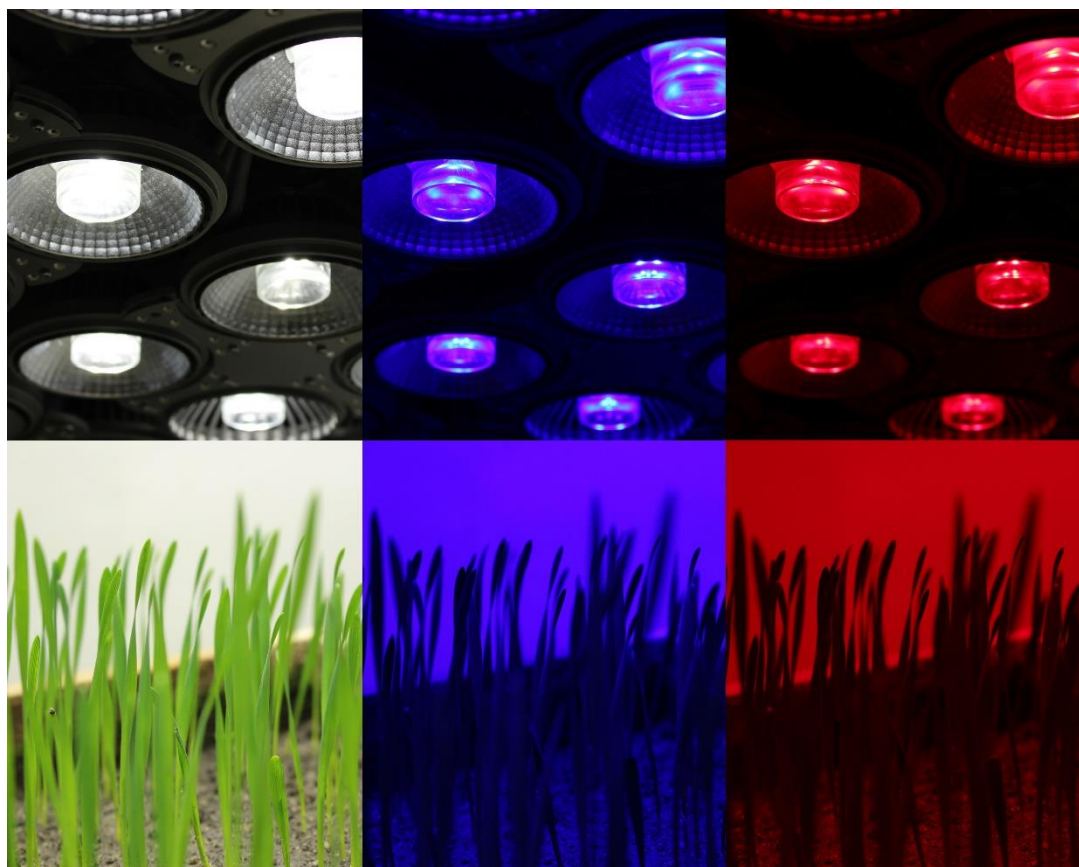


ZÁRÓJELENTÉS

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása

K-111879

2015. január 01 – 2018. december 31.



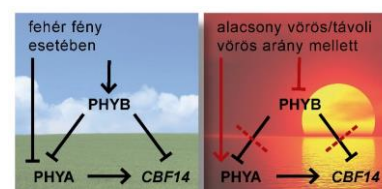
Vezető kutató:

Prof. Galiba Gábor

MTA Agrártudományi Kutatóközpont

Növényi Molekuláris Biológiai Osztály

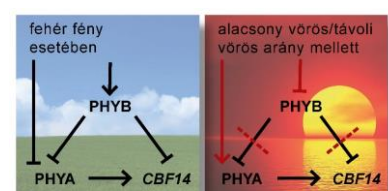
Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



Tartalom

A PÁLYÁZAT.....	3
Futamideje.....	3
Résztevői.....	3
SZAKMAI BESZÁMOLÓ	4
1. feladat: a <i>CBF</i> gének és a fény kapcsolatának teljes körű vizsgálata.....	4
1.3 feladat: a <i>CBF</i> gének promótereinek vizsgálata	4
1.4 feladat: <i>PhyC</i> mutáns durum búzavonalak vizsgálata	5
2. feladat: a <i>CBF</i> gének és a dormancia kapcsolatának vizsgálata fás szárú növényekben.....	6
Plusz feladatok	6
Alkalmazott kutatás.....	7
KÖZLEMÉNYEK	8

