DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

GIERCZIK KRISZTIÁN GYÖRGY

KESZTHELY

2021.

SZENT ISTVÁN EGYETEM
GEORGIKON KAR
FESTETICS DOKTORI ISKOLA
KESZTHELY

A foszfolipid-CBF jelátviteli út szabályozásának vizsgálata árpa modellnövényben

Gierczik Krisztián György

Témavezetők

Prof. Galiba Gábor

Dr. Vágújfalvi Attila

ATK MGI
MEZŐGAZDASÁGI INTÉZET

Martonvásár

2021.

A doktori iskola

megnevezése: Festetics Doktori Iskola

tudományága: Környezettudományok

vezetője: Prof. Anda Angéla
Egyetemi tanár, DSc
Szent István Egyetem, Georgikon Kar
Meteorológia és Vízgazdálkodás Tanszék

Témavezető: Prof. Galiba Gábor
tudományos osztályvezető, DSc
Agrártudományi Kutatóközpont MGI
Növényi Molekuláris Biológia Osztály

Témavezető: Dr. Vágújfalvi Attila
tudományos főmunkatárs, PhD
Agrártudományi Kutatóközpont MGI
Növényi Molekuláris Biológia Osztály

……	……	……
Prof. Anda Angéla jóváhagyása	Prof. Galiba Gábor jóváhagyása	Dr. Vágújfalvi Attila jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

Előrejelzések alapján 2050-re a Föld lakossága a jelenlegi 7,7 milliárdról körülbelül 9 milliárdra növekszik, míg élelmiszerszükséglete 85%-kal lesz több (Raza et al., 2019). Elkerülhetetlen lesz tehát a kultúrnövények éves termésmennyiségének folyamatos növelése. A gabonafélék a Föld legelterjedtebb és legrégebben termesztett növényfajai közé tartoznak, élelmiszer alapanyagként betöltött szerepük kiemelkedik a többi haszonnövény közül. Néhány fejlődő országban szinte csak a búza, a kukorica vagy a rizs teszi ki az ott élő emberek teljes étrendjét – termesztésük tehát nélkülözhetetlen, és a termésbiztonság növelése jelentős gazdasági megtakarítást eredményezhet.

A növények abiotikus stressztűrő képessége komplex folyamatok eredménye, melyek részletes ismerete kulcsfontosságú a magasabb termésbiztonság elérése érdekében. Az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében működő Növényi Molekuláris Biológia Osztály dolgozói évtizedek óta vizsgálják a gabonafélék környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodását és annak molekuláris hátterét, melynek során kiemelten foglalkoznak az alacsony hőmérsékleti stressztolerancia kialakításáért felelős jelátviteli folyamatokkal.

Kutatásaink során a fagytűrés kialakításáért felelős jelátviteli folyamatok közül a „foszfolipid jelátvitel → Ca^{2+} jelátvitel → CBF transzkripciós faktorok” útvonalat, valamint rájuk ható molekuláris szabályozó mechanizmusokat tanulmányoztuk.

Kutatócsoportunk egyik fő érdeklődési területe a gabonafélék alacsony hőmérsékleti stressztoleranciáját kialakító molekuláris mechanizmusok vizsgálata. Munkánk során a hidegstressz ellenni védelem egyik fő komponensét,

a CBF (C-ismétlődés kötő faktor) transzkripciós faktorokat kódoló géncsaládot, valamint a rájuk ható szabályozó mechanizmusokat vizsgáltuk. A Ca^{2+} jelátviteli útvonal és a CBF transzkripciós faktorok közötti kapcsolatot *Arabidopsis* modellnövényben bizonyították először: ennek során kimutatták, hogy a CAMTA3 (kalmodulin-kötő transzkripciós aktivátor 3) képes szabályozni az *AtCBF2* gén működését (Doherty et al., 2009); így bizonyították a kalmodulinok – és ezáltal a Ca^{2+} jelátviteli útvonal – hidegtűrésben betöltött szerepét. A Ca^{2+} mint másodlagos hírvivő felszabadításáért – részben – a foszfolipid jelátviteli útvonal felelős, azonban mindezidáig csak kevés tanulmány foglalkozott a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti génjeinek (*PITP* és *PI4K*) stressztűrésben betöltött szerepével. A Ca^{2+} stressztűrésben betöltött kiemelkedő szerepe már régóta ismert; több növényfaj esetében is vizsgálták már a hidegtűrés kialakításában játszott szerepét.

