



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**Hidegstresszben szerepet játszó jelátviteli utak azonosítása génexpressziós vizsgálatokkal
gabonafélékben**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DOI: 10.54598/003860

Marozsánné Tóth Zsuzsa

Gödöllő

2023

A doktori iskola

megnevezése: Festetics Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

vezetője: Dr. Anda Angéla

Egyetemi tanár, DSc

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus

Festetics Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Galiba Gábor Ottó

tudományos tanácsadó, DSc

Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet, ELKH,

Biológiai Erőforrások Osztálya;

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus

Festetics Doktori Iskola

.....
Dr. Anda Angéla

jóváhagyása

.....
Dr. Galiba Gábor

jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
KIVONAT.....	7
ABSTRACT	9
1. BEVEZETÉS, A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE	11
2. SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	13
2.1. Az alacsony hőmérsékleti stressz és fagyállóság	13
2.2 A hidegakklimatizáció és a fagyállóság kialakulásáért felelős genetikai háttér áttekintése	13
2.3. A hidegstressz hatására lezajló jelátviteli folyamatok áttekintés	17
2.4 Foszfolipáz C (PLC), foszfolipáz D (PLD), kalcium-függő jelátviteli útvonalak farmakológiai háttérének áttekintése	21
3. KÉRDÉSFELTEVÉS.....	24
4. CÉLKITŰZÉSEK	24
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZERSZEREK.....	26
5.1. Növényi anyagok	26
5.2. <i>COR14b</i> és <i>CBF</i> gének expressziós intenzitásának megállapítása hidegstresszválasz során.....	26
5.2.1. Növénynevelés, edzés körülményei	26
5.2.2. Mintavételezés	26
5.2.3. RNS izolálás és cDNS átírás	27
5.2.4. Szemikvantitatív PCR.....	27
5.2.5. Kvantitatív valós idejű PCR	29
5.3. PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatásának vizsgálata a <i>CBF-COR</i> rendszer működésére inhibitorok használatával	30
5.3.1. Növénynevelés, inhibitor kezelések, edzés körülményei	30
5.3.2. Mintavételezés és cDNS átírás.....	31
5.3.3. Az inhibitoros kezelésekből származó mintákon történő génexpressziós vizsgálat	31

5.4. Hidegstressz által kiváltott PLC , PLD és kalcium jelátvitel hatása a fagyállóságra, fagyasztási tesztek.....	31
5.4.1. Növénynevelés, edzés körülményei	32
5.4.2. Konduktometriás fagyteszt, levélszegmens fagyasztás.....	32
5.4.3. Egész növény fagyasztás.....	33
6. EREDMÉNYEK	35
6.1. <i>COR14b</i> és <i>CBF</i> gének expressziós intenzitásának megállapítása hidegstresszválasz során	35
6.2. PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatása a <i>CBF-COR</i> rendszer működésére inhibitorok használatával	39
6.2.1. Kalcium jelátvitel vizsgálata	40
6.2.2. Foszfolipáz C (PLC) jelátvitel vizsgálata	47
6.2.3. Foszfolipáz D (PLD) jelátvitel vizsgálata	49
6.3. Hidegstressz által kiváltott PLC-, PLD- és kalcium jelátvitel hatása a fagyállóságra, fagyasztási tesztek.....	51
6.3.1. Egész növény fagyasztás árpa esetén, inhibitorok hatása	51
6.3.2. Levélszegmens fagyasztás árpa esetén.....	54
7. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	58
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)	70
9. NEW RESULTS (THESES)	72
10. ÖSSZEFOGLALÁS.....	74
11. SUMMARY	76
12. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	78
13. IRODALOMJEGYZÉK.....	81
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

At	<i>Arabidopsis thaliana</i> L. (lúdfű)
5H	árpa ötös kromoszómája
5A	búza ötös kromoszómája
bp	bázispár
Ca²⁺	kalciumion
CaM	calmodulin (kalmodulin fehérjék)
cDNS	komplementer (kiegészítő) DNS szekvencia
cM	centimorgan
CBF	C-repeat binding factor (C-ismétlődés kötő faktor)
CBF/DREB	C-repeat binding factor / dehydration-responsive element binding factor (C-ismétlődés/dehidratációra érzékeny elem-kötő faktor)
COR	cold-regulated (hideg által szabályozott)
DAG	diacilglicerol
DNH	dehidrin
EGTA	etilén-glikol- <i>bis</i> β-aminoethyl
FI	Fold induction (relatív génexpresszió változás)
FR	frost resistance locus (fagyállósági lókuszt)
<i>Fr-H2</i>	az árpa <i>Fr-2</i> lókusza
<i>Fr-A2</i>	a búza <i>Fr-2</i> lókusza
Fw	forward primer (5' – 3' orientációjú oligonukleotid)
G3116	<i>T. monococcum</i> fagytoleráns genotípus
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> L. (árpa)
ICE	inducer of CBF expression
IP	inositol phosphate (inositol-foszfát)
IP₃	inositol-1, 4, 5-triphosphate (inozitol-1, 4, 5-trifoszfát)
KIN	cold-induced (hideg-indukált)

MAPK	mitogen activated protein kinase
MQ víz	milliQ víz
PA	phosphatidic acid (foszfatidsav)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz lánreakció)
PI	phosphatidylinositol (foszfatidilinozitol)
PI₃K	phosphatidylinositol-3-kinase (foszfatidilinozitol-3-kináz)
PI₃P	phosphatidylinositol-3-phosphate (foszfatidilinozitol-3-foszfát)
PI₄K	phosphatidylinositol-4-kinase (foszfatidilinozitol-4-kináz)
PI₄P	phosphatidylinositol-4-phosphate (foszfatidilinozitol-4-foszfát)
PI₅K	phosphatidylinositol-5-kinase (foszfatidilinozitol-5-kináz)
PI₅P	phosphatidylinositol-5-phosphate (foszfatidilinozitol-5-foszfát)
PIP₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát)
PIP₄K	phosphatidylinositol-4-phosphokinase (foszfatidilinozitol-4-foszfokináz)
PIP₅K	phosphatidylinositol-5-phosphokinase (foszfatidilinozitol-5-foszfokináz)
PITP	phosphatidylinositol transfer protein (foszfatidilinozitol szállítófehérje)
PLC	phospholipase C (foszfolipáz C)
PLD	phospholipase D (foszfolipáz D)
qPCR	quantitative PCR (kvantitatív PCR)
RD	responsive to desiccation (dehidratációra érzékeny)
Rev	reverse primer (3' – 5' orientációjú oligonukleotid)
U73122	1-(6-{[17β-3-metoxi-1,3,5(10)-trién-17-yl]amino}hexil)-1H-pirrol-2,5-dion (inhibitor)
Ta	<i>Triticum aestivum</i> L. (közönséges kenyérbúza)
Tm	<i>Triticum monococcum</i> L. (alakor búza)

KIVONAT

Hidegstresszben szerepet játszó jelátviteli utak azonosítása génexpressziós vizsgálatokkal gabonafélékben

A klímaváltozás következtében az átlagostól eltérő, szélsőséges időjárás előfordulásának gyakorisága nőtt, ami hőmérsékleti, szárazság vagy ozmotikus stresszt idéz elő a kalászosok és más kultúrnövények számára, ezáltal jelentős termeléskiesést és termés-csökkenést okoz. Ez a jelenség előtérbe hozta a gabonafélék abiotikus stressztűrés fokozásának szükségességét. A haszonnövények alkalmazkodóképességének javítása érdekében nagyon fontos megérteni, hogy ezek a növények hogyan képesek érzékelni a környezeti jeleket, és ezek a jelek hogyan alakulnak át molekuláris válaszokká. Így a főbb jelátviteli mechanizmusok vizsgálata és az abiotikus stressztűrésben szerepet játszó jelátviteli komponensek azonosítása nemcsak modellszervezetekben, hanem kultúrnövényekben is nagyon fontos. Jelen munka keretében a kalcium- és foszfolipid jelátviteli komponenseit azonosítottuk és vizsgáltuk árpa- és alakor búzában, valamint ezek hatását a hidegstresszre adott válaszban.

Előkísérleteinkben szemikvantitatív PCR és RT-qPCR segítségével azonosítottuk árpa és alakor búza vonalakban a hidegdedzés hatására megnyilvánuló géneket. A hideg által indukált *CBF* (C-repeat kötő faktor) transzkripciós faktorok és *COR14b* (*cold-regulated*), *DHN5* (*dehidrin*) gének expresszióját RT-qPCR-rel vizsgáltuk hidegkezelést követően kontroll és inhibitorral előkezelt növényekben, hogy azonosítsuk a hideg által kiváltott génexpresszióban szerepet játszó jelátviteli komponenseket. Az említett gének részt vesznek a fagytolerancia kialakításában az ősszel lejátszódó hidegakklimatizációs folyamat során gabonafélékben. A búzában és árpa- és alakor búzában leírt *CBF*-ek olyan transzkripciós faktorok, amelyek az általuk szabályozott hideg indukálta gének promóteréhez kötődve segítik azok kifejeződését, ami a növény megnövekedett fagyűrő képességét eredményezi. Több *CBF* gén indukálható hideggel, továbbá olyanok is ismertek, melyek expresszióját befolyásolja a nappalhossz és a fényminőség, azaz a hullámhossz-összetétel. Kísérleteinkben a foszfolipáz C-t (PLC) U73122 és neomicin molekulákkal gátoltuk, a foszfolipáz D-t (PLD) 1-butanollal. A kalcium jelátviteli komponensek befolyásolására kalcium-kelátképző EGTA-t, Ca^{2+} -csatorna blokkoló lantán-kloridot, vakuoláris Ca^{2+} -csatorna gátló ruténium vöröset, intracelluláris Ca^{2+} -szint növelő mastoparant, Ca^{2+} ionofór ionomicint, Ca^{2+} -pumpa blokkoló tapsigargin-t használtunk. A génexpressziós vizsgálatokon kívül az egyes jelátviteli molekulák hatását egész növény, illetve levélszegmens fagyasztási tesztek segítségével is megvizsgáltuk.

Hideghatásra és inhibitor hiányában az őszi árpában megemelkedett a *HvCBF9*, *HvCBF14*, *HvCOR14b* és *HvDHN5* gének, őszi alakor búzában *TmCBF12*, *TmCBF14* és *TmCOR14b* gének expressziós szintje a szobahőmérsékleten nevelt, kontroll növényekhez képest. Őszi árpában és alakor búzában kimutattuk, mely *CBF*-ek, *COR14b*, illetve *DHN5* gén foszfolipáz C-, foszfolipáz D- vagy Ca^{2+} -függő. Megállapítottuk, hogy a *CBF* géncsaládot hideg regulációjuk szintje alapján három csoportba sorolhatjuk. Elkülöníthetünk olyan *CBF* családot, melyek hidegakklimatizáció során nem, vagy csak kis mértékben aktiválódtak. Ezeket a jelátviteli molekulák blokkolása sem befolyásolta (*HvCBF6*). A második géncsoportba sorolhatók azok a *CBF*-k, melyek hideghatást követően magas szinten aktiválódtak, ilyen a *TmCBF12*, *TmCBF14*, és *HvCBF14*. A harmadik *CBF* csoport tagjaihoz tartoznak azok a gének, melyek a hideghatást követően közepes expressziós növekedést mutattak (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*). *COR14b*, illetve *DHN5* gének esetén elmondható, hogy működésüket a *CBF* géneken kívül több faktor is befolyásolta.

Fagyteszt vizsgálatok és eredmények alapján igazoltuk, hogy egyes hosszú távú inhibitor kezelések letálisak lehetnek a növényekre, illetve negatívan befolyásolják a fagytolerancia kialakulását.

Elmondhatjuk, hogy árpában és búzában a rövid ideig tartó hidegstresszt követően a kalcium, PLC, PLD útvonalak befolyásolják a *CBF-COR* rendszer kinetikáját és a fagytolerancia mértékét, de ezen jelátviteli folyamatok mélyebb megértése további vizsgálatokat igényel.

ABSTRACT

Identification of signaling pathways involved in cold stress by gene expression studies in cereals

As a result of climate change, the frequency of the occurrence of unusual, extreme weather has increased, which causes temperature, drought or osmotic stress for corn plants and other crops, thereby causing a significant loss of production and yield reduction. This phenomenon highlighted the need to increase the abiotic stress tolerance of cereals. In order to improve the adaptive capacity of crop plants, it is very important to understand how these plants are able to sense environmental signals and how these signals are translated into molecular responses. Thus, the examination of the main signaling mechanisms and the identification of the signaling components involved in abiotic stress tolerance are very important not only in model organisms, but also in cultivated plants. Within the framework of this work, we identified and investigated the components of calcium and phospholipid signaling in barley and alakor wheat, as well as their effect on the response to cold stress.

In our preliminary experiments, we used semi-quantitative PCR and RT-qPCR to identify the genes expressed by cold training in barley and alakor wheat lines. The expression of the cold-induced transcription factors *CBF* (C-repeat binding factor) and *COR14b* (cold-regulated), *DHN5* (dehydrin) genes was investigated by RT-qPCR in control and inhibitor-pretreated plants after cold treatment in order to identify their role in cold-induced gene expression playing signaling components. The mentioned genes are involved in the formation of frost tolerance during the cold acclimatization process that takes place in the autumn in cereals. The *CBFs* described in wheat and barley are transcription factors that bind to the promoters of the cold-induced genes they regulate and help their expression, which results in the plant's increased frost tolerance. Several *CBF* genes can be induced by cold, and there are also known ones whose expression is influenced by day length and light quality, i.e. wavelength composition. In our experiments, phospholipase C (PLC) was inhibited with U73122 and neomycin molecules, and phospholipase D (PLD) with 1-butanol. Calcium chelating EGTA, Ca^{2+} -channel blocker lanthanum chloride, vacuolar Ca^{2+} -channel blocker ruthenium red, intracellular Ca^{2+} -level-increasing mastoparan, Ca^{2+} ionophore ionomycin, Ca^{2+} -pump blocker thapsigargin were used to influence the calcium signaling components. In addition to the gene expression tests, the effect of the individual signal transduction molecules was also examined using whole plant and leaf segment freezing tests.

The expression level of *HvCBF9*, *HvCBF14*, *HvCOR14b* and *HvDHN5* genes increased in winter barley, and *TmCBF12*, *TmCBF14* and *TmCOR14b* genes in autumn wheat compared to control plants grown at room temperature, when exposed to cold and in the absence of an inhibitor. In winter barley and spring wheat, we showed which *CBFs*, *COR14b* and *DHN5* genes are phospholipase C-, phospholipase D- or Ca^{2+} dependent. We found that the *CBF* gene family can be classified into three groups based on their level of cold regulation. We can isolate *CBF* families that were not or only slightly activated during cold acclimatization. They were also unaffected by blocking signaling molecules (*HvCBF6*). The *CBFs* that were activated at a high level after cold exposure can be classified into the second gene group, such as *TmCBF12*, *TmCBF14*, and *HvCBF14*. The members of the third *CBF* group include those genes that showed a moderate increase in expression after the cold exposure (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*). In the case of *COR14b* and *DHN5* genes, it can be said that their function was influenced by several factors besides the *CBF* genes.

Based on frost test tests and results, we proved that some long-term inhibitor treatments can be lethal to plants and negatively affect the development of frost tolerance.

We can say that in barley and wheat after short-term cold stress, the calcium, PLC, and PLD pathways influence the kinetics of the *CBF-COR* system and the degree of frost tolerance, but a deeper understanding of these signaling processes requires further investigations.

1. BEVEZETÉS

A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE

A termesztett haszonnövények felhasználási területe széleskörű: alapvető élelmiszerek, elengedhetetlenek a haszonállatok takarmányozásánál, illetve ipari és gyógyászati alapanyagként való hasznosításuk is jelentős. A Központi Statisztikai Hivatal (KSH) adatai szerint Magyarországon 2015-ben őszi búzából 992139 hektárt, míg őszi árpából 220408 hektárt vetettek (Központi Statisztikai Hivatal, 2015). Ez a teljes mezőgazdaságra hasznosítható területek 18 %-át jelenti őszi búza, míg 4 %-ot őszi árpa esetén. Ezzel szemben a tavaszi búza termőterülete mindösszesen 15616 hektár (0,3 %), míg a tavaszi árpáé 76861 hektár (1,4 %) volt. Az őszi búza és árpa tehát a kukorica után a leggyakrabban vetett szántóföldi növényünk. Az őszi vetésű gabonaféléink ráadásul hektáronként mintegy 0,5-1 tonnával többet is teremnek tavaszi társaiknál.

A Földet borító növényzet összességének fejlődése során számos, akár drasztikus mértékű környezeti változással kell szembenéznie, például ultraibolya fénystressz, hőmérsékleti stressz, szárazságstressz, ásványi- és tápanyaghiány, sóstressz, biotikus stresszek, valamint antropogén eredetű zavaró hatások (légszennyező anyagok, savas esők, talajsavanyodás, nehézfém szennyezések, UV-stressz, xenobiotikumok: herbicid, fungicid, peszticid). Napjainkban alapvető befolyásoló tényezőnek tekinthető a globális klímaváltozás, egyre gyakoribbá válnak a szélsőséges időjárási jelenségek, alkalmanként jelentősen csökkentve az éves terméshozamot, illetve fontos tényező a túlélési képességet tekintve. Kultúrnövényeink a vad rokonaikéhoz képest sokszor alacsonyabb stressztolerancia szinttel rendelkeznek, mely további problémát jelent. Kontinentális éghajlat esetén a hideg és fagy kiemelkedően fontos környezeti tényezők. Napjainkban kiszámíthatatlanabbak a telek, ezért az áttelelő növényeknek védekezniük kell az alacsony hőmérséklet káros hatásaival szemben (jégképződés, elfagyás, vízhiány, oxigénhiány). Kiemelkedő jelentőségű feladat tehát az áttelelő gabonanövények fagyállóságát kialakító folyamatok minél alaposabb megértése a jelátviteli folyamatok aktiválódásán át a hidegindukált gének működésén keresztül, mely eredmények hasznosak lehetnek a növénynemesítők számára.

A mérsékelt égövön az áttelelő őszi gabonaféléket októberben vetik el és azok kikelésük után alkalmazkodnak a külső körülményekhez. Ennek lényege, hogy fokozatosan csökken a nappalhossz, valamint a hőmérséklet. Ezt a többhetes edződési folyamatot hidegakklimatizációnak nevezzük, melynek eredményeként a kezdetben még fagyérzékeny növények képessé válnak elviselni a téli fagyokat (Catalá és mtsi. 2011). A növényeknek nemcsak növekedését és fejlődését befolyásolja a hideg elleni védekezésük hatékonysága, hanem az egyes növényfajok földrajzi eloszlásában is kulcsszerepe van a hőmérsékletnek (Mickelbart és mtsi. 2015, Guo és mtsi. 2017, Nurhasanah

Ritonga és Chen 2020). A fagyállóság kialakulásának molekuláris hátteréről az utóbbi években egyre több információ látott napvilágot (Doherty és mtsi. 2009, Galiba és mtsi. 2013, Soltész és mtsi. 2013, Mickelbart és mtsi, 2015; Novák és mtsi. 2016, Nurhasanah Ritonga és Chen 2020). Ismertté váltak a *CBF/DREB* (C-repeat/Dehydration Responsive Element Binding Factor) transzkripciósfaktorokat kódoló géncsalád tagjai, melyek az általuk szabályozott több száz hideg indukálta (*COR-Cold Regulated*) gén promóteréhez kötődve beindítják azok expresszióját, melynek következtében kialakul a fagyűrés.

Az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet Biológiai Erőforrások Osztályán évtizedek óta vizsgálják a gabonafélék környezeti tényezőkhöz, például a hideghez/fagyhoz való alkalmazkodását és annak molekuláris hátterét. Azonban a hidegedződést befolyásoló jelátviteli folyamatok és a fagytolerancia közötti kölcsönhatásokról nem sok információ van jelenleg. A disszertáció témáját adó kutatásaink során a fagyűrés kialakításáért felelős jelátviteli folyamatok közül a „foszfolipid jelátvitel (Ca^{2+} , foszfolipáz C és foszfolipáz D (PLC, PLD)) → *CBF* transzkripciósfaktorok → effektor gének (*COR14b*, *DHN5*)” útvonalat tanulmányoztuk.

2. SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. Az alacsony hőmérsékleti stressz és fagyállóság

A növények állandó környezeti hatásoknak, esetenként stressznek vannak kitéve, melyek jelentősen befolyásolják anyagcseréjüket, növekedésüket és reprodukciójukat. Az egyik legfontosabb abiotikus stresszor a hőmérséklet. A környezeti tényezők közül a hőmérséklet jelentős mértékben meghatározza a növények természetes előfordulását, valamint a mezőgazdasági növények termesztetőségének határát és produktivitását (Luo 2011). A hőmérsékleti stresszfaktorok közül – a jelen disszertáció témája miatt – a továbbiakban csak az alacsony hőmérsékleti stressz hatásáról nyújtok áttekintést.

Hidegstresszről beszélünk, ha a hőmérséklet 12 °C alá csökken, de 0 °C alá nem esik. Fagystressz esetén a hőmérséklet fagypontra alá süllyed (Beck és mtsi. 2004, Lindlőf 2010). A hőmérséklet 0 °C alá süllyedése jégkristályok képződését indítja el a sejtek közötti térben, amely vízpotenciál csökkenést okoz, ami pedig a sejten belüli víz kiáramlását eredményezi. -10 °C esetén a sejten lévő víz 90%-a kiáramlik a sejt közötti térbe komoly dehidratációt okozva ezzel (Thomashow 1999). A jégkristályok képződése mechanikai sérülésekkel is járhat, visszafordíthatatlan károkat okozva a membránban, ami akár az egyed halálához is vezethet. Azok a növények télállóak, melyek a tél viszontagságait károsodás nélkül átvészelik. A télállóság egyik eleme a fagyűrűs. A növénynek maximális fagyállósága fajtól függően 2-7 hetes alkalmazkodási periódus (hidegakklimatizáció) elteltével alakul ki (Yiting és mtsi. 2019). A hidegedződés során krioprotektív molekulák, különböző fehérjék, cukrok, egyszerűbb szerves vegyületek halmozódnak fel a sejten és a sejt közötti térben, melyek védelmet nyújtanak a membránsérülések, illetve az ozmotikus stressz okozta károsodások ellen (Raju és mtsi. 2018, Smallwood és Bowles 2002, Cook és mtsi. 2004).

A nemesített természetű növényeink nagyobb szintű hidegstressz toleranciával rendelkeznek, mint elődeik, azonban számos fajta és változat továbbra is rendkívül érzékeny a fagy okozta sérülésekkel szemben (Pareek és mtsi. 2017).

2.2 A hidegakklimatizáció és a fagyállóság kialakulásáért felelős genetikai háttér áttekintése

A környezeti hőmérséklet csökkenése aktiválja a hideg jelátviteli mechanizmust, amely során számos gén expresszálódik. A hidegakklimatizációt meghatározó molekuláris jelátviteli folyamatok feltárása a lúdfű modellnövényben (*Arabidopsis thaliana*) a legelőrehaladottabb, de a mezőgazdaságban betöltött jelentősége miatt kívánatos ezen folyamat molekuláris alapjainak megismerése a gabonafélékben is (Yukun és mtsi. 2019). A gabonafélékben ismeretes, hogy a

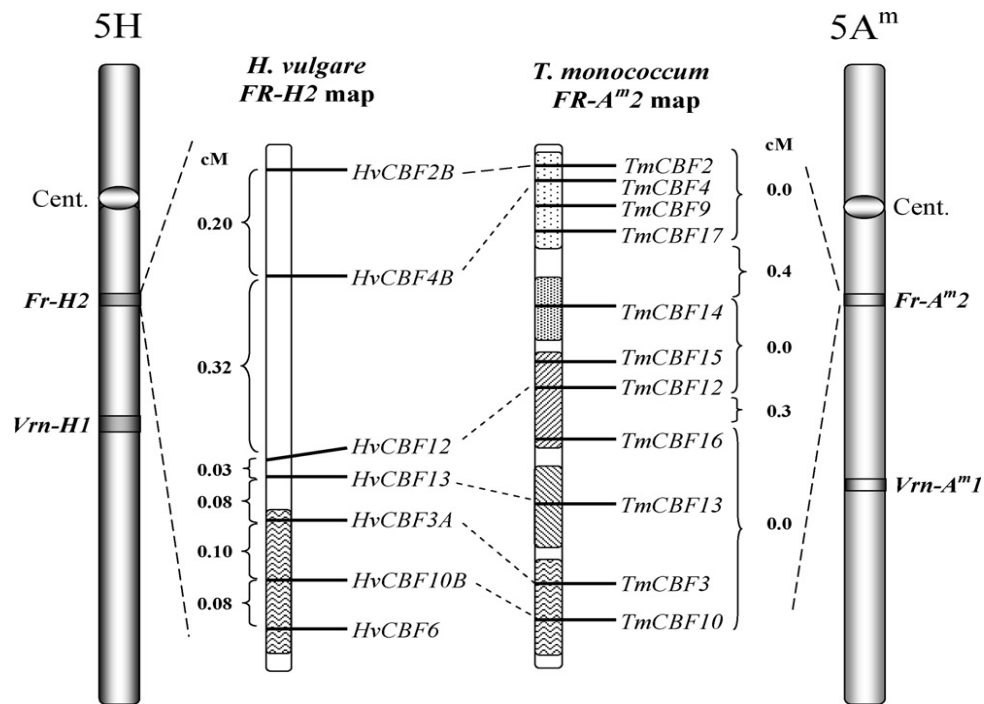
hőmérséklet csökkenése hidegindukálható transzkripciós faktorok expresszióját indukálja, amelyek a hidegződésben fontos effektor gének aktiválásáért felelősek. Ilyenek az *ICE-CBF-COR* rendszer (*ICE: Inducer of CBF Expression, CBF: C-Repeat Binding Factor, COR: Cold-Regulated Gene*). A fagyállóság alapja tehát genetikailag kódolt tulajdonság (Thomashow 1999).

Az évelő és az egynyári növényfajokban a jól összehangolt akklimatizációs folyamatokat egy adott géncsoport, a *CBF* gének irányítják. Ezért e transzkripciós faktorokat az akklimatizáció „mestergénjeinek” is szokták nevezni (Liu és mtsi. 2019). Ezt a géncsaládot a szakirodalomban kétféle néven hívják: *CBF*-géneknél, vagy más néven *DREB* géneknél (*Dehydration-responsive element binding factor*) (Stockinger és mtsi. 1997, Liu és mtsi. 1998). Ezek a gének az *APETALA2* (*AP2*) /ethylene-responsive factor (*ERF*) családba tartoznak. Jellemző rájuk, hogy tartalmazzák az *AP2* DNS-kötő domént, egy kb. 60 aminosavból álló szakaszt. A *CBF*-eket a család más tagjaitól az különbözteti meg, hogy két, az *AP2* domén előtt és mögött 1-1 konzervált motívum helyezkedik el: a *PKKP/RAGR_xKF_xETRHP* (röviden *PKKPAGR*) és a *DSAWR* (Jaglo és mtsi. 2001). A *PKKPAGR* motívum egyben fontos eleme ezen gének DNS-kötő képességének (Canella és mtsi. 2010), ugyanis a *CBF* transzkripciós faktorok DNS-kötő doménjük segítségével alacsony hőmérséklet hatására a szabályozásuk alatt álló gének promóterében megtalálható *C-repeat* (*CRT*) motívumhoz (*CCGAC*) kötődve szabályozzák azok kifejeződését (Baker és mtsi. 1994, Jaglo-Ottosen és mtsi. 1998, Barrero-Gil és Salinas 2019).

Az *Arabidopsis thaliana* L. (*At*) kétszikű modellnövény genomja négy *CBF* gént kódol, melyek közül három, az *AtCBF1*, *AtCBF2* és *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 és mtsi. 1998, Gilmour és mtsi. 2004). Ezzel szemben az *AtCBF4* gén nem indukálódik hideg hatására, viszont jelentős mértékben fejeződik ki szárazság-, vagy sóstressz következtében (Haake és mtsi. 2002; Sakuma és mtsi. 2002). A gazdasági jelentőséggel bíró növényeink közül a hexaploid kenyérbúza (*Triticum aestivum* L., *Ta*) genomja legalább 37 (Badawi és mtsi. 2007), az alakor búza (*Triticum monococcum* L., *Tm*) 13 (Miller és mtsi. 2006), míg az árpa (*Hordeum vulgare* L., *Hv*) legalább 20 (Skinner és mtsi. 2005) *CBF* gént kódol. A kísérletekben használt alakor búza és árpa fajták kromoszómakészlete hasonló.

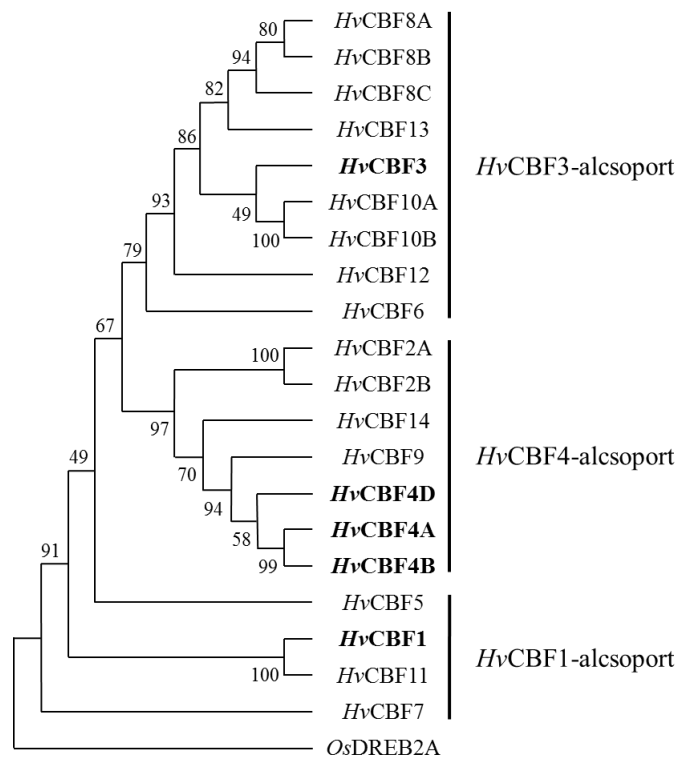
Az általunk vizsgált *CBF* gének az 5-ös kromoszóma hosszú karján lévő *Fr-2* (*Frost resistance-2*) fagyállósági lókuszon helyezkednek el (Vágújfalvi és mtsi 2003; Miller és mtsi 2006; Francia és mtsi 2007; Knox és mtsi. 2008). Az árpa 5H kromoszóma *Fr-2* lókuszában legalább tizenegy *CBF* gén helyezkedik el (Skinner és mtsi. 2006), ráadásul legalább hét *CBF* gén

mindössze 0,8 cM távolságon belül kódolt (Francia és mtsi. 2007), míg alakor búza esetében legalább tizenegy *CBF* gén helyezkedik el az 5A^m kromoszóma *Fr-2* lokuszán (Miller és mtsi. 2006). (1. ábra).



1. ábra Árpa (*H. vulgare*) és alakor búza (*T. monococcum*) 5-ös kromoszómáján lévő *Fr-2* (*Frost Resistance*) fagyállósági lokuszon a transzkripciós faktorokat kódoló gének kapcsolati viszonyainak áttekintése (Galiba és mtsi. 2009). Árpa 5-ös kromoszómája: 5H; Alakor búza 5-ös kromoszómája: 5A^m

Az árpa genomjában kódolt *CBF* gének három filogenetikai alcsoportba sorolhatók (Skinner és mtsi 2006): *HvCBF1*-, *HvCBF3*-, *HvCBF4*- alcsoportot különböztetünk meg (2. ábra). A *HvCBF3*- és *HvCBF4*-alcsoport legtöbb tagja az árpa ötös kromoszómájának hosszú karján helyezkedik el (Skinner és mtsi. 2006).



