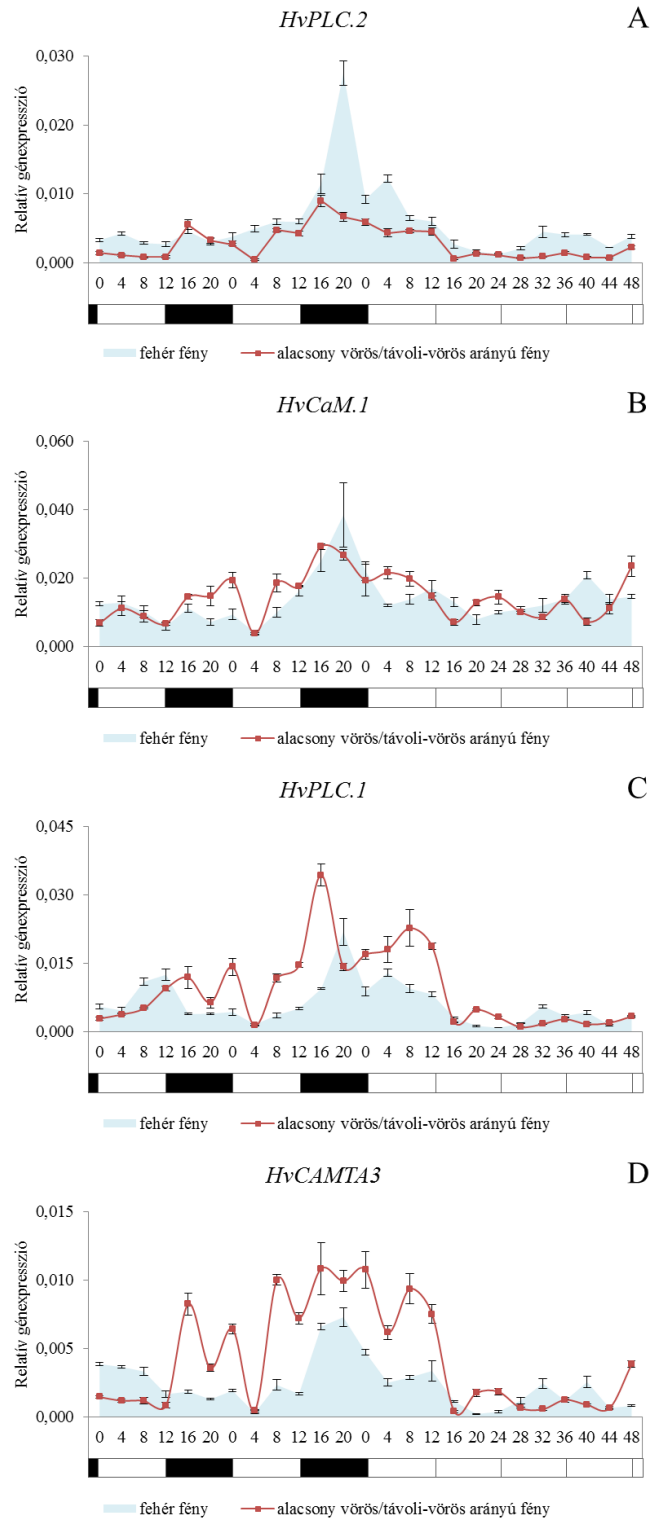
1. melléklet: A Real-Time qPCR során alkalmazott primerek listája és forrása. A: saját tervezés; B: Burton et al., 2004; C: Morran et al., 2011; D: Dhillon et al., 2017.

Gén neve	Orientáció	Szekvencia	NCBI azonosító	Forrás
<i>HvCyclophilin</i>	Fw	CCTGTCGTGTCGTCGGTCTAAA	AK253120.1	B
	Rev	ACGCAGATCCAGCAGCCTAAAG		
<i>HvCCA1</i>	Fw	AATAAGACTGGGGCAACTGGC	JN603242.1	A
	Rev	TAGTTGTGGGAAAGGGCTG		
<i>HvTOC1</i>	Fw	AGGCAGAAAAGGAAGGACCG	HQ850268.1	A
	Rev	TGCCTAACAACTGACCCCG		
<i>HvPITP</i>	Fw	AGTGGTACGGCATGACCATGGAG	AK374523.1	A
	Rev	CTACGTGCAGCTCCCCATGACTG		
<i>HvPI4K</i>	Fw	CTATTGCTAATCTTCGGAAGCGTTTC	AK360859.1	A
	Rev	CTATTTCTCAATACCTTGCTGCAAGTATTGAATC		
<i>HvPLC.1</i>	Fw	GCCACAACCTCTACCTCACCG	AK370341.1	A
	Rev	TAGGGAGATGCGACGAAAGC		
<i>HvPLC.2</i>	Fw	TCTCCAAGCCAAAGTAGCCG	AK360343.1	A
	Rev	CCCTGAATTCTTGTGGTGGTTTAG		
<i>HvPLD</i>	Fw	AAAGGGCATGATTGTGGACG	AJ495780.1	A
	Rev	TCCACGAGGGGCAGAAATC		
<i>HvCBL2</i>	Fw	AGACGAGCAAGAAGGAGAGCC	HQ696014.1	A
	Rev	CACGAGCAAACCTCTCAAACCC		
<i>HvCaM.1</i>	Fw	CGGTGTCCTTCATCTTGCG	GQ926857.1	A
	Rev	ACGAGGTTGATGCTGACGG		
<i>HvCaM.2</i>	Fw	CAACGGCACCATTGACTTCC	M27303.1	A
	Rev	GCAGAGATGAAGCCGTTTTGG		
<i>HvCDPK12</i>	Fw	TTTGCTATGTGGTGTCCCC	EU240660.2	A
	Rev	GCAGAGAGCCGCTTTGTAGG		
<i>HvCAMTA3</i>	Fw	ATCTCGAAGTCAAGGCTGGC	AK365210.1	A
	Rev	TCGTATTCAGAGGCTTGCCG		
<i>HvCBF1</i>	Fw	ATGGACGATGGTATGGACTTC	AY785839.1	C
	Rev	TGCACATGCATTAGTAGTTC		
<i>HvCBF2A</i>	Fw	CCGCAGTTTGAGGAGCAAG	AY785841.1	A
	Rev	CGTCGGCTGGGTGCTG		
<i>HvCBF3</i>	Fw	TGTTCAGGCTTGACTTGTTCC	EU331981.1	C
	Rev	AAACAGAGCAGAATCATCTGG		
<i>HvCBF4B</i>	Fw	GATTATTCTCCAGTAGCGTGTCCATC	AY785850.1	A
	Rev	GCAGTCGAACAAATAGCTCCATAGTG		
<i>HvCBF6</i>	Fw	TGGGATGGGACCTTTACTACG	EU332012.1	C
	Rev	GCATCAATCGGAAGCCAAGAC		
<i>HvCBF9</i>	Fw	AGCACTACTGTCAACATGTAG	AY785877.1	C
	Rev	CCTTGATTTGATTTCATGGAG		
<i>HvCBF10A</i>	Fw	ATGGACATCGAAATGTTTCAGG	AY785881.1	C
	Rev	AGTCAAAACAAAGCAGAGTCC		
<i>HvCBF11</i>	Fw	TGCAGGGCTATCTTGACATGG	AY785889.1	C
	Rev	ACAGGTTTGTCTGGATGACC		
<i>HvCBF12</i>	Fw	CTTTGCTTAACGCTTCAAACC	EU593539.1	D
	Rev	ACAGCTTGTGGTGTGTGACG		
<i>HvCBF14</i>	Fw	GTTGAATGAGCACTGGTTTGG	DQ151545.1	C
	Rev	ACAATGAACGAGCAGGTATGG		
<i>HvCBF15</i>	Fw	GGACCTGGACACATACTATGC	EU593535.1	C
	Rev	TGCTGGAAGGGAACAGCTTCG		
<i>HvCBF16</i>	Fw	ATGGACCTGGGCACGTACTAC	EU593542.1	C
	Rev	TGCATAGAATCAAAGCAGCTG		