Az alacsony hőmérséklet mellett a fény mint környezeti faktor is befolyásolja a *CBF* gének expresszióját: a fotoperiódus hossza mellett a fény intenzitása és a spektrális összetétele is hatással van a kifejeződésükre. A vörös és a távoli-vörös fény elnyeléséért a fitokrómok a felelősek. E fotoreceptorokkal a PIF transzkripciós faktorok képesek kapcsolatot kialakítani, melyek így játszanak fontos szerepet a különböző jelátviteli útvonalak szabályozásában. A *PIF* gének transzkripciós faktorokat kódolnak, fontos szabályozó szerepük van a biotikus és abiotikus stressz indukált jelátviteli útvonalakban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Az árpa *CBF* gének filogenetikai alcsoportok szerinti cirkadián kifejeződésének, valamint az alacsony vörös/távoli-vörös arányú spektrum génexpressziós mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- Annak vizsgálata, hogy a *HvCBF* génekre ható Ca^{2+}, valamint a foszfolipid jelátviteli útvonalak mely elemeinek expressziója mutat cirkadián ritmust, illetve mely komponens(ek)re van az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénynek hatása.
- A foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti lépéseit kódoló két gén, a *HvPITP* és *HvPI4K* gének szerepének tanulmányozása az árpa abiotikus stressztoleranciájának kialakításában, transzgénikus növények analízisével.
- A vörös és távoli-vörös tartományában elnyelő fitokróm fehérjékkel kapcsolatot kialakító PIF transzkripciós faktorok *in silico* azonosítása, tagjainak filogenetikai csoportosítása, valamint eddig nem azonosított, fitokróm kötőhelyeket kódoló *HvPIF* szekvenciák identifikálása.

3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

3.1 Cirkadián ritmus vizsgálata árpában

A tanulmányozandó gének cirkadián ritmusának vizsgálataihoz az árpa (*Hordeum vulgare* spp. *vulgare*) egy kiemelkedő fagytűrésű őszi genotípusát, a Nure-t (Genomics Research Centre, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország) vontuk be a kísérleteinkbe. Standard csíráztatást követően a növényeket hét napon keresztül Conviron PGV36 (Controlled Environments Inc.) típusú klímakamrában, 12 órás megvilágítás mellett, 20/17°C (nappali/éjszakai hőmérséklet) hőmérsékleten, 70-75%-os relatív páratartalomban neveltük tovább faládákban. A növénynevelő kamrában beállított 250 µmol $m^{-2}s^{-1}$ fényintezitást fluoreszcens fénycsövek (Sylvania 215 W F96 T12) biztosították. Ezt követően a növénynevelő kamra hőmérséklete folyamatos 22/22°C-ra módosult, azonban a többi környezeti paraméter nem változott. E periódus öt napig tartott, melynek végére a növények a Z13-as fejlettségi állapotot érték el (Zadoks et al., 1974), amikor is a faládákat a fénykezeléshez két részre osztottuk el a kamrán belül. A növények fele továbbra is a fluoreszcens fénycsövek által kibocsátott fehér fény alatt nevelkedett tovább, melynek összetétele megegyezett az előnevelés során alkalmazott spektrummal, viszont a második csoport a fehér fény mellett távoli-vörös fénykiegészítést kapott. A két csoport közé fényvisszaverő fóliát helyeztünk el, megakadályozva ezzel az esetleges fényszennyezést.

A fehér fény mellett a távoli-vörös fénykiegészítést 735 nm hullámhosszon emittáló 3 W LED panelek (Shenzhen Justar Electronic Technology Co., Ltd., Kína) biztosították tizenegy napon keresztül. A fénykezelés a

vörös/távoli-vörös fény arányát 0,4 - 0,5-re csökkentette, míg más környezeti paraméterek nem változtak.

A fénykezelés megkezdése utáni nyolcadik napon, közvetlenül a fény bekapcsolása után kezdtük meg a levélminták begyűjtését génexpressziós vizsgálatokhoz. A mintasorozat előállításához 4 napon keresztül, 4 óránként történt mintavételezés. Az első és a második mintavételi napon továbbra is 12 órás megvilágítást kaptak a növények, azonban a harmadik és a negyedik napon folyamatos fény alatt neveltük őket tovább.

3.2 *HvPITP* és *HvPI4K* génfunkciós vizsgálatok transzgénikus növények felhasználásával

Kutatócsoportunk korábbi munkája során pBract214-*Hv*PITP és pBract214-*Hv*PI4K konstrukciókat *Agrobacterium tumefaciens* segítségével jutatták be az árpa egy tavaszi genotípusába, a Golden Promise fajtából izolált éretlen embriókba, mely során 15 független *HvPITP* (foszfatidilinozitol transzfer fehérje) és 13 független *HvPI4K* (foszfatidilinozitol 4-kináz) túltermelő egyedet hoztak létre. Munkánk során a transzgénikus növények morfológiai jellemzése során megvizsgáltuk a hajtáscsúcs fejlődési ütemét, meghatároztuk a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét, valamint elvégeztük az egyedek fenotipizálását (kalászolási- és virágzási idő, teljes növénymagasság, elszáradás utáni biomassza tömeg, főkalászok hossza, tömege, szemszáma, növényenkénti összes szemszám, összes szemtömeg, mellékkalászok száma, ezermagtömeg) is.