2. ábra: Az árpa *CBF* gének filogenetikai kapcsolatok áttekintése Skinner és mtsi. (2006) alapján, „Minimum Evolúciós” filogenetikai fa Neighbor Joining funkciót alkalmazva. A függőleges sávok az azonos alcsoportokhoz tartozó tagokat jelölik. Az alcsoportok elnevezése a félkövérrel jelölt tagok neveiből származnak. A számok a 'Bootstrap' értékeket jelölik. A Bootstrap analízis egyfajta statisztikai elemzés az evolúciós fa egyes ágai megbízhatóságának tesztelésére (Efron és Gong 1983; Felsenstein 1985; Swofford és mtsi. 1996). Az *OsDREB2A* egy közeli rokon rizs szekvencia.

A *CBF* géncsalád egyes tagjai normál környezeti körülmények között is mutatnak egy alapszintű expressziót és hideg hatására jelentősebben megemelkedik a szintjük. Más *CBF* gének expressziója csak hidegstressz által aktiválódik. A transzkripciós faktorok indukciója gyors és tranzien, már néhány óra alatt lezajlik (Vágújfalvi és mtsi. 2005; Stockinger és mtsi. 2007; Vashegyi és mtsi. 2013). A hidegaklimatizáció során időbeli eltolódás van ezen gének expressziója között (Novillo és mtsi. 2007, Gierczik és mtsi. 2017). Nure őszi árpában 22 °C-on két napig 12 óra fény /sötét ciklusban, majd két napig folyamatos fényben vizsgálták a *CBF* gének cirkadián ritmusát. A *HvCBF1*, *HvCBF3* és *HvCBF4* alcsoport megvizsgált elemei közül az 5A kromoszómán elhelyezkedő 4-es alcsoport tagjai cirkadián ritmust mutattak. A *CBF2*, *CBF9* és *CBF14* gének nagyobb expressziót mutattak az őszi, mint tavaszi búzában, a fagyűrő *Triticum aestivum subsp. aestivum* cultivar Cheyenne *CBF14* gén expressziója pedig négyszerese volt a hidegérzékeny *Triticum spelta*-ból származó *CBF14* génnek (Vágújfalvi és mtsi. 2005; Galiba és mtsi. 2013).

Az *ICE* transzkripciós faktorokat a *CBF* géncsalád egyik pozitív szabályozó faktorának tekintjük, tehát a hidegstresszválaszban először ezek aktiválódnak, melyeknek foszforilálódnia kell ahhoz, hogy részt vegyenek a további génszabályozásban (Badawi és mtsi. 2007).

A *CBF*-ek az általuk szabályozott gének promóterében található CRT/DRE motívumhoz (RCCGAC) kötődnek (Baker és mtsi. 1994). Ez a szekvencia számos hideg- és szárazságstresszre indukálódó génben megtalálható, köztük a *DHN* (*dehidrin*), a *KIN* (*cold-induced*), a *COR* (*cold-regulated*).

A *COR* gének közül a *COR14b* az, amely gabonafélék fagyűrését nagy mértékben növeli. A *COR14b* gén a sejtmagban lokalizált, de fehérjeterméke a kloroplasztiszba transzlokálódik. A *COR14b* gén expresszióját a *CBF* transzkripciós faktorok működése mellett további faktorok is befolyásolják, úgymint a megvilágítás hossza és a fény minősége (Vágújfalvi és mtsi. 2000).

Őszi búzában (Cheyenne) és árpában (Nure) már 15 °C-on megnövekszik a *CBF14* gén expressziós szintje és a fagyűrés mértéke, míg az alacsony fagyűrőképességgel bíró őszi alakorban (G3116) nem (Novák és mtsi. 2016). Az árpában túltermeltetett *TaCBF14* és *TaCBF15* gének hatására a transzgenikus vonalak hidegedzés után, valamint annak hiányában is fagyűrőbbek lettek, mint a vad típus (Soltész és mtsi. 2013).

Számos *CBF* gén egyedi funkciója eddig még nem teljesen tisztázott, mivel az egyes fajokban más és más szinten működnek, sőt az egy fajhoz tartozó, de különböző genotípusokban is különbözik az aktivitásuk mértéke (Barrero-Gil és Salinas 2019)

2.3. A hidegstressz hatására lezajló jelátviteli folyamatok áttekintése

Ősszel a növényekben a hidegaklimatizáció során az alacsony, nem fagypont alatti hőmérsékletet a sejtmembránokban lévő receptorok érzékelik (Levitt 1980; Ruelland és Zachowski 2010). A sejtmembránok szerkezeti változáson mennek keresztül, a fluiditás és szempermeabilitás csökken, így a membránhoz kötött fehérjék struktúrája és funkciója megváltozik (Uemura és mtsi. 1999).

Az enzimaktivitással rendelkező membránreceptorok többnyire protein-kinázok, amik foszforiláció révén hatnak a célfehérjére. A kalciumot befolyásoló jelátviteli útvonalak egyike a foszfolipid jelátviteli útvonal, melyről növényekben még kevés az ismeret. Kimutatták, hogy ionszatórnák szabályozásában is részt vesz (Xue és mtsi. 2009), szerepet játszva ezzel abiotikus stresszek elleni védelemben (Xue és mtsi. 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. PI később a foszfolipáz C (PLC) jelátvitelben

vesz részt (Hong és mtsi. 2016). A plazmamembrán lipidjeihez kapcsolódó foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) a foszfoinozítid-specifikus foszfolipáz C (PI-PLC) hasítja le, s a keletkező diacilglicerol (DAG) a membránhoz kötve marad és további kinázok aktiválásában játszik szerepet, míg az inozitol-trifoszfát (IP₃) a citoszolba kerülve a Ca²⁺-t kiválasztó kompartmentet, illetve a Ca²⁺-csatornákat aktiválja. A növényi sejtek kalciumukat vakuólumban, endoplazmatikus retikulumban és sejtfalmátrixban tárolják. A hőmérséklet csökkenés hatására a Ca²⁺-csatornákon keresztül történő beáramlás következtében megemelkedik a citoszolban lévő Ca²⁺ mennyisége (Knight és mtsi. 1996). A kalciumionok citoplazmába áramlását idézik elő a másodlagos hírvivők egy csoportját alkotó inozitol-foszfatidok (IP) is. A növényi sejt citoplazmájában lévő kalciumion koncentrációja hatással van a kalcium-függő jelátviteli útvonalak szabályozására (Martí Ruiz és mtsi. 2018), valamint szerepet játszik különböző biotikus (Aldon és mtsi. 2018) és abiotikus stresszek (só, alacsony hőmérséklet, ozmotikus, hipoxia) elleni védelemben is (Ranty és mtsi. 2016; Yuan és mtsi. 2018). A Ca²⁺-csatornák nagyban érintettek a hidegérzékelés folyamatában (Ding és Pickard, 1993). A hidegjelzés egyes komponenseit már azonosították gabonafélékben, és egyértelmű, hogy a Ca²⁺, mint másodlagos hírvivő, nagy szerepet tölt be számos gén kifejeződésének stimulálásában a hidegstressz során. Mivel ez a kation számos párhuzamos jelátviteli folyamatért felelős a növényi sejtekben, a kalcium jelátviteli út aktiválódása nem egy egyszerű lineáris esemény (Guangyang és mtsi. 2017).

A kalciumkoncentráció változását másodlagos hírvivő molekulaként az úgynevezett kalcium-kötő fehérjék érzékelik (Yáñez és mtsi. 2012; Wilkins és mtsi. 2016). Ezek a fehérjék több csoportba sorolhatók (Ranty és mtsi. 2016): kalcineurin B-szerű fehérjék (CBLs, calcineurin B-like proteins), kalmodulinok (CaMs, calmodulins), kalmodulin-szerű fehérjék (CMLs, calmodulin-like proteins), kalcium-függő fehérje kinázok (CDPKs, calcium-dependent protein kinases) és kalcium/kalmodulin-függő kinázok (CCaMKs, calcium/calmodulin-dependent kinases). Az intracelluláris kalciumionok kötését követően konformáció változás megy végbe a kalcium-kötő fehérjék térszerkezetében, melyek transzkripciós faktorok szabályozását indukálják (DeFalco és mtsi. 2010), majd ezek foszforilálódásával gének expresszióját segítik (Ruelland és mtsi. 2009).

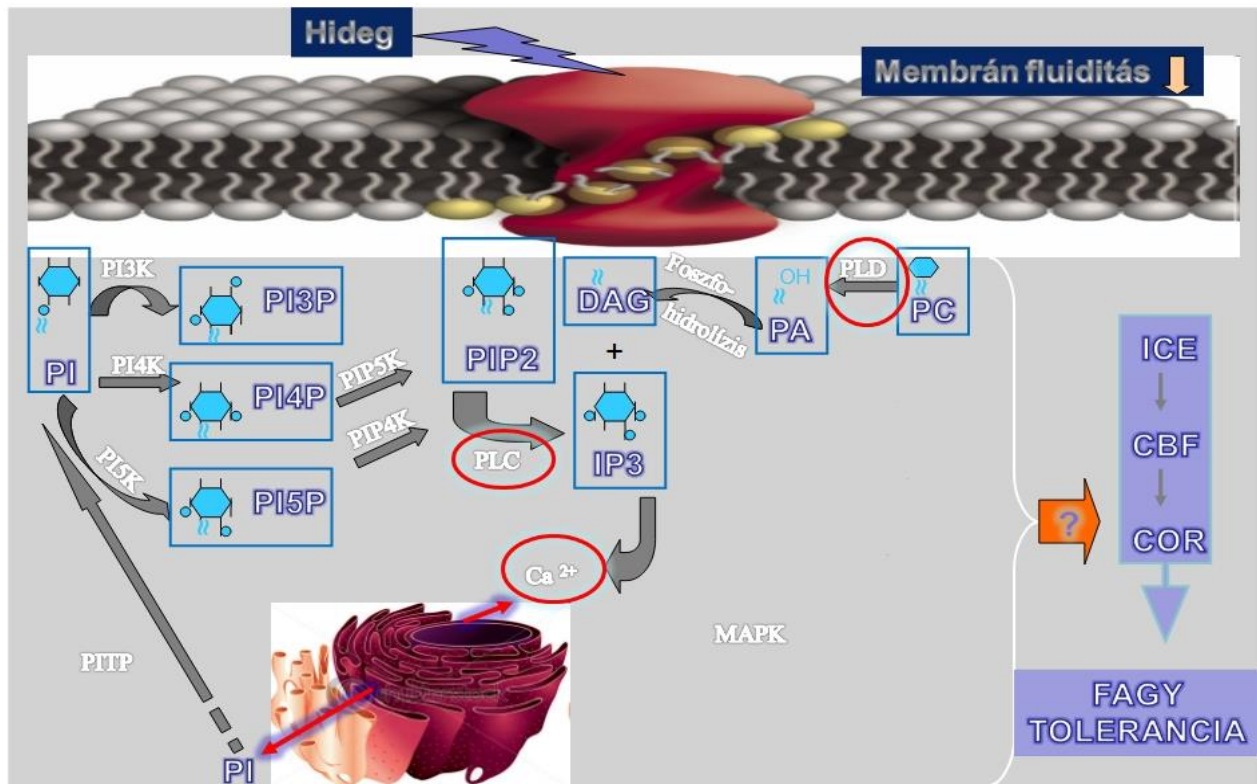
A kalcium jelátviteli útvonal és a *CBF* transzkripciós faktorok közötti kapcsolatot *Arabidopsis* modellnövényben bizonyították először. Kimutatták, hogy a CAMTA3 (CaM-binding transcription activator 3) képes szabályozni az *AtCBF2* gén működését (Doherty és mtsi. 2009), így bizonyították a CaM-ok hidegtűrésben betöltött szabályozó szerepét (Gierczik és mtsi. 2017). A kalcium-kalmodulin komplex kapcsolatot alakít ki a CAMTA fehérjével, mely fehérjekomplex

már képes szabályozni a *CBF*-ek átírását (Testerink és Munnik 2011; Delage és mtsi. 2013; Ruelland és mtsi. 2015; Dickson és Hille 2019). A később kialakuló hidegstressz-válasz kialakításában a kalcium okozta jelerősítésnek és foszfolipid jelátvitelnek lehet köze.

A foszfolipáz fehérjék foszfolipideket hidrolizálnak foszfatidsavból (PA), melyek másodlagos jelátviteli molekulákként hatnak a jelátviteli kaszkádon belül. Foszfatisav képződés két útvonalon lehetséges, foszfolipáz C (PLC) és foszfolipáz D (PLD) enzimek segítségével (Munnik és mtsi. 2001). A PLD fontos szerepet játszhat mind a citoszolban lejátszódó második jelátvitelben, mind a membránhoz kötött folyamatok szabályozásában. PLD egy citoplazmatikus enzim, mely a foszfolipideket bontja le foszfatidsavvá (PA) és fejcsoporttá. A növényi sejtekben a PA, mint szignál ismert célmolekulái közé tartoznak a protein kinázok és Ca^{2+} -csatornák (Lee és mtsi. 2001; Qin és Wang 2002). A növényi PLD fehérjék szerepet játszhatnak a mikrotubulusok által közvetített membránkomponensek útján zajló jelátvitelben is (Collings és mtsi. 2003, Musgrave 2001), vagyis hasonló funkcióval rendelkeznek, mint az élesztő és állati PLD fehérjék (Cockcroft 2001).

A fent leírt kaszkádot a 3. ábra mutatja be.

Hidegakklimatizáció alatt végbemenő szignalizáció hatására speciális fagyálló fehérjék halmozódnak fel az apoplastban, ezáltal biztosítva a növények védelmét. Felhalmozódnak az úgynevezett hidrophil fehérjék is. Ilyenek például a hideg érzékeny COR, alacsony hőmérséklet indukált LTI, abszcizinsavra érzékeny RAB, hideg indukált KIN fehérjék. Ide sorolhatók a dehidrinek (DHN), melyek a LEA fehérjékhez tartoznak. A dehidrinek szerepének tulajdonítható a dehidratáció során a membrán destabilizálódásának megelőzése, illetve a fagytolerancia fokozása (Nakaminami és mtsi. 2006; Sasaki és mtsi. 2007).



3.ábra Hidegstresszben szerepet játszó kalcium-, foszfolipid jelátviteli útvonalak áttekintése. Az őszi kalászosokban a hideg akklimatizációs folyamat megy végbe a téli fagykár túlélése érdekében. Az alacsony hőmérséklet érzékelésekor a növényi sejtmembrán folyékonysága csökken, mely aktiválja a kinázokat, például a MAP-kinázt (MAPK), a foszfolipáz C-t és D-t (PLC, PLD) a membránban. A PLC a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) diacilglicerollá (DAG) és inozitol-trifoszfáttá (IP₃) bontja. A DAG foszforilált formája a foszfatidsav (PA). A PLD a foszfolipideket (PC) bontja le foszfatidsavvá (PA) és fejszoporttá. A DAG a membránhoz kötve marad és más proteinkinázokat aktivál, az IP₃ a citoszolba kerülve megemeli a Ca²⁺-szintet. A PLC-jelátviteli útvonal kulcsfontosságú szabályozói a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI₃K), foszfatidilinozitol-4-kináz (PI₄K) és foszfatidilinozitol-5-kináz (PI₅K), melyek foszfatidilinozitolból (PI) foszfatidilinozitol-3-foszfátot, foszfatidilinozitol-4-foszfátot vagy foszfatidilinozitol-5-foszfátot készítenek. Ezen termékek adják a PIP₂ szubsztrátját, mely reakciókat a foszfatidilinozitol-4-foszfokináz (PIP₄K), illetve a foszfatidilinozitol-5-foszfokináz (PIP₅K) katalizál. A PLC jelátviteli útvonal további szabályozói lehetnek a foszfatidilinozitol transzfer fehérjék (PITP), melyek foszfatidilinozitol (PI) szállítanak az endoplazmatikus retikulum és a sejtmembrán között. Valószínűleg ezek a jelátviteli utak szabályozhatják az *ICE*, a *CBF*, majd *COR* gének expresszióját, ami végül hidegtűréshez vezet a gabonafélékben. A bekarikázott jelátviteli folyamatokat vizsgáltuk a kísérletek során.

2.4 Foszfolipáz C (PLC), foszfolipáz D (PLD), kalcium-függő jelátviteli útvonalak farmakológiai hátterének áttekintése

A kísérleteink során azt kívántuk megvizsgálni, hogy a hideg által megnövekedett Ca^{2+} -szint, a PLC, PLD enzimek milyen hatással vannak a hidegakklimatizációs folyamatok szabályozásában kulcsszerepet játszó *CBF-COR* rendszer és a dehidrinek működésére, valamint a jelátvitel és a hidegindukált gének közötti kölcsönhatások blokkolása okoz-e fenotípusos változásokat.

Farmakológiai tekintetben a következő inhibitorokat (gátlószereket) alkalmaztuk genetikai vizsgálatainkhoz: lantán-klorid, EGTA [etilén-glikol-*bis*(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraecetsav], thapsigargin, ruténium vörös, mastoparan, U73122 (1-(6-{{[17 β -3-metoxi-1,3,5(10)-trién-17-yl]amino}hexil)-1H-pirrol-2,5-dion), ionomicin, neomicin és 1-butanol. Az egyes inhibitorok hatását az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: A kísérletek során alkalmazott inhibitor molekulák fiziológiai hatásának áttekintése

Inhibitor	Hatás
Lantán- klorid	Kalcium csatorna blokkoló
EGTA	Kalcium kötő
Ionomicin	Kalcium felszabadító
Neomicin	PLC inhibitor
Ruténium vörös	Vakuoláris Kalcium csatorna blokkoló
Mastoparan	Intracelluláris Kalcium szintet növeli
1-Butanol	PLD inhibitor
U73122	PI-PLC aktivitást gátolja
Thapsigargin	Kalcium-pumpa inhibitor, Kalciumot szabadít fel a raktárakból

Ezek az egyébként jellemzően farmakológiai vonatkozásban használt vegyületek növényekre gyakorolt hatása kevésbé ismert, ezért több anyagot is kiválasztottunk kísérletekhez. Az inhibitor molekulák célcsoportja ismert, azonban egyes esetekben csak állati vagy humán rendszerekből származik adat róluk. Az alapján szelektáltunk a választott inhibitorok közül, hogy a növények hogyan reagáltak rájuk.

A lantán-klorid és EGTA részlegesen gátolják a hidegsokk okozta Ca^{2+} -szint emelkedést és ezáltal a védekezésben szerepet játszó gének expressziójára is hathatnak. A lantán-klorid hatással van több receptorra és ioncsatornára, többek között a Ca^{2+} -csatornákat is blokkolja, ily módon

csökkenti a sejtekben a Ca^{2+} -szintet (Boldyreva 2005). A lantán-klorid, mint inhibitor molekula a növény növekedését is részben gátolja, ami arra vél következtetni, hogy a Ca^{2+} esszenciális a szármegnyúlási folyamatokhoz, emellett másodlagos hírvivő molekulaként ingerérzékelésért, illetve különböző sejtek növekedéséért felelős (Bush, 1995). Az EGTA (etilén-glikol-*bis*(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraecetsav) egy kelátképző szer, nagy az affinitása a kalciumionokra, így célirányosan képes csökkenteni a rendelkezésre álló extracelluláris Ca^{2+} szintjét (Pooviah és mtsi. 1987).

A thapsigargin a *Thapsia gargani* L. (*Apiaceae*) mediterrán növény kivonata, mely nem-kompetitív inhibitora az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz-nak (Rogers és mtsi. 1995). Humán kísérletekből kiderült, hogy a thapsigargin az intarcelluláris kalcium koncentráció szintjét megemeli úgy, hogy a szarkoplazmatikus és endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -pumpáinak működését gátolja, ami a plazmamembránban lévő Ca^{2+} -csatornák aktiválására készíti a sejtet, így Ca^{2+} áramlik a citoszolba (Lytton és mtsi. 1991).

Ruténium vörös egy hat vegyértékű poliszacharid, szervesen festék, melyet egyrészt mukopoliszacharidok festésére használnak, másrészt celluláris folyamatok vizsgálatában farmakológia eszközként alkalmaznak. Utóbbi alkalmazása során nem kompetitív inhibitora a növényi ioncsatornáknak, Ca^{2+} -ATPáz-nak, mitokondriális Ca^{2+} uniporternek és Ca^{2+} -kötő fehérjéknek, mint a kalmodulinnak. Tehát intracelluláris Ca^{2+} -csatorna antagonistaként tarják számon, ami megszünteti a Ca^{2+} beáramlást a sejtbe (Bae és mtsi. 2003).

A mastoparan egy 14 aminosavból álló peptid, melyet a darazsak mérgéből izoláltak és a sejtmembrán pórusainak nyitódását képes stimulálni Ca^{2+} jelenlétében. Nagyobb koncentrációban alkalmazva képes Ca^{2+} és ciklosporin A-független úton is megnyitni a pórusokat (Pfeiffer és mtsi. 1995). Ezen kívül a mastoparan jelentősen serkenti a növényi sejtek MAP-kináz működését, továbbá növeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet. Állati sejtekben a MAP-kináz aktiválódását az öt kódoló génben a guanin nukleotid kicserélődése idézi elő. Ezzel szemben a növényi sejtek esetén a mastoparan indukált MAP-kináz jelátvitelhez nem szükséges a G fehérjéket kódoló gén nukleotid sorrendjének megváltozása, habár az sem zárható ki, hogy ez a folyamat növényekben is lezajlik. Viszont a MAP-kináz kaszkádhoz a sejt igényli egyes ROS formák, a MAPKK jelenlétét és extracelluláris Ca^{2+} beáramlását (Miles és mtsi. 2004). A mastoparant már széles körben használják a kutatásban a G-proteinek által szabályozott folyamatok vizsgálatában, mind a növények és állatok esetén. Mastoparan kezelést követően rövidtávú válaszreakciók zajlanak le a növényi sejtekben: celluláris Ca^{2+} növekedés, inozitol-1,4,5-trifoszfát forgalom indukálódása,

illetve foszfolipáz C-, foszfolipáz D₂- és mielin alapú fehérje (MBP) kinázok aktiválódása (Kauss és Jeblick 1996).

Az U73122 egy aminoszteroid vegyület, amely a foszfoinozitol-függő PLC jelátviteli folyamatok specifikus inhibitora. A PLC által közvetített foszfoinozitol-4,5-biszfoszfát hidrolízisét specifikusan gátolja (Bleasdale és mtsi. 1990). Ez a gátló hatás bizonyítottan ugyanúgy működik növényi sejtekben, mint állatokban. Mivel a PLC enzim a hidrolízis során IP₃-t és DAG-t eredményez, ezáltal az U73122 inhibitorral kezelt növényekben az IP₃-függő Ca²⁺ beáramlás is blokkolódik a belső raktárakból (Parre és mtsi. 2007). Ezen kívül az U73122 gátolja az ABA-indukált szabad citoszolikus Ca²⁺ koncentráció ingadozását és a sztómák záródását is, viszont közvetlenül nem hat a zárósejtek Ca²⁺ -szintjére. Ez azt sugallja, hogy a zárósejtek Ca²⁺ koncentrációjának megváltozására és a sztómák záródására nem specifikusan az U73122 hat, hanem ezen hatások az inhibitorkezelést követő PI-PLC gátlás miatt következnek be (Staxe'n és mtsi. 1999).

Az ionomicin a *Streptomyces conglobatus* (ATCC 31005) baktérium által termeltetett ionofor. Specifikusan növeli az intracelluláris Ca²⁺ -szintet, kation kötő- és szállító tulajdonsággal rendelkező antibiotikum. Erősen specifikus a kétértékű kationokra, különösen a kalciumra (Morgan és Jacob 1994).

A neomicin-szulfát (neomicin) az antibiotikumok aminoglikozid osztályába tartozó molekulája, mely kettő vagy több aminocukor csoportot tartalmazhat. Antibakteriális hatásán kívül számos más tulajdonságát is bizonyították: például növeli az ATPáz aktivitást, hatékony inhibitora a szarkoplazmatikus retikulumból történő Ca²⁺ felszabadulásnak, gátolja a foszfatidil-PLD aktivitást. Kutatásainkhoz kapcsolódóan a neomicin a foszfoinozitid ciklusban okozhat zavart, ezáltal a PLC működését inaktíválja. A PIP és PIP₂ molekulákkal kapcsolódva az inhibitor molekula elektroneutrális komplexeket hoz létre, ezáltal blokkolja ezen molekuláknak a szolubilizált enzimmel (PLC) történő kötődését. Ha a negatív töltésű inozitol-foszfát fejrésze ATP-áz molekulával tud kapcsolódni, működőképessé válnak az inozitol-foszfolipidek, ha viszont neomicinnel lépnek kapcsolatba, a lipidek hatása csökken (Teemu és mtsi. 1989; Shota és mtsi. 2008).

A butanolnak, más néven butil-alkoholnak négy szerkezeti izomerjét ismerjük. Az 1-, 2- és 3- butanol a PLD-függő foszfatidsav (PA) termelés specifikus inhibitora. Kísérleteinkben 1-butanol használtuk a PLD útvonal blokkolására. Az 1-butanolal kezelt növények vagy PLD-hiányos növények gátolt növekedést és fejlődést mutatnak, valamint gátolja a szemtermés csírázását, a gyököcske és a sziklevel megjelenését (Hirase és mtsi. 2006).

3. KÉRDÉSFELTEVÉS

A gabonafélék gazdasági jelentősége miatt nagyon fontos a hidegérzékelés folyamatának minél alaposabb megértése, amely segítheti a nemesítők munkáját a növények télállóságának fokozásában. A növények fagyállóságának kialakulása a hidegaklimatizáción alapul, melynek folyamata nagyon összetett, különböző jelátviteli hálózatok és géncsaládok összehangolt működésének eredménye. A célhoz vezető különböző genetikai, biokémiai és fiziológiai folyamatok hatékonyságának optimalizálása és azok környezeti feltételekhez, változásokhoz történő időzítése a növények számára elengedhetetlen készség.

Felmerül a kérdés, hogy hogyan tudja ezt a komplex hálózatot a növény szabályozni? Fontos, hogy tisztázhassuk a hidegstresszhez való alkalmazkodás molekuláris és genetikai hátterét. Ennek a bonyolult szabályozórendszernek működését a jelenleg rendelkezésünkre álló eszközökkel, módszerekkel teljes egészében nem mindig, gyakran csak részleteiben tudjuk vizsgálni. A teljes folyamat megértéséhez pedig a részeredmények összerakásából kaphatjuk meg a teljes képet.

Munkánk során a szakirodalmi ismeretek kiegészítése céljából diploid gabonaféléken vizsgáltuk a hideg által indukált fagyűrést szabályozó jelátviteli és genetikai folyamatok mélyebb molekuláris hátterét (CBF-COR regulon) és a fagytolerancia mértékét.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Arról, hogy a hideghatására hogyan változnak meg az egyes jelátviteli folyamatok, mint a foszfolipáz C-, foszfolipáz D-, kalcium jelátvitel és ez hogyan befolyásolja a további stresszválaszt genetikai és fiziológiai szinten, növények esetén kísérleteim elvégzése idején kevés információ állt rendelkezésre. Célunk az volt, hogy *Hordeum vulgare* és *Triticum monococcum* fajokat összehasonlítva képet kapjunk ezen folyamatokról és hatásukról a CBF transzkripciós faktorokra és *COR14b*, *DHN5* effektor génekre.

A PhD értekezés fő célkitűzései:

1. Tavaszi és őszi árpa, illetve tavaszi és őszi alakor búza vonalakban az *Fr-2* (búza estén *Fr-A^m2*, árpánál *Fr-H2*) lókuszhoz kapcsolható CBF transzkripciós faktorok, valamint a később indukálódó *HvCOR14b*, *TmCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének hidegindukált időbeli aktivációjának vizsgálata.
2. Szemikvantitatív PCR és kvantitatív RT-qPCR segítségével kiválogatni azokat a CBF géneket, melyeknek rövid idejű hidegstressz hatására megemelkedik az indukciójuk.

3. Az egyes jelátviteli molekulákat blokkoló inhibitorok összehasonlítása, az optimális koncentrációjuk meghatározása, majd használata a genetikai és fenotípus vizsgálatokhoz.
4. Farmakológiai vizsgálatokkal összehasonlítani a PLC-, PLD-, kalcium jelátviteli folyamatok hatását őszi árpa és őszi alakor búza vonalakban a RT-qPCR alapján kiválasztott géncsoportokban hidegakklimatizáció és fagyűrés tekintetében, különböző inhibitorok használatával.
5. Fenotípusos vizsgálat egész növény fagyasztással őszi árpa és őszi alakor búza növények esetén, mellyel a fagyállóság mértékét meghatározzuk az egyes jelátviteli folyamatok blokkolása után.
6. A növények fiziológiai állapotát érintő, hideg hatására bekövetkező membránkárosodások következményeinek monitorozása őszi árpában és őszi alakor búzában hidegedzést és fagyasztást követően.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Növényi anyagok

Kísérleteinkben alakor búzát (*Triticum monococcum*) és árpát (*Hordeum vulgare*) használtunk, fagyűrő fajtáik neve: *T. monococcum*: G3116 és *H. vulgare*: Nure (Genomics Research Centre, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország), illetve a vizsgálatok első szakaszában használt fagyérzékeny variánsok: *T. monococcum*: DV92 és *H. vulgare*: Tremois.

5.2. *COR14b* és *CBF* gének expressziós intenzitásának megállapítása hidegstresszválasz során

5.2.1. Növénynevelés, edzés körülményei

Célunk a tavaszi és őszi gabona típusok genetikai összehasonlítása volt, illetve a hideghatást követően a gének expressziójának összehasonlítása, melyet alapul véve kiválasztottuk a legerőteljesebben aktiválódó géneket. A kísérleteket két független ismétlésben végeztük. A kísérlethez fagyűrő és fagyérzékeny alakor búza és árpa fajtákat/vonalakat használtunk. A szemterméseket steril Petri csészébe helyezett nedves, MilliQ vízzel átitatott steril kétrétegű szűrőpapíron csíráztattuk. Árpa magvak külső pelyva részét előzetesen lehúztuk, mivel a fejlődő csírák számára ez a kemény héj nehezen áttörhető. A kifejlődött fiatal csíranövényeket benedvesített tőzegkorongba (Jiffy) ültettük, melyeket fitotron (növénynevelő) Conviron PGV36 (Conviron Controlled Environments Inc., Winnipeg, Canada) típusú klímakamrában kontroll körülmények között előneveltük 2 héten keresztül (nappalhossz: 16/8 óra (nappal/éj), hőmérséklet: 20/20 °C (nappal/éj), relatív páratartalom: 75 %, megvilágítás: fehér fény, megvilágítás intenzitása: 260 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). A kísérlet során az elpárolgó, növények által felvett folyadékot folyamatosan pótoltuk. A 14 napos előnevelést követően a palánták egy részét 4 °C-os kamrában (nappalhossz: 16/8 óra (nappal/éj), hőmérséklet: 4/4 °C (nappal/éj), relatív páratartalom: 75 %, megvilágítás: fehér fény, megvilágítás intenzitása: 260 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) hidegedzettük 24 órán keresztül. A kontroll minták 20 °C-on maradtak ez idő alatt.

5.2.2. Mintavételezés

A mintavételezések a 2 hetes előnevelési időszak (20/20 °C) végén, valamint az edzési időszak (4/4 °C) 2., 6., 12. és 24. órájában végeztük. A minták három-három darab növény gyökér feletti hajtáscsúcs részéből származtak (tartalmazza az apikális hajtás merisztémát). Az RNS-izolálásig a mintákat -80 °C hőmérsékleten tároltuk, ezzel megelőzve azt, hogy a növények a mechanikai sérülés következtében más jelátviteli folyamatokat indítsanak be.

