



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

A BURGONYA KORAI SÁGÁT BEFOLYÁSOLÓ MOLEKULÁRIS
FOLYAMATOK VIZSGÁLATA

Karsai-Rektenwald Flóra

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Gödöllő
2024**

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénygenetika és biotechnológia

vezetője: Dr. Helyes Lajos
főigazgató, egyetemi tanár, MTA tag,
MATE, Szent István Campus
Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék

Témavezető: Dr. Bánfalvi Zsófia
csoportvezető, DSc
MATE, Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Burgonyakutatás Csoport

Társtémavezető: Dr. Veres Anikó
egyetemi docens
MATE, Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Molekuláris Genetika és Nemesítés Csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Társtémavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1.	A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	5
2.1.	Baktérium törzsek és növényvonalak.....	5
2.2.	Táptalajok.....	5
2.3.	<i>In vitro</i> növénynevelés és transzformáció.....	5
2.4.	Molekuláris biológiai módszerek.....	5
2.5.	DNS szekvencia analízis.....	6
2.6.	A <i>GI</i> promóterek <i>in silico</i> DNS szekvencia analízise.....	6
2.7.	Transzkriptom analízis.....	6
2.8.	Génszerkesztésre használt konstrukciók létrehozása.....	6
2.9.	Üvegházi növénynevelés és morfológiai vizsgálatok.....	7
2.10.	A gumóhéjak antocián tartalmának meghatározása.....	7
2.11.	Statisztikai analízis.....	7
3.	EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITATÁSA.....	8
3.1.	A <i>CDF1</i> gén jellemzése burgonyában.....	8
3.2.	A <i>gCDF1</i> mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása.....	11
3.3.	A <i>GI</i> gének azonosítása és <i>in silico</i> promóter elemzése burgonyában.....	12
3.4.	A <i>GI</i> gének promóter elemzéséből kapott eredmények megvitatása.....	14
3.5.	Az <i>aGI52</i> levelek transzkriptom elemzése.....	15
3.6.	A transzkriptom elemzés eredményeinek megvitatása.....	16
3.7.	A <i>GI</i> mutánsok izolálása és jellemzése.....	17
3.8.	A <i>GI</i> mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása.....	24
4.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK.....	26
5.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	29
6.	A TÉMAKÖRHÖZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK.....	30
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	32

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Napjaink alapvető feladata a klímaváltozás, a termőföldek kimerülése és a kórokozók, kártevők elleni küzdelem. Az egyre növekvő népesség miatt jelentős problémát jelent az élelmiszerhiány. Mindemellett azonban előtérbe került az egészséges táplálkozás is. A vitaminokban, ásványi anyagokban gazdag szántóföldi és zöldségnövények egyre jelentősebb szerepet töltenek be a mindennapi élelmiszerfogyasztásban.

Az egyik legfontosabb termesztett élelmiszernövény a világon, a burgonya (*Solanum tuberosum* L.). Kedvező táplálkozás-élettani tulajdonságokkal bír és értékes ásványi anyagokat, vitaminokat tartalmaz. A FAO szerint, több mint 17 millió hektár volt a burgonya vetésterülete a világon 2022-ben. A burgonya egynyári növény, melyet megvastagodott szárképletéért (gumójáért) termesztünk. Felhasználhatósága sokrétű, ipari feldolgozásban és állati takarmányozásban is fontos szerepet tölt be. Ezért a gumó fejlődésének kutatása, mind gazdasági, mind biológiai szempontból, meghatározó feladat. Kétféle burgonya típust különböztetünk meg: vannak rövid és hosszú tenyészidejű burgonya fajták. A rövid tenyészidejű, korán termő fajták kevésbé vannak kitéve a szélsőséges időjárásnak és a betegségeknek, és mivel rövid idő alatt tudnak termést hozni, a korai fajták gazdasági szempontból is előnyösek. Ezért a burgonyanemesítés egyik fő célja a koraiság növelése.

A növények szaporodási ciklusainak időpontját a környezeti tényezők erősen befolyásolják. A termesztett burgonyafajták őseinek gumófejlődése függ a naphossztól, a rövid nappalos fényviszonyok serkentik, a hosszú nappalok gátolják a gumóképződést. A modern burgonyafajták gumóképzése nem függ a naphossztól, de a hőmérsékletre való érzékenységük megmaradt. Kedvező környezeti feltételek mellett a levélből származó floém-mobil jelek indítják meg a gumófejlődést, majd ezek eljutnak a földalatti módosult szárhoz, a sztólóhoz. A folyamatban három fő szabályozó elem vesz részt: az SP6A, a BEL5 és a CDF1. A CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1) a DOF transzkripció faktor családba tartozik és az obligát rövid nappalos *S. tuberosum* Andigena tájfajtában a gumófejlődés megindulásának időpontját határozza meg. Kísérleteink egy részének célja az volt, hogy megismerjük a CDF1 szerepét egy naphossztól független gumózású kereskedelmi fajtában, a 'Désirée'-ben.