2. melléklet: A pBract214-HvPITP és pBract214-HvPI4K vektorkonstrukciók térképe. A *hygromycin foszfotransferáz* szelektációs markergén folyamatos expresszióját a kukoricából származó konstitutív 35S promóter biztosította. A vektorok térképét a Vector NTI® programmal (Invitrogen Corp., Kanada) készítettük el.



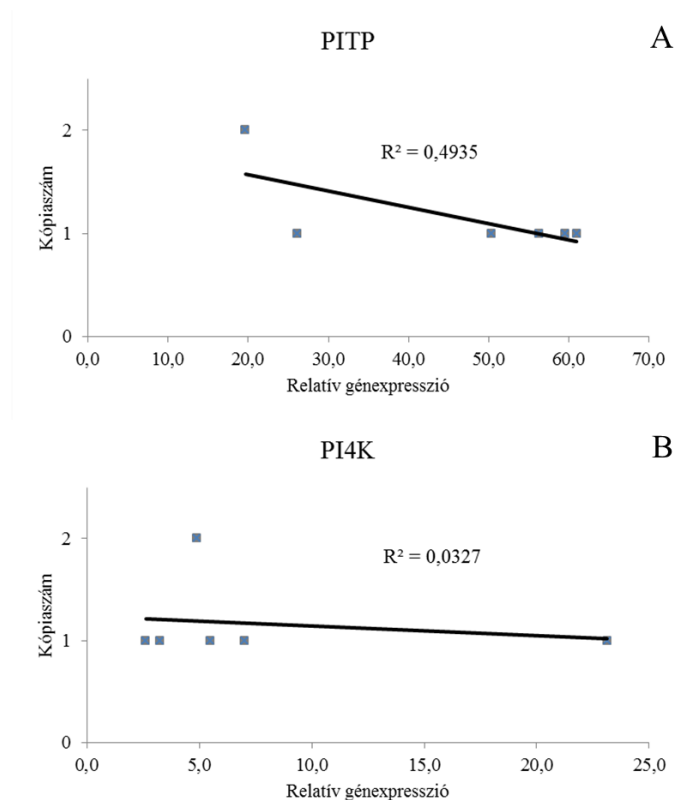


3. melléklet: A *HvPLC.2* (A), *HvCaM.1* (B), *HvPLC.1* (C) és *HvCAMTA3* (D) gének expressziós mintázata fehér-, valamint alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénykezelés hatására. Az abszcissa értékei a mesterséges megvilágítás kezdete óta eltelt időt jelzik, órákban kifejezve. A fekete/fehér skála a sötét/fény szakaszokat reprezentálja.

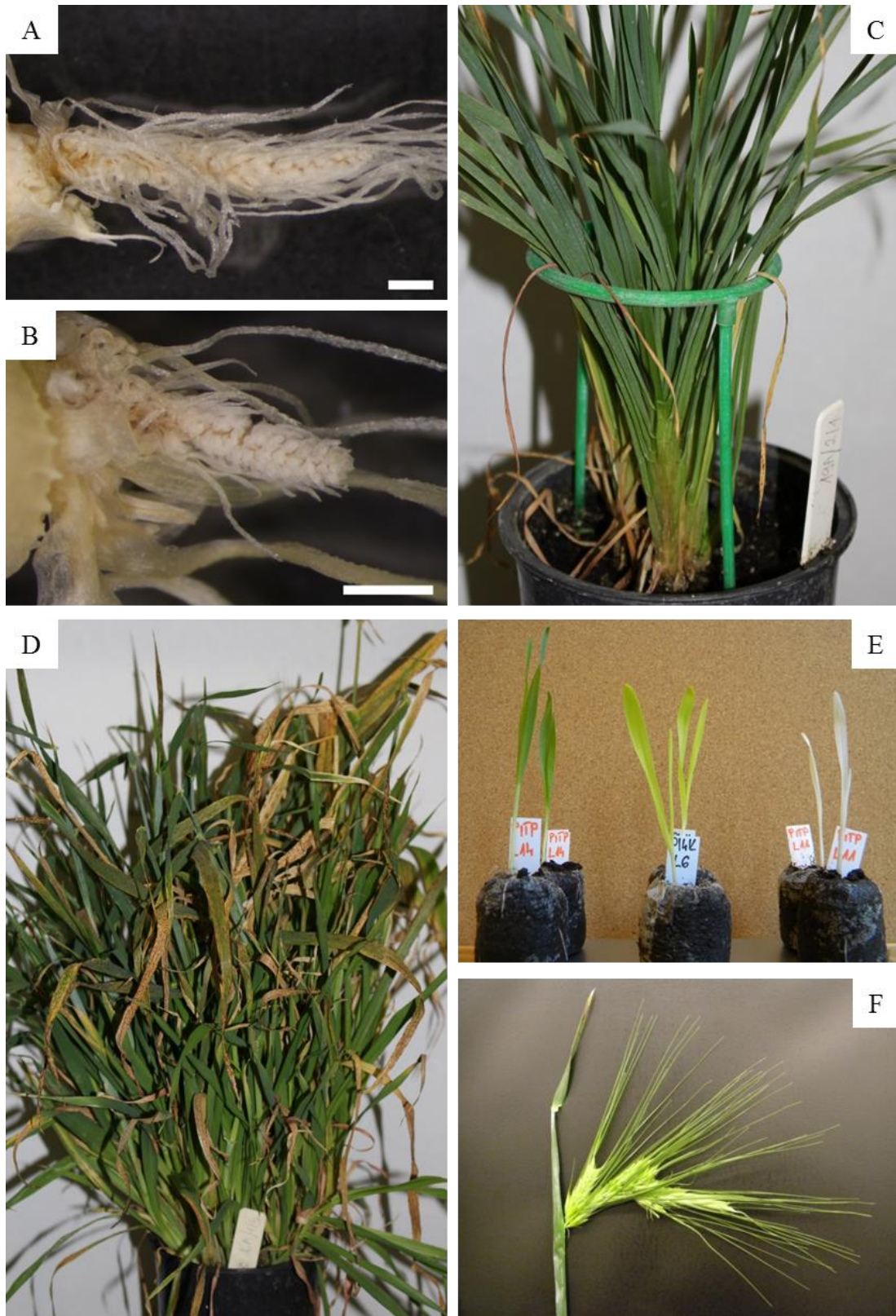
4. melléklet: *HvPITP* és *HvPI4K* transzgenikus növények kópiaszám meghatározása a T<sub>0</sub> nemzedékben. A vizsgálat során a *hpt* szelekciós markergén jelenlétét és beépülésének gyakoriságát vizsgáltuk. Negatív kontrollként a Golden Promise vad típust alkalmaztuk.