5.2.3. RNS izolálás és cDNS átírás

TRIzol és RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) segítségével történt az RNS izolálás, mely kiegészült a DNase set (Qiagen) használatával is. Az RNS szuszpenziók koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel mértük (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

1 µg RNS-t tartalmazó oldatból indultunk ki, majd egy lépéses cDNS szintézist alkalmaztunk 25 µl végtérfogatban az alábbi összetevőkkel: Oligo(dT)18 (Thermo Fisher Scientific), 5x M-MLV reakció puffer (50mM Tris-HCl pH:8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 10 µM deoxiribonukleozid-trifoszfát (dNTP) mix, Molony Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverz transzkriptáz (Promega Corporation, Madison, WI, USA) és nukleáz mentes víz. Szintézis lépései a következők voltak: 5 perc 25 °C, 60 perc 42 °C, 15 perc 70 °C. A cDNS molekulát tartalmazó elegyet steril desztillált vízzel 40 µl végtérfogatra hígítottuk. Az így elkészült 25 ng/µl végkoncentrációjú cDNS minták szolgálták a szemikvantitatív- és valós idejű PCR kísérletek templátjaként.

5.2.4. Szemikvantitatív PCR

A PCR során felhasznált oligonukleotid primereket az árpa és alakor búza cDNS szekvenciák konzervált DNS szakaszaira Primer3 programot használva terveztük. Az alakor búzára 10 *CBF* gént, illetve a *COR14b*-t terveztük, az árpa esetén 11 *CBF* gént. Utóbbi esetén *HvCOR14b* és *HvDHN5* primereket irodalmi adatok alapján választottuk ki kísérleteinkhez (Stockinger és mtsi. 2007; Campoli és mtsi. 2009). Referencia vagy háztartási géneként *HvActin*-t és *Ta30797* (Paolacci és mtsi. 2009) géneket használtunk. A primereket a következők jellemzik: optimális T_m=60 °C, GC arány 40-60 %, 3' vég nem tartalmaz kettőnél több G (guanin) és C (citozin) végződést. A primerek adatai a 2. és 3. táblázatban szerepelnek.

A PCR reakció körülményei: 20 µl reakciótérfogatban 10 µM forward és reverse primer, 2,5 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, GoTaq puffer, GoTaq (Promega, 5 U/µl); steril desztillált víz. A PCR program: 95 °C 2 perc; [95 °C 1 perc, 60 °C 45 másodperc, 72 °C 30 másodperc] ciklusszám: 35; 72 °C 6 perc. A 25. ciklusától kezdve 2-2 ciklusonként történt a mintavétel, mivel 25 ciklus alatt a szintetizálódott DNS mennyisége nem volt látható agaróz gélen. A felsokszorosított DNS mintákat etidium-bromidot tartalmazó 1 %-os agaróz gélen detektáltuk. Agaróz gélelektroforézis körülményei: Lonza gyártmányú agaróz és GeneRuler 50 bp DNS létra használata, 80 V-on, 40 percig történő futtatás.

2. táblázat: Kísérletek során felhasznált oligonukleotid árpa primerek (5'-3' irány), melyek közül 11 *CBF* gén és *HvActin* referencia gén Primer 3 programmal lett tervezve árpa cDNS szekvenciáinak konzervált DNS szakaszaira. *HvCOR14b* és *HvDHN5* primereket irodalmi adatok alapján választottuk ki kísérleteinkhez (Stockinger és mtsi. 2007; Campoli és mtsi. 2009).

Primer neve	Irány	Szekvencia	Forrás	Termék hossza (bp)	Szekvencia azonosító (NCBI)
<i>Hv Actin</i>	forward	GGATCTCGAAGGGTGAGTACGA	Saját forrás	75	XM_045093373.1
	reverse	GACAACCTCGCAACTTAGAAGCACTT			
<i>HvCBF2</i>	forward	CGACCCCCATCACCTCAAG	Saját forrás	141	XM_045091538.1
	reverse	CGTCCTCCCGCCACCCTC			
<i>HvCBF3</i>	forward	GTCTCCCACACTCTCGCTCAAG	Saját forrás	98	XM_045091570.1
	reverse	CGGCTTCCTTCTTGAACAGTC			
<i>HvCBF5</i>	forward	GGACATGCATTCTACTACTGCTAC	Saját forrás	148	XM_045104349.1
	reverse	CCGATCAATCTCAGACAATCAGTAG			
<i>HvCBF6</i>	forward	GCGATTACGGCGAGGCTC	Saját forrás	123	XM_045091573.1
	reverse	CATCAATCGGAAGCCAAGAC			
<i>HvCBF7</i>	forward	CATGTGTGGCTCGTAGATGGTC	Saját forrás	142	XM_045095985.1
	reverse	CGATAAAGAACACAGGGCTAACC			
<i>HvCBF9</i>	forward	CATGTAGATAGTTGCGTTCTTCCAG	Saját forrás	118	XR_006609922.1
	reverse	CACAATCGAGTTCAGTACCAATTG			
<i>HvCBF10</i>	forward	CGCGTACTGGGATAACGGAG	Saját forrás	153	XM_045091572.1
	reverse	CAATCTACAGAGTCTTCTCCCG			
<i>HvCBF11</i>	forward	GGACTACGACTGCGAGATCAG	Saját forrás	118	XM_045114493.1
	reverse	GGTTTGTCTGGATGACCATAATAAG			
<i>HvCBF12</i>	forward	GCCATCACCGAGGTGACC	Saját forrás	99	XM_045092807.1
	reverse	CAGCTGGTAGTGGGACGACG			
<i>HvCBF13</i>	forward	GATGGAGATTTGAGTTGCC	Saját forrás	84	MN251600.1
	reverse	GTACGAGCCTAGGTCCATTTC			
<i>Hv Cbf14</i>	forward	GGGAGGCTGCATTTGACTTG	Saját forrás	150	MN251600.1
	reverse	CCATGGAGTGCTTGAGGTCC			
<i>HvCOR14b</i>	forward	AGACCCAGATCGATGGCTTCT	Stockinger E.J. és mtsai., 2007	102	XM_045114576.1
	reverse	GCACGGCCTGGGAAGAG			
<i>HvDHN5</i>	forward	CCACCAGCATACCACTGAGACC	Campoli és mtsai, 2009	207	XM_045098426.1
	reverse	TAGTGCTGTCCAGGCAGCTTGT			

3. táblázat: Kísérletek során felhasznált oligonukleotid *Triticum monococcum* primerek (5'-3' irány), melyek közül 11 *CBF* gén és *TmCor14b* Primer 3 programmal lett tervezve akkor búza cDNS szekvenciáinak konzervált DNS szakaszaira. Háztartási génként *Ta 30797* (Paolacci és mtsai, 2009) gént használtunk.

Primer neve	Irány	Szekvencia	Forrás	Termék hossza (bp)	Szekvencia azonosító (NCBI)
<i>Ta30797</i>	forward	GCCGTGTCCATGCCAGTG	Paolacci AR és mtsai, 2009	126	M_044563081.1
	reverse	TTAGCCTGAACCACCTGTGC			
<i>TmCBF2</i>	forward	GTCCATCACCTCCAACGACT	Saját forrás	89	AY951945.1
	reverse	GCGCCAAGTTTGCCTAGTA			
<i>TmCBF3</i>	forward	GCGGTGGACACCGATATGTTTCAG	Saját forrás	200	AY951949.1
	reverse	GCGAGGGGAATTATCGACTGTAC			
<i>TmCBF4</i>	forward	GCTGTTCTCCATGTCGTCAG	Saját forrás	82	AY951945.1
	reverse	GTAGTACGACCCGGCAACC			
<i>TmCBF9</i>	forward	CCAGCAGCAGCAGATCATT	Saját forrás	65	AY951945.1
	reverse	CGCCGGAAGACATGTA AAAAC			
<i>TmCBF10</i>	forward	TGTTTCAGTAGGCTTGACTTGTTCCCG	Saját forrás	180	AY951950.1
	reverse	GCAGAATCGGCTACAAGCTCCAG			
<i>TmCBF12</i>	forward	GTCCCACTCCCACTCACAG	Saját forrás	74	AY951944.1
	reverse	ACATGTCGTGGCACAATGC			
<i>TmCBF13</i>	forward	TGGACATCGACATGTTTCAGGCTTG	Saját forrás	213	AY951951.1
	reverse	CAGAGCAGAATCAGATGGGGAATC			
<i>TmCBF15</i>	forward	CATGTTTCGAGCTGGATATGTCCGGGG	Saját forrás	212	AY951944.1
	reverse	GGGAACAGCTTCGGTTTGTTCATGC			
<i>TmCBF16</i>	forward	GCGGCATGCCTCCAACAGCGCAG	Saját forrás	200	AY951944.1
	reverse	ACGTGCCCAAGTCCATCTCCCCG			
<i>TmCBF17</i>	forward	GAGTTCGACTTGAGCTGGA	Saját forrás	67	AY951945.1
	reverse	CGAAATCCGCGTAGTAGGAG			
<i>TmCOR14b</i>	forward	GAGCGACTCCTGCTAACGAC	Saját forrás	135	XM_044464449.1
	reverse	CTACCGCCTCCTGTACCTTG			

5.2.5. Kvantitatív valós idejű PCR

A szemikvantitatív PCR reakció eredményei alapján a kiválasztott hidegindukált *CBF* és *COR* gének aktivációjának pontosabb elemzéséhez az RT-qPCR technikát használtunk, melynek keretében csak az őszi variánsokat használtuk.

Az RT-qPCR vizsgálatot ABI 7500 készülékkel kiviteleztük és Power SYBR Green reagens (Life Technology) használtunk a reakciótermékek detektálására. A PCR körülmények a következők voltak 25 µl reakciótérfogat esetén: 25 ng/µl koncentrációjú cDNS, 10 mM koncentrációjú forward- és reverse primer, Power Sybr Green Master Mix, steril nukleáz mentes víz. A normalizáláshoz árpa esetén *HvActin* referencia gént, búza esetén *Ta30797* gént használtunk, illetve a szemikvantitatív PCR-hez is használt, az irodalomban leírt, valamint saját tervezésű primereket használtuk a reakciókhoz. A minták technikai ismétléseinek száma 3-3 volt. PCR program két fázisból állt, az első fázis 10 perc 95 °C-on, a második fázis tartalmazta a ciklusosan ismétlődő szakaszt: 95 °C 15 másodperces és 60 °C 1 perces szakasz, ciklusszám: 42. Az olvadási görbe vizsgálatához a gép 0,5 °C-onként lépkedve felfelé 60-95 °C-ig detektált minden

ciklus végén, mellyel a PCR-amplikont ellenőriztük a mérést követően, illetve a használt primerpárok specificitását bizonyította. A PCR reakció lefutása után az olvadási görbéket, a Ct értékeket és a technikai ismétlések közötti szórásokat ellenőriztük. A Ct értékeket $\Delta\Delta Ct$ számoláshoz Microsoft Office Excelbe exportáltuk, ahol Livak és Schmittgen (2001) módszere szerint határoztuk meg a relatív expresszió mértékét, a kontroll (kalibrátor) mintákhoz képest a kezelt mintákon mennyi a mért génexpressziós változás.

Normalizációs lépés (mintán belüli): $\Delta Ct = \text{cél gén Ct} - \text{háztartási gén Ct}$

Kalibrátorként választott minta/ kontroll mintához képest ($\Delta\Delta Ct$) = kezelt minta ΔCt – kalibrátor minta ΔCt

Ha a hatékonyság 100%, az expressziós különbség: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

5.3. PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatásának vizsgálata a *CBF-COR* rendszer működésére inhibitorok használatával

Az 5.2.4. pontban leírt szemikvantitatív PCR és 5.2.5. pontban található RT-qPCR vizsgálatok után kiválasztásra kerültek azok a gének, melyeket az inhibitoros kísérletünkben tovább vizsgáltunk összpontosítva a PLC, PLD és Ca^{2+} jelátvitelt blokkolva.

5.3.1. Növénynevelés, inhibitor kezelések, edzés körülményei

A tavaszi típusokat kihagyva csak az őszi árpa (Nure) és őszi alakor búza (G3116) fajtákat használtuk az inhibitoros kísérletekhez. Mindkettő vonal esetén Petri csészébe helyeztünk nedves, MilliQ vízzel átitatott steril szűrőpapíron csíráztattuk a szemeket, majd a fiatal csíranövénykéket 2-2 ml különböző inhibitorot tartalmazó eleggyel kezeltük, melyek egyes foszfolipáz jelátviteli komponenseket (PLC, PLD), illetve Ca^{2+} -szintet befolyásolják (1. táblázat), a következők szerint: 10 mM EGTA, 1 mM lantán-klorid, 1 μM thasigargin, 50 μM ruténium vörös, 20 μM mastoparan, 10 μM U73122, 100 nM ionomicin, 1 mM neomicin és 0,2 v.v % 1-butanol. Egyes gátlószerek (U73122, ionomicin és thapsigargin) dimetil szulfoxidban (DMSO) oldódnak, így ezen inhibitorokkal kezelt növényeket DMSO tartalmú oldatban nevelt növényi mintákkal normalizáltuk, ezeket tekintettük kontrollnak. Mind a DMSO-ban, mind a vízben oldott elegyeket pH=6.0-ra állítottuk.

Normál körülmények között 20/20 °C-os fitotron kamrákban 16 órán keresztül tartottuk a növényeket az inhibitoros oldatokban, majd a növények egy részét hideg edzés céljából áthelyeztük 4/4 °C-os fitotron kamrába, a növények másik részét 20/20 °C kontroll körülmények

között tartottuk. A kísérlet során az elpárolgó, növények által felvett kezelőoldatokat pótoltuk. A teljes kísérletet kétszer megismételtük.

5.3.2. Mintavételezés és cDNS átírás

A mintavételezések az edzési időszak (4/4 °C) 0., 6., 12. és 24. órájában történtek. Minden minta három-három darab növény hajtáscsúcs részéből, illetve levélszegmenséből tevődött össze, melyeket együtt egy-egy steril 2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, majd azonnal folyékony nitrogénbe tettük és -80 °C-os hőmérsékleten tároltuk őket az RNS feltárásig. A növényi szövetekből az RNS-izolálás és cDNS szintézis az 5.2.3. részben leírtak alapján történt.

5.3.3. Az inhibitoros kezelésekből származó mintákon történő génexpressziós vizsgálat

Az 5.2.5. pontban leírt RT-qPCR körülmények, a használt készülék és a program némileg eltért az inhibitoros kísérletben szereplő körülményektől, mivel egy másik típusú PCR rendszeren belül vizsgáltuk a mintákat. A vizsgálathoz a BioRad CFX96 (C1000 Touch Thermal Cycler) PCR készüléket és KAPA Sybr Fast Universal qPCR reagenst (Kapa Biosystems) használtuk a detektálásra. A 10 µl reakcióelegy a következő összetételű volt: 25 ng/µl koncentrációjú cDNS, 10 mM koncentrációjú forward- és reverse primer, Sybr Fast Master Mix, steril nukleáz mentes víz. A normalizáláshoz árpa esetén *HvActin* referenciagént, búza esetén a *Ta30797* gént használtuk. A technikai ismétlések száma 3 volt. A PCR program két fázisból állt: az első fázis 3 perc 95 °C-on, a második fázis tartalmazta a ciklusosan ismétlődő szakaszt: 95 °C 5 másodperces és 60 °C 30 másodperces szakasz, a ciklusszám 40 volt. A PCR reakció lefutása után leellenőriztük az olvadási görbéket, a Ct értékeket és a technikai ismétlések közötti szórásokat. Mindegyik minta eredményét ugyanannak a kontroll körülmények között nevelt kalibrátor mintapopulációnak az eredményéhez viszonyítottuk és Livak és Schmittgen (2001) módszere szerint határoztuk meg a relatív expresszió mértékét.

5.4. Hidegstressz által kiváltott PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatása a fagyállóságra, fagyasztási tesztek

Genetikai vizsgálatok után fagyteszteket hajtottunk végre, hogy megállapítsuk, van-e a molekuláris rendszerekben bekövetkező változásoknak valamilyen hatása a fenotípusra nézve, illetve befolyásolják-e a megfelelő fagyállóság kialakulását. Őszi árpa (Nure) és őszi alakor búza (G3116) genotípusokat használtunk az inhibitoros, fagyasztásos kísérletekhez. Kétféle fagytesztet végeztünk GP200-R4 típusú folyadékos fagyasztórendszerben (Grant Instruments, Shepreth, Anglia): levélszegmens fagyasztás során konduktometriás módszerrel megállapítottuk a levél sérülésein keresztül kiáramló ionok mennyiségét, így következtetve a növények túlélő

képességére. A másik fagyteszt során egész növények fagyasztására került sor, melyeket a regenerációs időszakban szemrevételezéssel bonitálási értékekkel jellemeztünk.

5.4.1. Növénynevelés, edzés körülményei

A szemterméseket steril Petri csészébe helyezett nedves, MilliQ vízzel átitatott steril szűrőpapíron csíráztattuk. A kifejlődött fiatal csíranövényeket Hoagland tápoldatban előneveltük 7 napig normál körülmények között 20/20 °C-os növénynevelő kamrában. Egy liter tápoldat 50 ml makroelem-törzsoldatot, 0,125 ml mikroelem-törzsoldatot, 10 ml Fe-EDTA törzsoldatot és desztillált vizet tartalmazott, pH=5,8 [Makro törzsoldat (1 l): 5,055 g KNO₃, 11,81 g Ca(NO₃)²* 4 H₂O, 4,932 g MgSO₄* 7 H₂O, 1,361 g KH₂PO₄. Mikro törzsoldat (100 ml): 286 mg H₃BO₃, 362 mg MnCl₂* 4 H₂O, 22 mg ZnSO₄* 7 H₂O, 12 mg Na₂MoO₄* 2 H₂O, 8 mg CuSO₄* 5 H₂O. Fe-EDTA (1 l): 4 g C₁₀H₁₂N₂NaFeO₈ (Fe(III)-EDTA)]. A növények alatt 3 naponta történt a friss tápoldat csere.

Az előnevelés 5. napjától a palántákat inhibitorokat tartalmazó eleggyel kezeltük és neveltük. Az inhibitorokat Hoagland oldat helyett desztillált vízben oldottuk fel annak érdekében, hogy a növények biztosan felvegyék az oldatokban a jelátvitel-blokkoló elegyeket és ne kapjanak más tápanyagot ebben az időszakban. A 20/20 °C-os előnevelés utolsó (7.) napján hidegakklimatizációs körülményeket használva 2 hétig 4/4 °C-on edzettük az inhibitor mentes-, illetve inhibitorokat tartalmazó tápoldatban nevelt növényeket. Az edzési periódus kezdetén kicseréltük a inhibitoros desztillált vizeket inhibitort tartalmazó Hoagland oldatokra, az inhibitormentes növények esetén inhibitorokat nem tartalmazó Hoagland oldatra. Három naponta történt a friss tápoldat cseréje. A kontrollként használt palántákat az edzés idején továbbra is a 20/20 °C-os kamrában tartottuk, melyekhez normalizáltuk az edzett növények túlélőképességét.

Mindkettő típusú fagyasztás esetén az 1. mintavételezés és fagyteszt a 20/20 °C-os előnevelés utolsó napján (7. nap) történt, a 2. és 3. mintavételeket és fagyteszteket a 4/4 °C-os edzési periódus 7. és 14. napján végeztük.

5.4.2. Konduktometriás fagyteszt, levélszegmens fagyasztás

Mintavételezés során 2 kifejlett növény legidősebb (alsó) levelének középső harmadából vágott 4-4 darab, körülbelül 1-1 centiméteres levélszegmens adott egy mintát. Ezeket 12 ml-es steril falcon csövekbe helyeztük. A mintákat minden esetben ugyanabban a napszakban, megvilágítási ciklusban vettük és ügyeltünk a vágási felületek épségére, illetve a levéldarabkák egyforma méretére, melyet tömegük segítségével ellenőriztünk. A biológiai ismétlések száma kezelésenként 4 volt, a kísérletet 2 alkalommal ismételtük meg.

A levélszegmensek fagyasztását a Webb és mtsi. (1994) által leírt protokoll alapján végeztük el. A mintavételezést követően a minták egy részét nem fagyasztottuk, melyeket az alapvonal beállításához használtuk (100% túlélés, azaz a legcsekélyebb membránkárosodást szenvedett állapot). A folyékony nitrogénnel kezelt mintákat 0 %-os túlélésnek tekintettük (legerősebb membránkárosodás). A fagyasztani kívánt csövek GP200-R4 típusú folyadékos fagyasztórendszerbe kerültek. Fagyasztási körülmények: 2 °C-os fagyasztóba behelyeztük a mintákat, majd fokozatosan hűtöttük 0 °C-ra, -2 °C-ra, majd -4 °C-ra a növények fagypont alatti hőmérséklethez való hozzászoktatásához. A -2 °C-ra történő lehülés kezdeti szakaszán minden egyes mintához egy-egy ugyanolyan nagyságú és tömegű jégdarabkát raktunk amiatt, hogy a jégképződés a mintákban megkezdődhessen. Az árpa növények levélszegmenseit -6 °C, -12 °C és -15 °C hőmérsékleten, míg alakor búza palánták levélmintáit -5 °C, -8 °C, -11 °C és -14 °C hőmérsékleteken fagyasztottuk, minden esetben 1-1 órán keresztül. A fagyasztás után a mintákat 4 °C-on 30 perces regenerációs idő követte, majd 8-8 ml desztillált vizet hozzá téve rázattuk, végül konduktométer készülékkel meghatároztuk az oldatok vezetőképességét. A rázások leteltével minden esetben 4-4 ml folyadékból a minták vezetőképességét MultiSample Konduktométer (Mikro KKT, Magyarország) segítségével határoztuk meg. A mérés eredményeit a még DOS operációs rendszer alatt futó Multi-Sample Conductometer version 1.0 (Intron Software) szoftver használatával tekinthettük meg, az eredményekkel excelben számoltunk tovább az eredeti cikkben leírt képlet alapján (Webb és mtsi. 1994). A kiáramló ionok mennyisége, így az oldat vezetőképessége az elfagyás következtében szövetelhalást, szövetroncsolódást szenvedett növények esetén nagyobb, mint a fagyasztást túlélő növényeknél.

5.4.3. Egész növény fagyasztás

Mintavételek után a palánták gyökereiről eltávolítottuk a tápoldatot, majd nedves szűrőpapírba és folyadékot át nem eresztő zacskókba helyezve fagyasztottuk őket. A benedvesítés a jégképződés beindulása érdekében történt. Minden szűrőpapírba 4-4 palántát csomagoltunk. A fagyasztási körülmények a következők voltak: a 4 °C hőmérsékletű fagyasztóba helyeztük a mintákat, majd hűtöttük 0 °C-ra, ezután a fagyasztási hőmérsékletekre. Az árpa növényeket -6 °C, -10 °C és -12 °C hőmérsékleten, míg az alakor palántákat -4 °C, -7 °C és -10 °C hőmérsékleteken fagyasztottuk, minden esetben 1-1 órán keresztül. A fagyasztás után a mintákat szobahőmérsékleten hagytuk felolvadni, felitattuk gyökereikről a folyadékot és eltávolítottuk a leveleiket, csupán a bokrosodási csomókat hagytuk meg. Utóbbiakat növénynevelő cserepekbe ültettük el, amelyekben 2:1:1 arányú kerti föld, homok és humusz keveréke volt. Azokat a növényeket, melyeket az életképességi vizsgálat során kontrollnak tekintettünk és hozzájuk

hasonlítottuk a fagyasztott palánták regenerációjának mértékét, a fagyasztás ideje alatt 20/20 °C-on tartottuk, majd a fentihez hasonló módon ültettük el. A regeneráció 12 napig 20/20 °C-on klímakamrában zajlott. A regeneráció mértékét 3 naponta felvételeztünk, amikor is megmértük a hajtáshosszt és bonitálási értékekkel jellemeztük őket egy 0-tól 5-ig tartó diszkrét skálán.

A bonitális skála a következő volt:

0: teljesen elfagyott növények.

1: kis mértékű életképességet mutató növények.

2: a regenerált palántán nagy mértékű szöveti nekrozis mutatkozott, a hajtások kis növések.

3: levél elszíneződés, közepes mértékű szöveti nekrozis jellemezte a növényt, a levelek lelassult növekedését tapasztaltuk.

4: kis mértékű növekedéscsökkenés mutatkozott, a hajtásokon kevés levél elszíneződés volt jellemző.

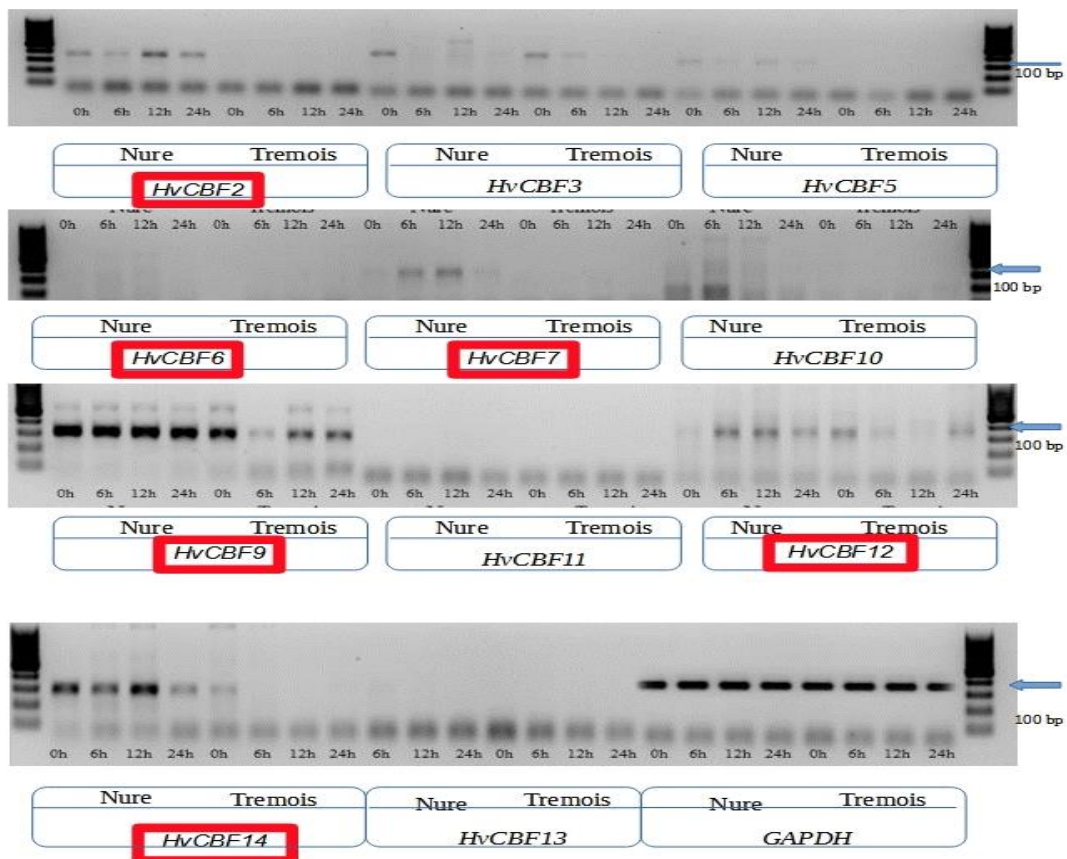
5: normál növések, életképes növények.

6. EREDMÉNYEK

6.1. *COR14b* és *CBF* gének expressziós intenzitásának megállapítása hidegstresszválasz során

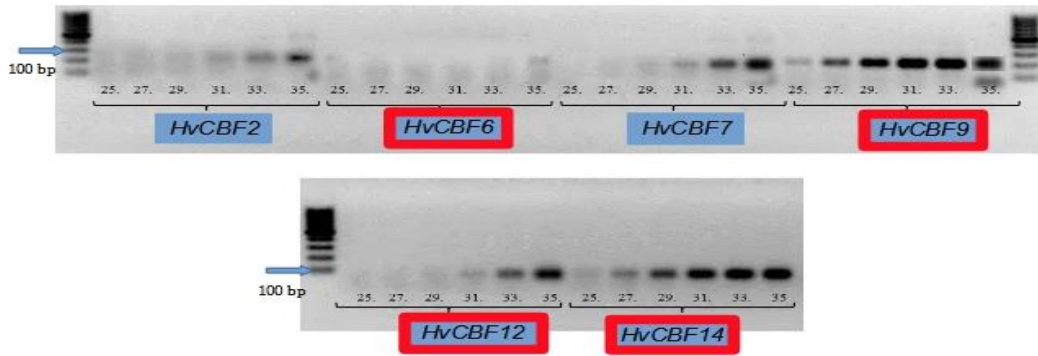
Árpa esetén *HvCBF2*, *HvCBF3*, *HvCBF5*, *HvCBF6*, *HvCBF7*, *HvCBF9*, *HvCBF10*, *HvCBF11*, *HvCBF12*, *HvCBF13*, *HvCBF14* gének expressziós szintjét hasonlítottuk össze, amikor búza esetén pedig a *TmCBF2*, *TmCBF3*, *TmCBF4*, *TmCBF9*, *TmCBF10*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCBF15*, *TmCBF16*, *TmCBF17* és *TmCOR14b* géneket hasonlítottuk össze a kontroll és edzett állapotok között PCR, szemikvantitatív PCR, RT-qPCR technikát használva.

Árpa PCR eredménye alapján elmondható, hogy kontroll körülmények között (20/20 °C), illetve a tavaszi variánsokban vizsgált *CBF* gének a hidegedzés hatására nem mutattak számottevő aktivitást, de néhány esetben alapszintű expresszió megfigyelhető volt. A *CBF* transzkripció faktorok őszi gabonafélékben nagyobb aktivitást mutattak a tavaszi fajtákhoz képest. A 6 órás, 12 órás és 24 órás edzést követő expressziós változásokat összehasonlítva elmondható, hogy körülbelül 6 vagy 12 órás hidegstresszt követően érték el a maximális szintet. A 11 árpa *CBF* génből az előzetes PCR eredmények alapján kiválasztottunk kis, közepes és nagy mértékben kifejeződő géneket (*HvCBF2*, *HvCBF6*, *HvCBF7*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*), melyeket tovább vizsgáltunk szemikvantitatív PCR-rel annak érdekében, hogy ki tudjuk választani azokat a transzkripció faktorokat, melyeket az inhibitorral kezelt növények génexpressziós vizsgálataihoz használtunk. Az árpa PCR eredményeket a 4. ábra mutatja be.



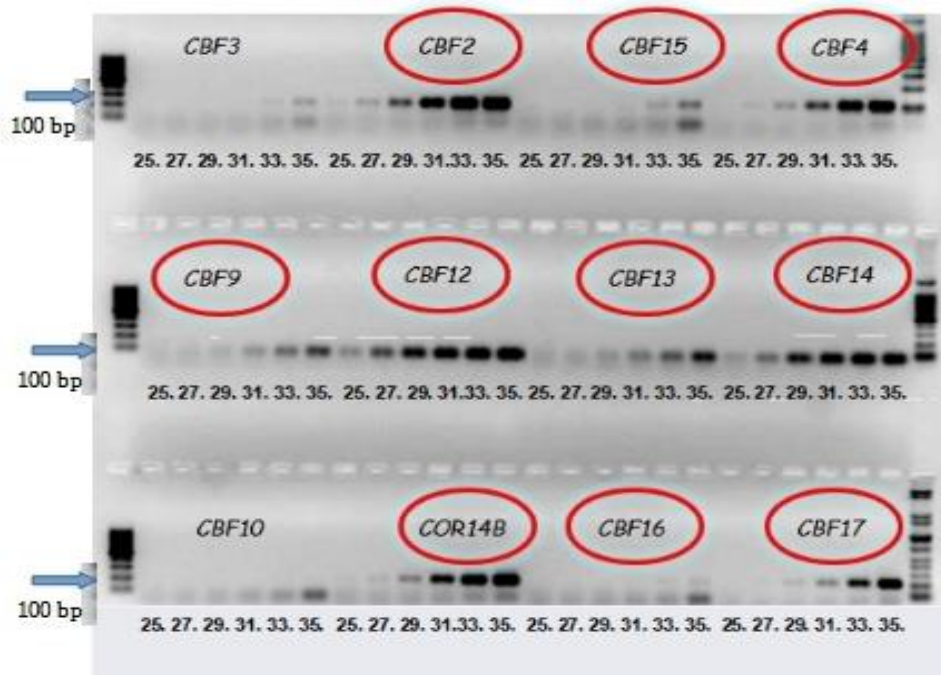
4. ábra Az árpa *CBF* transzkripciós faktorok expressziós szintjének összehasonlítása hidegkezelést követő 0, 6, 12 és 24 órában (0h, 6h, 12h, 24h) őszi Nure és tavaszi Tremois variánsokban. A 100 bázispárhoz közeli hosszúságú PCR termékeket etidium-bromidot tartalmazó 1 %-os agaróz gélen detektáltuk. Az eredmények alapján kiválasztottuk a piros kerettel jelölt géneket a szemikvantitatív PCR vizsgálathoz.

