

AZ ALACSONY HŐMÉRSÉKLET HATÁSÁRA BEKÖVETKEZŐ REDOX ÉS GÉNEXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK GABONAFÉLÉKBEN

KOCSY GÁBOR, VÁGÚJFALVI ATTILA, TÓTH BALÁZS, SZALAI GABRIELLA,
SOLTÉSZ ALEXANDRA, KELLŐS TIBOR, VASHEGYI ILDIKÓ, SZILÁGYI VIRÁG,
SUTKA JÓZSEF ÉS GALIBA GÁBOR

Genetika és Növényélettan Osztály

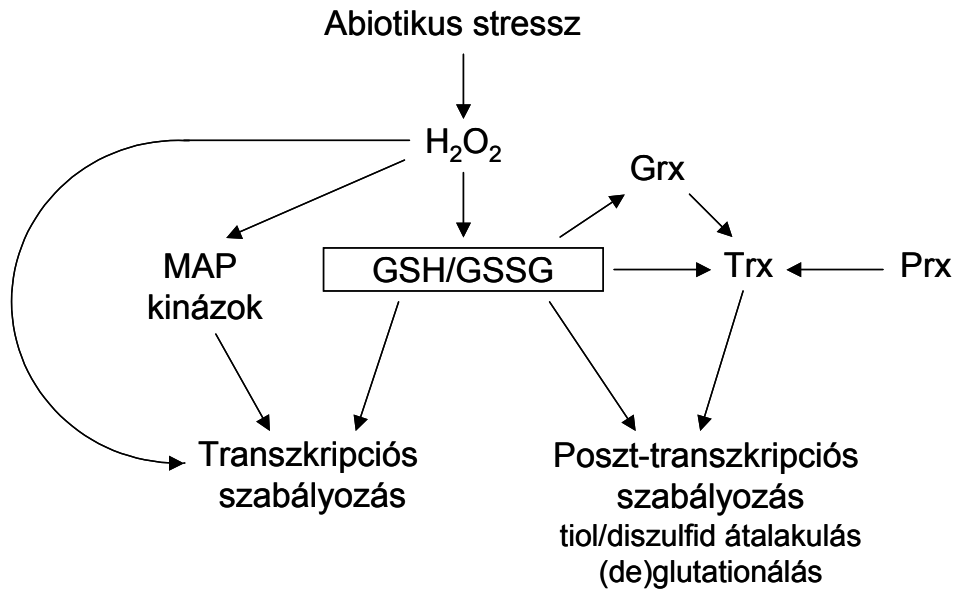
Bevezetés

A termesztett növények várható termés hozamát és így az élelmiszeripar megbízható nyersanyagellátását is nagymértékben befolyásolják az abiotikus környezeti stresszhatások, melyek akár 60% termés kiesést is okozhatnak. A hirtelen bekövetkező nagy hőingadozások miatt nagyon fontos az őszi kalászos gabonafélék fagyállóságának és a kukorica hidegtűrésének a növelése. Osztályunkon az elmúlt 10 évben tanulmányoztuk az alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező redox változásokat, és bizonyítottuk a glutation fontos szerepét a búza és a kukorica védekezésében. Térképeztük a fagyűrési és a vernalizációs géneket búzában. Részletesen vizsgáltuk a CBF transzkripciós faktorok fagyűrésben betöltött szerepét. Funkcionális genomikai vizsgálatokat végeztünk a búza fagyűrését befolyásoló további gének azonosítása céljából.