Genotípus		Kópiaszám
PITP	L1	1
	L2	1
	L3	1
	L4	1
	L5	6
	L6	1
	L7	2
	L8	2
	L9	2
	L10	1
	L11	1
	L12	1
	L13	1
	L14	1
	L15	1

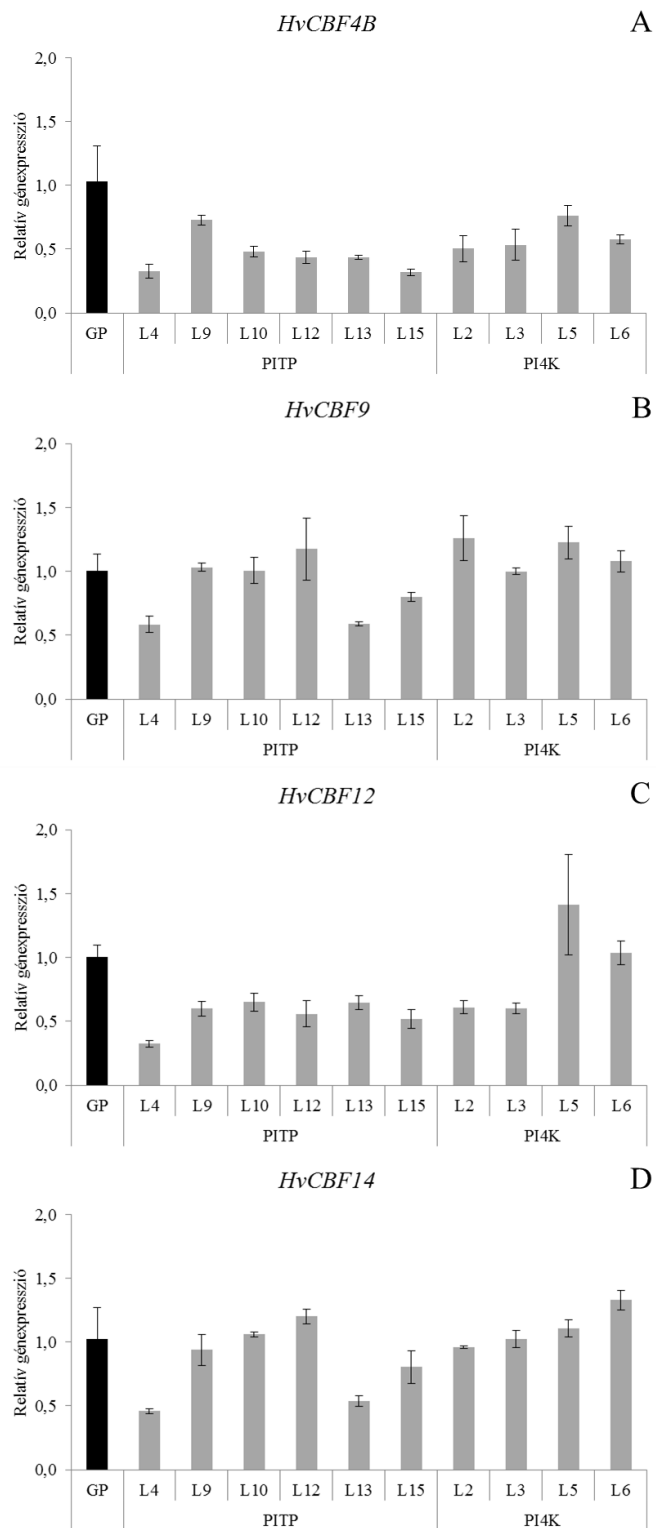
Genotípus		Kópiaszám
PI4K	L1	1
	L2	1
	L3	2
	L4	1
	L5	1
	L6	1
	L7	1
	L8	1
	L9	2
	L10	2
	L11	1
	L12	2
	L13	2
Golden Promise		0