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



A PÁLYÁZAT

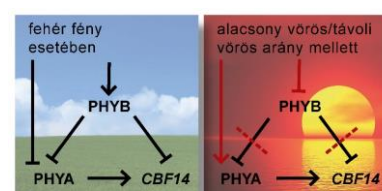
Futamideje

Pályázatunk négy évre szólt, 2015 január 1-én kezdtük a munkát és 2018 december 31-éig használhattuk fel a támogatást. A pályázat keretein túl néhány feladatot később fogunk csak lezárni, amiről a szakmai beszámoló részben részletesebben is szólnunk.

Részvevői

A pályázat indulása óta számos személycsere történt, ami szerencsére nem volt negatív hatással a megvalósításra. Tóth Balázs és Novák Aliz kilépésének oka, hogy távoztak az intézetünkéből. Bolvári-Soltész Alexandra és Ahres Mohamed beléptetését 2016. januárjában és decemberében kérvényeztük és az engedélyt meg is kaptuk. Hasonlóan jártunk el, amikor Boldizsár Ákos 2016. augusztusában kilépett a pályázatból. Harnos Noémi 2017. októberében távozott az intézetből Bolvári-Soltész Alexandra pedig 2018 februárjában ment szülési szabadságra. Az összes személyi változást engedélyztettük.

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



SZAKMAI BESZÁMOLÓ

1. feladat: a *CBF* gének és a fény kapcsolatának teljes körű vizsgálata

Fő célként a fagyűrésben kulcsszerepet játszó *CBF* gének és a fény kapcsolatának teljes körű vizsgálatát tűztük ki célul. A négy év során monokromatikus fényekkel és fénykiegészítésekkel is terveztünk dolgozni. Az első év során őszi és tavaszi búzákkal, valamint árpa növényekkel végeztük a monokromatikus fénykezeléseket. Vizsgálati anyagaink a következők voltak: *Triticum aestivum* cv. Cheyenne, *T. aestivum* cv. Norstar, *T. monococcum* cv G3116, *T. monococcum* Dv92 és *Hordeum vulgare* cv. Nure, *H. vulgare* cv Tremois. Ezeket a növényeket azonos fényintenzitású kék (450 nm), vörös (660nm) és távoli-vörös (735 nm) monokromatikus fényvel kezeltük. Ezen vizsgálataink után a LED panelek segítségével módosítottuk a spektrumot magasabb távoli vörös (735 nm) (alacsony vörös/távoli vörös arány) illetve kék (465 nm) tartalmú összetételre illetve vizsgáltuk a módosítatlan fehér fény és a nagyobb arányban vörös fényt (660 nm) tartalmazó spektrum hatását is.

Minden kezelés esetében vizsgáltuk a növények fagyűrését, folyadékfosztyóban, több hőmérsékleten, ezenkívül qRT-PCR segítségével analizáltuk többek között a *CBF* génexpressziót. A növények általános fittségi állapotát fotoszintetikus képességeik mérésével jellemeztük. A kísérletek végén próbálkoztunk a kezelt és kezeletlen növények fagyállóságának növény szintű meghatározásával. Ezen utóbbi kísérletek sajnos ellentmondásos eredményeket adtak.

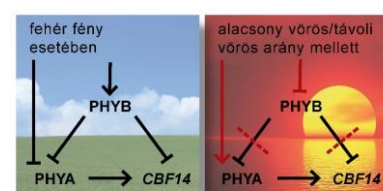
A kísérleteink eredményeit témák szerint tudtuk publikálni. A monokromatikus fénykezelésekkel végzett vizsgálataink alapján kijelenthetjük azt, hogy a *CBF14* gabonákban leginkább kék fényvel indukálható, és a fény, illetve a hőmérséklet hatása összeadódhat, valamint azt is, hogy a hőmérséklet-változás okozta *CBF* indukció fénykezeléstől függetlenül is bekövetkezhet. Megfigyeltük azt is, hogy a kék fény okozta *CBF14* indukció nem járt együtt a *CRY* gének indukciójával (Novák és mtsai. 2017).