Redox változások

Az alacsony hőmérséklet következtében, más abiotikus stresszhatásokhoz hasonlóan, felhalmozódnak a reaktív oxigénszármazékok, és így oxidatív stressz alakul ki a növényben (Szalai és mtsai, 2009). Kutatásaink során igazoltuk, hogy a reaktív oxigénszármazékok felhalmozódásával párhuzamosan számos antioxidáns enzim aktivitása és nem enzimikus antioxidáns mennyisége változott meg, jelezve a védekező rendszer aktiválódását (Szalai és mtsai, 2009). A H₂O₂ elbontásában és a sejt redox egyensúlyának fenntartásában részt vevő glutation (1. ábra) stresszválaszban betöltött szerepét eltérő stressztűrési genotípusok összehasonlításával, valamint a vegyület koncentrációjának vegyszeres manipulációjával bizonyítottuk (Kocsy és mtsai, 2001). A glutation redox állapotának változásai szintén összefüggést mutattak a stresszérzékenységgel, mely jelzi a redox szabályozás fontosságát a stresszválaszban (Szalai és mtsai, 2009). Az alacsony hőmérsékleti stressz során a glutation redox állapotára hatással vannak a különböző növényi szabályozóanyagok (Szalai és mtsai, 2009), ahogy ezt a szalicilsavas és abszcizinsavas kezeléssel kukoricában kimutattuk (Kellős és mtsai, 2008). Az

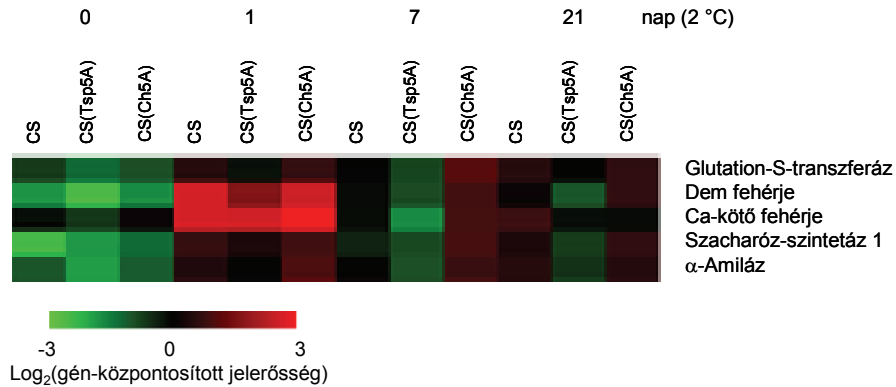
antioxidánsok tanulmányozása mellett a szabad aminosavak és poliaminok koncentrációját is nyomon követtük a búza hidegedzése alatt. Ennek során eltérő stressztűrésű genotípusok összehasonlításával be tudtuk bizonyítani ezek stressztűrésben betöltött szerepét.



1. ábra. Általános modell a GSH/GSSG redoxpár jelátvitelben történő részvételére. A glutation transzkripció és poszt-transzkripció szinten egyaránt, közvetlenül vagy közvetve, más redox rendszerekkel kölcsönhatásban, kifejezheti szabályozó szerepét. Grx: glutaredoxin, GSH: glutation, GSSG: glutation diszulfid, MAP kinázok: mitogén-aktivált protein kinázok, Prx: peroxiredoxin, Trx: tioredoxin (Szalai és mtsai, 2009).

Transzkripció elemzés

A növények stresszválaszát nemcsak az anyagcseretermékek, hanem a génexpresszió szintjén is tanulmányoztuk. Mivel a búza 5A kromoszómája fontos szerepet játszik a fagyűrésben, eltérő fagyűrésű 5A kromoszóma szubsztitúciós vonalak hidegedzés során bekövetkező transzkripció mintázatát hasonlítottuk össze a fagyűrésben szerepet játszó gének kiválasztása céljából (Kocsy és mtsai, 2008). Elkezdtek több olyan gén részletes jellemzését, melyek kifejeződése eltért a hidegkezelés során a fagyűrő és érzékeny vonalakban, és ezért szerepet játszhatnak a fagyűrés növelésében (2. ábra). Érdekesnek tűnik egy Ca-kötő fehérjét kódoló gén hideg hatására bekövetkező gyors átmeneti indukciója, mely kétszer akkora volt a toleráns genotípusban, mint az érzékenyben. Ez a fehérje