A szemikvantitatív PCR eredmény alapján elmondható, hogy vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódtak. Találtunk közepes mértékű expressziós szintet mutató géneket és magas szinten aktiválódó *CBF*-eket is. Végül az inhibitoros vizsgálatokhoz a *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14* géneket választottuk ki (5. ábra). Az inhibitorral kezelt növények esetén a kísérleti rendszerünkhöz negatív kontrollnak a *HvCBF6* gént választottuk, illetve a hidegstresszt követően nagyobb mértékben expresszálódó *HvCBF9*, *HvCBF12* és *HvCBF14* transzkripciós faktorokat vizsgáltuk a *HvCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének mellett. Kísérletünk is igazolta, hogy gabonafélék esetén a *HvCBF14* gént a leghatásosabb és legfontosabb a fagyűrész kialakítását tekintve, azonban valószínűleg a *HvCBF9* is fontos szerepet játszhat.



5. ábra Árpa *CBF* transzkripciós faktorok vizsgálata szemikvantitatív PCR technikával. A számok jelölik azt, hogy a 25. ciklustól a 35. ciklusig 2-2 ciklusonként történt a mintavétel. A PCR termékeket etidiumbromidot tartalmazó 1 %-os agaróz gélen detektáltuk. Ezen eredmények alapján válogattuk ki a piros kerettel jelölt kis, közepes és nagy mértékben expresszálandó géneket, melyeket az inhibitorral kezelt növények esetén vizsgáltunk RT-qPCR módszerrel.

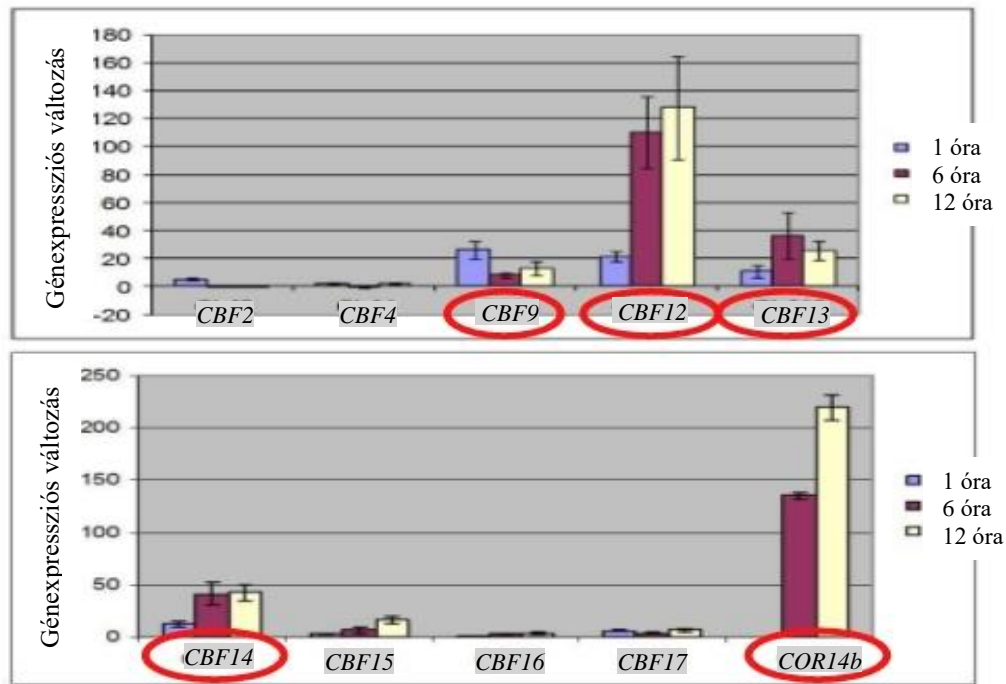
Alakor búzában a fentebb említett 11 *CBF* transzkripciós faktort és *TmCOR14b* effektor gént hasonlítottunk össze szemikvantitatív PCR módszerrel, mely előzetes eredményként szolgált a további RT-qPCR kísérleteinhez. Az eredményeket figyelembe véve a *CBF* gének közül kiválasztottunk azt a 9 gént (*TmCBF2*, *TmCBF4*, *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCBF15*, *TmCBF16*, *TmCBF17*), illetve a *TmCOR14b* effektor gént, melyek génkifejeződést mutattak hidegzést követően. (6. ábra).



6. ábra Alakor búza *CBF* transzkripciós faktorok és *COR14b* gén vizsgálata szemikvantitatív PCR technikával. A számok jelölik azt, hogy a 25. ciklustól a 35. ciklusig 2-2 ciklusonként történt a mintavétel.

A PCR termékeket etidium-bromidot tartalmazó 1 %-os agaróz gélen detektáltuk. Ezen eredmények alapján válogattuk ki a piros kerettel jelölt génkifejeződést mutató géneket a RT-qPCR vizsgálathoz.

A kiválasztott géneket megvizsgáltuk RT-qPCR technikát alkalmazva hidegstresszt követő 1, 6 és 12 órában, annak érdekében, hogy ki tudjuk választani azokat a transzkripciós faktorokat, melyeket az inhibitorral kezelt növények génexpressziós vizsgálataihoz használtunk. Elmondható, hogy akkor búzában is vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódnak, valamint találtunk közepes és magas szinten expresszálódó *CBF*-eket is. Hidegedzést követően a vizsgált gének kis mértékű génkifejeződése volt jellemző *TmCBF2*, *TmCBF4*, *TmCBF16* és *TmCBF17* esetén. A kontrollhoz képest 20-40-szer volt magasabb a génexpressziós szint *TmCBF9*, *TmCBF13*, *TmCBF15* esetében. Magas génkifejeződést a *TmCBF12* és *TmCBF14* transzkripciós faktorok mutatták. *CBF* géneknél már 1 óra hidegedzés hatására is detektálható volt a génexpressziós változás, majd 6 óra elteltével magasabb szintet értek el. 12 óra hideghatás után egyes *CBF*-ek esetében lecsengés volt megfigyelhető, míg más transzkripciós faktoroknál növekedett a génkifejeződés mértéke. A *TmCOR14b* effektor gén expressziós szintje 1 órás hidegkezelés után még nem volt számottevő, 6 óras után viszont majdnem 150-szeres génkifejeződést mutatott a kontrollhoz képest, 12 órás hidegstresszt követően a szintje megemelkedett, a transzkripciós faktorokhoz képest 3-5-ször nagyobb mértékű a génkifejeződés mértéke. Az inhibitoros kísérleteinkhez -ahol az egyes jelátviteli folyamatokat tanulmányoztuk-, kiválasztottuk a *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14* és *TmCOR14b* géneket, mivel ezen gének kifejeződése nagyobb a többi vizsgált génhez képest rövid idejű hideghatást követően. Közepesen aktiválódó kontrollnak a *TmCBF13* gént választottuk. A fent leírt, akkor búzából származó eredményeket a 7. ábra mutatja be.



7. ábra *Triticum monococcum*-ban a kiválasztott 9 génkifejeződést mutató *CBF*, illetve a *TmCOR14b* effektor gén vizsgálata RT-qPCR technikával 1, 6 és 12 órás hidegedzést követően. Ezen eredmények alapján válogattuk ki a piros kerettel jelölt közepes és nagy mértékben expresszálandó géneket, melyeket az inhibitorral kezelt növények esetén vizsgáltunk RT-qPCR módszerrel

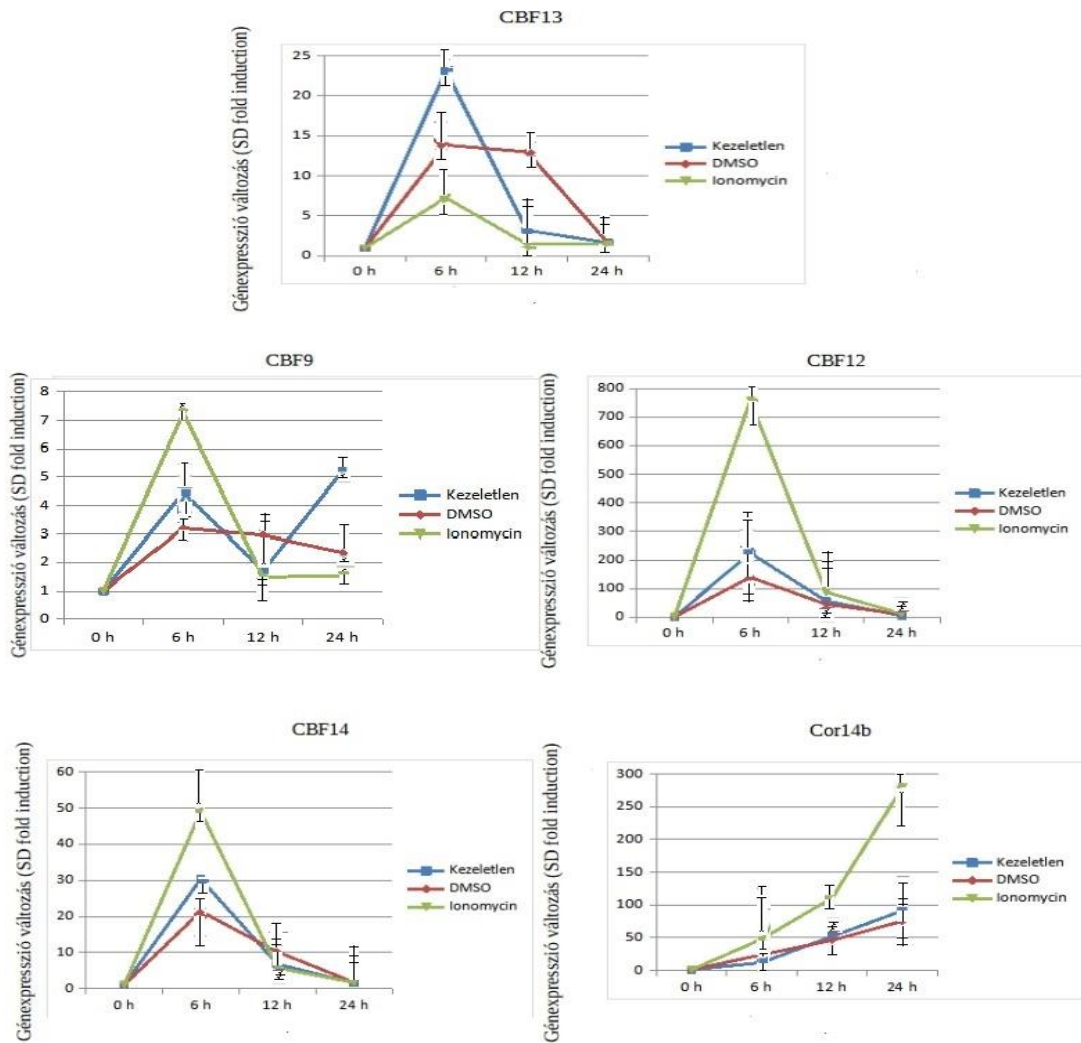
6.2. PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatása a *CBF-COR* rendszer működésére inhibitorok használatával

A 6.1. pontban leírt szemikvantitatív PCR és RT-qPCR eredmények alapján kiválasztásra kerültek azok a gének, melyeket tovább vizsgáltunk inhibitorokat használva a PLC, PLD és Ca^{2+} jelátvitelt befolyásolva. Kiválasztásra kerültek a hidegedzés hatására legnagyobb kifejeződést mutató gének, illetve ezen kívül olyan transzkripciós faktorokat is kiválogattunk, melyek negatív kontrollnak tekinthetők. Ez alapján az árpában a *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b* és *HvDHN5* gének, alakor búzában pedig a *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14* és *TmCOR14b* gének működését kívántuk megvizsgálni a PLC-, PLD- és kalcium-jelátviteli folyamatok tekintetében. A kérdések megválaszolására a fiatal csíranövényeket olyan inhibitorokkal (gátlószerekkel) kezeltük (lásd. 2.4. fejezet), melyek az adott jelátvitel egyes részleteire gyakorolnak blokkoló hatást. Az alakor búza esetén megállapítható volt, hogy sokkal érzékenyebben reagáltak az egyes, kísérletünkben használt gátlószerekre az árpaéhoz képest. Ezen tapasztalat után az alakor búza *CBF-COR* rendszer ilyen típusú vizsgálatától eltekintettünk (neomicin kezelés esetén).

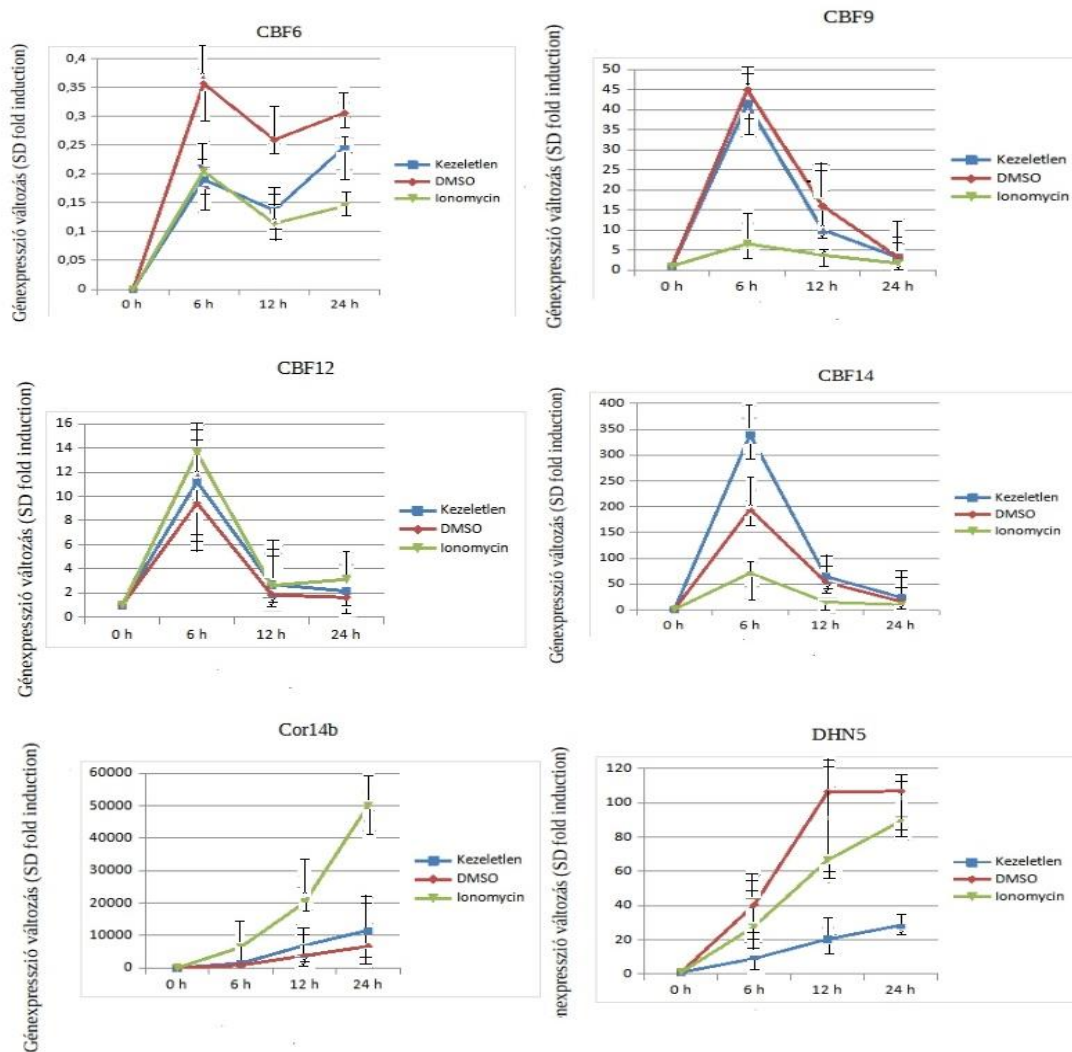
6.2.1. Kalcium jelátvitel vizsgálata

Kalcium jelátvitelt többféle módon befolyásoltuk: egyrészt a kalcium ionoforokra ható ionomicinnel fokoztuk a Ca^{2+} mennyiséget, másrészt a Ca^{2+} -csatornát blokkoló lantán-kloriddal és ruténium vörössel, Ca^{2+} kelátor EGTA-val és a Ca^{2+} -pumpákat befolyásoló thapsigarginnal befolyásoltuk a kalciumionok transzportját, illetve mastoparannal megemeltük az intracelluláris Ca^{2+} -szintet.

Az ionomicinnel a sejtben jelen lévő Ca^{2+} -szintjét megnöveltük és eredményeiből kiderült, hogy meglehetősen ellenőrizhetetlen hatást gyakorol a növények génexpressziós- és anyagcsere-folyamataira. Valószínűsíthetően bármelyik géncsalád expressziós szintjét megváltoztathatja. Az alakor búza és árpa növényekben is másként változtatta meg egyes *CBF* faktorok működését: hidegakklimatizáció hatására a magasan expresszáló *CBF9*, *CBF13* és *CBF14* esetén is ellenkező hatást gyakorolt az ionomicinnel serkentett Ca^{2+} -szint növekedés (8. és 9. ábra). Mivel még nincs információ arról, hogy hogyan befolyásolja a növényi sejtekben lezajló anyagcsere útvonalakat az ionomicin, csupán csak állat kísérletekben használatos anyag, ezért szeretnénk volna a *CBF-COR* rendszerre gyakorolt hatását is megvizsgálni. Eredményeink alapján viszont azt tapasztaltuk, hogy túlságosan erős hatást gyakoroltak a vizsgált gének működésére, illetve súlyos általános gátlóhatást sejtetnek a növényi életműködésre vonatkozóan.



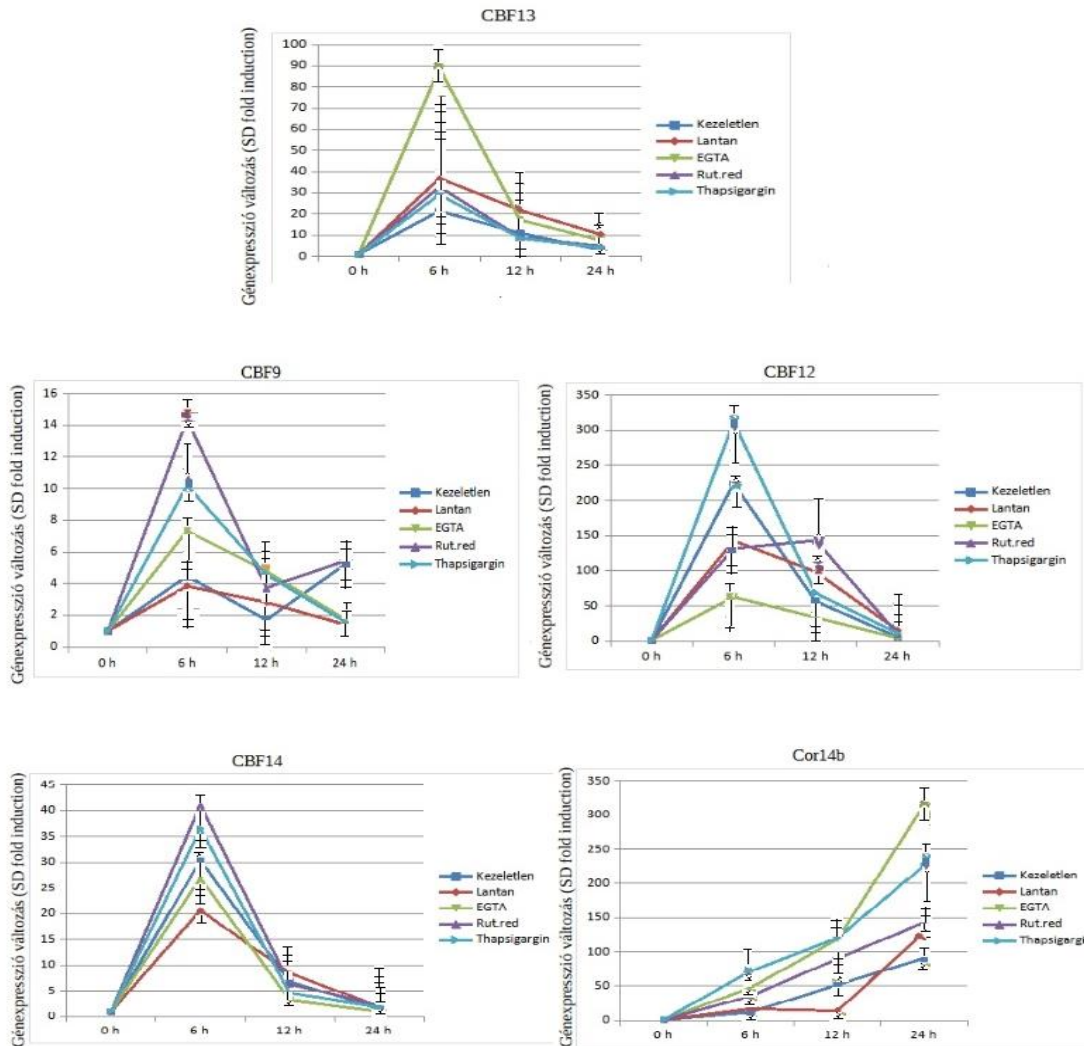
8. ábra A *Triticum monococcum* CBF-COR rendszer aktivációja kalcium jelátvitelt fokozó ionomicin kezelést követően a következő gének esetén: *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCOR14b*. A Ca^{2+} ionofór, Ca^{2+} felszabadító ionomicin vegyületet DMSO-ban kell feloldani, melyet a kezeletlen mintákhoz hasonlóan kontrollnak tekintettünk. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag \pm szórás (n=6).



9. ábra Árpa *CBF-COR* rendszer aktivációja kalcium jelátvitelt fokozó ionomicin kezelést követően a következő gének esetén: *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b*, *HvDHN5*. A Ca^{2+} ionofór, Ca^{2+} felszabadító ionomicin vegyületet DMSO-ban kell feloldani, melyet a kezeletlen mintákhoz hasonlóan kontrollnak tekintettünk. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

A Ca^{2+} -csatornákra és Ca^{2+} -szintre ható inhibitorokat alkalmazva a következőket tapasztaltuk alakor búzában: hidegstressz során közepes mértékben kifejeződő *TmCBF13* szintjét a Ca^{2+} -csatornák blokkolására használt lantán-klorid, ruténium vörös, thapsigargin nem befolyásolta, a Ca^{2+} kelátor EGTA kis mértékben pedig megemelte a génexpressziót. Hidegedzés után a *TmCBF9* és *TmCBF14* expressziója magas volt és szintjüket sem változtatták meg a gátlóanyagok. *TmCBF12* esetén elmondható, hogy mindegyik inhibitor kis mértékben lecsökkentette az expressziót az alapszinthez képest, egyedül a thapsigargin működött ellenkezőleg, azaz növelte a génexpressziót. *TmCOR14b* effektor gén alapszintje normál

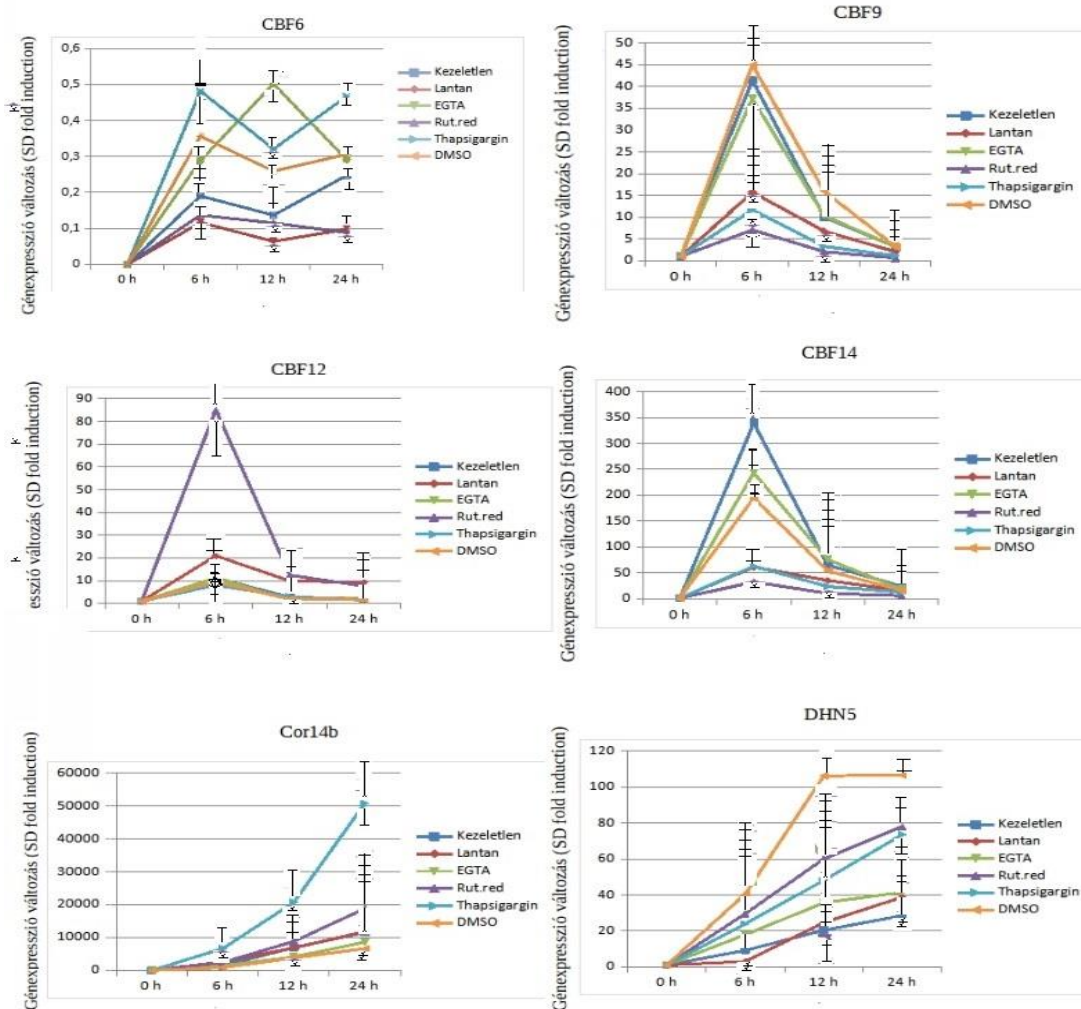
körülmények között 100-as nagyságrendű volt. A kezelések hatására kis mértékű növekedést tapasztaltunk, de leginkább EGTA kezelést követően emelkedett meg duplájára (10. ábra).



10. ábra Az alakor búza *CBF-COR* szabályzórendszer génexpressziós válasza a Ca^{2+} -csatorna blokkoló lantan- klorid, Ca^{2+} kelátor EGTA, vakouláris Ca^{2+} -csatorna blokkoló ruténium vörös és Ca^{2+} -pumpa inhibitor, Ca^{2+} felszabadító thapsigargin kezelést követően a következő gének esetén: *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCOR14b*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

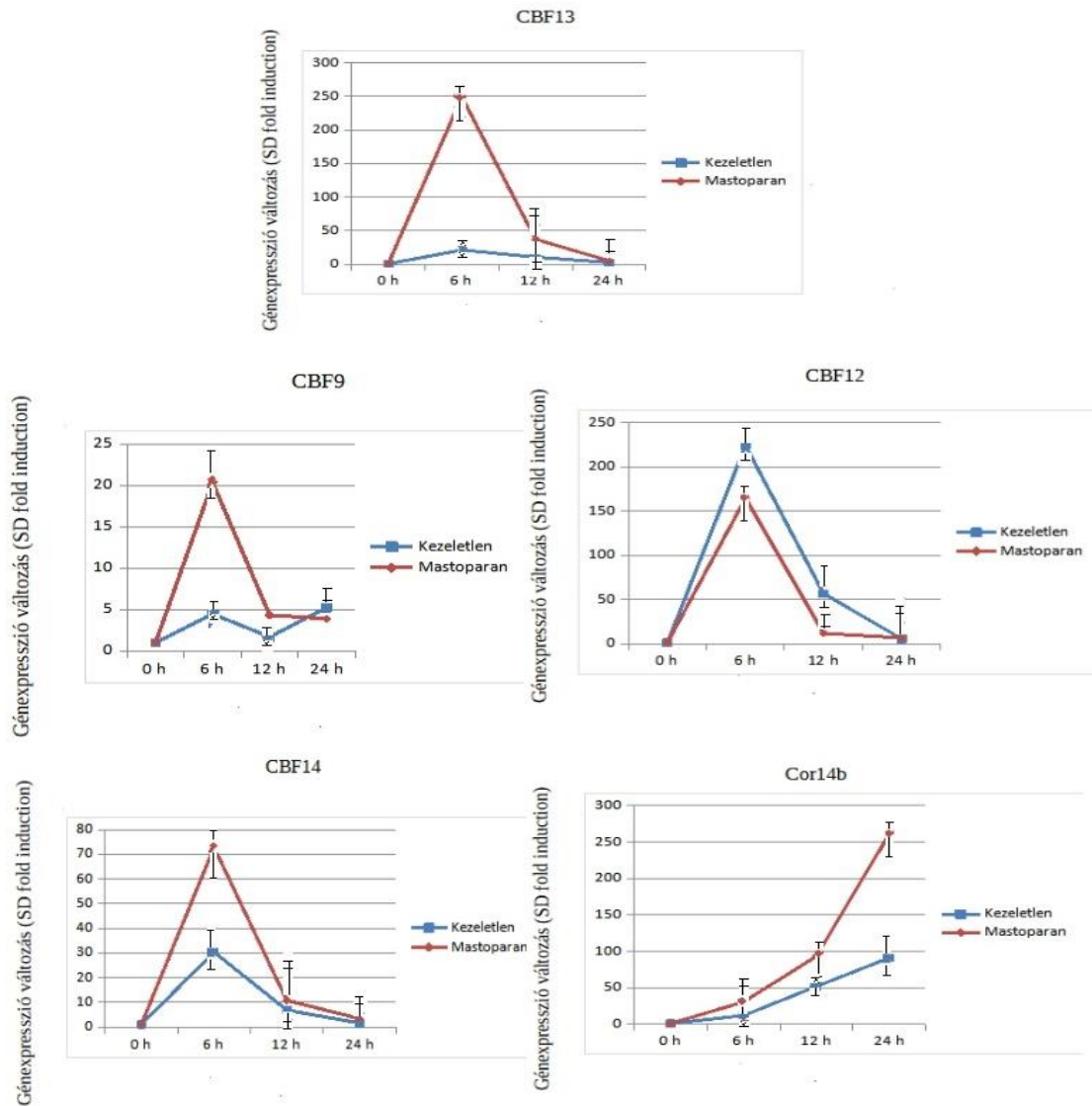
Árpa esetén a Ca^{2+} -csatornák blokkolására használt lantan-klorid, ruténium vörös, thapsigargin, illetve a Ca^{2+} kelátor EGTA a negatív kontrollként használt *HvCBF6* expresszióját nem befolyásolta. Az inhibitormentes körülmények között nevelt árpa palántákban a *HvCBF9* és *HvCBF14* expressziós szintje kimagasló volt, leginkább *HvCBF14* esetén. Ezen gének expressziós kinetikáját jelentősen befolyásolták az inhibitor kezelések. A *HvCBF9* génkifejeződését EGTA kivételével az összes Ca^{2+} útvonalat blokkoló anyag lecsökkentette: lantan- klorid a felére, ruténium vörös hatására pedig nyolcszor alacsonyabb expressziós szintet okozott. A *HvCBF14* működését

mindegyik kezelés lecsökkentette: az EGTA 1,5-szörösére, a többi kalcium jelátvitelt blokkoló anyag 7-8-szorosára. A *HvCBF12* esetén elmondható, hogy számottevő változást nem tapasztaltunk EGTA és thapsigargin kezelést követően, ám a további gátlóanyagok megemelték a *HvCBF12* szintjét: a lantan-klorid duplájára, míg ruténium vörösnel nyolcszoros expressziós növekedés volt megfigyelhető. Az effektor gének működését a lecsökkentett Ca^{2+} -szint másképpen befolyásolta, mint a *CBF*-ekét. A *HvCOR14b* alapszintje a kontroll árpa palántákban 10000-es nagyságrendű volt, a thapsigarginon kívül a kezelések hatására nagyobb mértékű változást nem tapasztaltunk. A thapsigargin viszont ötszörösére emelte a génműködést a *HvDHN5* esetén. A *HvCOR14b* génhez hasonlóan a lantan-klorid és EGTA kezelések hatása elhanyagolható volt és az alapszint sem bizonyult nagyon magasnak a *HvDHN5* esetén (11. ábra).