A 2016-ban megjelent Light-quality and temperature-dependent *CBF14* gene expression modulates freezing tolerance in cereals című munkánkban mutattuk be azt, hogy a *CBF14* expressziós szintjének növekedését és a következményeként kialakuló fokozott fagyűrést elő lehet segíteni a fehér fény távoli vörössel (735 nm) való kiegészítésével. Ezt a hatást kenyérbúzában és árpában is sikerrel elő tudtuk idézni már 15 °C-os hőmérséklet mellett is. Továbbá megállapíthattuk, hogy az alkalmazott fénykezelés az általunk használt összes gabonanövényben (búza, árpa és alakor) fokozta a *PHYA* gén kifejeződésének mértékét, de a *PHYB* esetében ez csak az alakor vonalban volt mérhető. Eredményeink alapján javasoltunk egy modellt, amivel magyarázható a vörös fényt érzékelő fitokrómok és a hideg-stressz elleni védelemben fontos szerepet játszó *CBF14* gén közötti kapcsolat, valamint ennek a kapcsolatrendszernek a fény spektrumfüggő megváltozása is (Novák és mtsai. 2016).

1.3 feladat: a *CBF* gének promótereinek vizsgálata

Egy másik munkacsomagban a *CBF* géneket egy alapos molekuláris biológiai analízisnek terveztük alávetni. Ennek során szeretnénk volna a fényre érzékeny és nem érzékeny *CBF* gének promótereit összehasonlítani *in silico* módon árpa és búza promóter szekvenciák alapján. Az irodalomban leírt fényregulációban résztvevő motívumokat szeretnénk volna megtalálni. Később 5' RACE módszerrel a fényindukált promótereket izoláltuk volna. Riporter gén konstrukciókat hoztunk volna létre a promóterek funkcióinak igazolására. Ezután transzformáltuk volna az árpa növényeket a megfelelő riporter konstrukciókkal. Majd a kísérletesen igazolt fényregulált promóterekhez

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



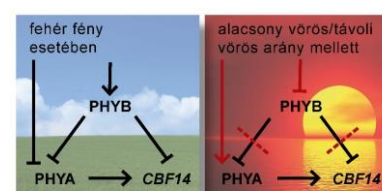
kötődő transzkripció faktorokat DNA pull-down assay módszerrel kihalásztuk volna és tömeg spektrometriás módszerrel (MS = Mass Spectrometry) azonosítottuk volna. A feltételes módból látható, hogy ez a munkacsomag nem teljesen ebben a formában valósult meg. Kolléganőnk Novák Aliz egy nyolc hónapos kanadai tanulmányút során dolgozott ezen a projekt részen. Az *in silico* promóter analízis során a *CBF14* gén promótere a tavaszi Chinese Spring (CS) búza vonal A, B és D genomjában is azonosításra került, árpa vonalak közül a vizsgált Nure genotípus mellett a Morex *CBF14* promóterét is sikerült azonosítani. Az adatbázis nem tartalmazott annotált Cheyenne szekvenciát, ezért ennek genomból történő izolálását PCR alapú módszerekkel megpróbáltuk. Végül Aliz a Norstar őszi búza genotípus promóterével dolgozott Kanadában Professzor Ravindra N. Chibbar csoportjában. Munkája során Monica Băga is segítette. A feladat annyiban módosult, hogy a promóter más-más szakaszai kerültek beépítésre többféle riporter gén konstrukcióba, amik csak tranzienst transzformációval kerültek bejuttatásra a növények levelébe. A többféle konstrukció közül riporter génnek az egyszerű rendszerekben hatékonyan alkalmazott vörös fluoreszcens fehérjét (RFP-red fluorescent protein) választottuk. A kész konstrukciókat steril csíráztatott *Triticum aestivum* cv. Norstar növények levelébe jutattuk 1 µm átmérőjű aranyhoz kötve egy Bio-Rad gyártmányú gépuska (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System) segítségével. Lövés után a csíranövények 5 nap sötét vagy kék vagy fehér fénykezelést kaptak 20 °C-on napi 12 órán keresztül, 5 nap kék fénykezelést 15 °C-on és 5 nap fehér fénykezelést kontrollnak 5 °C-on. Amíg a G- és GATA-boxot tartalmazó szakasz kék fényben indukálódott mindkét hőmérsékleten, de 20 °C-on sötétben nem, addig a két fényérzékeny elemet nem tartalmazó rész csak sötétben mutatott némi aktivitást. Nem kaptunk jelet azonban egyik esetben sem 20 °C-on fehér fényben, annak ellenére, hogy az ubikvitin promóteres konstrukció jól működött minden esetben, és a *CBF14* promóter darabok is aktívak voltak hideg hatására (Novák 2017).