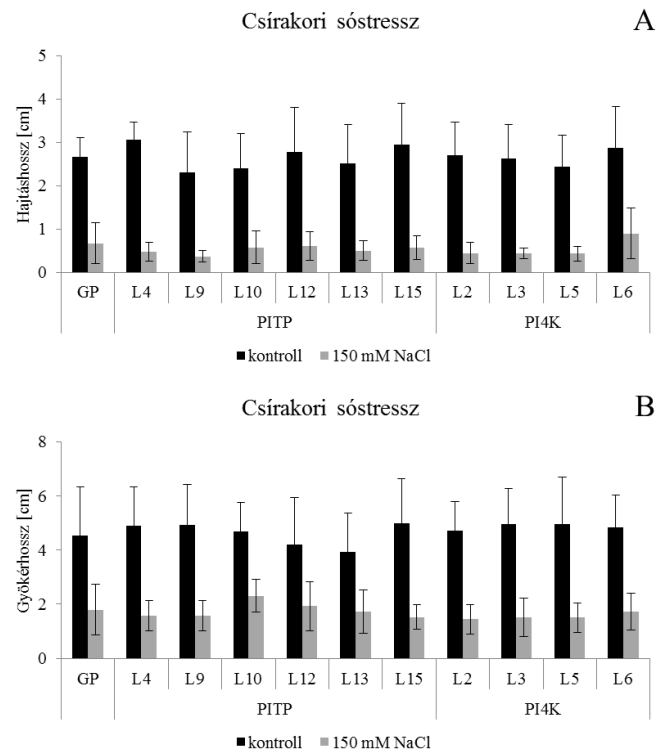
5. melléklet: Korrelációs vizsgálat a *HvPITP* (A) és *HvPI4K* (B) gének beépülésének gyakorisága, valamint a transzgének kifejeződése között. Az ábrázolt értékek (szürke négyzetek) egy-egy transzgénikus vonalat, az abszcissa relatív génexpressziós értékeket, míg az ordináta a *hpt* szelektációs markergén alapján meghatározott kópiaszámot reprezentálnak.



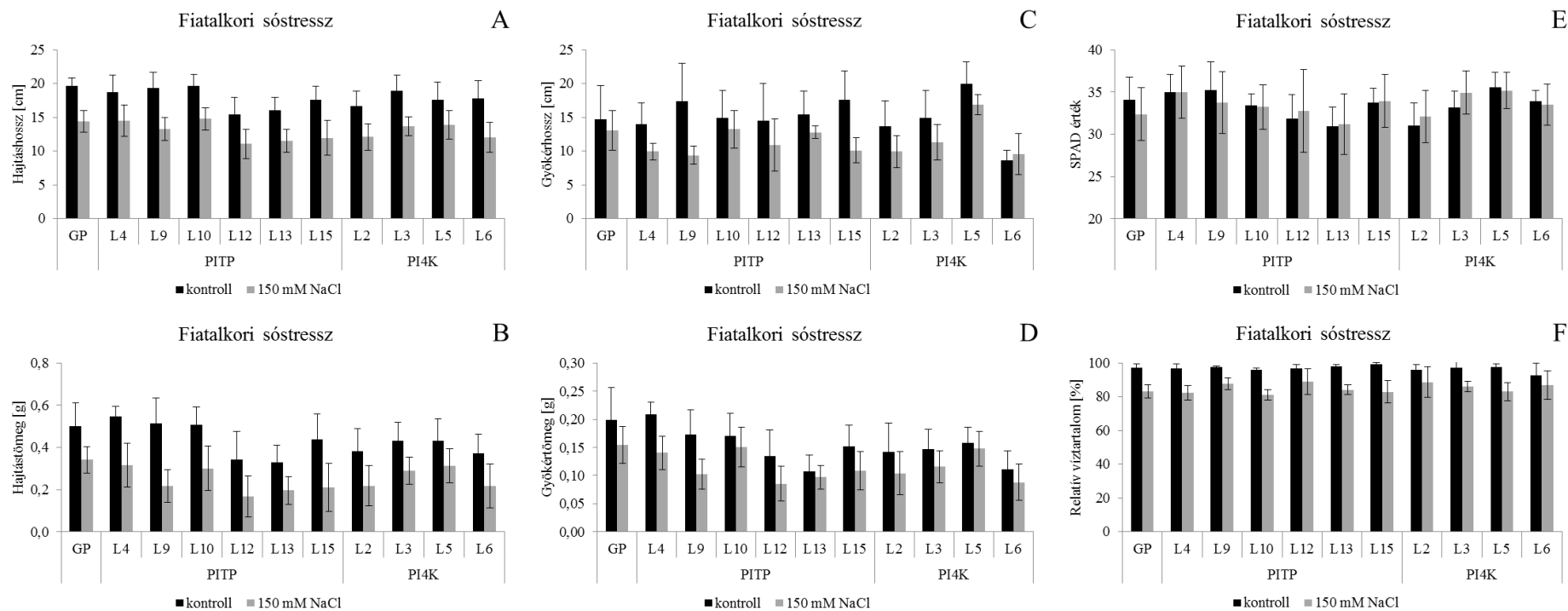
6. melléklet: Fejlődési rendellenességek a *HvP1TP* és *HvP14K* transzgenikus vonalaknál. Abnormális kalászfajlás (A és B; skála: 1,0 mm). Internódiumok nélküli növény (C). Vegetatív stádiumban ragadt növény (D). Klorofill hiányos transzgenikus egyedek (E). Abnormális kalászfajlás a P1TP L4 esetében (F).



7. melléklet: A *HvCBF4B* (A), *HvCBF9* (B), *HvCBF12* (C) és *HvCBF14* (D) gének kifejeződésének vizsgálata a homozigóta T<sub>3</sub> populáció esetében. A relatív génexpressziós értékeket a *HvCyclophilin* referencia génre, valamint a Golden Promise vad típus értékeire normalizált ( $\Delta\Delta C_q$ ) 3-3 biológiai- és technikai ismétlés alapján határoztuk meg.

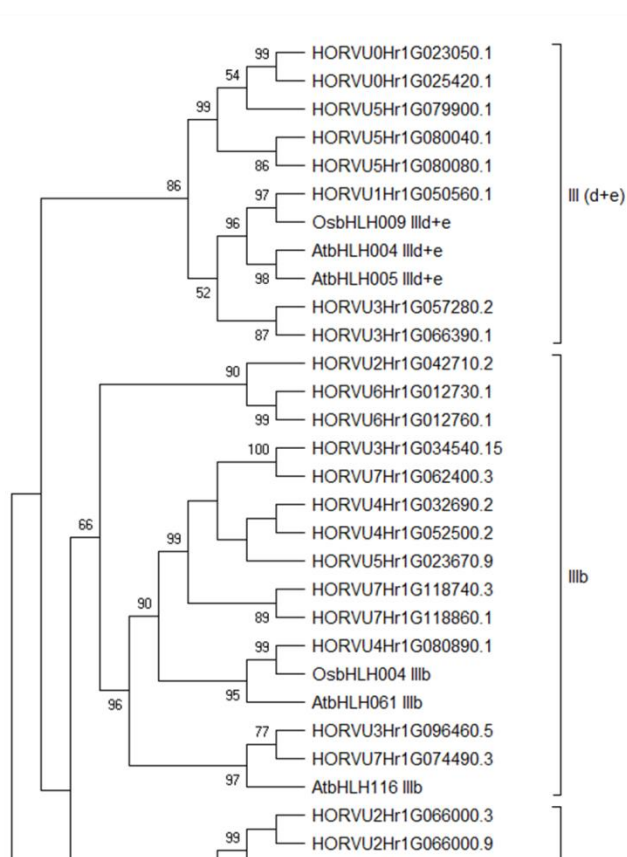


8. melléklet: A csírkori NaCl kezelés hatása a homozigóta T<sub>3</sub> populációból származó hat PITP és négy PI4K transzformáns vonal, valamint a Golden Promise vad típus hajtáshossz (A), illetve gyökérhossz (B) változására.