11. ábra Az árpa *CBF-COR* rendszer aktivációja a Ca^{2+} -csatorna blokkoló lantan- klorid, Ca^{2+} kelátor EGTA, vakouláris Ca^{2+} -csatorna blokkoló ruténium vörös és Ca^{2+} -pumpa inhibitor, Ca^{2+} felszabadító thapsigargin kezelést követően a következő gének esetén: *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *COR14b*, *HvDHN5*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag \pm szórás (n=6).

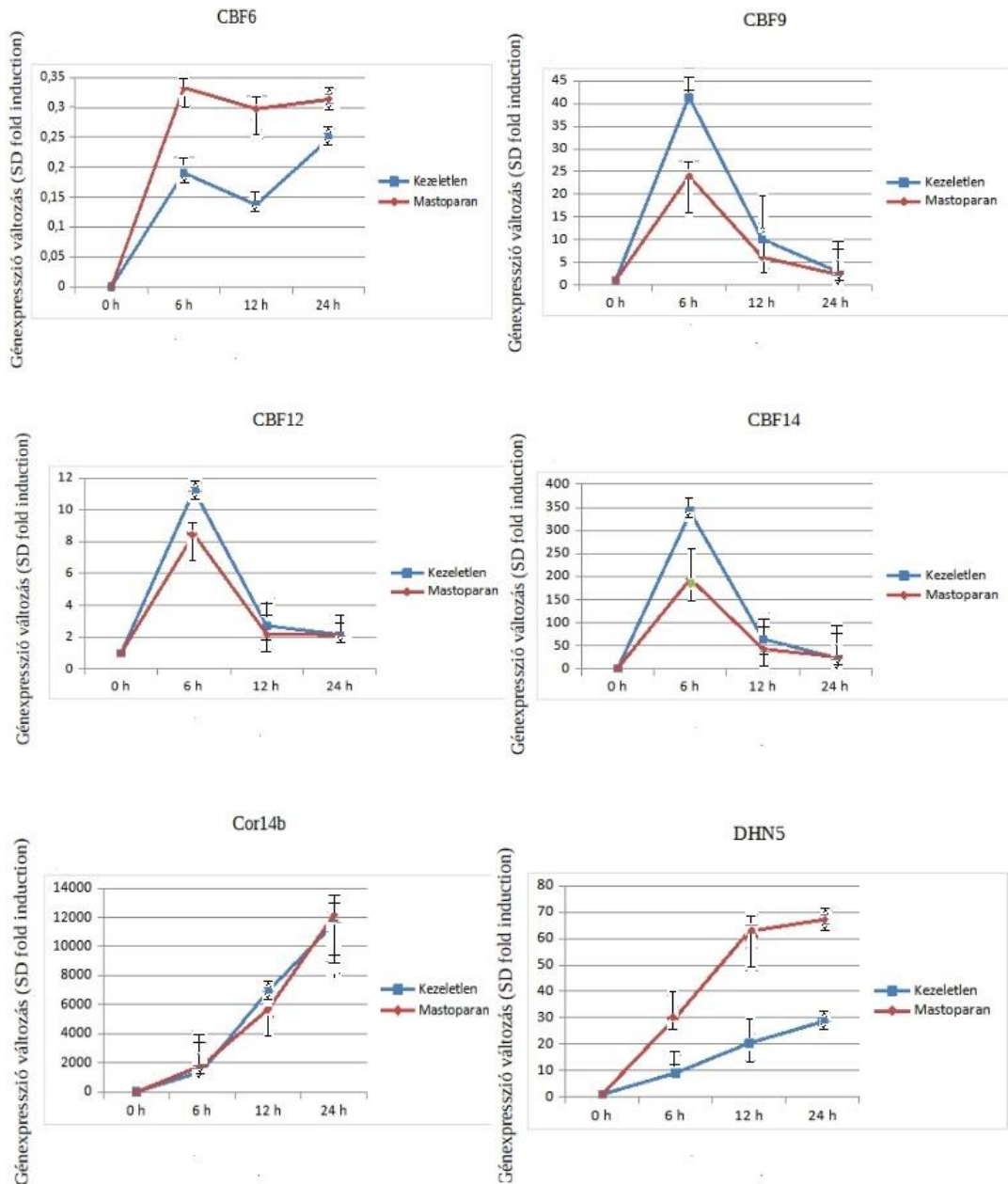
Kísérletünk során mastoparant alkalmaztunk az intracelluláris Ca^{2+} -szint növelésére. Alakor búza esetén az eredmények alapján megállapítható, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok expressziós kinetikája a következőképpen alakult: a *TmCBF13* szintje kilencszeresére növekedett, a *TmCBF9* és *TmCBF14* gének működését szintén pozitívan befolyásolta a mastoparan kezelés, *TmCBF9* expresszióját 3-szorosára, *TmCBF14* szintjét 2-szeresére emelte. A *TmCBF12* esetén a génműködés szintje változatlan maradt. A *TmCOR14b* génkifejeződése 2,5-szeresére növekedett (12. ábra).



12. ábra Az alakor búza *CBF-COR* rendszer aktivációja intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést befolyásoló mastoparan kezelést követően a következő gének esetén: *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCOR14b*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag \pm szórás (n=6).

Az árpa vizsgálata esetén elmondható, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok aktivációjának kinetikája hasonló az eddig tapasztaltakhoz. *HvCBF6* esetén a kezelés utáni változás

elhanyagolható. *HvCBF9* és *HvCBF14* gének működését az alapszintjükhöz képest negatívan befolyásolja a mastoparan kezelés: mindkettő esetén a génkifejeződés másfélszeresére csökkent. *HvCBF12* esetén a génműködés változatlan. A *HvCOR14b* szintje változatlan maradt, míg a *HvDHN5* gént pozitívan befolyásolta a kezelés és 2-szeres mértékben emelkedett meg az expresszió (13. ábra).

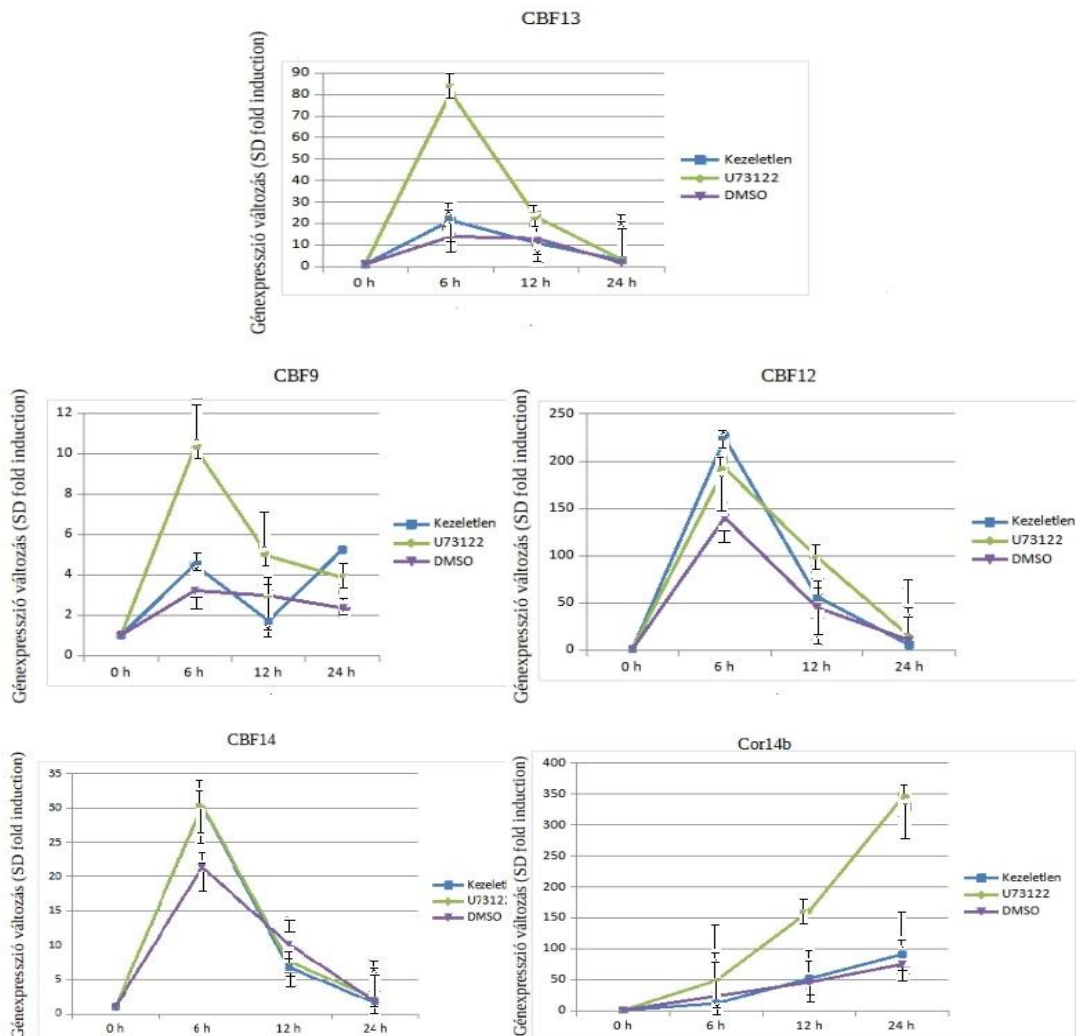


13. ábra Az árpa *CBF-COR* rendszer aktivációja intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést befolyásoló mastoparan kezelést követően a következő gének esetén: *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b*, *HvDHN5*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

6.2.2. Foszfolipáz C (PLC) jelátvitel vizsgálata

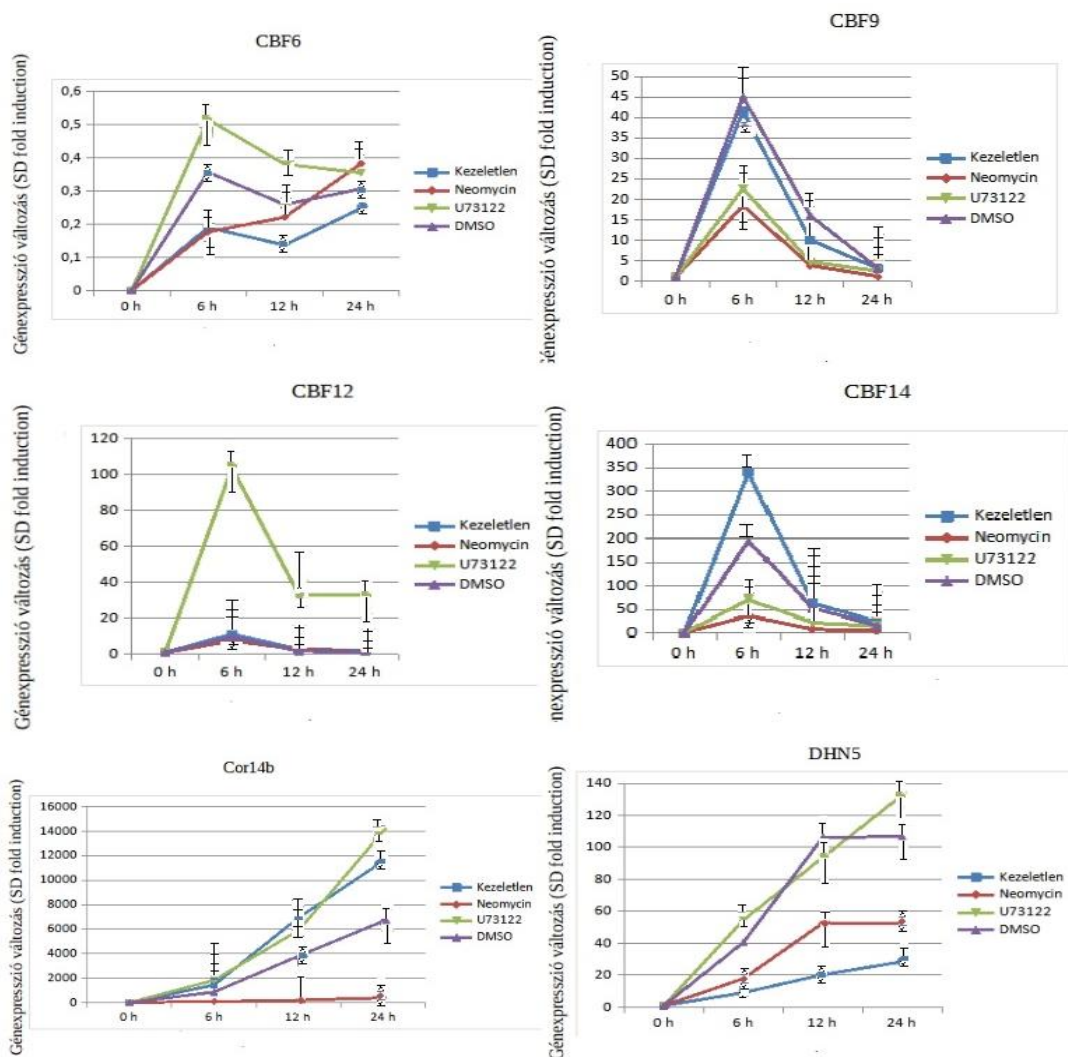
Kísérleti rendszerünkben a PLC-függő jelátvitel gátlásához U73122-t és neomicin inhibitorokat használtunk.

A *Triticum monococcum* genetikai vizsgálat és fagyteszt eredményeinkből kiderült, hogy neomicin inhibitor túlságosan toxikusnak bizonyult, mind a *CBF-COR* rendszer működését, mind a fenotípust tekintve, így ezen eredményeket nem közlöm a disszertációban. Alakor búza esetén az U73122 kezelést követően elmondható, hogy *TmCBF13* szintjét négyszeresére növelte a kezelés. A *TmCBF9* és *TmCBF14* faktorok működését kissé pozitívan befolyásolta a kezelés, de ez elhanyagolható mértékű. A *TmCBF12* esetén az U73122 kezelés nem változtatta meg a géneexpressziót. A *TmCOR14b* effektor gént pozitívan befolyásolta a gátlószer, szintjét a 3,5-szeresére növelte (14. ábra).



14. ábra A *Triticum monococcum* *CBF-COR* rendszer aktivációja foszfolipáz C jelátvitelt gátló U73122 kezelést követően a következő gének esetén: *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCOR14b*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag \pm szórás (n=6).

Az árpában az U73122 és neomicin kezelést követően a *CBF* transzkripciós faktorok aktivációjának kinetikája hasonló volt a kalcium jelátviteli vizsgálatoknál tapasztaltakhoz. A *HvCBF6* szintje változatlan maradt. A *HvCBF9* és *HvCBF14* működését negatívan befolyásolta a kezelés, a *HvCBF9* expresszióját felére, míg *HvCBF14* szintjét 6-7-szer alacsonyabbra csökkentette mindkét kezelés. A *HvCBF12* esetén az U73122 10-szeresére növelte a génexpressziót, neomicin nem volt hatással a működésére. Az effektor géneket máshogyan befolyásolta a két anyag a transzkripciós faktorokhoz képest: a *HvCOR14b* szintjét az U73122 nem befolyásolta, a neomicin viszont jelentősen lecsökkentette, míg a *HvDHN5* expressziót a neomicin alig, az U73122 kezelés pedig 6-7-szeresére növelte (15. ábra).

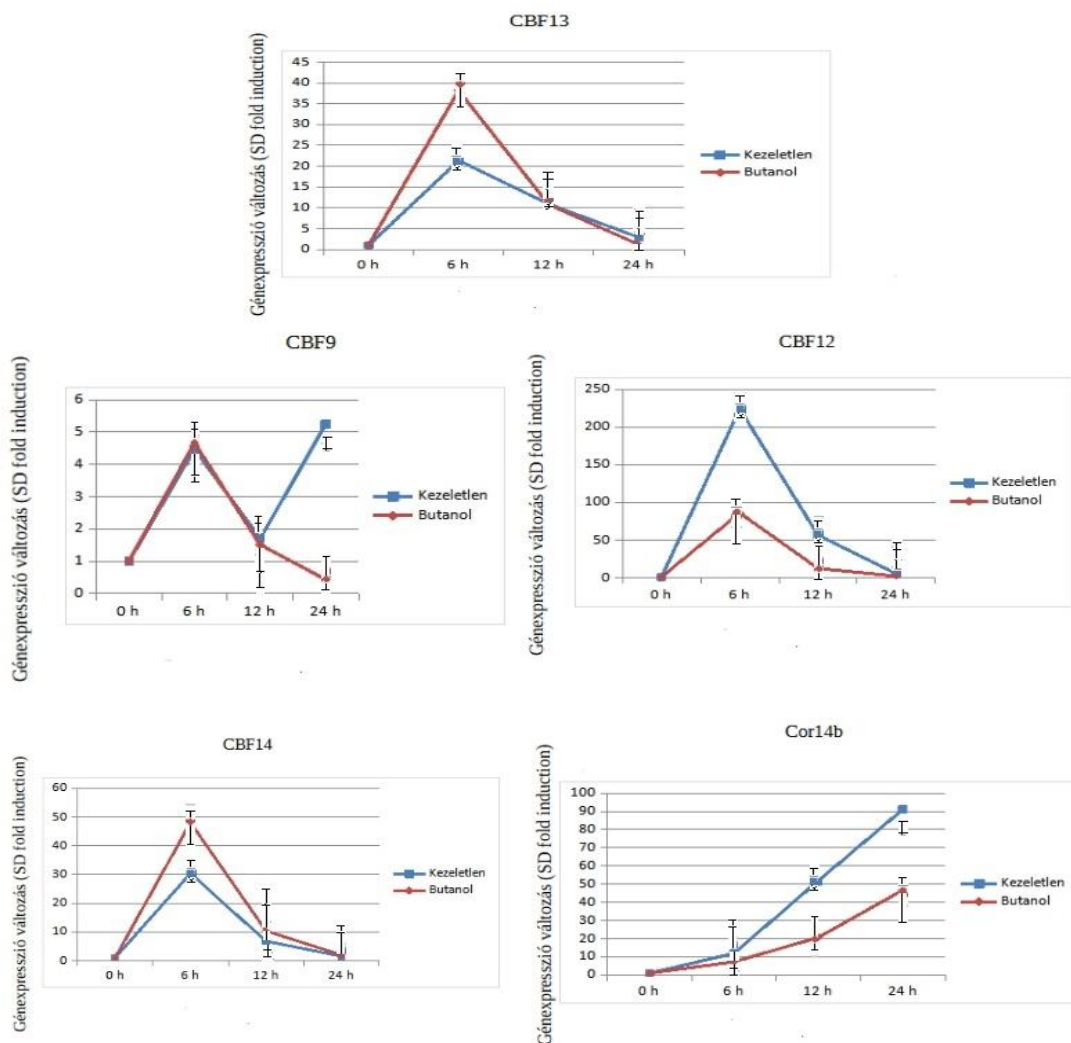


15. ábra Az árpa *CBF-COR* rendszer aktivációja foszfolipáz C jelátvitelt gátló U73122 és neomicin kezelést követően a következő gének esetén: *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b*, *HvDHN5*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

6.2.3. Foszfolipáz D (PLD) jelátvitel vizsgálata

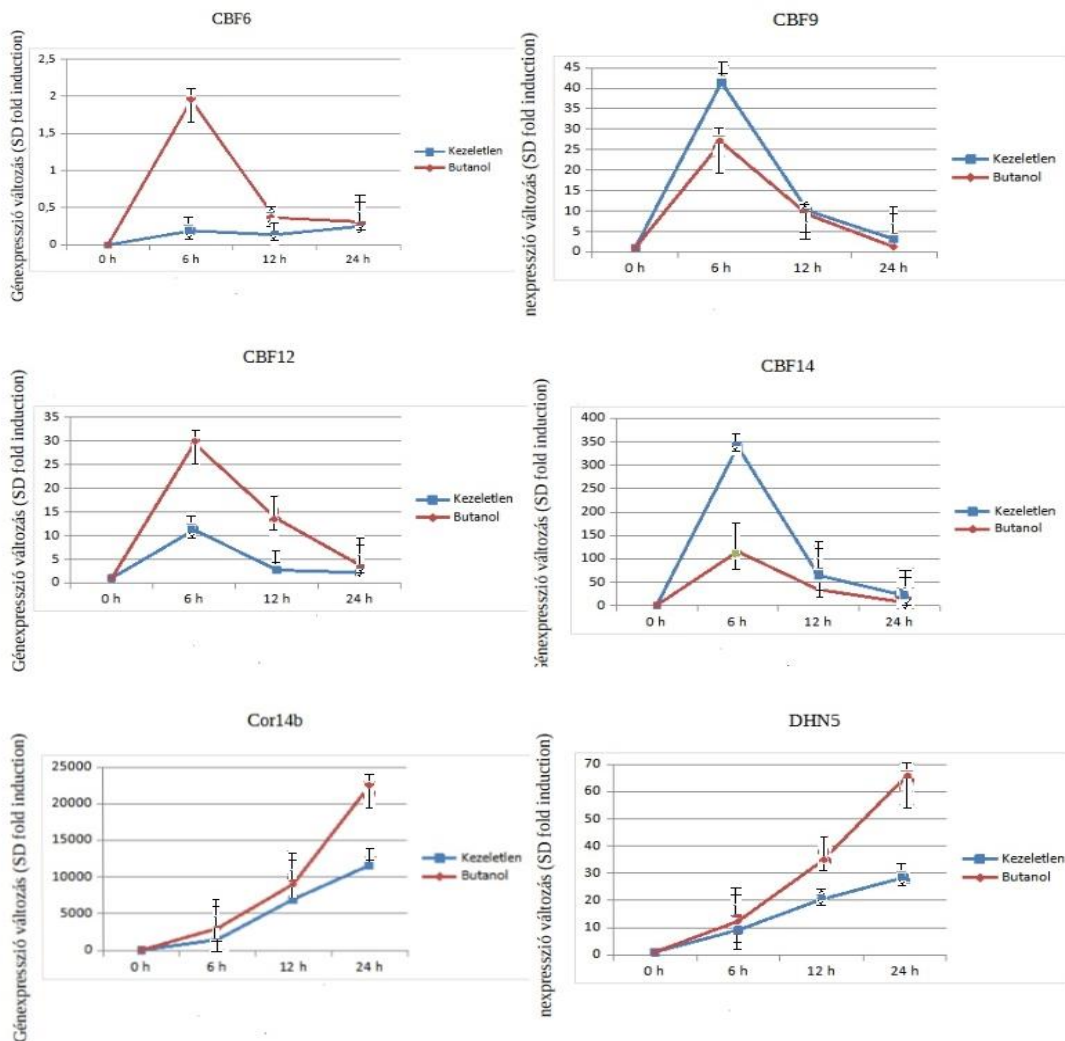
A PLD-függő jelátvitel gátlásához 1-butanol gátlószert alkalmaztunk.

Alakor búza vizsgálat esetén elmondható, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok géneexpressziós kinetikája kevésbé tükrözte az eddig tapasztaltakat. A *TmCBF13* szintje kétszeresére növekedett a kezelést követően. A *TmCBF9* és *TmCBF14* gének működését a kezelés szintén pozitívan befolyásolta, azonban a *TmCBF9* expresszióját csak a 24. óra után befolyásolta, 5-szörösére növelte. A *TmCBF14* kifejeződését csak kis mértékben növelte a gátlószeres beavatkozás, míg a *TmCBF12* esetén lecsökkentette. A *TmCOR14b* effektor gén expressziós szintjét felére csökkentette a kezelés (16. ábra).



16. ábra A *Triticum monococcum* CBF-COR rendszer aktivációja foszfolipáz D jelátvitelt gátló 1-butanol kezelést követően a következő gének esetén: *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCOR14b*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

Az árpa vizsgálata esetén elmondható, hogy a *HvCBF6* szintjét a kezelés kis mértékben befolyásolta. A *HvCBF9* és *HvCBF14* gének működését az alapszintjükhöz képest negatívan befolyásolta az 1-butanolos kezelés: a *HvCBF9* génkifejeződése másfélszeresére, *HvCBF14* szintjét pedig 3,5-szeresére csökkentette. *HvCBF12* esetén a génműködés 3-szorosára nőtt. Mind a *HvCOR14b* szintjét, mind a *HvDHN5* gént pozitívan befolyásolta a kezelés, mindkét esetben 2,5-3-szoros mértékben megemelkedett a génkifejeződés (17. ábra).



17. ábra Az árpa *CBF-COR* rendszer aktivációja foszfolipáz D jelátvitelt gátló 1-butanol kezelést követően a következő gének esetén: *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b*, *HvDHN5*. Az ábra a mért adatok átlagértékét plusz/minusz szórását mutatja be Átlag±szórás (n=6).

6.3. Hidegstressz által kiváltott PLC, PLD és kalcium jelátvitel hatása a fagyállóságra, fagyasztási tesztek

Az általunk vizsgált jelátviteli folyamatok fenotípusos jellegekre gyakorolt hatása a *CBF-COR* rendszer működéséhez köthető fagyállóság szintjének mérésével is jellemezhető. Az inhibitoros kezeléseket követően folyadékos fagyasztórendszerben teljes növény fagytesztet végeztünk, majd megbecsültük a túlélési arányt. A membránkárosodás és intracelluláris ionkiáramlás meghatározására levélszegmens-fagyasztást is végeztünk.

A fagyasztási eredmények alapján a Ca^{2+} ionofor, Ca^{2+} felszabadító ionomicint, a Ca^{2+} -pumpa inhibitor thapsigargin, az intracelluláris Ca^{2+} -szint növelő mastoparant, a vakuoláris Ca^{2+} -csatorna blokkoló ruténium vöröst és a PI-PLC aktiválást gátló U73122-t kizelektáltuk ezen gátlószerek túlzott toxicitása miatt. Így a lantán-kloriddal, EGTA-val, neomicinnel és 1-butanollal kezelt növények fagyasztási eredményeit mutatjuk be. A *T. monococcum* esetén az egész növény szintű fagyasztás az összes fagyasztási hőmérsékleten letális volt. Megállapítható volt, hogy hosszútávú inhibitoros vizsgálat esetében nem alkalmazható, mivel az alakor búza érzékenyebben reagált az egyes anyagokra az árpához képest. Egész növény és levélszegmens fagyasztás esetén sem kaptunk releváns eredményeket. Emiatt, az egyes jelátviteli folyamatok blokkolása utáni alakor fagyteszt eredményének bemutatásától eltekintünk. Teljesen mást tapasztaltunk árpa esetén, ahol a kezeléseket nem befolyásolták ilyen nagy mértékben a növények fejlődését, azonban egyes inhibitorok fiziológiai hatása szembeutó volt a fagyűrész kialakulásának tekintetében.

6.3.1. Egész növény fagyasztás árpa esetén, inhibitorok hatása

A fagytesztet követően az árpa növényeknek egyedenkénti bonitálási értéket adtunk és meghatároztuk a túlélési arányt (18. ábra). A túlélési ráta $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást követően még 100 %-os volt az összes kezelés esetén, majd a fagyasztási hőmérsékletet csökkentve egyre kevesebb növény élte túl. A $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os és $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztás után az egyedek elpusztultak.

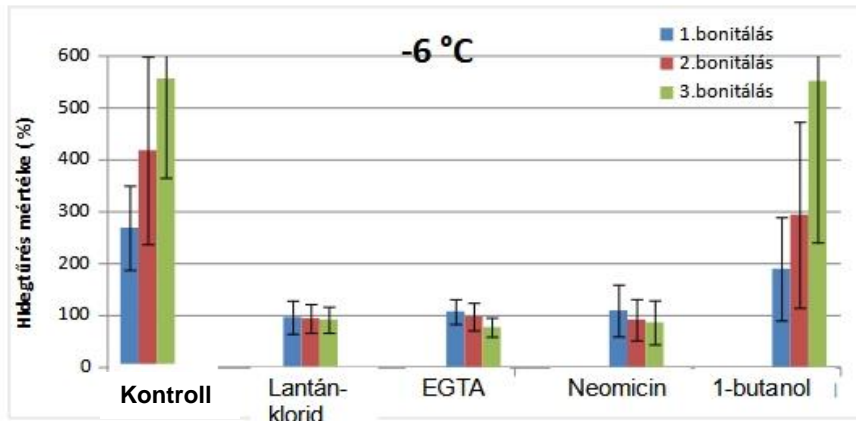


18. ábra Árpá palánták egész növényes fagyasztást (-6, -10 és -12 °C-on) követően fitotron növénynevelő kamrában szobahőmérsékleten regenerálva. Balra: növénynevelő cserepekbe elültetett bokrosodási csomók láthatók. Jobbra: 2 hetes regeneráltatott palánták.

Az inhibitoros kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy már 20 °C-on is volt toxikus hatása a lantán-kloridnak és neomicinnek, mivel 1 hét regeneráció után tovább már nem nőttek ezen inhibitorokkal kezelt egyedek.

A 20 °C-on tartott inhibitor mentes, valamint lantán-koriddal kezelt növények 80 %-ára már a -6 °C-on történő fagyasztási hőmérséklet is letális volt, az edzetlen EGTA-val kezelt növények esetén pedig a teljes populáció kifagyott. Az edzést követően a túlélési ráta megnőtt mind a kontoll, mind a Ca^{2+} blokkolt palánták esetében. A -10 °C-on történő fagyasztást az edzetlen növények többsége nem élte túl, az 1 hetes edzést követően csak kissé nőtt meg a túlélési ráta. A -12 °C-on fagyasztott növények túlélési aránya hasonló volt a -10 °C-on fagyasztottakhoz képest.