1.4 feladat: PhyC mutáns durum búzavonalak vizsgálata

Ennek a feladatnak a körében terveztünk egy kísérletet PhyC mutáns növényekkel. Először is kiválogattuk a mindkét genomra homozigóta mutációt mutató PhyC mutáns durum búza (*T. durum* cv. Kronos) növényeket PhyC CAPS markerekkel, majd növénynevelő kamrában felszaporítottuk azokat. A következő évben szerettük volna ezeket a mutánsokat fény kezelni és a mutáció *CBF*-regulonra gyakorolt hatását qRT-PCR módszerrel megvizsgálni. Amennyiben a mutációnak szignifikáns hatása lett volna egy összehasonlító transzkriptom elemzést végeztünk volna RNAseq módszerrel a mutáns és a vad típuson. A kezelt növények fagyállóságát a már leírt módokon teszteltük volna. Az RNAseq módszerrel kapott eredményeket real-time PCR-rel validálhattuk volna és az esetlegesen talált fitokróm C függő fagyűrésben szerepet játszó gének szerepét, ha lehet *Arabidopsis* mutánsokban komplementációs kísérletekkel igazolhattuk volna.

A PhyC mutánsokkal végzett munka eredményeképpen kiderült, hogy a mutáns genotípus magasabb *CBF14* expressziót mutatott sötétben, 20 °C-on a kontrollként használt Kronos Spring vonalhoz képest, viszont egyik megvilágítással sem értünk el fokozottabb indukciót. A kontroll Kronos Springben hasonlóan a többi vizsgált genotípushoz a vörös és kék fények induktívnak bizonyultak. A 15 °C-os kezelésben a mutánsok és a kontroll hasonlóan viselkedett. A vörös és kék fény hatása összeadódott az alacsony hőmérsékletével és jelentősen fokozta a *CBF14* expresszióját. A mutánsok fitokróm expressziós eredményei alapján elmondhatjuk, hogy nagyon hasonlóan viselkedtek, mint a többi korábban vizsgált genotípus, sötétben megnövekedett expressziós szintet mutatott a *PHYA* és *PHYB* is, az alacsony hőmérséklet viszont eliminált minden különbséget a Kronos Spring és a mutáns között és fényre adott különböző válaszokat sem detektáltunk. Ezen „negatív” eredmények miatt,

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



valamint amiatt, hogy a mutáns genotípusokat sterilitásuk miatt nem sikerült felszaporítani, nem láttuk értelmét tovább kísérletek elvégzésének. Ehelyett a Nure genotípust távoli vörös kiegészítéses megvilágítás mellett 15 és 5 °C-ot is alkalmazva nem csak RNAseq analízisnek vetettük alá, hanem egy átfogó metabolomikai-, hormon- és lipidanalízisnek is. Természetesen megismételve a korábbi módon elvégzett fagyállóság vizsgálatot is. Mivel a fenti paraméterek megbízásos munkák során más-más laborokban kerültek lemérése, ezért szintézisük későbbre várható.

2. feladat: a *CBF* gének és a dormancia kapcsolatának vizsgálata fás szárú növényekben

A fás szárú növényekkel végzett munkák során a *CBF* gének és a dormancia kapcsolatát térképeztük fel.

