



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

DOI: 10.54598/003860

Doktori értekezés tézisei

Marozsánné Tóth Zsuzsa

Keszthely

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

1. BEVEZETÉS

A klímaváltozás következtében Magyarországon az átlagostól eltérő, szélsőséges időjárás előfordulásának gyakorisága nőtt, ami hőmérsékleti, szárazság vagy ozmotikus stresszt generál a kalászosok és más kultúrnövények számára, ezáltal jelentős termeléskiesést és termés-csökkenést okoz. Ez a jelenség felerősítette a gabonafélék fokozott abiotikus stressztűrésének szükségességét.

Mindezek alapján belátható, hogy egyre inkább szükségesebbé válik az olyan gabonafélék létrehozása, amelyek sokkal ellenállóbbak a környezeti tényezőkre nézve, esetünkben a hőmérséklet jelentős változásaival szemben. A gabonafélék gazdasági jelentősége miatt nagyon fontos a hidegérzékelés folyamatának megértése, amely segítheti a nemesítők, illetve agrokémikusok munkáját e növények télállóságának növelésében. A haszonnövények alkalmazkodóképességének javítása érdekében fontos feladat a növény fagyállóságát kialakító folyamatok megértése a jelátviteli folyamatok aktiválódásán át a hideg indukálta génkifejeződésen keresztül, mely kutatások eredményei információként szolgálnak a gyakorlati hasznosításban.

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. A hidegakklimatizáció folyamata nagyon összetett, eredményessége a komplex jelfogó, jelátviteli, valamint végrehajtó genetikai és biokémiai tagok (molekulák) alkotta hálózat összjátékán alapul, melynek működése részleteiben még nem teljesen tisztázott. Felmerül a kérdés, hogy hogyan tudja ezt a komplex hálózatot egy növény szabályozni, működtetni. A rövid időn belül bekövetkező nagyobb hőmérsékleti ingadozások fontosak a

haszonnövények termesztését tekintve, így kiemelkedő jelentőségű feladat a különböző gazdasági növényfajták fagyállóságát kialakító folyamatok minél alaposabb megértése a jelátviteli folyamatok aktiválódásán át a hidegindukált gének működésén keresztül, mely eredmények hasznosak lehetnek a növénynevelés számára.

Számos publikáció szól a gabonafélék környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodásáról és annak molekuláris hátteréről, melyek az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia kialakításáért felelősek, azonban a jelátviteli folyamatokról, melyek a hidegstresszt követően aktiválódnak, nem sok információ van jelenleg.

A hidegaklimatizáció részletes molekuláris leírását leginkább az *Arabidopsis thaliana* növényben tanulmányozzák, de a mezőgazdaságban betöltött jelentősége miatt kívánatos ezen folyamat molekuláris alapjainak megismerése a gabonafélékben is. A gabonafélékben ismeretes, hogy a hőmérséklet csökkenése gének nagy halmazát indukálja, a hideghatás utáni első pár órában ezek többnyire szabályozó transzkripciós faktorok, amelyek a későbbi gének aktiválásáért felelősek. Ilyenek az *ICE-CBF-COR* rendszer (*ICE: Inducer of CBF Expression, CBF: C-Repeat Binding Factor, COR: Cold-Regulated Gene*). Az akklimatizációs folyamatokat egy adott géncsoport, a *C-repeat binding factorok* vagyis a *CBF* gének irányítják. Ezek a 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. Ez a szekvencia számos hideg- és szárazságstresszre indukálódó génben megtalálható, köztük a *DHN (dehidrin)*, a *KIN (cold-induced)*, a *COR (cold-regulated)*.

Kutatásaink során a fagyűrés kialakításáért felelős jelátviteli folyamatok közül a „foszfolipid jelátvitel \rightarrow Ca^{2+} , PLC, PLD jelátvitel \rightarrow *CBF*

transzkripciós faktorok → effektor gének (*COR14b*, *DHN5*)” útvonalat, valamint rájuk ható molekuláris szabályozó mechanizmusokat tanulmányoztuk. Két különböző kísérletet állítottunk be, ahol megvizsgáltuk árpa és *Triticum monococcum* (alakor búza) esetén a kalcium- és foszfolipid jelátvitelt a fagytűrés vonatkozásában.