A transzgének fagytűrésre gyakorolt hatását két típusú kísérletben vizsgáltuk. Az egyiknél a fagyasztási hőmérséklet (-6°C) beállta előtt hidegedzési periódust

alkalmaztunk (14 nap, 5/5°C), míg a másiknál az előnevelés után – hidegedzés nélkül – közvetlenül tettük ki a növényeket a fagy (-3°C és -5°C) károsító hatásának. A fagyasztás befejezése után a növényeket 18/13°C hőmérsékletű regenerációs kamrába helyeztük el. A fagyasztások után a növények levelét visszavágtuk, majd három hét regenerációs fázis után értékeltük az egyedek regenerációs képességét, túlélésének mértékét (Sutka, 1981).

A transzgénikus vonalak, valamint a vad típusú Golden Promise genotípus kombinált hideg és hipoxiás stressztűrését Barla-Szabó és Dolinka (1988) alapján vizsgáltuk. A kombinált stresszt az alacsony hőmérséklet és a hipoxia együttes alkalmazása jelentette. A négynapos stresszkezelés után regenerációs periódust alkalmaztunk, majd meghatároztuk a genotípusok túlélési százalékát és a nagy vigorral rendelkező csírák számát is.

3.3 PIF szekvenciák *in silico* azonosítása

Az *in silico* vizsgálatokhoz a disszertáció írásakor elérhető legújabb verziójú (40. kiadás) árpa proteomot használtuk fel, melyet az Ensembl Plants (Kersey et al., 2018) honlapról töltöttünk le. A feltételezett bHLH szekvenciák azonosítására a HMMER 3.0 verziójú programot (Eddy, 2009) és az ún. rejtett Markov-modell (HMM) módszerét alkalmaztuk a Pfam (Finn et al., 2016) HLH domén profil (PF00010) felhasználásával. A szoftver által prediktált bHLH szekvenciákat manuálisan szelektáltuk, csökkentve az ismétlődések számát és kizárva a hiányos találatokat. A szekvenciák illesztését a Clustal Omega (EMBL-EBI) webes program (Sievers et al., 2011) segítségével végeztük el. Ezt követően a WebLogo 2.8.2 verziójú programot (Crooks et al., 2004) használtuk a bHLH domén konzervált régiójának grafikus ábrázoláshoz.

Az azonosított árpa bHLH szekvenciák filogenetikai csoportosításához, valamint az árpa *PIF* (fitokrómmal kölcsönhatásba lépő faktor) gének azonosításához már ismert *Arabidopsis thaliana* (*At*) és rizs (*Oryza sativa*: *Os*) bHLH fehérjék filogenetikai alcsoportjainak reprezentatív elemeit (Pires és Dolan, 2010), valamint különböző növényfajok már azonosított PIF szekvenciáit (NCBI adatbázis), úgy mint *At*PIF, *At*PIL (PIF-hez hasonló), *Os*PIF és a szója (*Glycine max*: *Gm*) PIF szekvenciáit vontuk be az elemzésbe. A szekvencia illesztéseket a Clustal Omega (EMBL-EBI), valamint a MEGA X szoftver (Kumar et al., 2018) felhasználásával készítettük el. A szekvenciák filogenetikai elemzéséhez a Simple Phylogeny (EMBL-EBI) Neighbor-Joining módszerét használtuk (Larkin et al., 2007), majd a kapott filogenetikai fát bootstrap analízis segítségével (1000 ismétlés) ellenőriztük (Felsenstein, 1985). A filogenetikai fa struktúra grafikus ábrázolásához a FigTree 1.4.3 verziójú programcsomagot, valamint a MEGA X szoftvert használtuk fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Foszfolipid- és Ca^{2+} jelátvitel, valamint *HvCBF* gének cirkadián ritmusa

A foszfolipid jelátviteli útból vizsgált *HvPITP* és *HvPI4K* gének határozott cirkadián ritmust mutattak a teljes kísérlet alatt, ami a központi oszcillátor megfelelő működésére utal. Távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *HvPITP* gén működése mérséklődött, folyamatos megvilágítás esetén periodicitását elvesztette. Alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény hatására a *HvPI4K* expressziója fáziseltolódást mutatott, órákkal korábban jelentkezett.

A citoplazmában lévő Ca^{2+} ionok koncentrációját meghatározó, azokkal közvetlenül vagy közvetve kapcsolatba hozható gének közül több *HvPLC* (foszfolipáz C), *HvPLD* (foszfolipáz D), valamint kalcium-kötő fehérjéket kódoló gén expresszióját is vizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált Ca^{2+} jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének expressziója nem mutat egységes mintázatot.