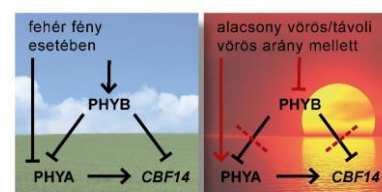
Az évek során a nyárfa (*Populus* sp.) és som (*Cornus* sp.) *CBF* génjeit azonosítottuk adatbázis és irodalom alapján és génexpressziós vizsgálatokhoz primereket tervezünk. Az esetleges összefüggést igyekeztük megtalálni a *CBF* expressziós szint, a dormancia és a fagyállóság között.

A 2017-es évben sikerült végül kiviteleznünk a két nyárfa hibriddel (Walker és Okanese) tervezett kísérleteket. A kísérlet során – a korábbi irodalmi adatokat megerősítve – az Okanese genotípusban elkezdődött a nyugalomba vonulás (30 nap után), míg a Walker genotípus esetében ezt nem tapasztaltuk. Összesen hat *CBF* gén expresszióját vizsgáltuk a folyamat háttérében, mind a levelekben, mind pedig a rügyekben. Ehhez beállítottunk egy, a laborunk számára új RNS izolálási technikát, amivel sikerrel vonhattuk ki a nukleinsavat a magas poli-fenol és mézga tartalmú rügyekből is. Az adatelemzés után nyilvánvaló vált, hogy az Okanese ökotípus esetében a dormancia kialakulásáért a *CBF* gének közül a *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* és *CBF6* lehet a felelős. Ám érdekes módon az utóbbi két gén a Walkerben is indukálódott a *CBF5* mellett, annak ellenére, hogy ez nem lehet összefüggésben a dormancia kialakulásával, hiszen a rügyfakadási teszt igazolta, hogy ebben a genotípusban nem alakult ki nyugalmi állapot a kezelés következtében. Eredményeink szerint tehát lehet a *CBF* géneknek szerepe a dormancia kialakulásában, és, ahogy más (akár egyszikű) fajoknál is, így a fás szárúakban is funkcionális polimorfizmus jellemzi a *CBF* géncsaládot. Ezen eredményeinket eddig csak előadás formájában kerültek bemutatásra a 11th International Plant Cold Hardiness Seminar (2018) című konferencián Madisonban (Wisconsin, USA) 2018.08.07-én. Az előadás címe: Investigation of the relationship between the dormancy and the *CBF* transcript level in poplar, de folyamatban van egy publikáció elkészítése is.

Plusz feladatok

Természetesen egy kutatás során mindig nyílik rengeteg új irány, így volt ez a mi esetünkben is. Korábbi kísérleteinkre alapozva elkezdtük a *CBF*-ek és a növényi hormonok kapcsolatának vizsgálatát. A *CBF*-regulon növényi hormonokon keresztül kifejtett hatása jelentősen determinálja a hideg alatti növekedést, így többek között a virágzás időpontját is. A *CBF*-ek és gibberellinek kapcsolatát már többen vizsgálták. A citokinin bioszintézis és a fitokróm jelátvitel kapcsolatát már szintén leírták, de feltételeztük, hogy több eddig nem ismert kapcsolódási pontot is feltérképezhetünk. Kalapos és mtsai. (2016) cikkében publikáltuk az erre vonatkozó vizsgálataink eredményét. A fagyűrő Cheyenne és a fagyérzékeny Chinese Spring kenyérbúza vonalak között 636 hideg hatásra különbözőképpen kifejeződő gént találtunk. A bioszintetikus útvonalak közül számos abszcizinsav-függő jelátviteli útvonal is különbözött a tanulmányozott genotípusok között. További hormon bioszintézissel kapcsolatos eredményeink kerültek leírásra Kalapos és mtsai. (2017) munkájában, ahol rámutattunk arra is, hogy a

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



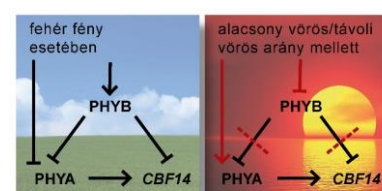
fagyűrő genotípusok levelében az abszcizinsav és citokinin szintek, és ezen hormonok bioszintetikus útvonalain elhelyezkedő gének expressziója is hasonlóan változott.