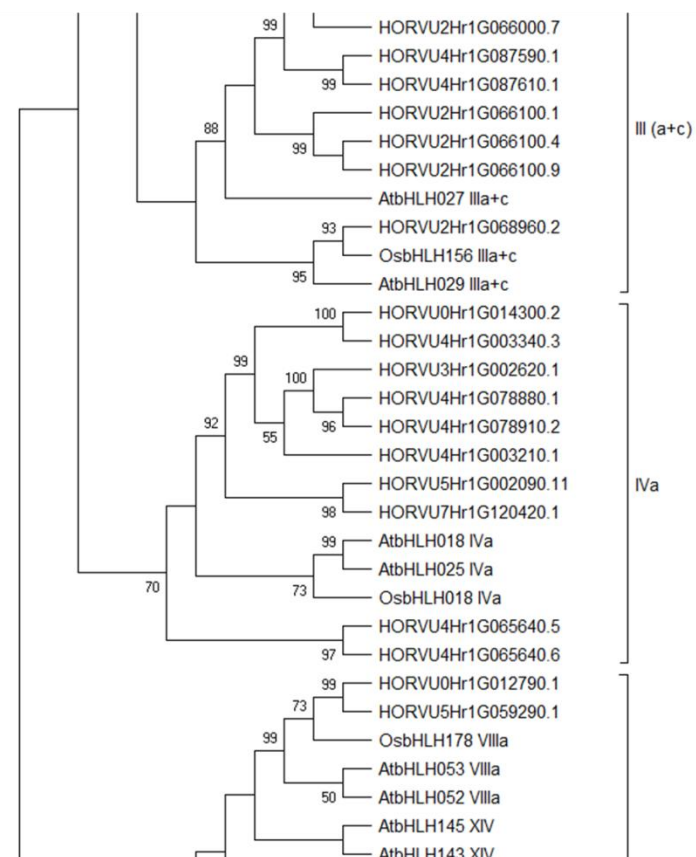


9. melléklet: Hidropónikus körülmények között alkalmazott 150 mM NaCl hatása a *HvP1TP* és *HvP14K* túltermelő transzgenikus vonalak, valamint a Golden Promise vad típus hajtáshossz (A), hajtástömeg (B), gyökérhossz (C), gyökértömeg (D), SPAD érték (E), valamint relatív víztartalom (F) változásaira.

1.



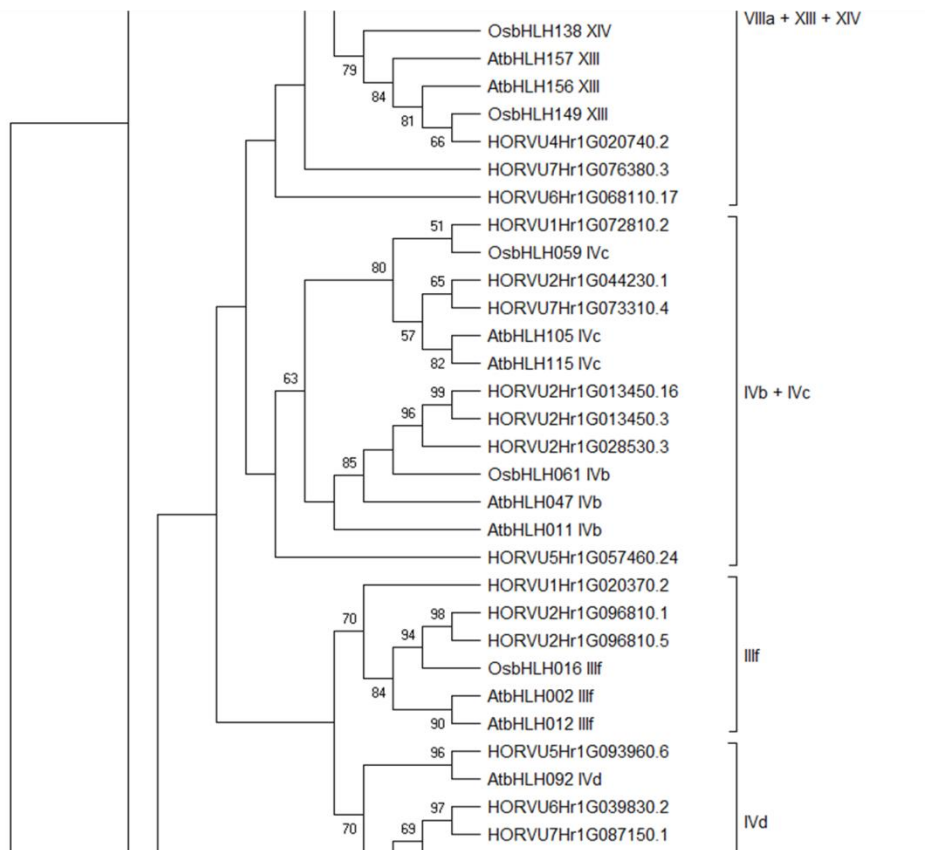
2.



