

MOLEKULÁRIS MODELL A FAGYÁLLÓSÁG ÉS A VERNALIZÁCIÓS IGÉNY KÖLCSÖNHATÁSÁNAK ÉRTELMEZÉSÉRE

GALIBA GÁBOR^{1,2}, VÁGÚJFALVI ATTILA¹, CHENGXIA LI³, SOLTÉSZ
ALEXANDRA¹, VASHEGYI ILDIKÓ¹, LUIGI CATTIVELLI⁴ ÉS JORGE DUBCOVSKY³

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár, Magyarország; ²Pannon Egyetem, Veszprém, Magyarország; ³Department of Plant Sciences, University of California, Davis, USA; ⁴Experimental Institute for Cereal Research, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország

A megfelelő fagyállósággal rendelkező őszi búza – hosszabb tenyészideje miatt – 20-30 százalékkal többet terem a tavaszinál. A genetikailag meghatározott maximális fagyállóság eléréséhez szükséges a növények edződése, mely során bekövetkező élettani változások már régóta ismertek, azonban az e változások hátterében álló gének szabályozására csak az utóbbi években derült fény. A gabonafélék esetében a búza és az árpa vált a fagyállóság molekuláris szintű kutatásának modellnövényévé. A fagyállóságot döntően meghatározó *FR2* fagyállósági lókuszt, és a hideg-indukálható gének szabályozásában nagy szerepet játszó *CBF* transzkripciós faktorok felfedezése hozott áttörést ezen a kutatási területen. A virágzási idő szabályozása is fontos szerepet játszik a növények sikeres fagy- ill. télállóságában. A virágzás idejét nagymértékben meghatározó, a vernalizációs igényt döntően befolyásoló *VRN1* gén kulcsszerepet játszik abban, hogy a gabonafélék vegetatív fejlődési fázisban maradjanak a tél folyamán, és képesek legyenek a virágzásra tavasszal. Az általunk javasolt modell segítségével bemutatjuk azt, hogy a *VRN1* gén a hideg-indukálható gének, beleértve a *CBF* regulont, gátlásával hogyan befolyásolja a fagyállóságot.

Kulcsszavak: gabonafélék, fagyállóság, vernalizáció, *CBF* gének, génreguláció

MOLECULAR MODEL EXPLAINING THE RELATIONSHIP OF FROST TOLERANCE AND VERNALIZATION REQUIREMENT

GÁBOR GALIBA^{1,2}, ATTILA VÁGÚJFALVI¹, CHENGXIA LI³, ALEXANDRA
SOLTÉSZ¹, ILDIKÓ VASHEGYI¹, LUIGI CATTIVELLI³, JORGE DUBCOVSKY⁴

¹Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár, Hungary; ²Pannon University, Veszprém, Hungary; ³Department of Plant Sciences, University of California, Davis, USA; ⁴Experimental Institute for Cereal Research, Fiorenzuola d'Arda, Italy

Winter wheat varieties are planted in the fall and, if they have adequate tolerance to survive winter freezing temperatures, usually have higher yield potential than spring varieties planted later in the spring because of their longer growing period. To reach their full capacity the frost tolerance plants must undergo a period, called cold hardening. The physiological changes happen during the hardening period have been known for long, however the gene regulatory mechanisms stands behind these alterations have been cleared just recently. Among cereals, wheat and barley became the model plants for the study of frost tolerance at molecular level. The breakthroughs on this subject were the discovery of the main frost tolerance gene *FR2*, and the description of the *CBF* genes, which are known regulators for many cold inducible genes. The precise control of flowering is also a crucial

point in the development of frost tolerance. *VRNI* gene is one of the main regulators for the timing of flowering. This gene ensures that cereal plants remain in vegetative phase in winter, and ensures the exact time of flowering in spring. Our proposed model describes the way the *VRNI* gene influences the frost tolerance by inhibition of cold inducible genes, among them the *CBF* regulon.