Farmakológiai tekintetben a következő táblázatban szereplő inhibitorokat (gátlószereket) alkalmaztuk genetikai és fagyasztási kísérleteinkhez:

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

Inhibitor	Hatás
Lantán- klorid	Kalcium csatorna blokkoló
EGTA	Kalcium kötő
Ionomycin	Kalcium felszabadító
Neomycin	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

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Tavaszi és őszi árpa, illetve tavaszi és őszi alakor búza vonalakban az *Fr-2* (búza esetén *Fr-A^m2*, árpánál *Fr-H2*) lókuszhoz kapcsolható *CBF* transzkripciós faktorok, valamint a később indukálódó *HvCOR14b*, *TmCOR14b* és *HvDHN5* gének hidegindukált időbeli aktivációjának vizsgálata.
- Szemikvantitatív PCR és kvantitatív RT-qPCR segítségével kiválogatni azokat a *CBF* géneket, melyeknek rövid idejű hidegstressz hatására megemelkedik az indukciójuk.
- Az egyes jelátviteli molekulákat blokkoló inhibitorok összehasonlítása, az optimális koncentrációjuk meghatározása, majd használata a genetikai és fenotípus vizsgálatokhoz.
- 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.
- Fenotípusos vizsgálat egész növény fagyasztással őszi árpa és őszi alakor búza növények esetén, mellyel a fagyállóság mértékét meghatározzuk az egyes jelátviteli folyamatok blokkolása után.
- A növények fiziológiai állapotát érintő, hideg hatására bekövetkező membránkárosodások következményeinek monitorozása őszi árpában és őszi alakor búzában hidegedzést és fagyasztást követően.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényi anyagok

Kísérleteinkben alakor búzát (*Triticum monococcum*) és árpát (*Hordeum vulgare*) használtunk, fagyűrő variánsaik neve: *T. monococcum*: G3116 és *H. vulgare*: Nure, illetve a vizsgálatok első szakaszában használt fagyérzékeny típusok: *T. monococcum*: DV92 és *H. vulgare*: Tremois.

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

A kísérlethez fagyűrő és fagyérzékeny vonalakat használtunk. A 20 °C-os fitotroni kamrában történt előnevelést követően a 2 hetes palánták egy részét 4 °C-os kamrában hidegedzettük 24 órán keresztül. A kontroll minták 20 °C-on maradtak ezalatt. A mintavételezéseket 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 a növények gyökér feletti hajtáscsúcs részéből származtak.

TRIzol és RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) segítségével történt az RNS-izolálás, mely kiegészült a DNase set (Qiagen) használatával is. Kísérleteinkben egy lépéses cDNS szintézist alkalmaztunk Molony Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverz transzkriptázt (Promega Corporation, Madison, WI, USA), illetve Oligo(dT)18 -t (Thermo Fisher Scientific) használva. 3 lépéses hőmérsékleti ciklusban zajlott a szintézis (5 perc 25 °C, 60 perc 42 °C, 15 perc 70 °C), majd 25 ng/μl végkoncentrációjú cDNS mintákra hígítottuk, melyek a szemikvantitatív- és RT-qPCR kísérletek templátjaként szolgáltak.

A PCR során felhasznált oligonukleotid primereket az árpa- és alakor búza esetén is Primer3 programot használva terveztük. Az alakor búzára 10 *CBF* gént, illetve a *COR14b*-t terveztük, az árpa esetén 11 *CBF* gént. Utóbbi esetén a *COR14b* és *DHN5* primereket irodalmi adatok alapján választottuk ki kísérleteinkhez (Stockinger és mtsi. 2007; Campoli és mtsi. 2009). Referencia vagy háztartási génként *HvActin*-t és *Ta30797* (Paolacci és mtsi. 2009) géneket

használtunk.

A PCR reakció 25. ciklusától kezdve 2-2 ciklusonként történt a mintavétel, mivel 25 ciklus alatt a szintetizálódott DNS mennyisége nem volt látható agaróz gélen. A felsokszorozított DNS mintákat etidium-bromidot tartalmazó 1 %-os agaróz gélen detektáltuk.

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 genotípusokat használtuk. Az RT-qPCR vizsgálatot ABI 7500 készülékkel végeztük és Power SYBR Green reagenst (Life Technology) használtunk a reakciótermékek detektálására. A Ct értékeket $\Delta\Delta C_t$ 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.

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

A 3.2.pontban leírt szemikvantitatív PCR és RT-qPCR eredmények alapján kiválasztásra kerültek azok a gének, melyeket tovább vizsgáltuk inhibitorokat használva a PLC, PLD és Ca^{2+} jelátvitelt befolyásolva.