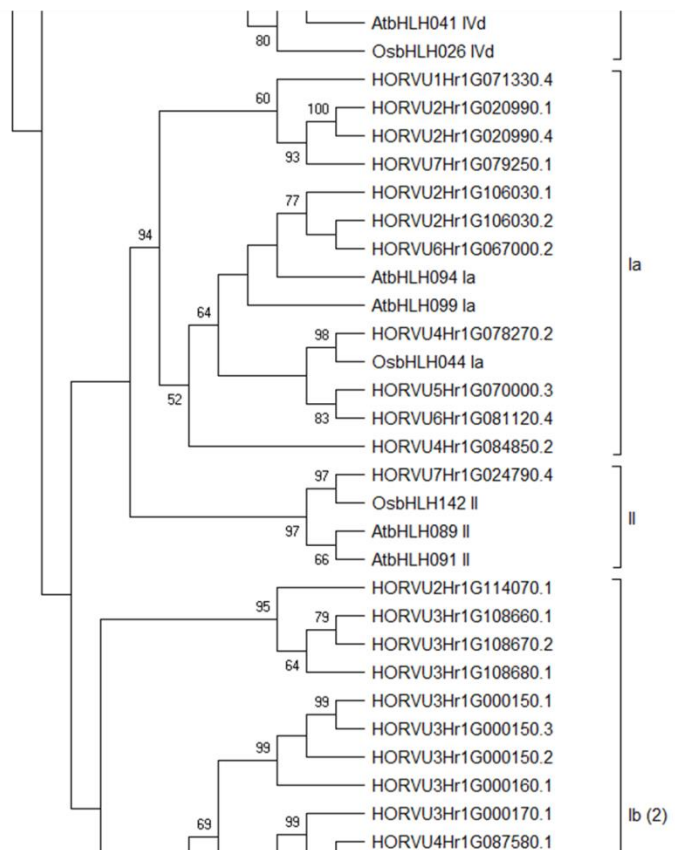
10. melléklet: Az árpa bHLH fehérjének filogenetikai analízise. Az általunk azonosított 183 árpa bHLH szekvencia mellett a 3. táblázatban (38. oldal) szereplő szekvenciákat vontuk be az elemzésbe. A vonalakra írt számok az elágazások valószínűségét jelölik, százalékban kifejezve, melyeket az 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap vizsgálat (Felsenstein, 1985) alapján kaptunk. Az 50%-nál kisebb valószínűségi elágazások értékeit nem tüntettük fel. Az ismert *At*, *Os* és *Gm* PIF szekvenciákat tartalmazó alcsoportot piros szín jelöli.



3.

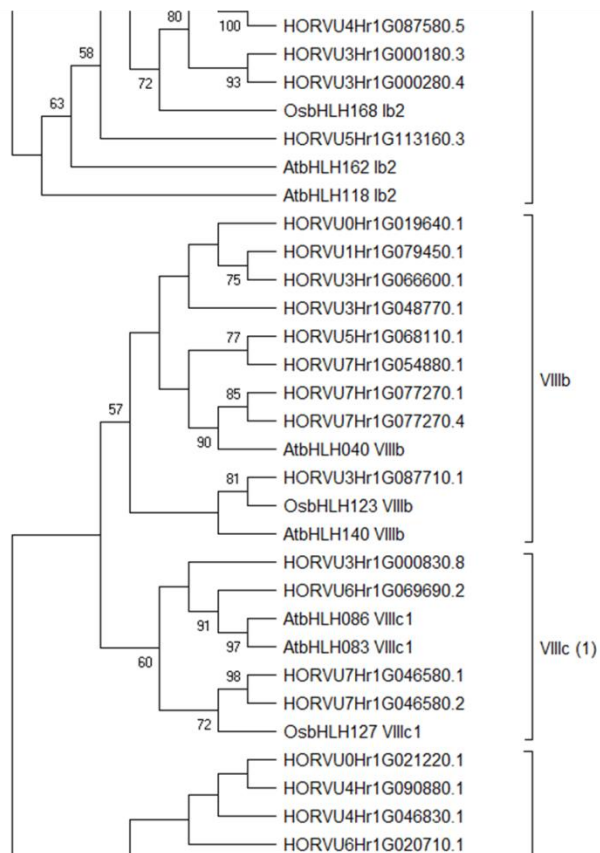


4.

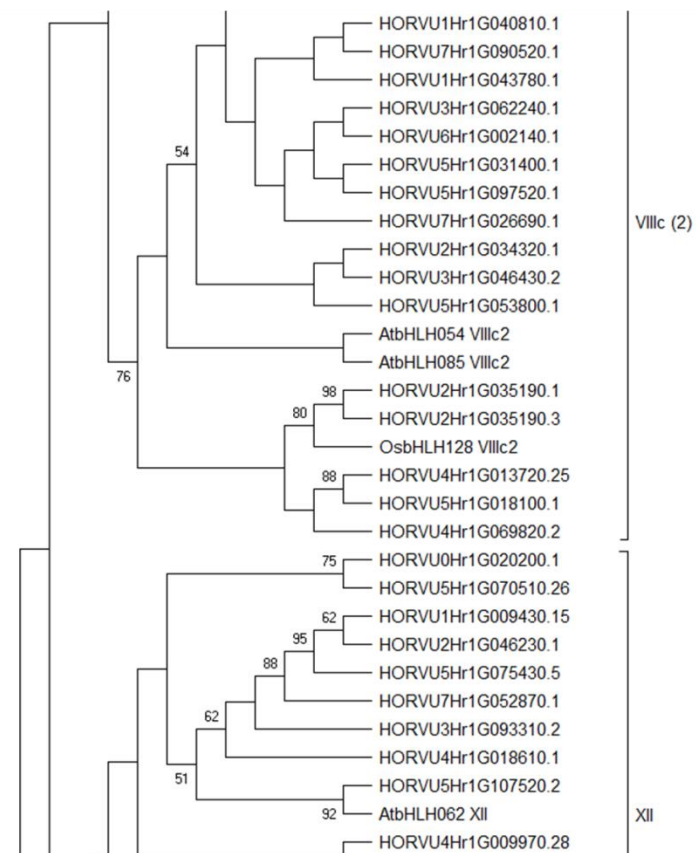


A 10. melléklet folytatása.

5.