Az árpa genomja legalább húsz *CBF* gént kódol, melyek három filogenetikai alcsoportba (*Hv*CBF1-, *Hv*CBF3-, valamint *Hv*CBF4-alcsoport) sorolhatóak. Vizsgálatainkat mindhárom alcsoportból reprezentatív számú gén tanulmányozásával végeztük el. A *Hv*CBF1-alcsoportba négy *CBF* gén tartozik, melyek közül a *HvCBF1*, valamint a *HvCBF11* gének expressziós mintázatát határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott 22°C-os nevelési hőmérséklet nem induktív ezekre a génekre. A *Hv*CBF3-alcsoport tagjai közül a *HvCBF3*, *HvCBF6*, *HvCBF10A*, *HvCBF12*, *HvCBF15*, valamint *HvCBF16* gének génexpressziós mintázatát vizsgáltuk meg. Ezek közül csupán a *HvCBF3* és *HvCBF6* gének indukálódtak 22°C-on.

Azt tapasztaltuk, hogy sem a *HvCBF3*, sem a *HvCBF6* gének nem rendelkeznek cirkadián ritmussal. A *Hv*CBF4-alcsoport hét tagja közül a *HvCBF2A*, *HvCBF4B*, *HvCBF9*, valamint a *HvCBF14* gének expressziós mintázatát határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy a négy megvizsgált gén kifejeződése nagyfokú hasonlóságot mutat. Expressziójuk 8-12 órával a mesterséges fény bekapcsolását követően érték el a maximumaikat. Folyamatos megvilágítás esetén mind a négy gén megőrizte periodicitását, cirkadián ritmust mutattak. Alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény hatására 12 órás megvilágítás esetén a génexpressziók maximum értékei sok esetben tovább fokozódtak, és órákkal korábban jelentkeztek. Folyamatosan megvilágítva, távoli-vörös fénykiegészítés mellett a *Hv*CBF4-alcsoport tagjainak csökkentek az expressziós értékeik, ráadásul cirkadián ritmusukat is elveszítették.

4.2 *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő transzformáns növények

Számos tanulmányban leírták már, hogy a transzformációs esemény sok esetben „hátrányt” jelent a növény számára, ami főként fenotípusos abnormalitás(ok)ban jelentkezik; e témakörről Vyroubalová et al. (2011) összefoglaló tanulmányt is közöltek. Jelen disszertáció során felhasznált, a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti lépéseit kódoló két génnel, a *HvPITP*-vel és a *HvPI4K*-val transzformált növények vizsgálata során is feljegyeztünk fenotípusos abnormalitásokat , sőt azt tapasztaltuk, hogy ezek előfordulása jóval gyakoribb a korábbi munkáink során tapasztaltaknál, illetve a szakirodalomban közölt adatoknál is. A kalluszokról regenerált növények fejlődése során azt tapasztaltuk, hogy néhány *HvPITP* és *HvPI4K* túltermelő egyed nem képes

kalászokat fejleszteni. A hajtásmerisztéma mikroszkópos vizsgálata során megállapítottuk, hogy habár a hajtáscsúcsban bekövetkezik a vegetatív/generatív átmenet, fejlődése leáll a Zadok skála szerinti Z45-50-es fejlettségi állapotban. A szegregáló első transzgénikus nemzedék közül három vonal csíranövényeinél megfigyeltük, hogy azok halványabbak voltak társaiknál, ráadásul némelyikük még fény hatására sem volt képes bezöldülni. A homozigóta második transzgénikus nemzedék egyedeinél megfigyeltük azt is, hogy néhány növény virágzatában a főtengelyen, vagyis a kalászorsón elhelyezkedő kalászkák helyett egy-egy esetében egy másodlagos (esetleg később egy harmadlagos) kalászorsó is megjelent, létrehozva ezzel egy összetettebb kalászmorfológiát/virágzatot.

Mivel feltételezésünk szerint e két gén az alacsonyhőmérsékleti stressz jelátviteli folyamatában szerepet játszik, ezért a transzgénikus PITP és PI4K vonalak, valamint a Golden Promise vad típus alacsony hőmérsékleti stressztűrésének vizsgálatához Sutka (1981) alapján két különböző megközelítésben végeztünk fagyteszteket. Az első típusú kísérletben az előnevelést követően hidegedzést végeztük. Megállapítottuk, hogy a PITP L9, valamint a PITP L13 vonalak bizonyultak a legellenállóbbnak a vizsgált huszonhét független transzformáns vonal (15 PITP és 12 PI4K) közül, közel kétszer annyi transzformáns növény élte túl a -6°C-os fagykezelést, mint amennyi a Golden Promise vad típus esetében. Az összes vizsgált vonal közül a PITP L9 egyedei bizonyultak a legvitálisabbnak a fagyasztást követően: 45%-uk ($P = 0,041$) volt képes a regenerációra. A második típusú fagytesztnél a transzformáns vonalakat (6 PITP és 4 PI4K), valamint a Golden Promise vad típust hidegedzés nélkül vetettük alá a fagyasztásnak. A növényeket -3°C és -5°C hőmérsékleteken kezeltük 16 órán keresztül, majd három hét regenerációt

követően értékeltük a fagy okozta károsodást, a túlélés mértékét. Megfigyeltük, hogy -3°C-on fagyasztva a vizsgált transzformáns PITP és PI4K vonalak, valamint a Golden Promise vad típus között nincs szignifikáns eltérés. Megállapítottuk azt is, hogy hidegedzés nélkül a -5°C fagyasztási hőmérséklet letális az összes vizsgált genotípus számára, sem a transzformáns PITP és PI4K vonalak, sem a Golden Promise vad típus nem élte túl az alkalmazott kezelés.