A tavaszi típusokat kihagyva csak az őszi árpa és alakor búza fajtákat használtuk az inhibitoros kísérletekhez. A fiatal csíranövényeket 2-2 ml inhibitort tartalmazó elegyekkel kezeltük, melyek egyes foszfolipáz jelátviteli komponenseket (PLC, PLD), illetve Ca^{2+} szintet befolyásolták (1. táblázat). Normál körülmények között 20 °C-os fitotron kamrákban 16 órán keresztül tartottuk a növényeket az inhibitoros oldatokban, majd a növények egy részét hideg edzés céljából áthelyeztük 4 °C-os fitotron kamrába, a növények másik részét 20 °C kontroll körülmények között tartottuk.

A mintavételezések az edzési időszak (4/4 °C) 0., 6., 12. és 24. órájában

történtek. A teljes kísérletet kétszer megismételtük. A minták a növények hajtáscsúcs részéből, illetve levélszegmenséből tevődött össze. Az RNS izolálás és a cDNS szintézis a 3.2. pontban leírtak alapján történt.

A 3.2. 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 vizsgálatához a BioRad CFX96 (C1000 Touch Thermal Cycler) PCR készüléket és KAPA Sybr Fast Universal qPCR reagenst (Kapa Biosystems) használtunk a detektálásra. Mindegyik minta eredményét ugyanannak a kontroll körülmények között nevelt kalibrátor mintapopulációnak az eredményéhez viszonyítottuk, majd Livak és Schmittgen (2001) módszere szerint határoztuk meg a relatív expresszió mértékét.

3.4. 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 befolyásolták-e a fagyállóság kialakulását. Őszi árpa és alakor búza variánsokat használtunk az inhibitoros, fagyasztásos kísérletekhez. Kétféle fagytesztet végeztünk GP200-R4 típusú folyadékos fagyasztórendszerben (Grant Instruments, Shepreth, Anglia): levélszegmens fagyasztást és egész növények fagyasztását.

Az 5 napos fiatal csíranövényeket Hoagland tápoldatban előneveltük 7 napig normál körülmények között növénynevelő kamrában. Az előnevelés 5. napjától a palántákat inhibitorokat tartalmazó eleggyel kezeltük 2 napig. A 20/20 °C-os előnevelés utolsó (7.) napjától 2 hétig 4 °C-on edzettük az inhibitor mentes-, illetve inhibitorokat tartalmazó tápoldatban nevelt növényeket. A kontrollként használt palántákat az edzés idején továbbra is a 20/20 °C-os kamrában tartottuk.

3.4.1. Konduktometriás fagyteszt, levélfagyasztás

A levélszegmensek fagyasztását a Webb és mtsi. (1994) által leírt protokoll alapján végeztük el. A 20/20 °C-os kontroll körülmények között kezelt növényekből az előnevelés utolsó napján (7. nap) megtörtént az 1. mintavételezés, majd az 1. fagyteszt. Ezek adták a kontroll, vagyis nem edzett mintákat. 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 mintavételezést követően a minták egy részét nem fagyasztottuk le, hanem 2 órán keresztül 8-8 ml MQ vízzel rázattuk, ezeket használtuk az alapvonal beállításához, ezt tekintettük 100 % túlélőképességnek, azaz a legcsekélyebb membránkárosodást szenvedett állapotnak. A maximális ionkiáramlást (legerősebb membránkárosodás) úgy határoztuk meg, hogy ugyanazon növényről származó levélszegmenseket folyékony nitrogénnel kezeltük, majd kiolvadás után ugyancsak 8-8 ml MQ vízzel rázattuk és a megmértük a vezetőképességét. Ezt az értéket vettük 0 %-os túlélési aránynak.

A fagyasztani kívánt csövek a folyadékos fagyasztórendszerbe kerültek. A fagyasztás körülményei: 2 °C hőmérsékletű fagyasztóba helyeztük a mintákat, majd fokozatosan hűtöttük 1-1 órán keresztül 0 °C-ra, -2 °C-ra, majd -4 °C-ra a növények fagyponthoz alatti hőmérsékletéhez való hozzászoktatásához. A -2 °C-ra történő lehűlés 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 hozzáadva a 8-8 ml vizet néhány órán keresztül szobahőmérsékleten tartottuk, rázattuk, végül konduktométer készülékkel meghatároztuk az oldatok vezetőképességét. A

rázatások leteltével minden esetben 4-4 ml folyadékból a minták vezetőképességét MultiSample Konduktométer (Mikro KKT, Magyarország) készülék segítségével határoztuk 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. A 4/4 °C-os edzési periódus 7. és 14. napján végeztük a 2. és 3. mintavételeket, illetve fagyteszteket. A fagyasztás, regeneráció, rázás és vezetőképesség mérése ugyanúgy zajlott, mint a kontroll minták esetén.