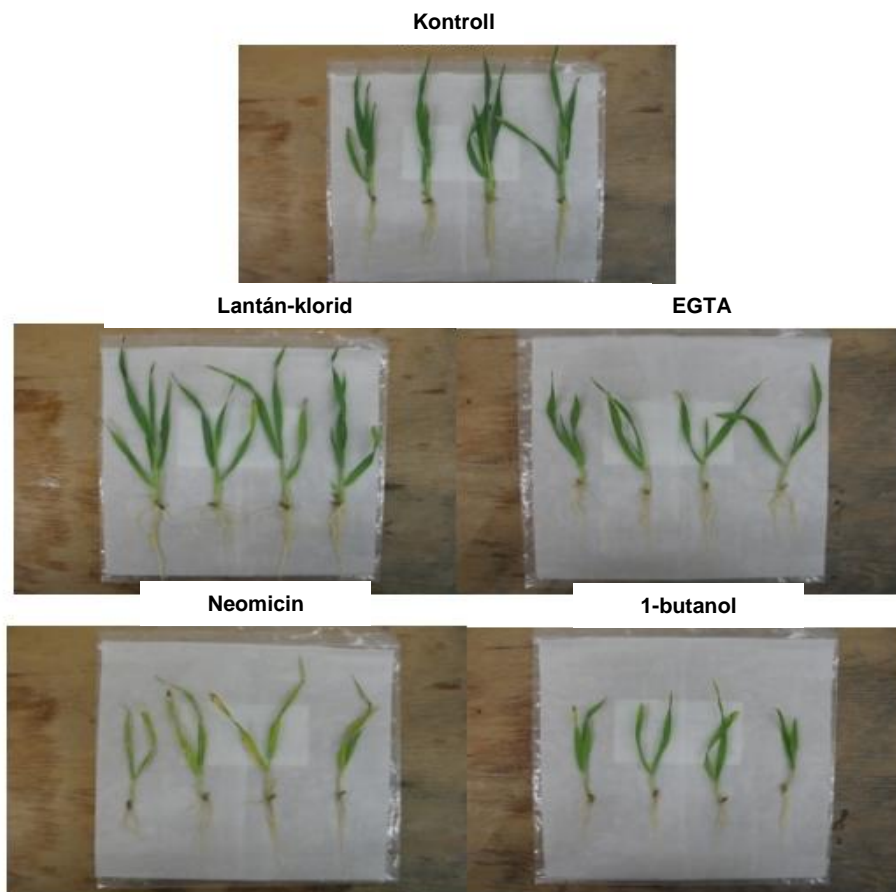
Mivel -6 °C volt az a hőmérséklet, ahol túlélési adatok alkalmasak az egyes gátlószerek hatásának összehasonlítására, így ezek az eredmények lettek bemutatva a 19. ábrán. Az 1 és 2 hetes edzést követően is a -10 °C és -12 °C is letálisnak tekinthető, mivel az inhibitormentes és kezelt palánták is kifagytak. Az ábrán látható, hogy a lantán-klorid, EGTA és neomicin kezelés az edződés mértékét lecsökkentette, az 1-butanol ugyanakkor nem befolyásolta a fagyűrés mértékét nagyobb mértékben a kezeletlen mintákhoz viszonyítva.



19. ábra Árpa növények fagytesztje inhibitoros kezelést követően a hidegtűrés mértékével kifejezve. A -6 °C-on történő fagyasztás esetén az inhibitormentes tápoldaton nevelt árpanövény (lásd: kontroll) nem fagyott ki, viszont a lantán-klorid (La), EGTA, neomicin kezelések lecsökkentették a fagyűrészt, az 1-butanol kezelés pedig nem befolyásolta az edzettségi szintet. Az 1., 2. és 3. bonitálás között 3-3 nap telt el.

Egyes inhibitorok fenotípusos változást okoztak az árpa palántákban (20. ábra):

- A lantán-klorid kezelés kis mértékű növekedés csökkenést, gyökérhossz csökkenést és szárlevélsötétedést eredményezett a kéthetes árpa növényeknél. A növények gyökerei szétágazóak lettek, szemben a kezeletlen növények egyenes, hosszú gyökereivel.
- EGTA esetén hasonló fenotípusos változást figyelhettünk meg, mint a lantán-klorid esetén, habár a palánták növekedését nagyobb mértékben gátolta az EGTA és kis mértékű rezes elszíneződés mutatkozott a hajtásokon.
- A kísérletben neomicin inhibitor alkalmazva közel letális állapotba kerültek a palánták, majd csak szöveti, szervi nekrotizshoz (elhalás) vezetett. A kezelés hatására növekedéscsökkenést, gyökér oldalágainak elhalását, levelek sárgásbarna elszíneződését tapasztaltuk.
- 1-butanollal kezelt növények gyökerei és azok gyökérszőrei rövidebbek voltak és gyakran elágazók is. Ezen kívül 1-butanol kezelés hatására a levelek lelassult növekedését, sárgásbarna elszíneződését tapasztaltuk, hasonlóan a neomicin kezelt palántákhoz, azonban a szöveti nekrotizis butanolnál kisebb mértékű volt.



20. ábra Egyes inhibitorok (lantán-klorid, EGTA, neomicin és 1-butanol) hatása árpa növényekre fenotípus szinten

6.3.2. Levélszegmens fagyasztás árpa esetén

A levelek elfagyás következtében kialakuló szöveti (membrán) sérüléseinek mértékével korreláló ionkiáramlás mértékét konduktancia mérésrel határoztuk meg. A sérülés okozta ionkiáramlás mértéke annál nagyobb, minél kisebb a túlélési arány.

A 2 hetes edzés során neomicin és 1-butanol kezelések a növényeket fenotípusosan kissé megváltoztatták, szöveti elváltozásokat okoztak. A lantán-klorid és EGTA kezelés számottevő szöveti és növekedési rendellenességet nem okozott. Ezen kívül a neomicin és 1-butanol az árpa növények konduktancia értékét is nagyban befolyásolta, az egyedeknél már a fagyasztást megelőzően is volt konduktanciabeli eltérés a kontroll, Hoaglandon nevelt növényekhez képest (megemelkedett a szintje). Ezen okok miatt csak a kalcium jelátvitelt blokkoló lantán-kloriddal és EGTA-val kezelt növények ionkiáramlását vettük figyelembe.

A 4. táblázatban láthatók az ionkiáramlási értékek. A konduktancia paraméter kontroll és edzett minták esetén kis mértékben különbözött. A -6 °C-on végzett fagyasztás nem volt nagy

hatással a konduktancia szintjére, bár a hőmérséklet csökkenésével megfigyelhető volt egy tendenciózus, enyhe emelkedés az értékében. A $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztáskor az árpa növények levelei már károsodottnak bizonyultak, a relatív ionkiáramlási szint ezen minták esetén megemelkedett, habár nem túl nagy mértékben. A $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztás hatására az ionkiáramlás megközelítette a maximális szintet. A lantán-klorid és EGTA kezelések számottevő ionkiáramlási különbség nem volt megfigyelhető sem kontroll ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sem edzett mintákon. A fagyasztást követően az inhibitormentes tápoldatban nevelt árpához képest EGTA-val kezelt mintákban ugyancsak megfigyelhető csekély ionkiáramlás emelkedés.

Az egy hetes hidegkezelt egyedek levélszegmenseinek $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztást követően kisebb mértékű a sérülés okozta konduktancia érték, majd $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on már szignifikáns ionkiáramlás növekedés figyelhető meg mind a Hoagland tápoldaton nevelt, mind az inhibitorokat tartalmazó tápoldatokon tartott egyedek esetén. Az utóbbi hőmérsékletek már letálisnak tekinthetők. A kéthetes hidegakklimatizáción átesett növények konduktancia értéke hasonló kinetikát mutat az egy hetes hideggedzéssel kezelt növényekével, habár megfigyelhető egy kisebb mértékű csökkenés az értékekben.

4. táblázat: Árpa levélszegmens fagyasztás utáni konduktanciamérések értékei kontroll (20 °C: 100 %-os túlélés + nitrogén: 0 %-os túlélés) és fagyasztott (-6 °C, -12 °C, -15 °C) mintákon

20 °C-on nevelt kontrol növények konduktometria értékei

KONTROL (20°C)		NITROGÉN		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT							
				Hoagland		Lantánium-klorid		EGTA							
Hoagland	219	Hoagland	1286	-6°C	748	-6°C	703	-6°C	1178						
	234		952								787		514		1190
	212		1012								872		757		1182
	222		1515								904		826		1143
	215		950								851		814		1116
	209		1052								837		621		1063
Lantánium	213	Lantánium	878	-12°C	1052	-12°C	1034	-12°C	1401						
klorid	246	klorid	1112								1365		900		1280
	200		1009								1371		888		1375
	255		1145								1127		838		1167
	203		1241								898		686		1180
	191		842								1313		497		1071
EGTA	335	EGTA	1101	-15°C	1146	-15°C	1010	-15°C	1355						
	315		1141								1262		975		1139
	406		1116								1168		811		1098
	238		992								1008		940		1213
	344		1182								1026		824		1255
	385		1086								1008		907		1108

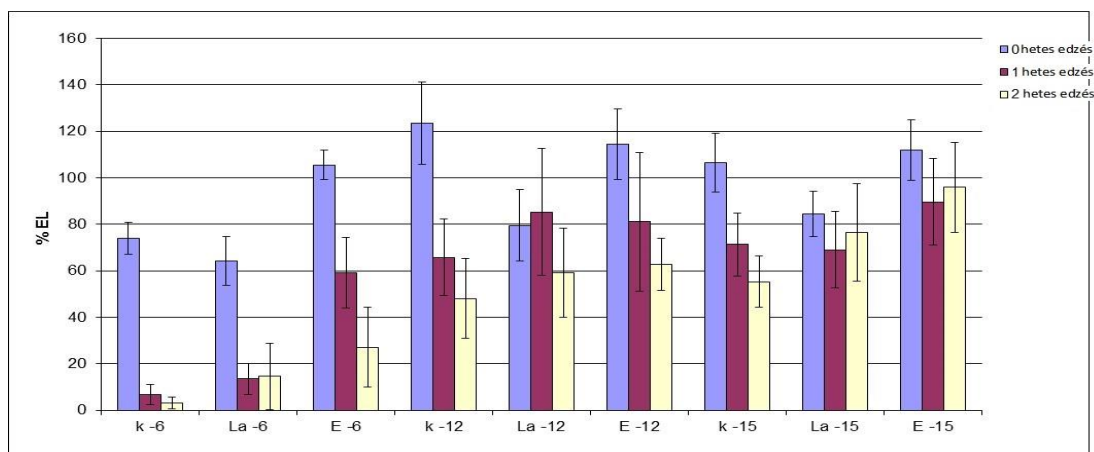
4 °C-on 1 hétig edzett növények konduktometria értékei

KONTROL (20°C)		NITROGÉN		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT							
				Hoagland		Lantánium-klorid		EGTA							
Hoagland	265	Hoagland	1458	-6°C	268	-6°C	385	-6°C	613						
	205		1273								255		254		968
	193		1488								385		295		869
	285		1098								205		262		781
	205		1283								296		319		808
	262		1544								339		297		775
Lantánium	201	Lantánium	870	-12°C	810	-12°C	677	-12°C	828						
klorid	255	klorid	1144								823		892		1355
	162		800								884		625		1196
	209		1011								1162		1008		711
	270		740								1183		1036		1231
	145		621								1559		618		896
EGTA	385	EGTA	1063	-15°C	869	-15°C	654	-15°C	1113						
	385		1145								1107		704		936
	328		1223								932		726		982
	327		1077								1039		873		907
	257		1145								969		696		1255
	386		1065								1298		512		1628

4 °C-on 2 hétig edzett növények konduktometria értékei

KONTROL (20°C)		NITROGÉN		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT		FAGYASZTOTT							
				Hoagland		Lantánium-klorid		EGTA							
Hoagland	251	Hoagland	1369	-6°C	321	-6°C	530	-6°C	840						
	174		1668								209		218		581
	223		1156								296		183		439
	269		1346								201		319		499
	214		1491								215		310		789
	237		1371								337		328		749
Lantánium	292	Lantánium	750	-12°C	596	-12°C	797	-12°C	738						
klorid	246	klorid	942								590		777		1068
	184		984								946		451		887
	234		1030								1040		652		943
	159		951								634		618		930
	243		1188								783		869		1149
EGTA	353	EGTA	1538	-15°C	776	-15°C	676	-15°C	1396						
	242		1265								871		1023		777
	782		1521								1014		845		1260
	477		1065								766		1038		1232
	302		993								691		759		1103
	558		1398								957		655		1598

A 21. ábrán a fagyasztott levelek elektrolit százalékos értékei láthatók az egyes fagyasztási hőmérsékletek és inhibitorkezelések esetén, melyet a következő egyenlet segítségével számítottunk ki Webb és mtsi. (1994) alapján: $EL \% = (EL^{\text{fagyasztott}} - EL^{\text{nem fagyasztott}} / EL^{\text{folyékony nitrogén}} - EL^{\text{nem fagyasztott}}) * 100$, EL%= elektrolit kiáramlási százalék (minél magasabb az értéke, a túlélési arány annál kisebb). Eredményeink alapján elmondható, hogy az 1 és 2 hetes hidegdedzésen túlesett inhibitormentes és inhibitorral kezelt minták edzettségi szintje is jelentősen megnőtt -6 °C-on történt fagyasztást követően. Ahogy csökkent a fagyasztási hőmérséklet, annál nagyobb volt a fagykárosodás mértéke, és az eredmények korrelálnak az egész növények fagyasztási eredményeivel. -12 °C-on és -15 °C-on történő fagyasztás az edzetlen minták esetén letálisnak tekinthető, az edzést követően a kifagyás mértéke felére csökkent, leginkább két hetes edzés szükséges a fagyállóság kialakulásához. A -6 °C-on végzett fagyasztás esetén látható, hogy lantan-klorid kis mértékben okozott zavart a hidegakklimatizációban, EGTA pedig nagyobb mértékben. Ez a kinetika nem látható -12 °C és -15 °C -on végzett fagyasztás esetén, ahol az EL% 70-90 volt az edzett mintáknál.



21. ábra Edzetlen (0 hetes edzéssel jelölt), illetve 1 hetes és 2 hetes hidegkezelt (edzett), fagyasztott árpa levelek elektrolit kiáramlásának százalékos értékben kifejezve lantan-klorid és EGTA kezelést követően Webb M.S és mtsi. (1994) egyenletét használva ($EL \% = (EL^{\text{fagyasztott}} - EL^{\text{nem fagyasztott}} / EL^{\text{folyékony nitrogén}} - EL^{\text{nem fagyasztott}}) * 100$). A fagyasztás -6, -12 és -15 °C-on történt. Az ábrán található jelölések: K=kezeletlen, inhibitorral nem kezelt egyedek, La= lantan-kloriddal kezelt egyedek, E= EGTA-val kezelt egyedek.

7. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Napjaink egyik kiemelkedően fontos kutatási területe a fagyűrés molekuláris szintű jelátviteli rendszerének megismerése és megértése. A fagyűrésben kiemelkedő szerepet játszó *CBF* gének *Arabidopsis*-ban a cirkadián ritmus, az alacsony hőmérséklet és a fény együttes szabályozása alatt állnak (Kinmonth-Schultz és mtsi. 2013). Kísérleteink megkezdése idején gabonafélékben azonban ez a komplex szabályozó hálózat még nagyrészt feltáratlan volt. Kevés irodalmi adat állt rendelkezésre hidegdedzés és a sejtmembránban lejátszódó jelátviteli folyamatokról, illetve az egyes *CBF*, *COR*, *DHN* gének és jelátviteli események kapcsolatáról. Novák és mtsi. (2016) megállapították, hogy az árpa *CBF14*-es génjének kifejeződése a hideghatáson kívül a fényminőségtől is függ, Crosatti és mtsi. (1999) pedig az árpa *COR14b* fehérje felhalmozódásának fényfüggését állapították meg. A kalcium- és foszfolipid jelátvitel, a *CBF*-ek, effektor gének, illetve a fagyűrés kapcsolata azonban feltérképezetlen terület volt mind árpában, mind alakor búzában.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az 5-ös kromoszóma hosszú karján a fagyállóságot befolyásoló *Fr-2* (*Frost resistance*) lókuszon elhelyezkedő általunk vizsgált 11 árpa *HvCBF* és 11 alakor búza *TmCBF* transzkripció faktorok közül nem tekinthető mindegyik hidegindukálhatónak. Ebből arra következtethetünk, hogy a rövid igeig tartó hideg hatásra bekövetkező membránstruktúra változás és az ezáltal aktiválódó jelátviteli folyamatok sokasága nem szabályozza az összes, fagyállósági lókuszon térképezett *CBF* gént. Stockinger és mtsi. (2007) is megállapították, hogy nem szükséges a *CBF* géncsalád összes tagjának aktiválódnia ahhoz, hogy az effektor gének működése beinduljon, mely végül növeli a növény fagyállóságát. Ezen kívül a tavaszi, fagyérzékeny variánsokban hideg sokk hatására nem vagy csak alig mérhető a *CBF-COR* rendszer expressziós változása.

Célunk volt a hidegakklimatizáció során aktiválódó jelátviteli útvonalak vizsgálata. A *CBF* transzkripció faktorok őszi gabonafélékben nagyobb expressziós szintet mutattak a tavaszi fajtákhoz képest (Francia és mtsi. 2004). A vizsgált 11 árpa *HvCBF* gén közül 6 (*HvCBF2*, *HvCBF6*, *HvCBF7*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*), valamint 11 búza *TmCBF* közül 9 (*TmCBF2*, *TmCBF4*, *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCBF15*, *TmCBF16*, *TmCBF17*) mutatott génexpressziós változást hidegstresszt követően. Az elsődleges eredményeket, illetve Stockinger és mtsi. (2007) alapján a 4 árpa *HvCBF* gének (*HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*), *HvCOR14b* és *HvDHN5* gének, illetve a 4 búza *TmCBF* gének (*TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*) és *TmCOR14b* génnek expressziós profilját vizsgáltuk meg részletesebben. Választásunkat számos, irodalomból vett eredmény is megerősítette, melyek

szerint gabonafélékben a *CBF14* gén bizonyult az egyik legnagyobb hatásúnak a fagyállóság kialakítása szempontjából (Vágújfalvi és mtsi. 2005, Knox és mtsi. 2008, Soltész és mtsi. 2013). Eredményeink alapján elmondható, hogy vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására nem aktiválódnak, találtunk közepes mértékű expressziós profilt mutató géneket és magas szinten aktiválódó *CBF*-eket is. Kísérletünk is igazolta, hogy gabonafélék esetén a *CBF14* gént a leghatásosabb és legfontosabb a fagy-tűrés kialakítását tekintve (Novák és mtsi. 2017), azonban árpa esetén valószínűleg a *HvCBF9*, búzában a *HvCBF12* is fontos szerepet játszhat. Elmondható, hogy *COR14b* effektor gén működése mindkettő gabonafajta hidegaklimatizációs folyamataiban esszenciális, illetve expressziójának mértéke különösen lényeges, hiszen pozitív korrelációt mutattak ki a *COR* géntermék akkumulációjának mértéke és a kialakult fagyállóság között (Vágújfalvi és mtsi. 2000).

Kísérleteink során választ kerestünk arra, hogy a foszfolipáz C, foszfolipáz D enzimek által szabályozott jelátviteli rendszer, illetve a hidegstressz hatására megemelkedett kalciumszint milyen hatással van a hidegaklimatizációs folyamatok szabályozásában kulcsszerepet betöltő *CBF*, *COR*, *DHN* genetikai rendszer működésére és a fagyállóság kialakulására alacsony hőmérsékleti stressz esetén. Az általunk használt hidegedzés eredményes volt, a vizsgált gabonafélék fagyállósága megnövekedett a 20 °C-on nevelt kontrollhoz képest, illetve a gátlószerek egyes *CBF* és effektor gének expresszióját megváltoztatták. Alátámasztottuk tehát korábbi kutatások eredményeit, miszerint a jelátviteli folyamatok hidegstressz során aktiválódnak (Uemura és Steponkus, 1999).

Farmakológiai kísérleteinkhez többféle inhibitor molekulát választottunk, mert több esetben csak állati rendszerben van adat ezen anyagok hatásmechanizmusáról. Növényi rendszerben alkalmazott hatásokról alig állt információ rendelkezésünkre. Kalcium jelátvitelt befolyásoló inhibitor molekulák közül csupán EGTA-ról, lantán-kloridról és mastoparanról találtunk publikációt. Tang és mtsi. (2019) EGTA használatával tanulmányozták a kalcium jelátvitelt lágyszárú bazsarózásban (*Paeonia lactiflora* Pall.), Pooviah és mtsi. (1987) szintén növényi rendszeren belül vizsgálták a kalcium jelátvitelt EGTA jelenlétében. Lantán-kloridot mind növényi (Friedman 1998; tátikán), mind állati sejteken (Boldyreva 2005; patkányon) is tanulmányozták annak blokkoló hatását a kalcium csatornákra. Mastoparant alkalmazott Miles és mtsi. (2004) növényben a MAPK vizsgálatára, Pfeiffer és mtsi (1995), illetve Kauss és Jeblick (1996) szintén mastoparant használtak növényi sejtek vizsgálatához, viszont állati kísérletekből is származik az inhibitorról információ (Tucker és Boss 1996; Pauly és mtsi. 2000; Whalley és mtsi. 2011). A további kalcium jelátvitelt befolyásoló inhibitorok esetén (ruténium vörös, thapsigargin, ionomicin)

humán tanulmányok születtek. Bae és mtsi. (2003) kalcium jelátvitel blokkolására ruténium vöröst használtak humán sejtek esetén, Lytton és mtsi. (1991) humán izomban Ca^{2+} pumpa inhibiorként használták a thapsigargin, illetve Rogers és mtsi. (1995) szintén thapsigargin inhibitor használtak humán izomsejtekben, Morgan és mtsi. (1994) pedig ionomicinnel befolyásolták a Ca^{2+} -szintet humán sejtvolalban. PLC jelátviteli folyamat blokkolásához használt U73122 molekula esetén is humán sejteket tanulmányoztak (Bleasdale és mtsi. 1990; Staxe'n és mtsi. 1999), míg neomicin PLC inhibitorról növények esetében is találtunk információt (Teemu és mtsi. 1989). Collings és mtsi. (2003), illetve Gardiner és mtsi. (2003) a PLD inhibitor 1-butanolt használták *Arabidopsis*-ban, illetve Hirase és mtsi. (2006) is növényi sejtek tanulmányozásához használtak 1-butanolt. A felsorolt inhibitorok közül az alapján szelektáltunk, hogy a növények hogyan reagáltak rájuk génexpressziós és fenotípusos szinten egyaránt. Előzetes tapasztalataink alapján ezért a PLC jelátvitelt befolyásoló neomicint alakor búza génexpressziós vizsgálatából kivontuk, illetve fenotípusos fagyasztási eredmények alapján a kalcium jelátvitelt befolyásoló ionomicint, tapsigargin, mastoparant, ruténium vöröst és a PI-PLC-t gátló U73122-t is kisselektáltuk a toxicitásuk miatt.

Búza vonalakon végzett fagyasztási vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy fagyűrő alakor búza növények nem alkalmasak farmakológiai vizsgálatra, érzékenyebbek ezen növények az inhibitorokra, így ez a fajta vizsgálat nem alkalmazható náluk. Ez a fajta érzékenység valószínűleg azzal magyarázható, hogy bár a diploid alakor búza szöveti felépítése hasonló az ugyancsak diploid árpához, azonban jóval érzékenyebben reagálnak a kísérletekben használt anyagokra és fagyállóságukat tekintve is könnyebben kifagynak, mint az árpa növények (Vágújfalvi és mtsai. 2003) és ez a hatás csak fokozódik inhibitorkezelések esetén.

Triticum monococcum inhibitorkezelések utáni génexpressziós összehasonlítást az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat A *Triticum monococcum* csíranövényekben blokkolt jelátviteli folyamatok regulációja a *CBF-COR* rendszerre százalékban kifejezve. Az inhibitor kezelések hatását a kezeletlen kontroll növények génműködéséhez viszonyítottuk, melyet 100 %-nak tekintettünk. Ehhez képest a változások láthatók a táblázatban: pirossal jelölt génexpressziós változás negatív regulációt, kék színnel jelölt változás pozitív szabályozást jelent. Zölddel színezett mezők azt jelzik, hogy nem történt változás a génexpresszióban az inhibitorkezelést követően.

<i>T. monococcum</i>		<i>CBF9</i>	<i>CBF12</i>	<i>CBF13</i>	<i>CBF14</i>	<i>COR14b</i>
Kalcium csatorna blokkoló	Lantán- klorid	86	64	173	68	141
Kalcium kötő	EGTA	164	28	416	89	346
Kalcium felszabadító	Ionomicin	227	541	167	229	371
Vakuoláris Kalcium csatorna blokkoló	Rutenium vörös	322	59	153	136	157
Intracelluláris Kalcium szintet növeli	Masztoparan	455	73	165	240	287
PLD inhibitor	1-butanol	104	38	179	158	51
PI-PLC aktivitást gátolja	U73122	322	137	584	142	457
Kalcium-pumpa inhibitor, Kalciumot szabadít fel a raktárakból	Tapsigargin	319	222	210	171	301

A *TmCBF9* egy hidegakklimatizációban kevésbé szerepet játszó transzkripciós faktor. Mivel hideghatás következtében inhibitormentes körülmények között kis mértékben fejeződik ki (relatív génexpresszió változás/ Fold Induction (FI) =4,5), így a kezeléseket követő kisebb expressziós változásra is nagyobb százalékos elváltozást mutat a kontrollhoz képest. Elmondható, hogy foszfolipáz D jelátvitelen kívül (1-butanollal való gátlás) az összes jelátvitelt befolyásoló inhibitor megemelte az aktivitását a kontrollhoz képest. Ez azt sugallja, hogy a gén PLC-, PLD- és kalcium-jelátviteltől függetlenül működik.

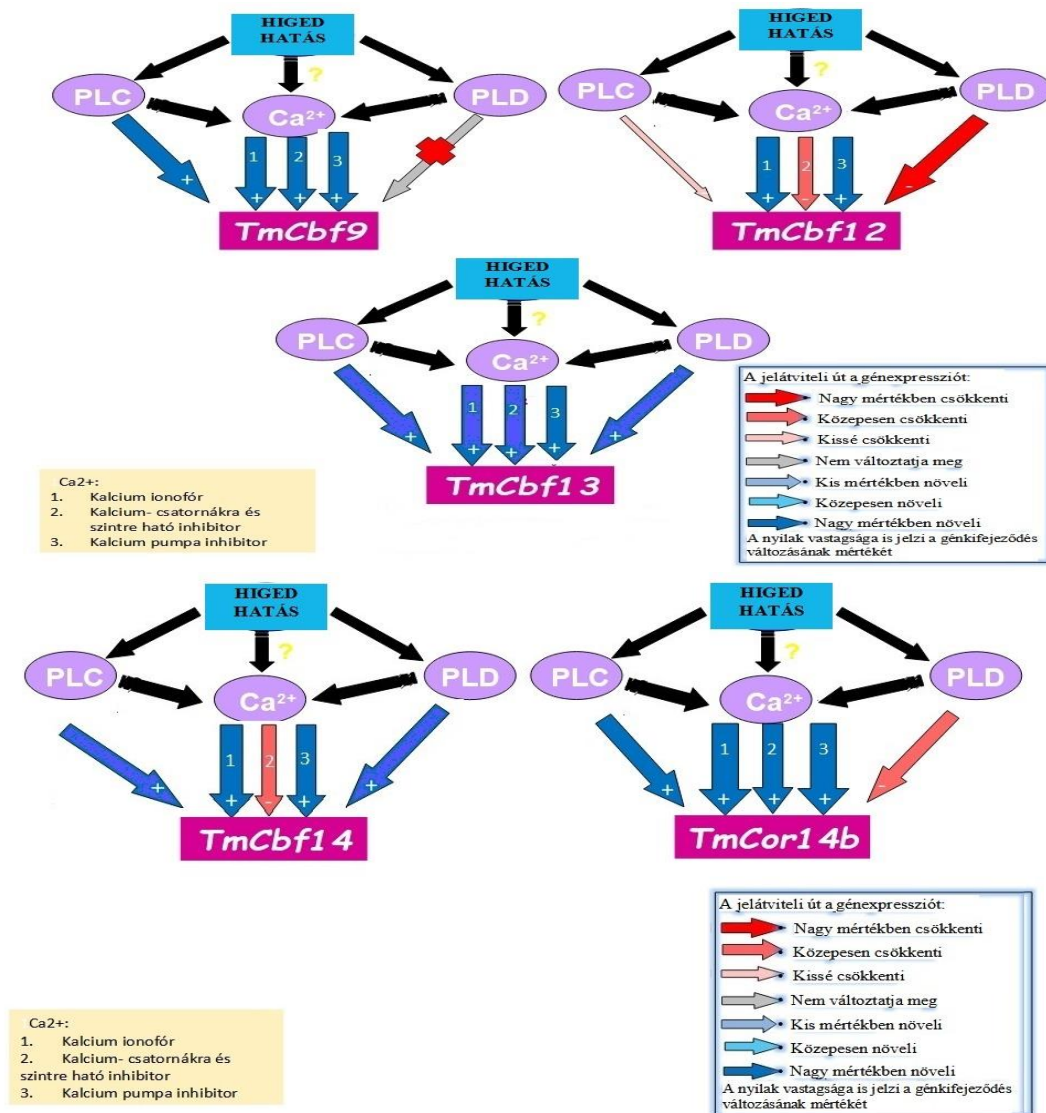
A *TmCBF13* hidegakklimatizáció során közepesen expresszáldó transzkripciós faktor (FI=21,4). Elmondható, hogy mind a kalcium jelátvitelre ható, mind a PLC- és PLD jelátvitelt blokkoló inhibitorok pozitívan hatottak a gén működésére, melyből azt a következtetést vonjuk le, hogy a gén ezen jelátvitelektől függetlenül működik.

A *TmCBF12* és *TmCBF14* hidegakklimatizációban nagyobb expressziót mutató transzkripciós faktorok (FI=224,2; FI=30,4). A *TmCBF12* esetén elmondható, hogy a működését pozitívan befolyásolta a Ca^{2+} ionofor ionomicin kezelés, illetve a Ca^{2+} -pumpa inhibitor ionomicin, míg foszfolipáz C-t (U73122) és foszfolipáz D-t (1-butanol) gátló, illetve a Ca^{2+} -csatornákra (lantán-klorid, ruténium vörös) és Ca^{2+} -szintre ható (EGTA, mastoparan) inhibitorok negatívan szabályozták a *TmCBF12* gén működését. Ez azt a következtetést vonja maga után, hogy a gén

PLC, PLD jelátvitel függő, illetve egyes kalcium-jelátviteli komponensek is szabályozzák a működését. *TmCBF14* esetén elmondható, hogy a Ca^{2+} -csatornákra (lantán-klorid) és Ca^{2+} -szintre ható (EGTA) inhibitorokon kívül mindegyik jelátvitelt szabályozó molekula pozitívan befolyásolta a génexpresszió változást. Utóbbi azt sugallja, hogy a *TmCBF14* gén csupán egyes kalcium-jelátviteli komponensek (Ca^{2+} -csatornák, Ca^{2+} -szint) által van szabályozva.

A *TmCOR14b* effektor gén szintje a 24 órás hidegkezelést követően nagyobb volt a legtöbb 6 órás hidegdedződés utáni transzkripciós faktoréhoz képest (FI=91). Elmondható, hogy a foszfolipáz D jelátvitel gátlásán (1-butanol) kívül mindegyik jelátvitelt szabályozó molekula pozitívan befolyásolta a génexpresszió változást. Ez azt sugallja, hogy a *TmCOR14b* gén működése foszfolipáz D jelátvitel függő.

A fent leírt gének és jelátviteli folyamatok kölcsönhatását a 22. ábra tartalmazza.



22.ábra Eredményeket összefoglaló ábra alakor búza esetén (PLC= foszfolipáz C jelátvitel, PLD= foszfolipáz D jelátvitel, Ca^{2+} =kalcium jelátvitel)

Az árpa inhibitorkezelések utáni génexpressziós összehasonlítást a 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat Árpában blokkolt jelátviteli folyamatok regulációja a *CBF-COR* rendszerre százalékban kifejezve. Az inhibitor kezelések hatását a kezeletlen kontroll növények génaktivációjához viszonyítottuk, melyet 100 %-nak tekintettünk. Ehhez képest a változások láthatók a táblázatban: pirossal jelölt génexpressziós változás negatív regulációt, kék színnel jelölt változás pozitív szabályozást jelent. Zölddel színezett mezők azt jelzik, hogy nem történt változás a génexpresszióban gátlást követően.