A transzgénikus vonalak alacsony hőmérsékleti stressztoleranciáját tovább vizsgálva egy csírakori alacsony hőmérséklettel kombinált hipoxiás kezelést is alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott stresszkezelés majdnem letális volt a vad típus számára, ezzel ellentétben néhány transzgénikus vonal kevésbé károsodott. A PITP L4, PITP L15, PI4K L2 és PI4K L5 vonalak közel azonos mértékben élték túl a kezelést, kismértékű fokozott toleranciát tapasztaltunk a vad típushoz képest. A PI4K L3 vonal esetében jelentősen megnőtt (P = 0,005) a túlélési százalék az alkalmazott stresszkezelést követően a Golden Promise genotípushoz képest, az alacsony hőmérséklettel kombinált hipoxia ellenére a transzgénikus magok 10%-a vitálisnak bizonyult és képes volt a csírázásra. Ráadásul a PI4K L3 vonal nem csupán nagyobb mértékben élte túl a stresszkezelést, hanem e vonal esetében jelentősen megnőtt (P = 0,031) a nagy vigorú csírák száma is.

4.3 A *Hv*PIF fehérjéket kódoló szekvenciák

Az általunk tanulmányozott jelátviteli útvonalak közül a távoli-vörös tartományba eső fény hatására aktiválódó fitokróm jelátviteli útvonalat vizsgáltuk meg részletesebben. Mindezidáig kevés növényfaj esetében írtak le *PIF* géneket;

tudomásunk szerint sem a kenyérbúza, sem az árpa esetében nem azonosítottak egy *PIF* szekvenciát sem.

Munkánk során az árpa feltételezett PIF fehérjéit kódoló szekvenciák *in silico* azonosítását végeztük el, melyhez először a HMM módszert alkalmazva a bHLH (bázikus hélix-hurok-hélix) motívumot tartalmazó szekvenciákat kerestük meg. Ahhoz, hogy az így azonosított 183 szekvencia közül kiválogassuk a feltételezhetően *Hv*PIF szekvenciákat, már ismert *Arabidopsis*, rizs és szója bHLH szekvenciákkal együtt végeztünk filogenetikai elemzést. Az így kapott filogenetikai fa struktúrája alapján megállapítottuk, hogy az árpa bHLH fehérjéi huszonöt alcsoportba sorolhatók, mely alcsoportok közül a VII (a+b) kilenc egyedi árpa bHLH fehérjét tartalmazott.

Az így kapott kilenc szekvencia között motívumkeresés alapján határoztuk meg a feltételezhető *Hv*PIF szekvenciákat. Megállapítottuk, hogy hat árpa bHLH esetében nagyfokú hasonlóságot mutattunk ki a szekvenciák N-terminális részében a referenciaként használt *At* APB (fitokróm B-kötő motívum) motívumával, ami arra enged következtetni, hogy az árpa genomja legalább 6 *PIF* szekvenciát kódol. A további vizsgálat során megállapítottuk azt is, hogy ezek közül az egyik szekvencia az APB motívum mellett tartalmazza az APA (fitokróm A-kötő motívum) motívumot (Al-Sady et al., 2006; Shen et al., 2008) is. Az *in silico* eredményeink összegzése alapján azt feltételezzük, hogy az árpa proteomból csak ez az egyetlen fehérje képes kapcsolatot kialakítani (az APB és APA motívumok megléte miatt) mind a fitokróm B, mind a fitokróm A fehérjékkel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK és JAVASLATOK

A disszertációban összefoglalt munkánk fő célja az volt, hogy az árpa mint gabona modellnövény felhasználásával (1) a foszfolipid jelátvitel, (2) a Ca^{2+} jelátvitel, valamint (3) a CBF transzkripciós faktorok közvetítette jelátviteli útvonalra ható szabályozó mechanizmusokat tanulmányozzuk.

Kísérleteink során mesterséges körülmények között nevelt Nure genotípus segítségével meghatároztuk a fent említett útvonalakhoz kapcsolódó gének cirkadián ritmusát. Vizsgálataink során fehér és távoli-vörössel kiegészített fehér fényt alkalmaztunk, így megállapíthattuk az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény génexpresszióra kifejtett hatását is.