3.4.2. Egész növény fagyasztás

A fagyteszt a hidegedzést követően folyadékos fagyasztórendszerben történt. A palánták gyökereiről eltávolítottuk a tápoldatot, majd nedves szűrőpapírba és zacskókba helyezve fagyasztottuk őket. A fagyasztási körülmények a következők voltak: a 4 °C hőmérsékletű fagyasztóba helyezve a mintákat folyamatosan hűtöttük 0 °C-ra, majd 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. Ezután eltávolítottuk a leveleiket, csupán a bokrosodási csomókat hagytuk meg. Utóbbiakat növénynevelő cserepekbe ültettük, amelyekben 2:1:1 arányú kerti föld, homok és humusz keveréke volt. Azokat a növényeket, melyeket az életképességi vizsgálat során kontrollnak tekintettük és hozzájuk hasonlítottuk a fagyasztott palánták regenerációjának mértékét, a fagyasztás ideje alatt 20 °C-on tartottuk, majd a fentihez hasonló módon ültettük el. A regeneráció 12 napig 20°C-on klímakamrában zajlott. A regeneráció mértékét 3 naponként felvételeztünk, amikor is megmértük a hajtáshosszt és bonitálási értékekkel jellemeztük őket egy 0-tól 5-ig tartó diszkrét skálán.

4. EREDMÉNYEK

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

A kísérletben tavaszi és őszi genotípusú árpa és alakor búza genetikai megnyilvánulását hasonlítottunk össze a 20/20 °C-os előkezelést követő rövid ideig (1 napig) tartó 4/4 °C hidegedzés után. Árpa esetén *HvCBF2*, *HvCBF3*, *HvCBF5*, *HvCBF6*, *HvCBF7*, *HvCBF9*, *HvCBF10*, *HvCBF11*, *HvCBF12*, *HvCBF13*, *HvCBF14* gének expressziós szintjét, alakor búza esetén *TmCBF2*, *TmCBF3*, *TmCBF4*, *TmCBF9*, *TmCBF10*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCBF15*, *TmCBF16*, *TmCBF17* és *TmCOR14b* gének expresszióját hasonlítottuk össze a kontroll (20/20°C) és edzett (4/4°C) növényi mintákban szemikvantitatív PCR, majd RT-qPCR technikát használva.

A 11 árpa *CBF* génből az előzetes PCR eredmények alapján kiválasztottunk 6 gént (*HvCBF2*, *HvCBF6*, *HvCBF7*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*), melyet tovább vizsgáltunk. Ezek közül az inhibitoros vizsgálatokhoz negatív kontrollnak a *HvCBF6* gént választottuk, illetve a hidegstresszt követően nagyobb mértékben aktiválódó *HvCBF9*, *HvCBF12* és *HvCBF14* transzkripciós faktorokat a *HvCOR14b* és *HvDHN5* effektor gének mellett. A vizsgált 11 alakor búza *CBF* gén közül kiválasztottunk azt a 9 gént (*TmCBF2*, *TmCBF4*, *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14*, *TmCBF15*, *TmCBF16*, *TmCBF17*), illetve a *TmCOR14b* gént, melyek magas expressziós aktivitást mutattak a hidegedzést követően és ezeket megvizsgáltuk real-time PCR-rel. A további, inhibitoros jelátviteli folyamatok tanulmányozásához kiválasztottuk a *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14* és *TmCOR14b* géneket.

Eredményeink alapján elmondható, hogy vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódnak, találtunk közepes mértékű expressziós profilt mutató géneket és magas szinten aktiválódó *CBF*-eket is. *CBF* géneknél már 1 óra hidegedzés hatására is expressziós intenzitás figyelhető meg, néhány óra elteltével egyre magasabb szintet érnek el, majd néhány esetben lecsengés

figyelhető meg, míg más transzkripciós faktoroknál 12 óra után is növekedik az aktivitásuk mértéke. *COR14b* effektor gén aktivációja 1 órás hidegkezeléskor még nem számottevő, 6 órás és 12 órás hidegstresszt követően a szintje folyamatosan emelkedik.