A gabonafélékben nem volt ismert a *CBF*-ek fénytől függő cirkadián szabályozása. Ezért, árpában megvizsgáltuk a *CBF*-ek és az őket szabályozó gének cirkadián és fényfüggő szabályozását is. Megállapítottuk, hogy a *CBF4*-filogenetikai csoportba tartozó géneknek van cirkadián ritmusa, és azt is, hogy az alacsony vörös/távoli vörös fény aránya befolyásolta a kalcium-függő jelátvitel és a foszfolipid szignáling, és a *TOC1* gének működését is. Eredményeink alapján elkészítettük az árpa *CBF* gének cirkadián szabályozásának a modelljét. A modell bemutatja, hogy a *CBF* gének regulációjában több jelátviteli rendszer is részt vesz a lipid-, illetve foszfolipid szignáling útvonalakon keresztül (Gierczik és mtsai. 2017).

Alkalmazott kutatás

A gabonanövényeken végzett kísérleteink során kiderült, hogy a változó spektrum nem csak a fagyállóságra hat, hanem befolyásolja a növények növekedését és a fotoszintézisük hatékonyságát is. Ezek a részeredmények arra utaltak, hogy a növények biomassza tömegét, illetve termésük mennyiségét befolyásolhatja az őket megvilágító fény spektruma. A hipotézisünk igazolása érdekében beállítottunk egy kísérletet, mely során LED világítással felszerelt növénynevelő kamrákban öt különböző fényspektrumon és változó fényintenzitás mellett neveltünk fel búza növényeket. A kísérlet eredménye igazolta feltételezésünket: a spektrum és fényintenzitás változásának függvényében a növénymagasság, kalászolási idő és a megtermelt búza termésmennyisége szintén változott. A búzaliszt minőségi paramétereinek a vizsgálata (fehérje, keményítő tartalom stb.) igazolta, hogy a beltartalmi értékek is szignifikánsan változnak, sikerült kiváló minőségű lisztet előállítani (Monostori és mtsai. 2018). Ez a kísérlet volt a kezdete az új innovációs kísérletsorozatnak (lásd a kutatás „hasznosítás” része a jelentésnek).

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása



KÖZLEMÉNYEK

- Gierczik, K., Novák, A., Ahres, M., Székely, A., Soltész, A., Boldizsár, Á., Gulyás, Z., Kalapos, B., Monostori, I., Kozma-Bognár, L., Galiba, G., Vágújfalvi, A. (2017) Circadian and Light Regulated Expression of CBFs and their Upstream Signalling Genes in Barley. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1828.
- Kalapos, B., Dobrev, P., Nagy, T., Vítámvás, P., Györgyey, J., Kocsy, G., Marincs, F., Galiba, G. (2016) Transcript and hormone analyses reveal the involvement of ABA-signalling, hormone crosstalk and genotype-specific biological processes in cold-shock response in wheat. *Plant Science* 253: 86–97.
- Kalapos, B., Novák, A., Dobrev, P., Vítámvás, P., Marincs, F., Galiba, G., Vanková, R. (2017) Effect of the Winter Wheat Cheyenne 5A Substituted Chromosome on Dynamics of Abscisic Acid and Cytokinins in Freezing-Sensitive Chinese Spring Genetic Background. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–12.
- Monostori, I., Heilmann, M., Kocsy, G., Rakszegi, M., Ahres, M., Altenbach, S.B., Szalai, G., Pál, M., Toldi, D., Simon-Sarkadi, L., Harnos, N., Galiba, G., Darko, É. (2018) LED Lighting – Modification of Growth, Metabolism, Yield and Flour Composition in Wheat by Spectral Quality and Intensity. *Frontiers in Plant Science* 9: 605.
- Novák, A. (2017) A *CBF14* gén fényminőségtől függő szabályozása, és szerepe a fagyűrész kialakulásában búzában és árpában. *University of Pannonia*
- Novák, A., Boldizsár, Á., Ádám, É., Kozma-Bognár, L., Majláth, I., Băga, 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.
- Novák, A., Boldizsár, Á., Gierczik, K., Vágújfalvi, A., Ádám, É., Kozma-Bognár, L., Galiba, G. (2017) Light and Temperature Signalling at the Level of *CBF14* Gene Expression in Wheat and Barley. *Plant Molecular Biology Reporter* 35: 399–408.

Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása