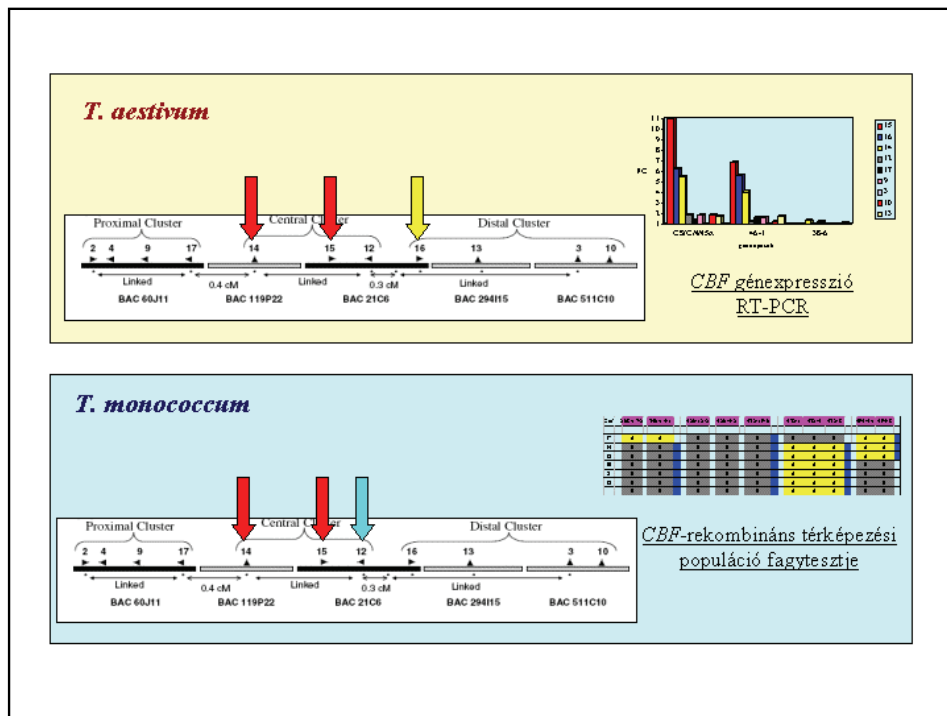
2. ábra. A hidegedzés és az 5A kromoszóma hatása néhány gén kifejeződésére búzában. CS: Chinese Spring – mérsékelten fagyérzékes, CS(Tsp5A): Chinese Spring (*Triticum spelta* 5A) – fagyérzékes, CS(Ch5A): Chinese Spring (Cheyenne 5A) – fagytüdő.

fontos szerepet tölthet be a hidegedződést kiváltó jelátviteli útban. Ezen kívül hasonló változásokat mutatott egy olyan fehérje (Dem) génje is, mely a merisztéma és embriófejlődésben játszik szerepet, és így részt vehet a vegetatív/generatív átmenetben. E gént az 5A kromoszómán lévő, a vegetatív/generatív átmenetet indukáló vernalizációs gének szabályozhatják, melyek megakadályozzák az áttelelő növények alacsony hőmérsékletre érzékeny reproduktív szerveinek a téli időszakban történő kifejlődését (Galiba és mtsai, 2009). A növényélettani és funkcionális genomikai módszereket kombinálva jelentős új ismereteket szerezhetünk a növények abiotikus stresszekre adott válaszáról.