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

Az előző kísérletekben kiválasztottuk azokat a géneket árpában és alakor búzában, melyek a legnagyobb génkifejeződést mutatták hidegdedzés hatására. Ezen kívül olyan transzkripciós faktorokat is kiválogattunk, melyek negatív kontrollnak tekinthetők. Ez alapján árpában a *HvCBF6*, *HvCBF9*, *HvCBF12*, *HvCBF14*, *HvCOR14b* és *DHN5* gének, alakor búzában a *TmCBF9*, *TmCBF12*, *TmCBF13*, *TmCBF14* és *TmCOR14b* gének működését és azok hatását kívántuk megvizsgálni a PLC, PLD és kalcium-jelátviteli folyamatokra. A fiatal csíranövényeket olyan inhibitorokkal (gátlószerekkel) kezeltük (lásd. 1. táblázat), 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 árpához képest. Ezen tapasztalat után az alakor búza *CBF-COR* rendszer ilyen típusú vizsgálatától eltekintettünk (neomicin kezelés esetén).

4.2.1. Kalcium jelátvitel vizsgálata

Kalcium jelátvitelt kétféle 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 gátoltuk a kalciumionok transzportját.

Az ionomicin meglehetősen ellenőrizhetetlen hatást gyakorolt a növények génexpressziójára. Valószínűsíthetően bármelyik géncsalád expressziós szintjét megváltoztathatja.

Hidegstressz során alacsonyán aktiválódó *TmCBF13* expresszióját a Ca^{2+} -csatornák blokkolására használt lantán-klorid, ruténium vörös, thapsigargin nem befolyásolta, a Ca^{2+} kelátor EGTA kis mértékben pedig emelte a génexpressziót. Az inhibitormentes körülmények között nevelt alakor palántákban a *TmCBF9* és *TmCBF14* expressziója magas volt és szintjüket sem változtatták meg a gátlóanyagok. *TmCBF12* esetén elmondható, hogy mindegyik inhibitor kis mértékben lecsökkentette az expresszióját. Egyedül a thapsigargin működött ellenkezőleg, azaz növelte a génexpressziót. *TmCOR14b* effektor gén expressziós szintje normál körülmények között 100-as nagyságrendű volt. A kezelések hatására kismértékű növekedést tapasztaltunk. Leghatásosabbnak az EGTA kezelés bizonyult, ugyanis ez a kezelés duplájára növelte a génexpressziót.

Árpa esetén a Ca^{2+} -csatornák blokkolására használt lantán-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* aktivációját EGTA kivételével az összes Ca^{2+} útvonalat blokkoló anyag lecsökkentette: lantán- klorid a felére, ruténium vörös hatására pedig nyolcszor kisebb 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 – az EGTA és a thapsigargin kezelésén kívül, melyeknél számottevő változást nem tapasztaltunk – az összes gátlóanyag megemelte a szintjét: a lantán-klorid duplájára, míg ruténium vörösnél nyolcszoros expressziónövekedés volt megfigyelhető. 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 lantán-klorid és EGTA kezelések hatása elhanyagolható volt és az alapszint sem bizonyult nagyon magasnak a *HvDHN5* esetén.

Kísérletünk során mastoparant alkalmaztunk az intracelluláris Ca^{2+} -szint növelésére. A *TmCBF13* szintje kilencszeresére növekedett, a *TmCBF9* és *TmCBF14* gének működését szintén pozitívan befolyásolta a mastoparan kezelés, *TmCBF9* aktivációt 3-szorosára, *TmCBF14* szintjét 2-szeresére növelte. A *TmCBF12* esetén a génműködés szintje változatlan maradt. A *TmCOR14b* effektor gén expressziója szintje 2,5-szeresére növekedett. 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: mindkét gén esetén az aktiváció másfélszeresére csökkent. *HvCBF12* esetén a génműködés változatlan. A két effektor gén expressziós változása különböző a mastoparan kezelés után. A *HvCOR14b* szintje változatlan maradt, míg a *HvDHN5* gént pozitívan befolyásolta a kezelés és 2-szeres mértékben emelkedett meg az expresszió.

4.2.2. 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. Mivel a transzkripciós faktorok és effektor gének kifejeződésében zavart okozott, így ezen eredményeket nem közlöm a disszertációban.