<i>H. vulgare</i>		<i>CBF6</i>	<i>CBF9</i>	<i>CBF12</i>	<i>CBF14</i>	<i>COR14b</i>	<i>DHN5</i>
Kalcium csatorna blokkoló	Lantán- klorid	61	38	187	18	102	136
Kalcium kötő	EGTA	152	90	100	72	74	146
Kalcium felszabadító	Ionomicin	57	15	28	37	753	84
PLC inhibitor	Neomicin	93	44	66	11	3	184
Vakuoláris Kalcium csatorna blokkoló	Rutenium vörös	72	17	759	9	163	274
Intracelluláris Kalcium szintet növeli	Masztoparan	175	58	75	57	105	235
PLD inhibitor	1-Butanol	1024	65	263	34	193	228
PI-PLC aktivitást gátolja	U73122	145	50	1099	37	210	124
Kalcium-pumpa inhibitor, Kalciumot szabadít fel a raktárakból	Tapsigargin	135	26	85	32	764	69

A *HvCBF6* a hidegakklimatizációban egy kis mértékű expressziót mutató transzkripciós faktor (FI=0,2), így a kezeléseket követő kisebb expressziós változásra is nagyobb százalékos elváltozást mutat a kontrollhoz képest. Egyik jelátvitelt befolyásoló inhibitor sem befolyásolta drasztikusan a működését. Ez azt sugallja, hogy a gén PLC, PLD és kalcium-jelátviteltől függetlenül működik.

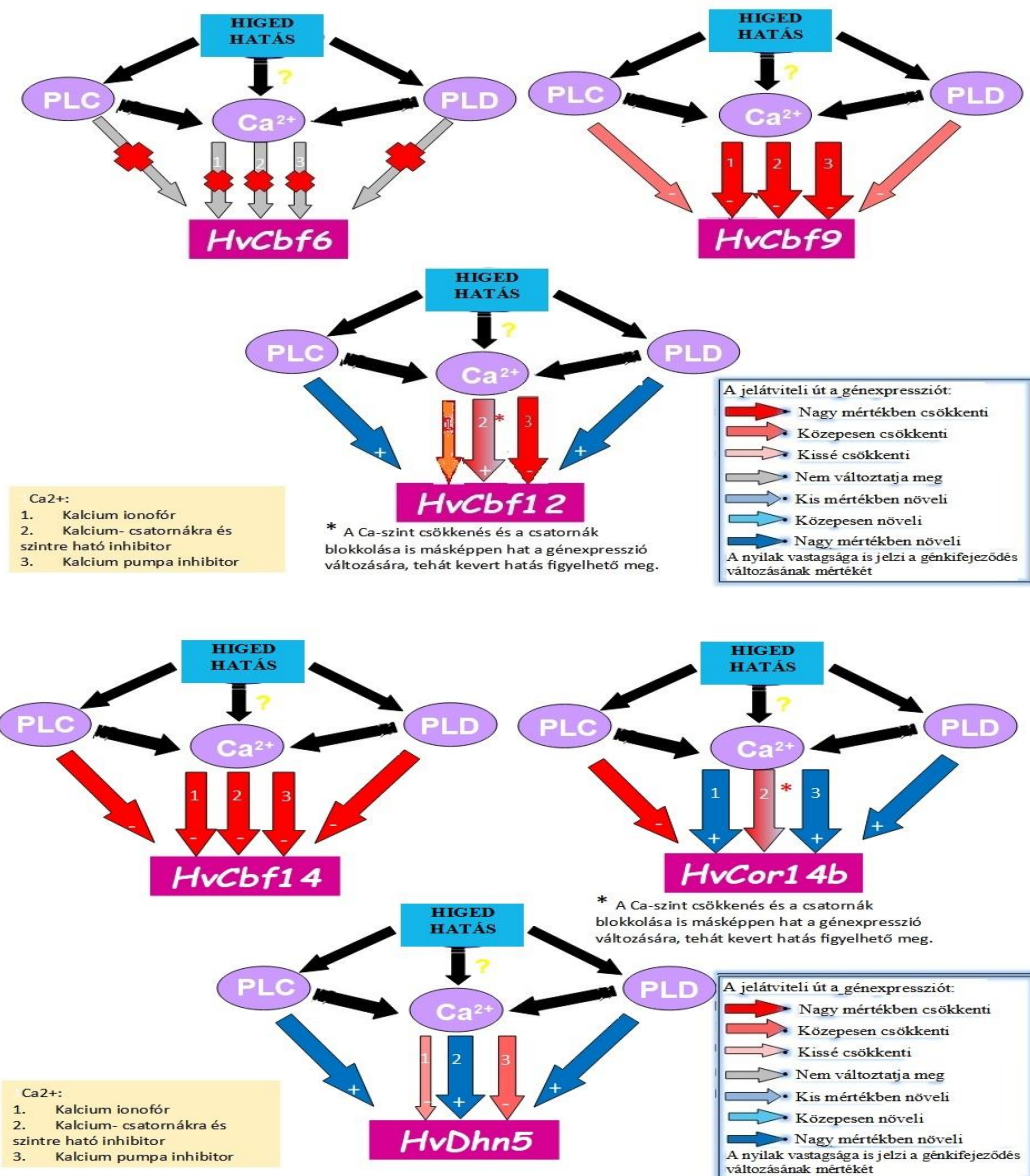
A *HvCBF12* hidegakklimatizáció során közepesen expresszálódó transzkripciós faktorok (FI=11,2). *HvCBF12* esetén a foszfolipáz C (U73122) és foszfolipáz D (1-butanol) jelátvitelt blokkoló inhibitorok pozitívan hatottak a transzkripciós faktor működésére, azonban a neomicin által blokkolt PLC jelátvitelt követően a *HvCBF12* expressziója lecsökkent. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonjuk le, hogy PLD- jelátviteltől függetlenül működik a gén, ám hatással lehet a PLC egyes komponense(i) a génműködésre. Kalcium-jelátvitel és *HvCBF12* működése esetén kevert hatás figyelhető meg: Ca^{2+} ionofór thapsigargin, Ca^{2+} -pumpát gátló ionomicin és az intracelluláris Ca^{2+} -szint növelő mastoparan hatására a gén működése csökkent, melyből arra következtethetünk, hogy ezen jelátviteli komponensektől is függ a *HvCBF12* aktivációja. A további Ca^{2+} -szintre és Ca^{2+} -csatornára ható inhibitorok (lantán-klorid, ruhténium vörös, EGTA) pozitívan vagy nem befolyásolták a transzkripciós faktor működését, amely azt sugallja, hogy ezen jelátviteli komponensektől független a gén működése.

A *HvCBF9* és *HvCBF14* hidegakklimatizációban nagyobb expressziót mutató transzkripciósfaktorok (FI=41,5; FI=339,4). Mindkettő gén esetén elmondható, hogy mind a kalcium jelátvitelre ható, mind a PLC- és PLD jelátvitelt blokkoló inhibitorok negatívan hatottak a transzkripciósfaktorok működésére, melyből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy működésükhöz PLC-, PLD- és kalcium jelátvitel is szükséges.

A *HvCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének hidegakklimatizáció során 24 órás hidegkezelést követően más szinten működnek: *HvDHN5* szintje alacsonyabb (FI=28,5), míg *HvCOR14b* expressziós szintje jóval magasabb (FI=11558,5). *HvCOR14b* esetén a génexpresszióra a kalcium jelátviteli komponensekre ható inhibitorok kevert hatást gyakoroltak: nem befolyásolta a génműködést a Ca^{2+} -szintre ható mastoparan és a Ca^{2+} -csatorna blokkoló lantán-klorid, míg a Ca^{2+} -szintet csökkentő EGTA csökkentette, a vakuoláris Ca^{2+} -csatornát blokkoló ruténium vörös, Ca^{2+} ionofór ionomicin és Ca^{2+} -pumpa inhibitor thapsigargin pedig növelte a génműködést. Eszerint a *HvCOR14b* génkifejeződése egyes kalcium jelátviteli komponensektől függ (EGTA által blokkolt Ca^{2+} -szint). Foszfolipáz D gátló 1-butanol, illetve PI-PLC aktivitást gátló U73122 megemelte a génexpressziót, míg ugyancsak PLC jelátvitelt blokkoló neomicin a génműködést csökkentette. Ez azt sugallja, hogy a *HvCOR14b* gén PLD függetlenül működik, viszont egyes PLC jelátviteli komponensektől függően aktiválódik.

HvDHN5 esetén elmondható, hogy Ca^{2+} ionofór ionomicin és Ca^{2+} -pumpát gátló thapsigargin inhibitorok csökkentették a génexpressziót, míg a további inhibitor molekulák a génműködést megnövelték. Arra következtethetünk ebből, hogy a *HvDHN5* működése egyes kalcium jelátviteli komponensektől függ, azonban PLC- és PLD- jelátviteltől függetlenül aktiválódnak.

A fent leírt árpa gének és jelátviteli folyamatok kölcsönhatását a 23. ábra tartalmazza.



23. ábra Eredményeket összefoglaló ábra árpa esetén (PLC= foszfolipáz C jelátvitel, PLD= foszfolipáz D jelátvitel, Ca²⁺= kalcium jelátvitel)

Érdekes tény, hogy az ionomicinnel serkentett Ca²⁺-szint növekedés alakor búza és árpa növényekben ellenkező hatást gyakorolt a hidegedzés után magasan expresszáló *CBF9*, *CBF13* és *CBF14* faktorok működésére. Ennek oka lehet a túlzott toxicitás, ami a fokozott Ca²⁺-szint növekedés okoz és ellenőrizhetetlen hatást gyakorol a növények génexpressziós folyamataira. A kísérleteink is bizonyítják a tényt, hogy az állati és humán (Morgan és mtsi. 1994) kísérletekben használatos ionomicin kezelés a fiatal növényekre toxikus hatással bírnak.

A molekuláris- és genetikai vizsgálatok mellett fagytesztekkel megvizsgáltuk, hogy a foszfolipid- és kalcium jelátvitel egyes komponenseinek farmakológiai gátlószerekkel való

befolyásolása hogyan hat a hideghez köthető fenotípusos változásokat illetően. Megjegyezendő, hogy a gabonafélék hidegedzése természetes körülmények között ősszel történik, kontrollált körülmények között pedig 5-6 hetes edzést tartanak optimálisnak (Fowler és mtsi. 1996), azonban inhibitoros kezelések mellett nem használhattuk ezt a maximális 6 hetes edzést, mivel hipotézisünk szerint a hosszabb edzési periódus már előhozhatja a gátlószerek toxikus hatását. Ezért a jelátvitelt befolyásoló gátlószerekkel kezelt árpa és alakor búza egyedeket csupán 2 hetes edzésnek vetettük alá a fagytesztek során. Levélszegmens fagyasztás után megállapítottuk, hogy -12 °C és -15 °C letálisnak tekinthető edzetlen minták esetén, hidegedzést követően a kifagyás mértéke felére csökkent. A 2 hetes edzés eredményesen növelte a fagyállóságot. A teljes növények fagytesztje alapján elmondható, hogy már a -10 °C is letálisnak tekinthető és 2 hetes hidegedzés szükséges a -6 °C-os fagyasztás túléléséhez. Árpában kimutatták, hogy az *Arabidopsis COR15* génjével homológ, hidrofíl tulajdonságú COR14b fehérje a kloroplasztisz sztrómájában helyezkedik el (Crosatti és mtsi. 1999), akkumulációja pedig megnövekedett fagyállóságot eredményez. Feltételezett szerepe a membrán stabilizálása, védelme a fagy által okozott sérülésektől, így csökkentheti az ionkiáramlás mértékét.

Fagyasztást követően a lantán-klorid és EGTA kezelés hatására a növények túlélési esélye lecsökkent, ami arra enged következtetni, hogy a Ca^{2+} -csatornák nagy szerepet játszanak a hidegaklimatizáció kialakulásában. Neomicin kezelést követő fagyasztási eredmények szintén ezt a kinetikát mutatták, melyből azt mondható el, hogy a foszfolipáz C jelátvitel is szükséges lehet a hidegedzés kialakításához.

A fagytesztekhez használt inhibitorok különböző hatást gyakoroltak a kísérletben használt növények fenotípusára. A lantán-klorid kezelés kis mértékű növekedés csökkenést és szár-levél sötétedést eredményezett a 2 hetes árpa növényeknél. Az inhibitor ezen hatása azzal magyarázható, hogy a szár görbületi növekedését gátolja, viszont alapvetően nem befolyásolja a szárnövekedési folyamatokat (Friedman és mtsi. 1998). Eszerint, a lantán-kloriddal lecsökkentett Ca^{2+} -szint hatással van a szármegnyúlási folyamatokra. Ezen hatást a mi kísérleti rendszerünkben is igazoltuk. A kis mértékű levélsötétedés azzal magyarázható, hogy a lantán-klorid befolyásolhatja a növényi színanyagtartalmat és a kloroplasztisz morfológiáját is. Ezen felül Hu és mtsi. (2016) azt is kimutatták, hogy lantán-kloriddal előidézett Ca^{2+} hiány befolyásolhatja a nyomelemek felhalmozódását a kloroplasztiszban, ezáltal az inhibitor különböző iontranszport mechanizmusokat és a levelek fotokémiai rendszereit is befolyásolhatja. Az ugyancsak Ca^{2+} -szintre ható EGTA esetén hasonló fenotípusos változást figyelhettünk meg a növényeken, viszont kisebb mértékben, mint a lantán-klorid esetén. Erre a kezelésre a hajtás rezes elszíneződése volt

jellemező. Eszerint az EGTA a lantán-kloridhoz hasonlóan érintheti a megnyúlási folyamatokat és a fotoszintézis működését is bizonyítottan befolyásolja (Tang és mtsi. 2019). A kísérletben neomicin inhibitort alkalmazva közel letális állapotba kerültek a 2 hetes növények. A palánták növekedése minimális volt, szövetelhalás mutatkozott a hajtásokon, gyökér oldalágainak nekrozisát, pigmentáltság megváltozását (sárgásbarna elszíneződés), illetve dehidratált állapothoz hasonló morfológiai jelenséget figyelhetünk meg. A neomicin is befolyásolja a kloroplasztisz működését, mellyel a szöveti és szervi elhalások megmagyarázhatóak (Teemu és mtsi. 1989). Mivel erre az inhibitorra érzékenyebben reagálnak a növények, mint a lantán-klorid és EGTA esetében, ezért valószínűleg a gyökereken keresztül történő anyagtranszport gyorsabb. Elmondható, hogy a foszfolipáz C függő jelátvitel, melyet a neomicin gátol, esszenciális folyamat lehet a növények megfelelő fejlődéséhez. A fagytesztekhez használt 1-butanollal kezelt növények gyökerei és azok szőrszájai rövidebbek voltak és gyakran elágazók is, a gyökerek sejtmegnyúlása gátolva volt, szemben az 1-butanol mentes tápoldaton nevelt növények hosszú és egyenes gyökerénél és azok szőrszálainál. Ezen kívül a kezelés hatására a levelek visszamaradt növekedését, sárgásbarna elszíneződését, módosult sziklevél morfológiát figyelhetünk meg, hasonlóan, mint a neomicinnel kezelt palánták esetében, azonban a szöveti nekrozis 1-butanol esetében kisebb mértékű volt. *Arabidopsis* vizsgálatok során kiderült, hogy az 1-butanol megzavarja a mikrotubulusok szerveződését a sejtosztódás interfázisa alatt (Gardiner és mtsi. 2003). Azok a butanol izoformák, melyeknek a PLD függő PA termelésre nincs hatása (2- és 3-butanol), zavartalanul hagyják a csírázást, a palánták növekedését és a mikrotubulusok szerveződését. Az utóbbiakat figyelembe véve azt a következtetést lehet levonni, hogy a foszfolipáz D-függő PA termelés valószínűleg fontos a gyökerek és levelek fejlődésének folyamatában.

A Ca^{2+} felhalmozódást a kalcium kötő fehérjék vagy a Ca^{2+} érzékelők detektálják. Növényekben 2 jelérzékelő csoportot különböztetünk meg: konformáció változáson végbemenő érzékelők, mint a kalmodulin, illetve azok az érzékelők, melyek más effektor funkcióval rendelkeznek, például protein kinázok vagy foszfolipáz domének. Eukariótákban a kalmodulin erősen konzervált fehérje, azonban a kalmodulin célfehérjék növényekben és állatokban nem konzerváltak (Kim és mtsi. 2001; Reddy és mtsi. 2002; Yang és Poovaiah, 2003). A Ca^{2+} felszabadulás megemeli a *CBF* és *COR* gének expressziós szintjét hidegstressz során (Chinnusamy és mtsi. 2010). *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy CAMTA (kalmodulin kötő transzkripciós aktivátor faktor) kötődik egy szabályozó elemhez a *CBF2* promoterén belül. A CAMTA faktorok közvetlenül a transzdukcióban szerepet játszhatnak a hidegstressz által indukált citoszolikus

kalcium jelátvitel utáni génexpressziós szabályozásban (Doherty és mtsi. 2009). A kalcium jelátvitel a *CBF* gének működésén keresztül hat egyéb *COR* gének expressziójára is, ezzel befolyásolhatja a fagytolerancia kialakulásának mértékét. Transzgénikus dohány növényben a *CBF1* vizsgálatával kimutatták, hogy a *CBF* gén *COR* célgénjeinek expressziója fokozódott, melyet a citoszolikus Ca^{2+} -szint megemelkedés váltott ki hideg-, só- és szárazság stresszválasz során (Jaglo-Ottosen és mtsi. 1998; Kasuga és mtsi. 1999). Annak ellenére, hogy a fentebb leírt Ca^{2+} érzékelő molekulákat összefüggésbe hozták a hidegstresszel, a Ca^{2+} által közvetített jelátviteli folyamat, illetve *CBF* és *COR* gének aktiválódásának kapcsolata még nem teljesen tisztázott. Elmondható, hogy a növények több egyedi kalcium jelátviteli komponenset és növényekre specifikus fehérjék tárházát tartalmazzák, így ezek felderítésére és a folyamatok megértésére további kísérletek szükségesek.

A növényi foszfolipid jelátviteli útvonal is több komponensből tevődik össze növényekben. A foszfolipáz D, foszfolipáz C, foszfolipáz A2 /A1 és lizofoszfolipáz A (a PLA termékét hidrolizálják) enzimek végzik a foszfolipidek hidrolízisét a növényi sejtben membránhoz kötötten. Az elmúlt évtizedekben jelentős előrelépések történtek a növényi PLC, PLD és PLA2-szabályozás megértésének terén (Stevenson és mtsi. 2000, Hong és mtsi. 2016). Az általunk vizsgált PLD enzim a heterogén enzimek családjából áll, amelyek különböző biokémiai, szabályozó és szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek. A növényi PLD géncsalád összetettebb, mint más organizmusokban: 12 PLD gén található az *Arabidopsis*-ban, míg emlősökben két PLD gén, illetve élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) egy PLD gén található (Wang 2002, 2004). Az *Arabidopsis* PLD hat típusba sorolható: PLD α , β , γ , δ , ϵ és ζ . A PLD δ számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amelyek megkülönböztetik a többi PLD-től. A PLD δ expressziója fokozódik súlyos dehidratáció, magas sótartalom és hideg akklimatizáció esetén. A PLD δ -módosított *Arabidopsis* elemzése azt sugallja, hogy a PLD δ pozitívan szabályozza a növények stressztűrő képességét, például fagyással, oxidatív stresszel és ultraibolya besugárzással szemben (Zhang és mtsi. 2003; Li és mtsi. 2004). A PLD δ -null mutáns *Arabidopsis* kevésbé toleráns a fagyasztással szemben, míg a PLD δ túlzott expressziója növeli a fagyűrést (Li és mtsi. 2004). A PLD enzim aktivitását számos tényező befolyásolhatja, többek között a Ca^{2+} (Wang 2000.), PI (Pappan és mtsi. 1997) a lipid szubsztrát összetétele (Pappan és mtsi. 1998). Az abiotikus stresszek esetén, mint a hideg- és szárazságstressz válaszként a PLD relatív eloszlása az oldható és a membrán frakciók között megváltozik (Ryu és Wang 1996). A molekuláris diverzitás és a redundáns funkciók a PLD-PA-t fontos jelátviteli komplexummá teszik, amely szabályozza a lipidanyagcserét, a citoskeleton

dinamikáját, a vezikulák forgalmát és a hormonális jelátvitelt a növényvédelemben a fehérje-fehérje és a fehérje-lipid kölcsönhatásokon vagy a hormonokon keresztül (Zhao 2015).

A foszfoinozítid-specifikus foszfolipáz C (PI-PLC) Ca^{2+} -függő enzim, mely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) diacilglicerollá (DAG) és inozit-trifoszfáttá (IP₃) hasít. A növényi PI-PLC-k számos alapvető növényi folyamatban vesznek részt, akár a fejlődéssel kapcsolatban, akár a környezeti terhelésekre adott válaszként. Úgy tűnik, hogy a növényekben az IP₃ nem az egyetlen aktív oldható molekula. Az inozitol-pentakiszfoszfát (IP₅) és az inozitol-hexakiszfát (IP₆) szintén jeleket továbbít, így rávilágít a PI-PLC, az inozitol-foszfát kinázok és foszfatázok fontosságára. A növényi PI-PLC útvonalak sajátossága, hogy az aktív lipid nem DAG, hanem annak foszforilált formája, a foszfatidsav (PA). Összességében a növényi PI-PLC-k funkcionális különbségeket mutatnak állati társaikhoz képest. Azonban hasonló általános jelátviteli útvonalakon hatnak, beleértve a Ca^{2+} -homeosztázist (Pokotylo és mtsi. 2014).

Összegezve a farmakológiai vizsgálatok során kapott eredményeket, megállapítható, hogy a kezelések nincsenek drasztikus hatással a növényi *CBF* génekre, továbbá a *COR* és *DHN* effektor génekre, viszont módosítják azok expresszióját. Megállapíthatjuk, hogy a jelátviteli rendszerek a külső kezeléstől függetlenül képesek a hideghatásra válaszolni, különbség a válasz mértékében van. Mivel növényekben a foszfolipázok aktiválódása és jelátviteli útvonalak által szabályozott génexpressziós változások sokasága még kiaknázatlan kutatási terület, így további vizsgálatok szükségesek a szabályozási hálózat pontosabb felderítésére. Az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak további tanulmányozása lehetőséget ad transzformáns vonalak létrehozására, konfokális mikroszkópos és még számos más vizsgálatra, amely fontos alapot képez az abiotikus stresszekkel szemben ellenállóbb gabonafélék létrehozásához.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

1. Kimutattuk, hogy az 5-ös kromoszóma *Fr-2* (*Frost resistance*) lókuszon elhelyezkedő, általunk vizsgált 11 árpa *HvCBF* és 11 alakor búza *TmCBF* transzkripciós faktor közül nem mind tekinthető hidegindukálható génnek, ami azt jelenti, hogy a rövid hideghatásra bekövetkező membránstruktúra változás és az ez által aktiválódó jelátviteli folyamatok sokasága nem szabályozza az összes, fagyállósági lókusztérképezett *CBF* gént. Kimutattuk, hogy vannak olyan *CBF* -ek, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódnak (*HvCBF6*), találtunk közepes mértékű expressziós profilt mutató géneket (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*) és magas szinten aktiválódó *CBF*-eket is (*TmCBF12*, *TmCBF14* és *HvCBF14*).
2. Kimutattuk, hogy az árpa *CBF*-k közül a *HvCBF9*, *HvCBF12* és *HvCBF14* bizonyult 6 órás hideghatást követően nagyobb expressziót mutató hidegaktivált génnek. A vizsgált búza transzkripciós faktorok közül a *TmCBF12* és *TmCBF14* mutatott hasonló kinetikájú expressziós aktivitást 6 órás hidegstresszt követően.
3. Kísérleti rendszerünkben a foszfolipáz C, foszfolipáz D és kalcium jelátviteli folyamatok kapcsolatát bizonyítottuk a *CBF* és effektor gének működésével. Bizonyítottuk, hogy a használt inhibitor molekulák közül génexpressziós szinten alakor búzában a foszfolipáz C jelátvitelt befolyásoló neomicin zavart okoz. Fagyasztási eredmények alapján kimutattuk, hogy a Ca^{2+} ionofor, Ca^{2+} felszabadító ionomicin, a Ca^{2+} -pumpa inhibitor thapsigargin, az intracelluláris Ca^{2+} -szint növelő mastoparan, a vakuoláris Ca^{2+} -csatorna blokkoló ruténium vörös és a PI-PLC aktiválást gátló U73122 a növényeket drasztikusan károsítja.
4. A gabona *CBF* géneket 3 csoportba sorolhatók aszerint, hogy farmakológiai megközelítésben milyen expressziós kinetikát mutatnak: megkülönböztethetünk olyan géncsoportot, mely hidegstresszt követően és inhibitorra sem reagálnak nagy mértékben, ilyen a *TmCBF9*, *HvCBF6*. A második géncsoportba sorolhatók azok a *CBF*-k, melyek hideghatást követően magas szinten aktiválódnak és inhibitorok hatására ez az expressziós szint leginkább csökken, ilyen a *TmCBF12*, *TmCBF14*, *HvCBF9* és *HvCBF14*. A harmadik *CBF* csoport tagjaihoz tartoznak azok a gének, melyek hideghatást követően közepes expressziós növekedéssel bírnak. Ide tartozik a *TmCBF13*, *HvCBF12*.
5. Eredményeink bizonyítják, hogy *COR14b* és *DHN5* effektor gének maximális aktivációjához a *CBF* gének megfelelő expressziós szintje mellett egyéb faktorok is szükségesek, így a vizsgált jelátviteli folyamatok megfelelő működése is.

6. Kimutattuk, hogy a vizsgált *CBF*-ek között vannak PLC, PLD és kalcium-jelátviteltől független gének (*HvCBF6*, *TmCBF9* és *TmCBF13*), PLC- és kalcium jelátvitel függő transzkripciós faktorok (*HvCBF12*), mindhárom jelátviteltől függő gének (*HvCBF9*, *HvCBF14*, *TmCBF12*), illetve olyan gén, melyet csupán egyes kalcium-jelátviteli komponensek (Ca^{2+} -csatornák, Ca^{2+} -szint) szabályozzák (*TmCBF14*). *HvCOR14b* kifejeződése egyes PLC- és kalcium jelátviteli komponensektől függ. *HvDHN5* expressziója egyes kalcium jelátviteli komponensektől függ, ám PLC- és PLD jelátviteltől függetlenül működik. *TmCOR14b* gén működése foszfolipáz D jelátvitel függő.
7. Árpa levélszegmens fagyasztás után megállapítottuk, hogy $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ letálisnak tekinthető edzetlen minták esetén, edzést követően a kifagyás mértéke felére csökkent, leginkább 2 hetes edzés szükséges a hidegakklimatizációhoz. Egész növény fagytesztje alapján elmondható, hogy már a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ is letálisnak tekinthető. 2 hetes edzést követően a fagyűrés mértéke elegendő ahhoz, hogy $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást kibírják az egyedek.

9. NEW RESULTS (THESES)

1. We have shown that not all of the 17 barley *HvCBF* and 11 alakor wheat *TmCBF* transcription factors located on the *Fr-2* (Frost resistance) locus of chromosome 5 can be considered as cold-inducible genes, which means that the membrane structure change that occurs upon short cold exposure and the activation by this a variety of signal transduction processes do not regulate all *CBF* genes mapped to the frost resistance locus. We showed that there are *CBF* genes that are not activated by cold stress (*HvCBF6*), we found genes with a moderate expression profile (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*) and *CBFs* that are activated at a high level (*TmCBF12*, *TmCBF14*, and *HvCBF14*)
2. We showed that among the barley *CBFs*, *HvCBF9*, *HvCBF12* and *HvCBF14* proved to be more cold-activated genes, they reached a high expression level after 6 hours of cold exposure. Among the examined wheat transcription factors, *TmCBF12* and *TmCBF14* showed expression activity with similar kinetics after 6 hours of cold stress.
3. In our experimental system, we demonstrated the relationship between phospholipase C, phospholipase D and calcium signaling processes with the functioning of *CBF* and effector genes. We proved that, among the inhibitor molecules used, neomicin, which affects phospholipase C signaling, causes a disturbance at the gene expression level in alakor wheat. Based on freezing results, we showed that the Ca^{2+} ionophore, Ca^{2+} releasing ionomicin, the Ca^{2+} -pump inhibitor thapsigargin, the intracellular Ca^{2+} -level increasing mastoparan, the vacuolar Ca^{2+} -channel blocker ruthenium red and the PI-PLC activation inhibitor U73122 are the plants they also had a negative effect on his phenotypic state.
4. Cereal *CBF* genes can be classified into 3 groups according to their expression kinetics in a pharmacological approach: we can distinguish a group of genes that do not react to a large extent after cold stress or to inhibitors, such as *TmCBF9*, *HvCBF6*. The second group of genes includes those *CBFs* that are activated at a high level after exposure to cold and this expression level is mostly reduced by inhibitors, such as *TmCBF12*, *TmCBF14*, *HvCBF9* and *HvCBF14*. The members of the third *CBF* group include those genes that show a moderate increase in expression after exposure to cold. These include *TmCBF13*, *HvCBF12*.
5. Our results prove that for the maximum activation of the effector genes *COR14b* and *DHN5*, in addition to the appropriate expression level of the *CBF* genes, other factors are also necessary, including the proper functioning of the investigated signaling processes..

6. We showed that among the investigated *CBFs* there are genes independent of PLC, PLD and calcium signaling (*HvCBF6*, *TmCBF9* and *TmCBF13*), transcription factors dependent on PLC and calcium signaling (*HvCBF12*), genes dependent on all three signaling (*HvCBF9*, *HvCBF14*, *TmCBF12*), or a gene that is regulated only by certain calcium signaling components (Ca^{2+} -channels, Ca^{2+} -level) (*TmCBF14*). *HvCOR14b* expression depends on some PLC and calcium signaling components. *HvDHN5* expression depends on some calcium signaling components, but it functions independently of PLC and PLD signaling. *TmCOR14b* gene function depends on phospholipase D signaling.
7. After freezing barley leaf segments, we found that -12 °C and -15 °C can be considered lethal for untrained samples, after training the extent of freezing was reduced by half, mostly 2 weeks of training is required for cold acclimatization. Based on the frost test of the whole plant, it can be said that even -10 °C is considered lethal. After 2 weeks of training, the degree of frost tolerance is sufficient for the individuals to withstand freezing to -6 °C.

10. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk háttérét több, ma már széles körben elfogadott tudományos eredményre alapoztuk. A búza és az árpa fagyállóságát befolyásoló *Fr-2* lókuszon számos *CBF* transzkripciós faktor gén található, amelyek kulcsszerepet töltenek be a növények hidegedződésének folyamatában. *Arabidopsis thaliana* modellnövényben bizonyították, hogy a *CBF* gének az alacsony hőmérsékletre, a fotoperiódusra, fényintenzitásra és fényminőségére is reagálnak, illetve a *COR* gének expresszióját is befolyásolják. Tudjuk, hogy ősszel számos környezeti tényező változására (pl. hőmérséklet, fényintenzitás) van szükség ahhoz, hogy a gabonafélék fiziológiailag felkészüljenek a téli fagyokra. Hipotézisünk, hogy a növényekben a csökkent hőmérséklet hatására aktiválódó egyes géncsaládok működésében szerepet játszik a foszfolipid- és a kalcium jelátvitel. Arról, hogy megbizonyosodjunk a jelátviteli utak szükségességéről a *CBF-COR* rendszer megfelelő működéséhez, génexpressziós, illetve fagyasztási kísérleteket állítottunk be. Kísérleteink során egy-egy jó fagyűrővel rendelkező őszi árpa, illetve őszi alakor búza vonalban vizsgáltuk alacsony hőmérséklet esetén az egyes inhibitorokkal befolyásolt foszfolipid C (PLC), foszfolipid D (PLD) és kalcium jelátviteli útvonalak változásától függő fagyűrés kialakulásának molekuláris háttérét. Ezekben a kísérletekben *CBF* transzkripciós faktorok, illetve a *HvCOR14b*, *TmCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének expresszióját vizsgáltuk.