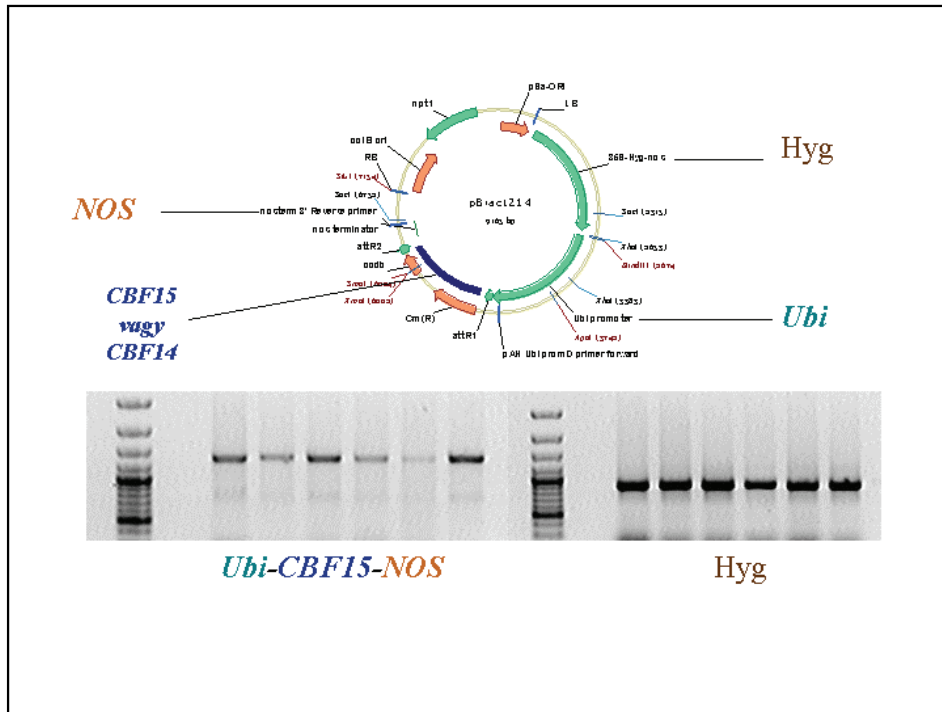
A gabonafélék fagyállóságának molekuláris magyarázata – a *CBF* gének szerepe

A gabonafélék abiotikus stressz-toleranciájának genetikai kontrolljában kiemelkedő szerepe az 5-ös (5A, 5B, 5D és 5H) kromoszómáknak van (Francia és mtsai, 2004, Tóth és mtsai, 2003). Kenyérbúzában (*Triticum aestivum*) bizonyítottuk, hogy az 5A kromoszóma hosszúkarján egy fagyállósági gén, az *Fr-A1* lokalizált; itt található olyan effektor gének (abszcizinsav-, szénhidrát-akkumuláció, stb.) is, amelyek a fagykár direkt kivédésében játszanak szerepet. Alakorban (*Triticum monococcum*) végzett kutatásainkkal igazoltuk, hogy e kromoszómán fontos szabályozó gének – a *CBF* gének – is lokalizálhatók. A *CBF* gének expressziója és a fagyállóság közötti összefüggést elsőként *Arabidopsis*-ban (lúdfű) bizonyították: egyértelmű összefüggést mutattak ki egy hideg-indukálható gén, a *COR15a* expressziója és a fagyállóság között. Igazolták azt is, hogy a hideg-indukálható *COR* gének szabályozásában a *CBF* transzkripció faktoroknak van kiemelkedő szerepük: a *CBF1* gén túlvezérlésével a *COR* gének indukcióját, ezzel együtt a fagyállóság növekedését igazolták lúdfűben. Kutatásaink során alakorban igazoltuk, hogy egy hideg-

indukálható gén, a *COR14b* expressziójáért felelős gén lókusza (Vágújfalvi és mtsai, 2000), egy újonnan azonosított fagyállósági gén lókusza, az *Fr-A2*, és egy *CBF* gén azonos helyre térképeződik az 5A kromoszóma hosszúkarján (Vágújfalvi és mtsai, 2003). Ezen eredmények alapján elsőként tettünk javaslatot egy fagyállósági gén jelölt génjére, egy *CBF* génre. A későbbiek során egy újonnan előállított finom-térképezési populáció analízisével a *CBF* géncsalád 11 génjét térképeztük az alakor fő fagyállósági QTL-jének (*Fr-A2*) megfelelő pozícióba (3. ábra) (Miller és mtsai, 2006). Megállapítottuk, hogy ezek a gének szorosan kapcsolatosak, mintegy 0,8 cM-os régióban lokalizáltak. Egy újabb, e szűk régióban rekombináns egyedekből álló térképezési populáció fitotroni fagytesztje azt az eredményt mutatta, hogy 3 *CBF* gén (*CBF12*, *CBF14*, *CBF15*) az, amelyek az alakor fagyállóságának kialakításához hozzájárul (Knox és mtsai, 2008). Kenyérbúzában szubsztitúciós és rekombináns vonalakon végzett génexpressziós kísérleteinkkel (Northern analízis, Real Time RT-PCR) bizonyítottuk, hogy a *CBF* géncsaládból 3 gén (*CBF14*, *CBF15*, *CBF16*) expressziója korrelál a fagyállóság mértékével. Igazoltuk azt is, hogy e gének kenyérbúzában is az *Fr-A2* gén pozíciójába térképeződnek (Vágújfalvi és mtsai, 2005).