A tanulmányozni kívánt jelátviteli útvonal első szakaszát, a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti génjeit vizsgáltuk meg először. Megállapítottuk, hogy a *HvPITP* és a *HvPI4K* gének cirkadián ritmus szerint expresszálódtak, és a távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *HvPI4K* expressziója fáziseltolódást mutatott. A Ca^{2+} jelátvitelben szerepet játszó gének átfogó vizsgálata során megfigyeltük, hogy azok nem mutattak egységes expressziós mintázatot. Egyes vizsgált gének kifejeződése az esti órák végén tetőzött, bár azok folyamatos megvilágítás esetén alacsony szintű, konstans kifejeződést mutattak, és a távoli-vörös fénykiegészítés nem befolyásolta e gének működését. Más génekre sem a cirkadián óra, sem a fénykezelés nem volt hatással. Egy harmadik csoport génkifejeződését csupán az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény befolyásolta, a cirkadián óra azonban nem. Mindezek az eredmények jól mutatják a Ca^{2+} jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének rendkívül komplex rendszerét, hiszen kísérleteink során az azonos körülményekre eltérő válaszmechanizmusokkal reagáltak. E

funkcionális divergencia magyarázatul szolgálhat arra, hogy hogyan képes a növényi genomban kódolt több száz kalcium-kötő fehérje (Day et al., 2002) oly szerteágazó válaszmechanizmust kiváltani (Ranty et al., 2016) különböző környezeti hatások során.

Az általunk vizsgálni kívánt útvonal utolsó „szereplője” a CBF transzkripciós faktorok családja. Az ezeket kódoló gének három filogenetikai alcsoportja közül csupán kettő, a *Hv*CBF3-, valamint a *Hv*CBF4-alcsoport tagjai fejeződtek ki az alkalmazott 22°C-os nevelési hőmérsékleten.

A *HvCBF*-ek közül a növény fagytűrése szempontjából jelentős szereppel bíró gének alcsoportja, a *Hv*CBF4-alcsoport tagjai cirkadián ritmus szerint fejeződtek ki, ráadásul az alkonyati fényösszetételre jellemző spektrum hatására expressziójuk sok esetben fokozódott, valamint a kifejeződés maximuma órákkal korábban jelentkezett. Elmondhatjuk tehát, hogy az általunk tanulmányozott foszfolipid és Ca^{2+} jelátviteli útvonal, valamint a *CBF* gének molekuláris szabályozásában az általunk vizsgált három „kísérleti változó”, vagyis a cirkadián óra, a fény spektrális összetétele, és a hőmérséklet is befolyásoló szereppel bírt. Érdekes lenne megvizsgálni azt is, hogy más – különböző fagytűréssel bíró – gabonafélék hogyan reagálnak az általunk vizsgált molekuláris- és környezeti faktorok változásaira, valamint hogyan hatnak ezek a változók a növények stressztűrésére, például alacsony hőmérsékleti stressztoleranciájára.

A vizsgált *HvPITP* és *HvPI4K* gének cirkadián ritmusa, valamint a foszfolipid útvonal jelátvitelben betöltött jelentős szerepe (melynek eredménye különböző másodlagos hírvivő molekulák felszabadulása) miatt tanulmányoztuk e két gén stressztűrésben betöltött esetleges szerepét is. Az előállított túltermelő transzformáns árpa vonalak segítségével

megállapítottuk, hogy *HvPITP* és *HvPI4K* gének kismértékben hozzájárultak az árpa alacsony hőmérsékleti stressztolerancia fokozásához. Kísérleteink során azonban számos esetben fejlődési/morfológiai rendellenességet (abnormális kalászfejlődést, rendellenes kalászorsó kialakulást, vegetatív stádiumban ragadt növényt, klorofill hiányt) tapasztaltunk a transzformáns vonalak esetében. Elméletünk szerint a jelátviteli útvonal korai szabályozó elemeinek túltermeltetése a jelátviteli utak divergenciája miatt szerteágazó, (súlyos) negatív hatással van a transzformáns növények egyes élettani folyamataira. Érdekes lenne megvizsgálni azt is, hogy más jelátviteli útvonalak kezdeti lépéseit kódoló gének transzformálása hasonló, gyakori fenotípusos abnormalitásokat okoz-e, mely során bizonyíthatnánk hipotézisünket. Mindenesetre azt gondoljuk, hogy sokkal célravezetőbb a növény stressztoleranciáját egy-egy transzkripciós faktor, vagy effektor gén túltermeltetésével fokozni, a szignál transzdukció kezdeti regulátorai helyett.