A kísérletekhez néhány napos őszi árpa és alakor búzát használtunk. A génexpresszió mértékét 1 napos inhibitorkezelt és edzett növényeken határoztuk meg RT-qPCR módszerrel. Bizonyítottuk, hogy vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódnak, illetve PLC, PLD és kalcium jelátviteltől függetlenek (*HvCBF6*, *TmCBF9* és *TmCBF13*), míg hidegedződés után expressziós profilt mutató gének közül is két csoportot különböztettünk meg: közepes szinten kifejeződő géneket (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*) és magas szinten aktiválódó transzkripciós faktorokat (*TmCBF12*, *TmCBF14*, és *HvCBF14*). Ezek közül egyes *CBF*-eknek a génkifejeződéshez a vizsgált jelátviteli folyamatokra szükségük van (*TmCBF12*, *TmCBF14*, *HvCBF9*, *HvCBF12* és *HvCBF14*), míg más *CBF*-ek azoktól függetlenül működnek. A vizsgált *TmCOR14b*, *HvCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének expressziójához a *CBF* gének kifejeződésén túl a vizsgált jelátviteli folyamatok megfelelő működése is szükséges. Bizonyítottuk, hogy a használt inhibitorok közül génexpressziós szinten alakor búzában a foszfolipáz C jelátvitel befolyásoló neomicin zavart okoz.

A fagyasztási kísérletben az inhibitorok által blokkolt jelátviteli folyamatok és a fagyállóság összefüggését fenotípusos szinten is vizsgáltuk. Őszi árpa és alakor búzát használtunk a kísérlethez, ahol a 2 hetes inhibitorkezelt és normál tápoldaton nevelt növényeket fagyasztottunk

le. Két féle fagytesztet végeztünk: egész növényes fagytesztet, illetve levélszegmens fagyasztást. Mindkettő esetében hidegedzés és inhibitoros kezeléseket követően folyadékos fagyasztórendszerben történt a fagyasztás, majd megbecsültük a túlélési arányt. A fagyasztási eredmények alapján megállapítottuk, hogy egyes hosszabb távú inhibitoros kezelések a fiatal növényekre toxikus hatással bírnak (ionomicin, thapsigargin, mastoparan, ruténium vörös, U73122). Az alakor búza esetén a fagyasztás az összes fagyasztási hőmérsékleten letális volt a kezeléseket követően, így megállapítható, hogy hosszútávú inhibitoros vizsgálat nem alkalmazható *Triticum monococcum* fiatal növényeken. Árpa egész növényes fagyasztást (-6, -10 és -12 °C-on) követően fitotron növénynevelő kamrában szobahőmérsékleten regeneráltuk és egyedenkénti bonitálás után meghatároztuk a túlélési arányt. Az 1, illetve 2 hetes edzést követően is a -10 °C és -12 °C letálisnak tekinthető. Legalább 2 hetes edzés szükséges a fagyállóság kialakulásához, ahol a palánták -6 °C-t képesek túlélni. A lantán-klorid, EGTA és neomicin kezelés az edződés mértékét lecsökkentette, az 1-butanol nem befolyásolta a fagyűrés mértékét. Ez arra enged következtetni, hogy a kalcium és a PLC jelátvitel is nagy szerepet játszhata a fagyállóság kialakulásában. Egyes inhibitorok fenotípusos változást is okoztak az árpa palántákban, miszerint növekedés és gyökérhossz csökkenést, szár-levél elszíneződést, szöveti, szervi nekrozist tapasztaltuk. A levélszegmens fagyasztás esetén azt tapasztaltuk, hogy neomicin és 1-butanol az árpa növények konduktancia értékét nagyban befolyásolta. A -12 °C és -15 °C-on történő fagyasztás az edzetlen minták esetén letálisnak volt tekinthető, az edzést követően a kifagyás mértéke felére csökkent. A lantán-klorid kis mértékben okozott zavart hidegakklimatizációban, EGTA pedig nagyobb mértékben.

Úgy tűnik, hogy a hidegedződési folyamat során aktiválódó foszfolipid és kalcium jelátviteli komponensek a *CBF* transzkripciós faktorok egy részére és az effektor génekre is hatnak, ami befolyásolja a fagyállóság mértékét. Az általunk elvégzett kísérletsorozat bizonyítékul szolgált a *CBF*-ek, az effektor gének, az alacsony hőmérséklet, a foszfolipid C, foszfolipid D, illetve kalcium jelátvitel közötti szoros kapcsolatra. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a megfelelő jelátviteli folyamatok aktiválódása és a növények kora egyaránt kulcsfontosságú tényező a hideg akklimatizációban.

11. SUMMARY

The background of our work was based on several now widely accepted scientific results. In the *FR-2* locus, which affects the frost resistance of wheat and barley, there are several *CBF* transcription factor genes, which play a key role in the process of cold acclimation of plants. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, it was demonstrated that *CBF* genes respond to low temperature, photoperiod, light intensity and light quality, and also influence the expression of *COR* genes. We know that in autumn, changes in many environmental factors (e.g. temperature, light intensity) are necessary in order for cereals to physiologically prepare for winter frosts. Our hypothesis is that phospholipid and calcium signaling plays a role in the function of certain gene families activated in plants due to reduced temperature. In order to ascertain the necessity of these signal transmissions for the proper functioning of the *CBF-COR* system, and thus for the formation of frost resistance, we set up PCR and phenotypic freezing experiments to support this, where in a winter barley with a good frost tolerance and a winter wheat genotype, we examined at low temperatures the the molecular background of the development of frost tolerance dependent on changes in phospholipid C (PLC), phospholipid D (PLD) and calcium signaling pathways inhibited by certain inhibitor molecules, especially the *CBF* transcription factors, and in the case of *HvCOR14b*, *TmCOR14b* and *HvDHN5* effector genes.

For our genetic experiments, we used a few days old autumn barley and alakor wheat, where we examined the 1-day-old inhibitor-treated and hardened plants using the RT-qPCR method. We proved that there are *CBF* genes that are not activated by cold stress and are independent of PLC, PLD and calcium signaling (*HvCBF6*, *TmCBF9* and *TmCBF13*), while among the genes showing an expression profile after cold training we distinguished two groups: genes expressed at a medium level (*TmCBF13*, *HvCBF9*, *HvCBF12*) and highly activated transcription factors (*TmCBF12*, *TmCBF14*, and *HvCBF14*). Some of these *CBFs* require the investigated signaling processes for gene expression (*TmCBF12*, *TmCBF14*, *HvCBF9*, *HvCBF12* and *HvCBF14*), while other *CBFs* function independently of them. The expression of the examined effector genes *TmCOR14b*, *HvCOR14b* and *HvDHN5* requires, in addition to the expression of the *CBF* genes, the proper functioning of the examined signaling processes. We proved that, among the inhibitor molecules used, neomycin, which affects phospholipase C signaling, causes a disturbance at the gene expression level in alakor wheat.

In the freezing experiment, the correlation between the signaling processes blocked by the inhibitors and the freezing resistance was also investigated at the phenotypic level. Autumn barley and alakor wheat were used for the experiment, where the 2-week-old inhibitor-treated and plants

grown on normal nutrient solution were frozen. We performed two types of frost test: whole plant frost test and leaf segment freezing. In both cases, after cold training and inhibitor treatments, freezing took place in a liquid freezing system, and then we estimated the survival rate. Based on the freezing results, we determined that some longer-term inhibitor treatments have a toxic effect on young plants (ionomycin, thapsigargin, mastoparan, ruthenium red, U73122). In the case of alakor wheat, freezing at all freezing temperatures was lethal after the treatments, so it can be concluded that a long-term inhibitor test cannot be used on young seedlings of *Triticum monococcum*. After whole-plant freezing of barley seedlings (at -6, -10 and -12 °C), they were regenerated at room temperature in a phytotron plant breeding chamber, and an individual assessment value was given to them, and the survival rate was determined. Even after 1 and 2 weeks of training, -10 °C and -12 °C can be considered lethal, mostly 2 weeks of training is necessary for the development of frost resistance, where the seedlings can survive -6 °C. Treatment with lanthanum chloride, EGTA and neomycin reduced the degree of hardening, 1-butanol did not affect the degree of frost tolerance. This suggests that calcium and PLC signaling may also play a major role in the development of frost resistance. Some inhibitors also caused phenotypic changes in barley seedlings, according to which we experienced a decrease in growth and root length, stem-leaf discoloration, and tissue and organ necrosis. In the case of leaf segment freezing, we found that neomycin and 1-butanol greatly influenced the conductance value of barley plants. Freezing at -12 °C and -15 °C was considered lethal in the case of untrained samples; after training, the rate of freezing was reduced by half. Lanthanum chloride caused a small disturbance in cold acclimation, and EGTA to a greater extent.

It seems that the phospholipid and calcium signaling components activated during the cold acclimation process also affect individual *CBF* transcription factors and effector genes, which can result in serious changes in the degree of frost resistance. Of course, this hypothesis could only be verified with further experiments. This series of experiments can serve as evidence for the close relationship between *CBFs*, effector genes, low temperature, phospholipid C, phospholipid D, and calcium signaling during the cold acclimation process. Based on these results, it seems that increased protection against low temperatures can occur in plants as an adaptation to environmental changes in autumn. However, it is important to emphasize that the activation of the appropriate signaling processes and the age of the plants are both key factors in cold acclimatization.

12. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A disszertációban bemutatott témákhoz kötődő, nemzetközi folyóiratban megjelent cikkek:

Zsuzsa Marozsán-Tóth, Ildikó Vashegyi, Gábor Galiba, Balázs Tóth (2015) The cold response of CBF genes in barley is regulated by distinct signaling mechanisms; *Journal Plant Physiology*; 181:42-49; DOI 10.1016/j.jplph

Ildikó Vashegyi, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Gábor Galiba, Petre I. Dobrev, Radomira Vankova, Balázs Tóth (2012) Cold Response of Dedifferentiated Barley Cells at the Gene Expression, Hormone Composition, and Freezing Tolerance Levels: Studies on Callus Cultures; *Molecular Biotechnology, Part B of Applied Biochemistry and Biotechnology*, ISSN 1073-6085, DOI 10.1007/s12033-012-9569-9

Krisztián Gierczik, András Székely, Mohamed Ahres, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Ildikó Vashegyi, Wendy Harwood, Balázs Tóth, Gábor Galiba, Alexandra Soltész & Attila Vágújfalvi (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*, 314–326, DOI 10.1007/s11105-019-01154-5

Más témákhoz kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent cikkek:

Ákos Boldizsár, Alexandra Soltész, Karen Tanino, Balázs Kalapos, Zsuzsa Marozsán-Tóth, István Monostori, Petre Dobrev, Radomira Vankova and Gábor Galiba (2021) Elucidation of molecular and hormonal background of early growth cessation and endodormancy induction in two contrasting *Populus hybrid* cultivars; *BMC Plant Biology* 21:111, DOI 10.1186/s12870-021-02828-7

Konferenciakiadványokban megjelent közlemények

Ildikó Vashegyi, Zsuzsa Tóth, Gábor Galiba, Balázs Tóth (2011) Calcium dependence of *COR14b* related cold acclimation. In: Stress responses - molecules, organisms and environments, Joint meeting of the British Ecological Society, the Biochemical Society, and the Society for Experimental Biology, Charles Darwin House, London, UK, 4-7 January 2011, STR1.50, pp. 28

I. Vashegyi, Z. Tóth, E. Sebestyén, V. Soós, G. Galiba, B. Tóth (2011) Calcium dependence of cold regulated genes, In: Veisz O.(szerk.) *Climate Change: Challenges and Opportunities in Agriculture: AGRISAFE Final Conference*. Budapest, Magyarország, 2011.03.21-

2011.03.23. Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Science, 2011. pp. 222-224

Zsuzsa Tóth (2012) Signaling pathways involved in cold stress in cereals, In: Proceedings of the PHD Mini Symposium 2012, Doctoral School of Molecular and Nanotechnologies, Faculty of International Technology, University of Pannonia; Martonvásár, Hungary; 18 June 2012; ISBN 978-615-5044-61-8; pp. 43-45.

Posztterek:

Tóth Zsuzsa, Vashegyi Ildikó, Galiba Gábor, Tóth Balázs (2011) Hidegstressz során lejátszódo jelátviteli folyamatok azonosítása génextpressziós vizsgálatokkal gabonafélékben, In: XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelítők Egyesülete MAE Genetikai Szakosztálya, Budapesti Corvinus Egyetem, Kertésztudományi Kar, Budapest, Magyarország, 2011. Április 27., pp: 149

Ildikó Vashegyi, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Gábor Galiba, Petre I. Dobrev, Radomira Vankova, Balázs Tóth (2012) Cold response of dedifferentiated barley cells: a study focused on the behaviour of the CBF-COR system and endogenous hormonal changes. In: Plant Breeding for Future Generations (Proceedings of the 19th EUCARPIA general congress). Z. Bedő, L. Láng (eds.), 2012.05.21-24. Budapest, Hungary pp. 315, ISBN: 978-963-8351-39-5

Gábor Galiba, Ildikó Vashegyi, Alexandra Soltész, Aliz Novák, Ákos Boldizsár, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Balázs Tóth, Attila Vágújfalvi, Gábor Kocsy (2012) Role of environmental stimuli and developmental phase in cold acclimation. In: *Plant Breeding for Future Generations* (Proceedings of the 19th EUCARPIA general congress). Z. Bedő, L. Láng (eds.), 2012.05.21-24. Budapest, Hungary pp. 152-155, ISBN: 978-963-8351-39-5.

Zsuzsa Marozsán-Toth, Ildiko Vashegyi, Gabor Galiba and Balazs Toth (2013) Effect of calcium on the cold induced gene expression in cereals, In: VIPCA Plant Genetic and Breeding Technologies International Conference, Vienna, Austria; 18– 20 February 2013; University of Vienna; 2013. pp. 79, N 89.

Ildikó Vashegyi, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Gábor Galiba, Petre I. Dobrev, Radomira Vankova, Balázs Tóth (2013) Regulatory components involved in cold tolerance of barley cells; In: Proceedings of the 2nd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 2013.11.05-07. Budapest, Hungary, p. 38-39.

Előadások:

Zsuzsa Marozsán-Tóth, Ildikó Vashegyi, Gábor Galiba, Balázs Tóth (2012) Identification of signal transduction pathways involved in cold stress by gene expression studies in cereals; In: Pannonian Plant Biotechnology Workshops, Advances in Plant Breeding and Plant biotechnology in Central Europe; Debrecen, Hungary; JUN 4TH– 6TH 2012; The Department of Plant Biotechnology, University of Debrecen, Centre of Agricultural Sciences; 2012. pp. 19-20.

Vashegyi Ildikó, Marozsánné Tóth Zsuzsa, Galiba Gábor, Petre Dobrev, Radomira Vankova, Tóth Balázs (2012) Dedifferenciált árpa sejtek hidegválasza: vizsgálatok kallusz tenyészetekben, In: I.ATK Tudományos Nap (Felfedező kutatások az Agrártudományi Kutatóközpontban), 2012.11.14. Martonvásár, Magyarország, pp. 65

Ildikó Vashegyi, Zsuzsa Marozsán-Tóth, Gábor Galiba, Balázs Tóth (2012) Identification of basic components in the activation of cold-induced gene expression in barley. Top Science BASF Symposium on Plant Stress Response, 2012.11.14-16, Neustadt an der Weinstraße, Germany, pp. 20-21

13. IRODALOMJEGYZÉK

- Aldon D., Mbengue M., Mazars C. és Galaud J.-P.** (2018) Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**, 665.
- 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.
- Bae JH., Park JW., Know TK.** (2003) rutinium red, inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca^{2+} depletion and cytochrome c release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **303**, 1073–1079.
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF.** (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.
- Barrero-Gil J., Salinas J.** (2019) Gene Regulatory Networks Mediating Cold Acclimation: The CBF Pathway, Part of the *Advances in Experimental Medicine and Biology* book. **1081**, 3–22.
- Beck EH, Heim R, Hansen J.** (2004) Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J. Bioscience*. **29**, 449–459.
- Bleasdale J. E., Thakur N. R., Gremban R. S., Bundy G. L., Fitzpatrick F. A., Smith R. J. Bunting S.** (1990) Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **255**(2) 756-68.
- Boldyreva A. A.** (2005) Lanthanum Potentiates GABA-Activated Currents in Rat Pyramidal Neurons of CA1 Hippocampal Field. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **140** (4) 403–5.
- Bush SD.** (1995): Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology's*. **46** 95–122.
- Campoli C., Maria A. Matus-Cádiz, Pozniak Curtis J., Cattivelli Luigi D., Fowler B.** (2009) Comparative expression of *Cbf* genes in the *Triticeae* under different acclimation induction temperatures. *Molecular Genetics and Genomics*, **282**, 141–152.

- Canella D., Gilmour S.J., Kuhn L.A., Thomashow M.F.** (2010) DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the PKKP/RAGR_xKFxETRHP signature sequence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. **1799**, 454–462.
- Catalá R., Medina J., Salinas, J.** (2011) Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, 16475–80.
- Chinnusamy V, Zhu JK, Sunkar R** (2010) Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology* **639**, 39–55
- Cockcroft S.** (2001) Signaling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**, 1674–1687
- Collings D.A., Harper J.D., Marc J.** (2003) The effects of phospholipase D antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organization in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*. **44**, 687–696.
- Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F.** (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low- temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 15243–8.
- Crosatti C., Polverino de Laureto P., Bassi R., Cattivelli L.** (1999) The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiology*. **119**, 671–680.
- DeFalco T.A., Bender K.W., Snedden W.A.** (2010) Breaking the code: Ca 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
- Dickson E.J. és Hille B.** (2019) Understanding phosphoinositides: rare, dynamic, and essential membrane phospholipids. *Biochemical Journal*. **476**, 1–23.
- Ding J.P., Pickard B.G.** (1993) Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*. **3**, 713–20.

- Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J., Thomashow M.F.**, (2009) Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *The Plant Cell*. **21**, 972–984.
- Fowler D.B., Chauvin L.P., Limin A.E., Sarhan F.** (1996): The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.*, **93**, 554-559.
- Francia E., Rizza F., Cattivelli L., Stanca A.M., Galiba G., Tóth B., Hayes P.M., Skinner J.S., Pecchioni N.** (2004) Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and applied genetics*. **108**, 670-80.
- 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., Whitelam G.C.** (2007) Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. **39**,1410–3.
- Friedman H., Meir S., Rosenberger I., Halevy A. H., Kaufman P. B., Philosoph-Hadas S.** (1998) Inhibition of the gravitropic response of snapdragon spikes by the calcium-channel blocker lanthanum chloride, *Plant Physiology*. **118**(2), 483-92
- Galiba G., Stockinger E.J., Francia E., Milc J., Kocsy G., Pecchioni N.** (2013) Freezing Tolerance in the Triticeae (RK Varshney és R Tuberosa, Szerk.). *Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.*
- Galiba G., Vágújfalvi A., Li C., Soltész A., Dubcovszky J** (2009) Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperature cereals. *Plant Science*, **176**, 12-19.
- Galon Y., Finkler A., Fromm H.** (2010) Calcium-regulated transcription in plants. *Molecular Plant*. **3**, 653–669.
- Gardiner J., Collings D. A., Harper J. D. I., Marc J.** (2003) The Effects of the Phospholipase D-Antagonist 1-Butanol on Seedling Development and Microtubule Organisation in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiology*. **44**, 687–696
- Gierczik K., Novák A., Ahres M.** (2017) Circadian and light regulated expression of CBFs and their upstream signalling genes in barley. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.

- Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F.**, (2004) *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology*. **54**, 767–781.
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M. Thomashow M.F.** (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal*. **16**, 433–442.
- Guangyang W., Aoyue B., Erick A., Huiying L., Liang Z., Cheng C., Tao H., Jinmin F.** (2017) Exogenous Calcium Enhances the Photosystem II Photochemistry Response, *Frontiers in Plant Science*. **8**, 2032.
- Guo X., Zhang L., Zhu J., Liu H. & Wang A.** (2017) Cloning and characterization of SiDHN, a novel dehydrin gene from *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. that enhances cold and drought tolerance in tobacco. *Plant Science*. **256**, 160–9.
- Guo Y., Xiong L., Ishitani M., Zhu J.K.** (2002) An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **99** 7786–7791 p.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F., Zhang J.Z.** (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **130**, 639–648.
- Hirase A., Hamada T., Itoh T.J., Simmen T., Sonobe S.** (2006): n-Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiology*. **47** 1004–1009.
- Hong Y., Zhao J., Guo L., Kim S.C., Deng X., Wang G., Zhang G., Li M., Wang X.** (2016) Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Science Direct by Elsevier*. **62**, 55-74
- Jaglo K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T., Thomashow M.F.** (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology*. **127**, 910–7.
- Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F.** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*. **280**, 104–6.

- Jamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*. **6**, 251–64.
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J., Huskisson N.S., Hirt H.** (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **93**(20) 11274-9.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *National Biotechnology*. **17**, 287–291.
- Kauss H., Jeblick W.** (1996) Influence of Salicylic Acid on the Induction of Competence for H2O2 Elicitation. *Plant Physiology*. **111**, 755-763.
- Kim S.A., Kwak J.M., Jae S.K., Wang M.H., Nam H.G.** (2001) Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an Arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiology*. **42**, 74–84.
- Kinmonth-Schultz H.A., Golembeski G.S., Imaizumi T.** (2013) Circadian clock-regulated physiological outputs: dynamic responses in nature. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **24**, 407–13.
- Knight H., Trewavas A.J., 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., Li C., Vágújfalvi A., Galiba G., Stockinger E.J. és Dubcovsky J.** (2008) Identification of candidate CBF genes for the frost tolerance locus Fr-A2 in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology*. **67**, 257–270.
- Központi Statisztikai Hivatal.** (2015) A fontosabb növények vetésterülete. *STATISZTIKAI TÜKÖR*. **57**, 1–2.
- Lee S., Hirt H., Lee Y.** (2001) Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant Journal*. **26**, 479–486.
- Levitt J. (Jacob).** (1980) Responses of plants to environmental stresses. *Academic Press*.
- Li W., Li M., Zhang W., Welti R., Wang X.** (2004) The plasma membrane-bound phospholipase D delta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *National Biotechnology*. **22**, 427–433.

- Lindlöf A.** (2010) Interplay between low-temperature pathways and light reduction. *Plant Signaling & Behavior*. **5**, 820–5.
- 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.
- Liu, Y., Dang, P., Liu, L. & He, C.** (2019) Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. **38**, 511–9.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**, 402–8.
- Luo Q.** (2011) Temperature thresholds and crop production: a review. *Climatic Change*. **109**, 583–598.
- Lytton J., Westlin M., Hanley M.R.** (1991) Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. *Journal of Biological Chemistry*. **266** (26) 17067-71. p.
- Marozsán-Tóth Zs., Vashegyi I., Galiba G., Tóth B.** (2015) The cold response of CBF genes in barley is regulated by distinct signaling mechanisms; *Journal 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., Webb A.A.R.** (2018) Circadian oscillations of cytosolic free calcium regulate the *Arabidopsis* circadian clock. *Nature Plants*. **4**, 690–698.
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P.M., Bailey-Serres, J.** (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. **16**, 237–51.
- Miles G-P., Samuel M.A., Ellis B.E.** (2004) Mastoparan Rapidly Activates Plant MAP Kinase Signaling Independent of Heterotrimeric G Proteins. *Plant Physiology*. **134**(4)1332-1336 p.
- Miller A.K., Galiba G. és Dubcovsky J.** (2006) A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A2* in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*. **275**, 193–203.
- Morgan A.J., Jacob R.** (1994) ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochemical Journal*. **3**, 665-72.

- Munnik T.** (2001) Phosphatidic acid: An emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science*. **6**, 227–233.
- Musgrave A.** (2001) Phospholipid signaling in plants: holding on to phospholipase D. *Science's STKE*. **111**, 42
- Nakaminami K., Karlson D.T., Imai R.** (2006) Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **103** 10122–10127.
- Novák A., Boldizsár Á., Ádám É., Kozma-Bognár L., Majláth I., Båga M., Tóth B., Chibbar R., Galiba G.** (2016) Light-quality and temperature-dependent CBF14 gene expression modulates freezing tolerance in cereals. *Journal of Experimental Botany*. **67**, 1285–1295.
- Novillo F., Medina J., Salinas J.** (2007) Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **104**, 21002–21007
- Nurhasanah Ritonga F., Chen S.** (2020) Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants*. **9**.
- Qin C.B. és Wang X.M.** (2002) The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLDzeta1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology*. **128**, 1057–1068.
- Paolacci A.R., Tanzarella nO.A., Porceddu E., Ciaffi M.** (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat, *BMC Molecular Biology*. **10**, 11.
- Pappan K., Austin-Brown S., Chapman K.D., Wang X.** (1998) Substrate selectivities and lipid modulation of phospholipase D and from plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **353**, 131–40
- Pappan K., Zheng S., Wang X.** (1997) Identification and characterization of a novel phospholipase D that requires polyphosphoinositide and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 7048–5
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Luit A.H., Moreau M., Trewavas A.J., Ranjeva R., Mazars C.** (2000) Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature*. **405**, 754–755.
- 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.

- Pfeiffer D.R., Gudz T.I., Novgorodov S.A., Erdahl W.L.** (1995) The Peptide Mastoparan Is a Potent Facilitator of the Mitochondrial Permeability Transition. *The Journal of Biological Chemistry*. 4923-4932.
- Pokotylo I., Kolesnikov Y., Kravets V., Zachowski A., Ruelland E.** (2014) Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme, *Biochimie from Elsevier*. **96**,144-157
- Pooviah B.W., Reddy A.S.N.** (1987) Calcium messenger systems in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **6**, 47-103.
- 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., Mazars C.** (2016) Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 327.
- Reddy V.S., Ali G.S., Reddy A.S.N.** (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 9840–9852.
- Rogers T.B., Inesi G., Wade R., Leserer W.J.** (1995) Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Bioscience Reports*. **15** (5) 3419. p.
- Ruelland E., Kravets V., Derevyanchuk M., Martinec J., Zachowski A., Pokotylo I.** (2015) Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*. **114**, 129–143.
- Ruelland E., Vaultier M.N., Zachowski A., Hurry V.** (2009) Chapter 2 cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*. **49**, 35–150.
- Ruelland E., Zachowski A.** (2010) How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*. **69**, 225–232.
- Ryu SB. és Wang X.** (1996) Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1303**, 243–50.
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors

involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **290**, 998–1009.

Sasaki K., Kim M.H., Imai R. (2007) Arabidopsis cold shock domain protein2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **364**, 633–638.

Shota Atsumi, Taizo Hanal, James C. Liao (2008): Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. In: *Nature*. **451** 86–89.

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.

Smallwood M, Bowles D.J. (2002.) Plants in a cold climate. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **357**, 831–47.

Soltész A., Smedley M., Vashegyi I., Galiba G., Harwood W., Vágújfalvi A. (2013) Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*. **64**, 1849–1862.

Staxe'n I, Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M., Mcainsh M.R. (1999) Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Biology*. **96** 1779–1784.

Stevenson J.M., Perera I.Y., Heilmann I., Pers son S., Boss W.F. (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends of Plant Science*. **5**, 252- 58.

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.
- Tang Y., Zhao D., Meng J., Tao J.** (2019) EGTA reduces the inflorescence stem mechanical strength of herbaceous peony by modifying secondary wall biosynthesis; *Horticulture Research*. **6**, 36.
- Teemu H. Teeri, Geeta K. Patel, Kristian Aspegren, Veli Kauppinen** (1989) Chloroplast targeting of *neomycin phosphotransferase II* with a pea transit peptide in electroporated barley mesophyll protoplasts, *Plant Cell Report*. **8**, 187-190.
- 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.
- Thomashow M.F** (2001) So What's New in the Field of Plant Cold Acclimation? Lots!. *Plant Physiology*. **1**: 89–93.
- Tucker E.B. és Boss W.F.** (1996) Mastoparan-Induced Intracellular Ca^{2+} Fluxes May Regulate Cell-to-Cell Communication in Plants. *Plant Physiology*. **111**, 459–467.
- Uemura M., Steponkus P.L.** (1999) Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*. **112** 245–254.
- Vashegyi I., Marozsán-Tóth Z., Galiba G., Dobrev P.I., Vankova R., Tóth B.** (2013) Cold response of dedifferentiated barley cells at the gene expression, hormone composition, and freezing tolerance levels: studies on callus cultures. *Molecular Biotechnology*. **54**, 337–349.
- 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., Crosatti C, Galiba G, Dubcovsky J, Cattivelli J.** (2000) Two loci on wheat chromosome 5A regulate the differential cold-dependent expression of the *cor14b* gene in frost-tolerant and frost-sensitive genotypes. *Molecular Genetics and Genomics*. **263**, 194-200.

- 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.
- Wang X.** (2000) Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research*. **39**, 109–49.
- Wang X.** (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion Plant Biololgy*. **5**, 408–414.
- Wang X.** (2004) Lipid signaling. *Current Opinion Plant Biololgy*, **7**, 329–336.
- Webb M.S., Uemura M., Steponkus P.L.** (1994) A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance '. *Plant Physiology*. **104**, 467–478.
- Whalley H.J, Sargeant A.W., Steele J.F.C., Lacoere T., Lamb R., Saunders N.J., Knight H., Knight M.R.** (2011) Transcriptomic Analysis Reveals Calcium Regulation of Specific Promoter Motifs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **11**. 4079–4095.
- Wilkins K.A., Matthus E., Swarbreck S.M. Davies J.M.** (2016) Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 1–17.
- Xue H., Chen X., 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.
- Yang, T., Poovaiah, B.W.** (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*. **8**, 505–512.
- Yáñez M., Gil-Longo J., Campos-Toimil M.** (2012) Calcium binding proteins. *Islam S, ed. Calcium Signaling. Springer Netherlands*. 461–482.
- Yiting S., Yanlin D., Shuhua Y.** (2018) Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Science Direct*. **7**, 623-637.
- Yuan P., Yang T., Poovaiah B.W.** (2018) Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**, 3896.
- Yukun L., Peiyu D., Lixia L., Chengzhong H.** (2019) Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. **38**, 511–519.

Zhao J. (2015) Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein–protein and lipid–protein interactions to hormone signalling. *Journal of Experimental Botany* **7**, 1721–1736.

Zhang W., Wang C., Qin C., Wood T., Olafsdottir G., Welti R., Wang X. (2003) The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **15**, 2285–2295.

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen disszertációban bemutatott kísérleteket a martonvásári Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében, a Biológiai Erőforrások Osztálya munkatársaként végeztem el.

Köszönöm Dr. Tóth Balázsnak, hogy támogatott szakmailag, a Martonvásáron töltött évek során bármikor fordulhattam hozzá segítségért. Köszönettel tartozom Dr. Galiba Gábornak, aki az Osztály egykori vezetőjeként lehetőséget biztosított munkám kezdetekor és folyamán, hogy doktori tanulmányaimat elkezdjem, majd vállalta a témavezetésemet is. Infrastrukturális, valamint jelentős anyagi támogatást is köszönöm Balázsnak és Gábornak.

Köszönettel tartozom továbbá az alábbi személyeknek:

- Dr. Vashegyi Ildikónak, hogy tanulmányaim alatt a segítségemre volt a kísérletek kivitelezésében
- Kalapos Balázsnak, aki szakmai tapasztalatával és emberségével segített -e disszertáció véglegesítésében.
- Horváth Imréné és Fehér E. Mónika kolléganőknek a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítséget.

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.