Key words: cereals, frost tolerance, vernalization, *CBF* genes, gene regulation

Bevezetés

Magyarországon a többlettermés várható realizálása érdekében 100%-ban őszi búzát termelnek. Az ősszel vetett gabonafélék terméseredményét a téli fagynak való kitettség miatt az időjárás döntően befolyásolhatja, ezért a termésbiztonság növelése érdekében a fagyállóságra való nemesítésnek nagy hagyománya van a martonvásári kutatóintézetben. A növénynemesítő kétféle stratégiát, illetve ezek kombinációját választhatja abból a célból, hogy az általa előállított fajták minél kevésbé sérüljenek az extrém klimatikus viszonyok következtében, és ezáltal javuljon a termésstabilitás: 1) A stressz-adaptáció szempontjából legérzékenyebb életciklus, a virágzás időzítésének befolyásolása. 2) Azoknak a géneknek az azonosítása és felhasználása, melyek növelik a növények stressz-toleranciáját. E két kérdéskörben végzett kutatások eredményeiről, azok összefüggéseiről számolunk be.

Eredmények

A gabonafélék virágzásának ideje három különböző géncsalád kontrollja alatt áll: vernalizációs igényt meghatározó gének (*VRN*), a fotoperiódusos (nappalhossz) érzékenységet befolyásoló gének (*PPD*) és a koraiság gének (*EPS*). Azok a gének, melyek a vernalizációra való érzékenységet befolyásolják határozzák meg egy adott fajta őszi, illetve tavaszi jellegét (*Karsai et al. 2005*). Az őszi búzáknak a virágzás (kalászosítás) érdekében szükségük van egy hosszú 6-10 hetes hideg periódusra, melynek a hőmérséklete 0°C és 8°C között ingadozhat. A tavaszi búzáknak nincs szükségük vernalizációra, vagy csak gyengén reagálnak rá (például hamarabb virágoznak). A vernalizációs igényt döntően a *VRNI* gén határozza meg, mely gén a hajtáscsúcs fejlődését befolyásolja; szabályozásában a hőmérséklet mellett a nappalhossz játszik fontos szerepet. Magát a gént a búza és az árpa 5-ös kromoszómájának hosszú karján ortológ pozícióban egy fagyállósági génlókusz az *FRI* (*Frost Resistance 1*) közelébe térképezték (*Hayes et al. 1993, Galiba et al. 1995*).

Az 5-ös kromoszóma hosszú karján az *FRI* géntől a centromer irányában több, mint 30 cM távolságra lévő másik fagyállóságot befolyásoló génlókusz az *FR2* létezésére csak az utóbbi néhány évben derült fény. A fagyállóságban betöltött fontos szerepét igazolták kenyérbúzában (*Vágújfalvi et al. 2005*), alakorban (*Vágújfalvi et al. 2003*) és árpában is (*Francia et al. 2004*).

A növényeknek a fagy stressz kivédéséhez szükségük van egy hosszabb ideig tartó, alacsony hőmérsékletű növekedési időszakra, az edződés időszakra.

Ennek során olyan élettani, biokémiai változások történnek, melyek segítik a kedvezőtlen hatások kivédését. E változások mögött a gének összehangolt működése áll, mely koordinációban kiemelkedő szerepük van a más gének expresszióját (így jó néhány hideg-indukálható génét is) szabályozó transzkripció faktoroknak.