Munkánk során számos esetben kimutattuk az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fénykezelés egyértelmű hatását különböző gének kifejeződésére. Mivel ismereteink eléggé hiányosak a távoli-vörös tartományába eső fény hatására aktiválódó jelátviteli útvonalakról és az azokat szabályozó mechanizmusokról, így célul tűztük ki a fitokróm fehérjékkel kapcsolatot kialakító *Hv*PIF transzkripciós faktorok *in silico* azonosítását. Munkánk során azonosítottuk az árpa bHLH fehérjéit, majd filogenetikai módszerek segítségével alcsoportokba soroltuk azokat. Ismert PIF szekvenciák felhasználásával, valamint a fitokróm-kötőhely motívumának keresésével sikerült azonosítanunk azokat a szekvenciákat, melyek árpa PIF géneket kódolnak. Eredményeink alapot biztosíthatnak arra, hogy segítségükkel részletesen megismerhessük a vörös és távoli-vörös fény

hatására aktiválódott PIF transzkripciós faktorok jelátviteli útvonalakra, más transzkripciós faktorokra, vagy akár egyedi génekre gyakorolt hatásait. Mivel a PIF transzkripciós faktorok a vörös és távoli-vörös tartományba eső fény hatására bekövetkezett molekuláris változások szabályozásában általános szereppel bírnak, érdekes lenne megvizsgálni azt is, hogy milyen összefüggés figyelhető meg a növény természetes előfordulási helye (trópusi, szubtrópusi, mediterrán, stb.), valamint a genomjában kódolt *PIF* gének száma és funkcionális polimorfizmusuk között. Vajon megfigyelhető a különböző komplexitású genomok között a fitokrómokat kódoló szekvenciák és a *PIF* gének számában összefüggés?

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kimutattuk, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonalban szereplő *HvPITP* és *HvPI4K* gének a cirkadián óra hatása alatt állnak, továbbá, hogy távoli-vörös fénykiegészítésre a *HvPI4K* gén korábbi expressziós maximummal reagál.

2. Megállapítottuk, hogy a Ca^{2+} jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének nem mutatnak cirkadián ritmust. Expressziós mintázatuk a cirkadián óra, az alacsony vörös/távoli-vörös arányú fény, vagy a hőmérséklet hatására három jól elkülönülő csoportra osztható.

3. Kimutattuk, hogy az árpa *CBF* gének filogenetikai alcsoportjai közül a *Hv*CBF1-alcsoport tagjai „szobahőmérsékleten" (22°C-on) nem fejeződnek ki. Bizonyítottuk, hogy a *Hv*CBF3-alcsoport génjei nem állnak a cirkadián óra hatása alatt.

4. Bebizonyítottuk, hogy hideginduk nélkül az árpa *CBF* gének közül csak a *Hv*CBF4-alcsoport tagjai fejeződnek ki, expressziójuk cirkadián ritmust követ, működésük a késő délutáni/kora esti órákban a legintenzívebb.

5. Kimutattuk, hogy távoli-vörös fénykiegészítés hatására a *Hv*CBF4-alcsoport génjei sok esetben nagyobb expressziós maximummal reagálnak, ráadásul órákkal korábban is kifejeződnek.

6. Bebizonyítottuk, hogy a *HvPITP* és *HvPI4K* gének kis mértékben járulnak hozzá az árpa alacsony hőmérsékleti stressztoleranciájának növeléséhez.

7. Megállapítottuk, hogy a foszfolipid jelátviteli útvonal kezdeti elemeinek túltermeltetése megnöveli a transzformáns növények egyes fejlődési rendellenességeinek (abnormális kalászfejlődés, rendellenes kalászorsó kialakulás, vegetatív stádium megrekedése, klorofill hiányos növények) gyakoriságát.

8. *In silico* azonosítottuk az árpa bHLH fehérjéit, filogenetikai alcsoportokba soroltuk azokat, majd meghatároztuk a *Hv*PIF szekvenciákat.

7. JELEN DOKTORI DISSZERTÁCIÓHOZ KÖTHETŐ PUBLIKÁCIÓK

Nemzetközi folyóiratban megjelent IF-es cikk

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Soltész A., Boldizsár Á., Gulyás Z., Kalapos B., Monostori I., Kozma-Bognár L., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2017. Circadian and Light Regulated Expression of *CBF*s and their Upstream Signalling Genes in Barley. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1828. (IF_{2017}: 3,687)

Gierczik K., Székely A., Ahres M., Marozsán-Tóth Zs., Vashegyi I., Harwood W., Tóth B., Galiba G., Soltész A. és Vágújfalvi A., 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*. 37, 314–326. (IF_{2018}: 1,604)

Hazai folyóiratban megjelent IF nélküli cikk

Gierczik K., Vágújfalvi A., Galiba G. és Kalapos B., 2019. *In silico* identification of putative barley Phytochrome Interacting Factors (PIFs). *Georgikon for Agriculture*. 23, 2-15.

Konferencia kiadványban megjelent több oldalas összefoglaló

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2016. A fény hatása az árpa stressz-indukált szignáltranszdukciós génjeinek ritmikus expressziós mintázatára. In: Koncz I., Szova I., szerk. *PEME XIII. PhD. - Konferencia*. Budapest: Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület, 53–64.