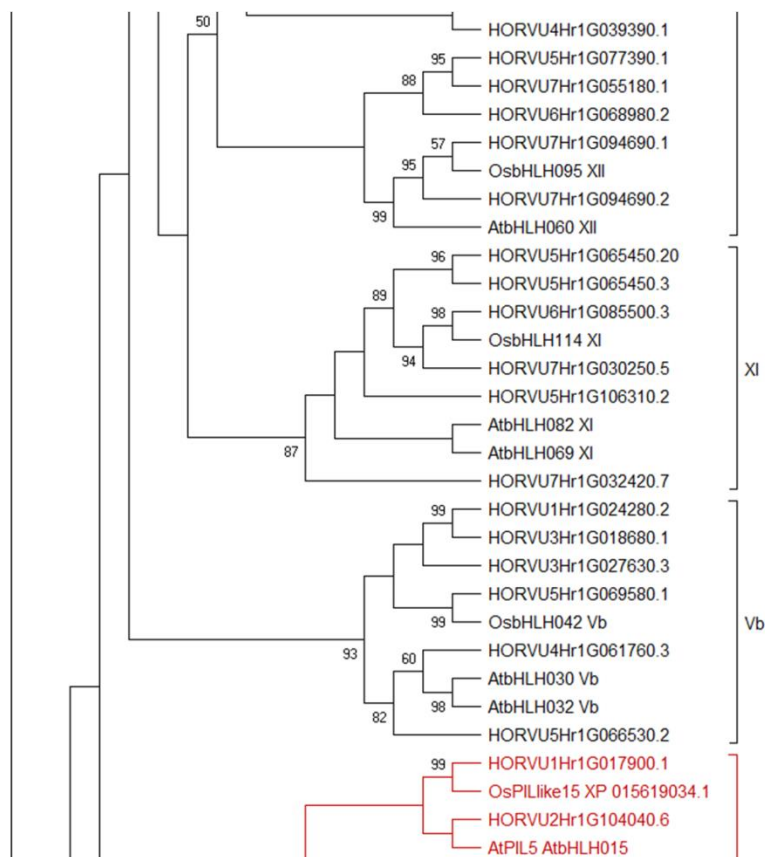


6.

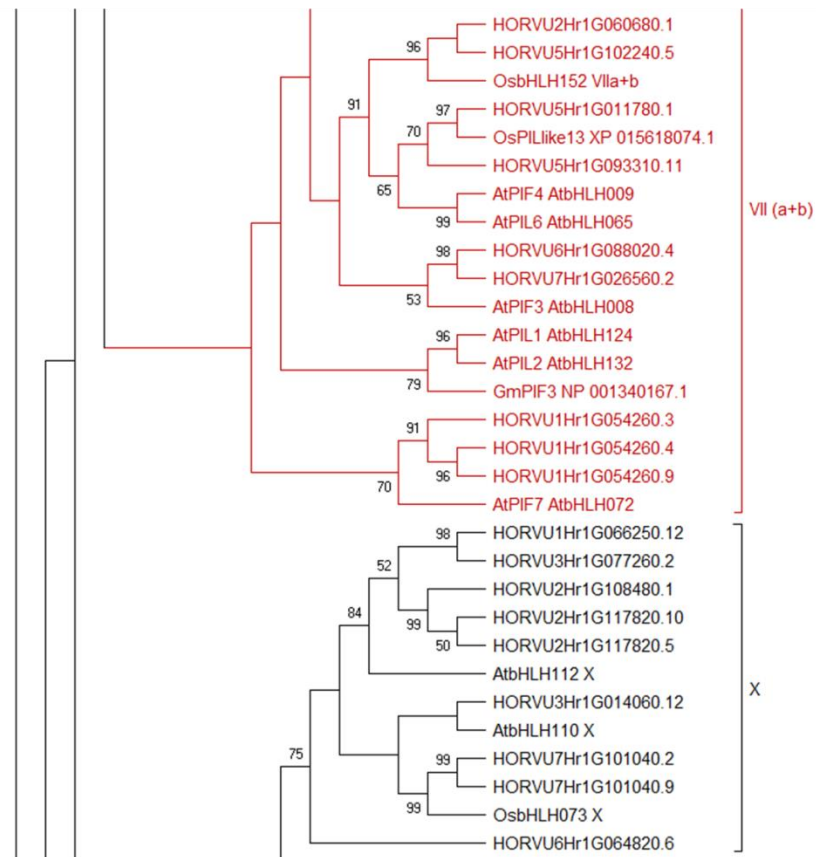


A 10. melléklet folytatása.

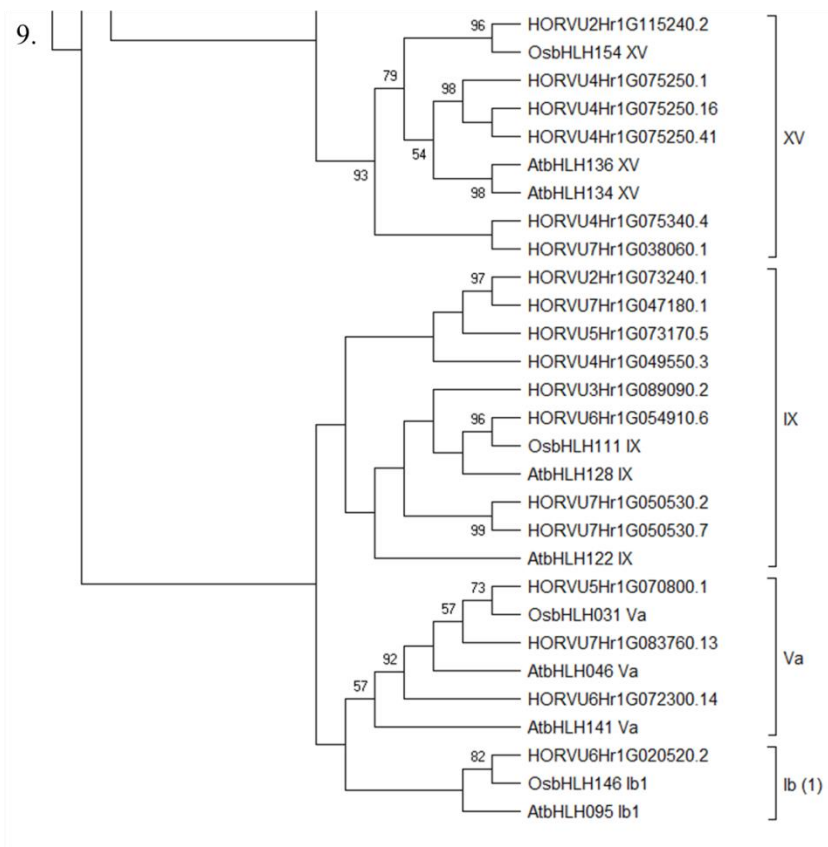
7.



8.



A 10. melléklet folytatása.



A 10. melléklet folytatása.