A fagyállóság és a hideg-indukálható gének expressziója közötti pozitív összefüggést az *FR2* génlókuszhoz kapcsolódó eredményeink ismertetésével mutatjuk be. Alakorral (*Triticum monococcum* L., $2n=2x = 14$) végzett kísérleteink bizonyították, hogy az *FR2* fagyállósági lókuszt szabályozza két hideg-indukálható gén, a *COR14b* és a *WCS120* expresszióját (Knox et al. 2008). Ismert, hogy e génekről átíródó fehérjék a fagy okozta sérülések kivédésében játszanak szerepet. Az *FR2* gén lókuszában *CBF* transzkripció faktor gének találhatók. A *CBF* és a hideg-indukálható *COR* gének funkcionális kapcsolatát, és szerepüket a fagyűrészben, lúdfűben (*Arabidopsis*) már korábban igazolták (Thomashow, 2001). Alakor térképezési populáció analízisével kimutattuk, hogy az *FR2* génlókuszt 11 *CBF* gén található (Miller et al. 2006) és, hogy e gének közül a *CBF12*, a *CBF14* és a *CBF15* a legfontosabb a fagyállóság növelése szempontjából (Knox et al. 2008). Kenyérbúzában végzett génextpressziós kísérleteink a *CBF14* és a *CBF15* gének szerepét igazolták (Vágújfalvi et al. 2005). Egyértelmű összefüggést mutattunk tehát ki a fagyállóság, a hideg-indukálható gének expressziója, és az azokat szabályozó *CBF* regulátorok között.

Ahhoz, hogy a növények elérjék a genetikailag kódolt maximális fagyállóságuk mértékét több hetes hideg-edződési periódusra van szükség. A különböző gabona félék edződését eltérő nappalhossz illetve hőmérséklet indukálja; nyilvánvaló előnyt jelent egy korábbi adaptációs kezdet, hiszen ily módon több idő van, hogy mindazok a változások végbe menjenek a növényben, melyek szükségesek a maximális tolerancia szint kialakulásához. A fagyálló genotípusokban hamarabb kezdődik, és már viszonylag magas hőmérsékleten (+15°C) az edződés folyamata. Az edződés kezdetét a nappalhosszúság és a környezet hőmérséklete határozza meg. Pozitív összefüggést mutattak ki ezen indukciós küszöbhőmérséklet és a fagyállóság mértéke között kenyérbúza, árpa és rozs genotípusok esetében (Fowler 2008). Különböző fagyállóságú búza genotípusok összehasonlításával igazoltuk, hogy a fagyállóbb genotípusoknak rövidebb hideg periódus is elég a fagyállóságuk maximumának eléréséhez, és az hosszabb ideig fennmarad, továbbá azt is, hogy ennek a különbségnek genetikai hátterében az *FR2* lókuszt áll (Vágújfalvi et al. 1999, Galiba et al. 2009). Az összefüggés alátámasztásához molekuláris bizonyítékokkal is rendelkezünk: alakorban igazoltuk, hogy azokban a genotípusokban, amelyekben az *FR2* gén fagyálló allélje található a *CBF12*, *CBF14* és *CBF15* gének indukciója már magasabb hőmérsékleten (12-15°C) is beindul, míg ezen a hőmérsékleten a fagyérzékeny allélt hordozó genotípusokban nincs expresszió (Knox et al. 2008).

Az *FR2* lókuszt szerepet játszik tehát a hidegedződés kezdetének és az indukciós küszöbhőmérsékletnek a meghatározásában is. A növények fagyállósága, bármeddig tartson is az edződés periódusa, természetes

körülmények között egy idő után lecsökken, majd megszűnik. Ennek a változásnak a háttérében azonban nem az *FR2*, hanem a *VRN1* gén működése áll. Búzában igazolták (Limin et al. 2006), hogy a fagyállóság csak addig marad fent, amíg a növények vegetatív fázisban vannak. A vegetatív – generatív átmenet során nagymértékben csökken a fagytolerancia; a generatív fázisú növényeknek pedig gyakorlatilag nincs fagyűrésük. A *VRN1* gén egy MADS box proteint kódol, működése a hajtáscsúcs állapotát befolyásolja, a gén expressziója a vegetatív – generatív átmenet során indukálódik, ezt az indukciót (a *VRN2* és a *VRN3* géneken működésén keresztül) az alacsony hőmérséklet mellett a nappalok hosszabbodása váltja ki. Egyértelműen negatív összefüggést mutattak ki a *VRN1* gén expressziójának mértéke és a hideg-indukálható gének megnyilvánulása között alacsony hőmérsékleti stressz során (Kobayashi et al. 2005). Negatív korrelációt mutattak ki a *VRN1* gén és a *CBF* gének expressziója között is specifikus árpa és búza genetikai anyagok (izogén, ill. DH vonalak) tanulmányozásával (Badawi et al. 2007, Stockinger et al. 2007). Mindez arra utal tehát, hogy a *VRN1* gén valamely módon gátolja a hideg-adaptációban szerepet játszó *COR* és *CBF* gének megnyilvánulását, és végsősorban a hideg-adaptációt.