3. ábra. A *CBF* gének térképezése, kifejeződésük és fagytüresben betöltött szerepük vizsgálata kenyérbúzában és alakorban.



4. ábra. Árpa transzformációja a fagyűrészben szerepet játszó búza *CBF14* és *CBF15* génekkel. Az *Agrobacterium*-os transzformációhoz használt konstrukció térképe, valamint a *CBF15* és a szelektációs markerként használt higromicin gén jelenlétének ellenőrzése a transzformáns jelöltekben.

Mivel két független – eltérő fajon (kenyérbúza és alakor), és eltérő metodikával (expressziós vizsgálatok és rekombináns vonalak fagytesztje) – végzett kísérlet is két gén, a *CBF14* és *CBF15* szerepét igazolta, ezért kutatásainkat e gének szerepének direkt igazolásával, azok transzformálásával folytattuk. Minthogy a kísérletek további két gén (*CBF12* és *CBF16*) szerepét is valószínűsítették, ezért ezeket a géneket is bevontuk a transzformációs munkákba.: A géneket lúdfübe, kenyérbúzába és árpába jutattuk be (4. ábra). A ”virágzat merítés” módszerét használtuk a lúdfü növények transzformálására, búzát génbelövéses, míg árpát *Agrobacterium*-közvetítette módszerrel transzformáltunk. Célunk a transzformánsok megnövekedett abiotikus stressztoleranciájának igazolása, melyet különböző, elsősorban élettani paramétereket vizsgáló tesztekkel kívánunk bizonyítani. Ennek során vizsgáljuk a transzformánsok szárazság, illetve ozmotikus stressztűrését, fagytoleranciáját.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a GVOP-3.11-2004-05-0441/3.1, az NKFP OM 0018, az OTKA K67906, az OTKA K75528, a Német-Magyar Plant Resource Phase I Nap-Bio, és az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázatok támogatták.

Megjelent publikációk

- 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., Vágújfalvi, A., Li, C. X., Soltész, A., Dubcovsky, J. (2009): Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science*, **176**, 12–19.
- Kellős, T., Timár, I., Szilágyi, V., Szalai, G., Galiba, G., Kocsy, G. (2008): Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biology*, **10**, 563–572.
- 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-A^m2* in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology*, **67**, 257–270.
- Kocsy, G., von Ballmoos, P., Rügsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. (2001): Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiology*, **127**, 1147–1156.
- Kocsy, G., Kellős, T., Stein, N., Galiba, G. (2008): Effect of chromosome 5A on gene expression during cold hardening in wheat. *Acta Biologica Szegediensis*, **52**, 73–74.
- Miller, A., Galiba, G., Dubcovsky, J. (2006): A cluster of 11 *Cbf* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A^m2* in *Triticum monococcum*. *Molecular General Genomics*, **275**, 193–203.
- Szalai, G., Kellős, T., Galiba, G., Kocsy, G. (2009): Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants subjected to abiotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 66–80.
- Tóth, B., Galiba, G., Fehér, E., Sutka J., Snape, J. W. (2003): Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 509–514.
- Vágújfalvi, A., Crosatti, C., Galiba, G., Dubcovsky, J., Cattivelli L. (2000): Two loci on wheat chromosome 5A regulate the differential cold-dependent expression of the *Cor14b* gene in frost tolerant and sensitive genotypes, *Molecular General Genetics*, **263**, 194–200.
- Vágújfalvi, A., Galiba, G., Cattivelli, L., Dubcovsky, J. (2003): The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Molecular General Genomics*, **269**, 60–67.
- Vágújfalvi, A., Aprile, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, J., Galiba, G., Cattivelli, L. (2005): The expression of several *Cbf* genes at the *Fr-A2* locus is linked to frost resistance in wheat. *Molecular General Genomics*, **274**, 506–514.