Alakor búza esetén az U73122 kezelést követően elmondható, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok aktivációjának kinetikája a következő volt: *TmCBF13* szintjét négyyszeresére növelte a kezelés. A *TmCBF9* és *TmCBF14*

faktorok működését kissé pozitívan befolyásolta a kezelés, de ez elhanyagolható mértékű. A *TmvCBF12* esetén az U73122 kezelés nem változtatta meg a génexpressziót. A vizsgált effektor gént pozitívan befolyásolta a PLC-függő jelátviteli útvonalat blokkoló anyag, azaz a *TmCOR14b* szintjét a 3,5-szeresére növelte.

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-szeresére 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 PLC-függő jelátviteli útvonalat blokkoló két anyag a transzkripciós faktorokéhoz 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.

4.2.3. Foszfolipáz D (PLD) jelátvitel vizsgálata

A PLD-függő jelátvitel gátlásához 1-butanol gátlószert alkalmaztunk. Alakor búza vizsgálat esetén elmondható, hogy a *CBF* transzkripciós faktorok génexpressziós kinetikája kevésbé tükrözte az eddig tapasztaltakat. A *TmCBF13* szintje kétszeresére növekedett a kezelést követően. A *TmCBF9* és *TmCBF14* gének működését az 1-butanos kezelés szintén pozitívan befolyásolta, azonban a *TmCBF9* expresszióját csak a 24. óra után befolyásolta, az 5-szörösére növelte. A *TmCBF14* kifejeződését csak kis mértékben növelte a gátlószeres beavatkozás, míg a *TmCBF12* esetén lecsökkentette. A PLD jelátviteli folyamat blokkolása után a *TmCOR14b* effektor gén expressziós szintjét felére csökkentette a kezelés.

Az árpa esetében a *CBF* transzkripciós faktorok expressziós kinetikája a következőképpen alakult: a *HvCBF6* szintjét a kezelés kis mértékben

befolyásolta. A *HvCBF9* és *HvCBF14* gének működését az alapszintjükhöz képest negatívan befolyásolja az 1-butanolos kezelés, azaz a *HvCBF9* expresszió másfélszeresére, a *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.

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

A fagyasztási eredmények alapján ionomicint, thapsigargin, mastoparant, ruténium vöröst és U73122-t kizselektáltuk a túlzott toxicitásuk miatt. Így tehát a lantán-kloriddal, EGTA-val, neomicinnel és 1-butanollal kezelt növények fagyasztási eredményeit mutatom be.

A *T. monococcum* esetén az egész növényes fagyasztás az összes fagyasztási hőmérsékleten letális volt. Megállapítható volt, hogy hosszútávú inhibitoros vizsgálat nem alkalmazható, mivel az alakor búza érzékenyebben reagált az egyes anyagokra az árpához képest. Emiatt az egyes jelátviteli folyamatok blokkolása utáni alakor fagytesztek eredményének bemutatásáértől eltekintünk. Teljesen mást tapasztaltunk árpa esetén, ahol a kezelések nem befolyásolták ilyen mértékben a növények fejlődését, azonban egyes inhibitorok fiziológiai hatása szembetűnő volt a fagyűrés kialakulásának tekintetében.

4.3.1. Egész növény fagyasztás árpa esetén, inhibitorok hatása

A fagytesztet követően az árpa növényeknek egyedenkénti bonitálási értéket adtunk és meghatároztuk a túlélési arányt. A túlélési ráta -6 °C -os fagyasztást követően még 100 %-os volt az összes kezelés esetén, majd a fagyasztási hőmérsékletet csökkentve egyre kevesebb növény élte túl. A -10 °C -on végzett fagyteszt után az egyedek elpusztultak. Az inhibitoros kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy már 20 °C -on is volt toxikus hatása a lantán-kloridnak és neomicinnek.

Az edzetlen lantán-koriddal kezelt növények 80 %-ára már a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 kontroll, mind a Ca^{2+} blokkolt palánták esetében. A $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztást az edzetlen növények többsége nem élte túl, az 1 hetes edzést követően csak kissé nőtt meg a túlélési ráta. A $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztott növények túlélési aránya hasonló volt a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottakhoz képest.

$-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt az a hőmérséklet, ahol releváns eredményeket kaptunk, vagyis a megfigyelt túlélési adatok alkalmasak az egyes gátlószerek hatásának összehasonlítására. Az 1 és 2 hetes edzést követően is a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ is letálisnak tekinthető, mivel az inhibitor mentes és inhibitorral kezelt palánták kifagytak. 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.