Következtetések

Hogyan különböztetik meg, miért adnak különböző választ a gabonafélék az őszi és a tavaszi alacsony-hőmérsékleteti stresszre? Mi szabályozza azt, hogy az őszi hideg a fagyállóság kialakulásához vezet, míg a tavaszi nem? Erre a kérdésre az eddig ismertetett eredmények alapján felállított modellünkkel adunk választ Galiba et al. (2009). Késő ősszel, koratélien, amikor a hőmérséklet alacsony, a rövid nappalhossz miatt a *VRN1* gén nem nyilvánul meg, nem gátolja a hideg-edződés kialakulását elősegítő gének (a szabályozó *CBF*, a hideg-indukálható *COR* és más gének) expresszióját. Tavasszal, még az ősziével azonos alacsony hőmérséklet esetén is, a fényperiódus hosszabbodásával aktiválódik a *VRN1* gén; ez (direkt, vagy ami valószínűbb: indirekt módon) gátolja a *CBF* és *COR* gének működését, nem alakul ki edzettség. A *VRN1* gén működésének eredményeként megtörténik a hajtáscsúcs generatív átalakulása, és ebben a fázisban már – az előbb ismertettek alapján – nem alakulhat ki fagytolerancia.

Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat a „Nap-Bio-2005” Német – Magyar konzorciális szerződés (OMFB-00515/2007) és K 68894 sz. OTKA pályázat támogatta. Köszönjük az AGRISAFE 203288 sz. EU7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatását is.

Irodalom

Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M., Sarhan, F. (2007): The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*, *Molecular Genetics and Genomics*, **277**: 533–554.

- Fowler, D.B. (2008) Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Sciences* **48**: 1147-1154.
- 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**: 670–680.
- Galiba G., Quarrie, S.A., Sutka, J., Morgounov, A., Snape, J.W. (1995): RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**: 1174-1179.
- Hayes, P.M., Blake, T., Chen, T.H.H., Tragoonrung, S., Chen, F., Pan, A., Liu, B. (1993) Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winterhardiness. *Genome*, **36**: 66-71.
- Karsai, I., Szűcs, P., Mészáros, K., Filichkina T., Hayes, P.M., Skinner, J.S., Láng, L., Bedő, Z. (2005) The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative x winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 1458–1466.
- Knox, A.K., Li, C., Vágújfalvi, A., Galiba, G., Stockinger, E.J., Dubcovsky, J. (2008): Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus *Fr-Am²* in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology*, **67**: 257–270.
- Kobayashi, F., Takumi, S., Kume, S., Ishibashi, M., Ohno, R., Murai, K., Nakamura, C. (2005): Regulation by *Vrn-1/Fr-1* chromosomal intervals of *CBF*-mediated *Cor/Lea* gene expression and freezing tolerance in common wheat. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 887–895.
- Limin, A.E., Fowler, D.B. (2006): Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* **224**: 360–366.
- Miller, A.K., Galiba, G., Dubcovsky, J. (2006): A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-Am²* in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*, **275**: 193–203.
- Stockinger, E.J., Skinner, J.S., Gardner, K.G., Francia, E., 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*, *Plant Journal* **51**: 308–321.
- Thomashow, M.F. (2001): So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, **125**: 89-93.
- Vágújfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., Sutka J. (1999): Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Science*, **144** 85–92.
- Vágújfalvi, A., Galiba, G., Cattivelli, L., Dubcovsky, J. (2003): The cold regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance gene *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Molecular Genetics and Genomics*, **269**: 60–67.
- Vágújfalvi, A., Aprile, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G., 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.