Novák A., Boldizsár Á., Gierczik K., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L., Vágújfalvi A., Båga M., Chibbar R. és Galiba G., 2017. Circadian and light quality regulated expression of *CBF* genes influences the cold acclimation process in cereals. In: Börner A., Galiba G., Bálint A., szerk. *4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding: Cereal Research Communications (Suppl.)*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 61–62.

Gierczik K., Vágújfalvi A., Galiba G. és Kalapos B., 2019. *Hv*PIF transzkripciós faktorok *in silico* azonosítása. In: Karsai I., szerk. *XXV. Növénynemesítési Tudományos Nap: Növénynemesítés a 21. század elején: kihívások és válaszok*. Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 301–304.

Tudományos előadás

Monostori I., Gierczik K., Boldizsár Á., Novák A., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L., Vágújfalvi A., Rakszegi M., Darkó É. és Galiba G., 2018. Light spectrum dependent regulation of freezing tolerance and yield quality in cereals. In: Börner A,, Ciucă M, szerk. *Proceedings of the 17th International EWAC Conference*. Bukarest: EUCARPIA, 126.

Tudományos poszter

Gierczik K., Novák A., Ahres M., Székely A., Boldizsár Á., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2017. Az árpa kalcium-függő jelátviteli útvonal elemeinek és *CBF* génjeinek ritmikus expressziós mintázata. In: Veisz, O, szerk. *XXIII. Növénynemesítési Tudományos Nap*. Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 102.

Gierczik K., Galiba G. és Vágújfalvi A., 2018. Far-red light regulated circadian expression of *CBF*s and their upstream signalling genes in barley. In: Tamás L., Zelenyánszki H., szerk. *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book*. Szeged: JATEPress Kiadó, 117.

Galiba G., Boldizsár Á., Gierczik K., Novák A., Ahres M., Ádám É., Kozma-Bognár L. és Vágújfalvi A., 2018. Molecular background of circadian clock-, light quality- and temperature dependent regulation of freezing tolerance in cereals. In: *Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen*. Koppenhága: Department of Plant and Environmental Sciences, 67.

Gierczik K., Kalapos B., Vágújfalvi A. és Galiba G., 2019. Identification of putative Phytochrome Interacting Factors (PIFs) in domesticated barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Book of Abstracts 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 90.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schäfer E. and Quail P.H., 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell*. 23, 439–446.

Barla-Szabó G. and Dolinka B., 1988. Complex stressing vigour test: a new method for wheat and maize seeds. *Seed Science and Technology*. 16, 63–73.

Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M. and Brenner S.E., 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*. 14, 1188–1190.

Day I.S., Reddy V.S., Shad Ali G. and Reddy A., 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology*. 3, research0056.1–0056.24.

Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J. and Thomashow M.F., 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *The Plant Cell*. 21, 972–984.

Eddy S.R., 2009. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Informatics*., 205–211.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783–791.

Finn R.D., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., Salazar G.A., Tate J. and Bateman A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*. 44, D279–D285.

Kersey P.J., Allen J.E., Allot A., Barba M., Boddu S., Bolt B.J., Carvalho-Silva D., Christensen M., Davis P., Grabmueller C., Kumar N., Liu Z., Maurel T., Moore B., McDowall M.D., Maheswari U., Naamati G., Newman V., Ong C.K., Paulini M., Pedro H., Perry E., Russell M., Sparrow H., Tapanari E., Taylor K., Vullo A., Williams G., Zadissia A., Olson A., Stein J., Wei S., Tello-Ruiz M., Ware D., Luciani A., Potter S., Finn R.D., Urban M., Hammond-Kosack K.E., Bolser D.M., De Silva N., Howe K.L., Langridge N., Maslen G., Staines D.M. and Yates A., 2018.

Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*. 46, D802–D808.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35, 1547–1549.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., Mcgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947–2948.

Pires N. and Dolan L., 2010. Origin and diversification of basic-Helix-Loop-Helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*. 27, 862–874.

Ranty B., Aldon D., Cotelle V., Galaud J.-P., Thuleau P. and Mazars C., 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*. 7, 327.

Raza A., Razzaq A., Mehmood S.S., Zou X., Zhang X., Lv Y. and Xu J., 2019. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*. 8, 34.

Shen H., Zhu L., Castillon A., Majee M., Downie B. and Huq E., 2008. Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *The Plant Cell Online*. 20, 1586–1602.

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. and Higgins D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 7.

Sutka J., 1981. Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 59, 145–152.

Vyroubalová Š., Šmehilová M., Galuszka P. and Ohnoutková L., 2011. Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biologia Plantarum*. 55, 213–224.

Zadoks J.C., Chang T.T. and Konzak C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14, 415–421.