4.3.2. Levélszegmens fagyasztás árpa esetén

A levelek elfagyás következtében kialakuló szöveti (membrán) sérüléseinek mértékével korreláló ionkiáramlás mértékét konduktancia méréssel határoztuk meg. 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, mivel a neomicinnel és 1-butanollal kezelt növények esetén valószínűsíthetően irreleváns eredmények születtek.

A konduktancia paraméter kontroll körülmények között nevelt növényekből és az edzett egyedekből származó minták esetén kis mértékben különbözött. A $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztás nem volt szignifikáns hatással a konduktancia szintjére, bár a hőmérséklet csökkenésével megfigyelhető egy enyhe emelkedés az értékében. A $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztás árpa növények levelei már sérültek, a relatív ionkiáramlási szint megemelkedett ezen minták esetén, de nem nagy mértékben. A $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztás hatására az ionkiáramlási érték megközelítette a maximális szintet.

A lantán-klorid és EGTA inhibitorokkal kezelt egyedek esetén nem figyelhető meg számottevő szignifikáns ionkiáramlási különbség a nem kezelt növényekhez képest sem kontroll ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) körülményeken nevelt árpánál, sem edzett egyedeknél, habár kis mértékben az EGTA kezelés megemelte ezt az értéket. Fagyasztást követően az inhibitormentes tápoldatban nevelt árpához képest EGTA-val kezelt mintákban ugyancsak megfigyelhető csekély ionkiáramlás emelkedés.

Az 1 hetes hidegkezelt egyedek levélszegmenseinek $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztást követően kisebb mértékű, majd $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on már szignifikáns ionkiáramlás növekedés figyelhető meg a normál körülmények között nevelkedett növényeknél mért értékekhez képest, mind a Hoagland táptalajon nevelt, mind az inhibitorokat tartalmazó tápoldatokon tartott egyedek esetén. Az utóbbi hőmérsékletek már letálisnak tekinthetők. A kéthetes edzést követően $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk inhibitormentes és inhibitormentes tartalmazó tápoldaton nevelt árpa növényeinket annak érdekében, hogy meghatározzuk mi az a hőmérséklet, melynél a növények fagyállóságának növekedése jól elkülöníthető, illetve az egyes inhibitorok hatása jól detektálható. Eredményeink alapján elmondható, az 1 és 2 hetes edzésen túlesett inhibitormentes és kezelt minták edzettségi szintje is jelentősen megnőtt $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt fagyasztást követően. Ahogy csökkent a fagyasztási hőmérséklet, annál nagyobb volt a fagykárosodás mértéke, és az eredmények korrelálnak az

egész növények fagyasztási eredményeivel.

A $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztás az edzetlen minták esetén letálisnak volt tekinthető, az edzést követően a kifagyás mértéke felére csökkent és leginkább 2 hetes edzés szükséges a hidegakklimatizációhoz. A $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett fagyasztás esetén látható, hogy lantán-klorid kis mértékben okozott zavart hidegakklimatizációban, EGTA pedig nagyobb mértékben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján elmondható, hogy vannak olyan *CBF* gének, melyek hidegstressz hatására sem aktiválódnak, találtunk közepes mértékű expressziós profilt mutató géneket és magas szinten aktiválódó *CBF*-eket is. Kísérletünk is igazolta, hogy gabonafélék esetén a *CBF14* gén a leghatásosabb és legfontosabb a fagyűrés 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 hidegakklimatizációs 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).

Kutatásunkból az a következtetés vonható le, hogy az általunk felállított rendszerben az edzés eredményes volt, a kultúrák fagyállósága megnövekedett a 20 °C-on nevelt kontrollhoz képest, illetve a gátlószerek egyes *CBF* és effektor génekre expressziós változást gyakoroltak, mely megerősíti azt a korábbi kutatások által felvetett hipotézist, mely szerint a jelátviteli folyamatok hidegstressz során aktiválódnak (Uemura és Steponkus 1999).

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 diploid alakor búza szöveti felépítése hasonló az ugyancsak diploid árpához és genetikailag is hasonlóak, azonban jóval érzékenyebben reagálnak a kísérletekben használt anyagokra és fagyállóságukat tekintve is könnyebben kifagynak, mint az árpa növények (Vágújfalvi és mtsi. 2003) és ez a hatás csak fokozódik inhibitor kezelések esetén.