## 15 JELEN DOKTORI DISSZERTÁCIÓHOZ KÖTHETŐ PUBLIKÁCIÓK

### NEMZETKÖZI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT IF-ES CIKK

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Soltész A., Boldizsár Á., Gulyás Z., Kalapos B., Monostori I., Kozma-Bognár L., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2017. Circadian and Light Regulated Expression of *CBFs* and their Upstream Signalling Genes in Barley. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1828. (IF<sub>2017</sub>: 3,687)

Gierczik K., Székely A., Ahres M., Marozsán-Tóth Zs., Vashegyi I., Harwood W., Tóth B., Galiba G., Soltész A. és Vágújfalvi A., 2019. Overexpression of two upstream phospholipid signaling genes improves cold stress response and hypoxia tolerance, but leads to developmental abnormalities in barley. *Plant Molecular Biology Reporter*. 37, 314–326. (IF<sub>2018</sub>: 1,604)

### HAZAI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT IF NÉLKÜLI CIKK

Gierczik K., Vágújfalvi A., Galiba G. és Kalapos B., 2019. *In silico* identification of putative barley Phytochrome Interacting Factors (PIFs). *Georgikon for Agriculture*. 23, 2–15.

### KONFERENCIA KIADVÁNYBAN MEGJELENT TÖBB OLDALAS ÖSSZEFOGLALÓ

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2016. A fény hatása az árpa stressz-indukált szignáltranszdukciós génjeinek ritmikus expressziós mintázatára. In: Koncz I., Szova I., szerk. *PEME XIII. PhD. - Konferencia*. Budapest: Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület, 53–64.

Novák A., Boldizsár Á., Gierczik K., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L., Vágújfalvi A., Bága M., Chibbar R. és Galiba G., 2017. Circadian and light quality regulated expression of *CBF* genes influences the cold acclimation process in cereals. In: Börner A., Galiba G., Bálint A., szerk. *4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding: Cereal Research Communications (Suppl.)*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 61–62.

Gierczik K., Vágújfalvi A., Galiba G. és Kalapos B., 2019. HvPIF transzkripciós faktorok *in silico* azonosítása. In: Karsai I., szerk. *XXV. Növénynevelési Tudományos Nap: Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok*. Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 301–304.

## TUDOMÁNYOS ELŐADÁS

Monostori I., Gierczik K., Boldizsár Á., Novák A., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L., Vágújfalvi A., Rakszegi M., Darkó É. és Galiba G., 2018. Light spectrum dependent regulation of freezing tolerance and yield quality in cereals. In: Börner A., Ciucă M., szerk. *Proceedings of the 17th International EWAC Conference*. Bukarest: EUCARPIA, 126.

## TUDOMÁNYOS POSZTER

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Boldizsár Á., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2017. Az árpa kalcium-függő jelátviteli útvonal elemeinek és *CBF* génjeinek ritmikus expressziós mintázata. In: Veisz, O., szerk. *XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap*. Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 102.

Gierczik K., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2018. Far-red light regulated circadian expression of *CBFs* and their upstream signalling genes in barley. In: Tamás L., Zelenyánszki H., szerk. *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book*. Szeged: JATEPress Kiadó, 117.

Galiba G., Boldizsár Á., Gierczik K., Novák A., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L. és Vágújfalvi A., 2018. Molecular background of circadian clock-, light quality- and temperature dependent regulation of freezing tolerance in cereals. In: *Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen*. Kopenhagen: Department of Plant and Environmental Sciences, 67.

Gierczik K., Kalapos B., Vágújfalvi A. és Galiba G., 2019. Identification of putative Phytochrome Interacting Factors (PIFs) in domesticated barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Book of Abstracts 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 90.

## 16 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen disszertációban bemutatott kísérleteket a martonvásári Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében, a Növényi Molekuláris Biológia Osztály munkatársaként végeztem el.

Köszönettel tartozom Prof. Galiba Gábornak, aki Osztályunk vezetőjeként lehetőséget biztosított arra, hogy doktori tanulmányaimat elkezdjem, és vállalta a témavezetésemet is. Infrastrukturális, valamint jelentős anyagi támogatása tette lehetővé az itt bemutatott kísérletek elvégzését. Gábor hozzáállása, valamint a kutatói közösségben betöltött szerepe révén mindent megtett annak érdekében, hogy mi, PhD hallgatók is a közösség tagjai lehessünk. Köszönet érte!

Nagyon hálás vagyok Dr. Vágújfalvi Attila témavezetőmnek, akihez az évek során bármikor fordulhattam segítségért. Nemcsak szakmai támogatást nyújtott a kísérletek tervezésében, az eredmények értelmezésében, vagy a dolgozat alapjául szolgáló publikációk megírásában, hanem az ő segítségével egy koherens disszertáció születhetett meg.

Szeretném megköszönni Dr. Bolvári-Soltész Alexandrának, hogy MSc-s tanulmányaim alatt felkarolt és elmélyítette a tudásomat a molekuláris biológiában. Hálás vagyok neki, hogy megalapozta a PhD témámat a transzformáns növények előállításával.

Köszönettel tartozom Kalapos Balázs segítségéért is, aki bevezetett az *in silico* módszerek rejtelseibe. Nélküle még mindig a HLH domén profilt keresném...

Nagyon köszönöm Dr. Novák Aliz fáradozását, hogy megmutatta nekem a kísérleteim kiértékeléséhez szükséges statisztikai módszerek megfelelő alkalmazását, valamint a különféle labor praktikákat, fortélyokat is. Köszönöm Aliz, Dr. Boldizsár Ákos, Dr. Gulyás Zsolt és Kalapos Balázs közreműködését a cirkadián kísérletekhez tartozó mintavételben, valamint Ahres Mohamed segítségét az RNS minták feltárásában.

Hálás vagyok Dr. Tóth Balásznak és Dr. Vashegyi Ildikónak, akik megteremtették a dolgozatom témájának alapjait, és habár rövid időre, de elvállalták a témavezetésemet.

Köszönöm Dr. Kozma-Bognár László és Prof. Wendy Harwood segítségét, akik ötleteikkel és szakmai tanácsaikkal segítettek, hogy a disszertáció alapjául szolgáló cikkek magasabb színvonalúak legyenek.

Köszönettel tartozom Dr. Kocsy Gábornak, aki elvállalta a német nyelvű Kivonat javítását.

Szeretném megköszönni Horváth Imréné és Fehér E. Mónika munkatársaimnak a kísérletek kivitelezésében, és a növények nevelése során nyújtott rengeteg segítségét, valamint, hogy bevezettek az „agrár” életbe.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni az Osztály jelenlegi és egykori munkatársainak, akik olyan munkakörnyezetet alakítottak ki, ahova szívesen jártam nap mint nap dolgozni.

*Szeretném megköszönni Nektek a sok-sok segítséget, a hasznos tanácsokat,  
a végtelen türelmet és a baráti támogatást!*

*Krisztián*