Elmondható, hogy 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 a génkifejeződés leginkább csökken, ilyen a *TmCBF12*, *TmCBF14*, *HvCBF9* és *HvCBF14*. A harmadik *CBF* csoport tagjaihoz tartoznak azok a gének, melyek hideghatást követően közepes expressziós emelkedést mutattak. Ide tartozott a *TmCBF13*, *HvCBF12*. Árpa és búza *COR14b* esetén is elmondható, hogy az inhibitorok hatására különböző módon reagáltak, ami azt sugallja, hogy a *CBF* által szabályozott aktivációján kívül számos más folyamatok is befolyásolhatják működését, mint a megvilágítás hossza, a fény minősége, illetve kloroplasztiszhoz köthető faktorok (Crosatti és mtsi. 1999, Franklin és Whitlam 2007, Novák és mtsi. 2016). Az árpa *HvDHN5* gén esetében elmondható, hogy a vizsgált anyagcsere folyamatok szabályozottabban befolyásolhatják a génműködést, mivel szinte az összes inhibitorral kivitelezett blokkolás megnövelte az expressziójának mértékét. Ez arra utal, hogy a kalcium, foszfolipáz C, foszfolipáz D útvonalak is negatívan regulálják a gén kifejeződését hidegstresszválasz folyamán. Eredményeink bizonyítják azt is, hogy *COR14b* és *DHN5* gének maximális aktivációjához a *CBF* gének megfelelő expressziós szintje mellett egyéb faktorok is szükségesek, így a vizsgált jelátviteli folyamatok megfelelő működése is.

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. Az teljes növények fagytesztje alapján elmondható, hogy már a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ is letálisnak tekinthető. A 2 hetes edzést követően a fagyűrés mértéke elegendő ahhoz, hogy $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást túléljék az egyedek.

A fagytesztekhez használt inhibítormolekulák különböző hatást

gyakoroltak a kísérletben használt növények fenotípusára. A lantán-klorid kezelés kis mértékű növekedés csökkenést és szár-levél sötétedést eredményezett a kéthetes árpa növényeknél. Ez azzal magyarázható, hogy a szár görbületi növekedését nagyobb mértékben gátolja (Friedman és mtsi. 1998). Eszerint a lantán-kloriddal lecsökkentett Ca^{2+} - szint hatással van a gravitációval kapcsolatos szármegnyúlási folyamatokhoz. Ezen hatást a mi kísérleti rendszerünkben is igazoltuk. A kis mértékű levélsötétedés azzal magyarázható, hogy a lantán-klorid befolyásolhatja a növényi színanyag tartalmát (klorofill tartalmát) és a kloroplasztisz morfológiáját is befolyásolhatja (Hu és mtsi. 2016). Az ugyancsak Ca^{2+} -szintjére ható Ca^{2+} kelátor EGTA esetén hasonló fenotípusos változást figyelhetünk meg a növényeken, viszont kisebb mértékben mint a lantán-klorid esetén, illetve a levél-szár sötétedése is elmaradt. Eszerint az EGTA a lantán-kloridhoz hasonlóan érintheti a megnyúlási folyamatokat és a fotoszintézis működését is befolyásolja (Tang és mtsi. 2019). A kísérletben neomicin inhibitort alkalmazva közel letális állapotba kerültek a 2 hetes növények, nekrozishoz (szövetelhalás) vezetett. A kezelés növekedés csökkenést, levél- és szármegnyúlás gátlását, gyökér oldalágainak nekrozisát, pigmentáltság megváltozását eredményezett (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). Elmondható, hogy a foszfolipáz C függő jelátvitel, melyet a neomicin gátol, esszenciális folyamat lehet a növények megfelelő fejlődéséhez. 1-butanollal kezelt növények gyökerei és azok szőrszálai rövidebbek voltak és gyakran elágazók is, a gyökerek sejtmegnyúlása gátolva volt, a levelek visszamaradt növekedését, sárgásbarna elszíneződését, módosult sziklelevél morfológiát figyelhetünk meg. *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.

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 azokat. 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, melyre az eredményeink alapul szolgálhat.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 lókuszon térképezett *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 transzkripció 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.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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* (2021) 21:111, DOI 10.1186/s12870-021-02828-7

Konferencia kiadványokban 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, 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 Internation 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 lejátszódó 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 endogen 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 Marozsan-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