A gumóképződés szabályozása a burgonyában hasonló az *Arabidopsis* virágzás szabályozásához, amiben a GIGANTEA (GI) is szerepet játszik. *S. tuberosum* Andigena-ban a GI az FKF1-gyel alkotott komplex részeként részt vesz a CDF1 megkötésében és eljuttatásában a proteaszómákhoz, ahol is a CDF1 lebomlik. Így tehát a GI, közvetett formában, de részt vesz a gumókötés idejének meghatározásában. Kísérleteink másik célja a GI

gumókötésben betöltött szerepének megismerése volt a 'Désirée' burgonyafajtában.

Célkitűzések:

A *CDF1* és *GI* 'Désirée' burgonyafajtában betöltött szerepének megismerésére az alábbi részfeladatok elvégzését terveztük:

- Célzott mutáció létrehozása a 'Désirée' *CDF1* génjében CRISPR/Cas9 rendszer segítségével
- A *CDF1* mutánsok azonosítása PCR-rel és DNS szekvencia analízissel
- Három kiválasztott *CDF1* mutáns vonal fenotípusos és gumóképzési jellemzőinek vizsgálata üvegházi körülmények között a nem transzformált 'Désirée'-hez viszonyítva

- A *GI* gén(ek) azonosítása 'Désirée'-ben
- *In silico* predikció a *GI* gén(ek) szabályozására és szerepére
- Egy *GI* expresszióban gátolt 'Désirée' vonal levelének transzkriptom elemzése
- Célzott mutáció létrehozása a 'Désirée' *GI* génje(i)ben CRISPR/Cas9 rendszer segítségével
- A *GI* mutánsok azonosítása PCR-rel és DNS szekvencia analízissel
- A *GI* mutáns vonalak fenotípusos és gumóképzési jellemzőinek vizsgálata üvegházi körülmények között a nem transzformált 'Désirée'-hez viszonyítva

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Baktérium törzsek és növényvonalak

A kísérletekhez *Escherichia coli* DH5 α és *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 baktérium törzseket használtunk. Kontroll növényünk a *Solanum tuberosum* L. cv. 'Désirée' volt. Ebből állítottunk elő CDF1 és GI mutáns vonalakat. Transzkriptom szinten az Odgerel et al. (2022) által előállított aGI.52 antiszensz módon gátolt növényeket vizsgáltuk.

2.2. Táptalajok

LB, SOB és SOC táptalajokat használtunk az *E. coli* és YEB táptalajt az *A. tumefaciens* törzsekkel végzett munkákhoz, amelyeket Sambrook et al. (1989) alapján készítettünk és antibiotikumokkal (rifampicin/kanamicin/ampicillin) egészítettünk ki. A burgonya szövettenyésztését Murashige-Skoog (MS; Murashige és Skoog 1962) és RM (MS táptalaj vitaminok nélkül) táptalajokon végeztük. A kalluszindukcióhoz CIM táptalajt, a hajtásindukcióhoz SIM táptalajt használtunk (Dietze et al. 1995).

2.3. *In vitro* növénynevelés és transzformáció

A burgonyanövényeket *in vitro* 24°C-os fényszobában neveltük, 16/8 óra nappali/éjszakai ciklusban, kémcsövekben vagy befőttesüvegekben. Az apikális hajtással rendelkező növényeket 4 hetente új RM táptalajba helyeztük és szárszegmensekről vegetatív módon szaporítottuk. Három hétig MS táptalajban, befőttesüvegekben nevelt 'Désirée' burgonyanövények leveleit Dietze et al. (1995) szerint transzformáltuk.

2.4. Molekuláris biológiai módszerek

Az *in vitro* nevelt burgonya növények leveléből Shure et al. (1983) módszere alapján izoláltunk genomi DNS-t.

A DNS fragmentumok felszaporítását PCR-rel végeztük. A reakció körülmények a primerek olvadáspontja és a PCR fragmentumok hosszúságától függően lettek beállítva. A PCR-fragmentumokat etídium-bromidos agaróz gélen futtattuk meg, majd Gel DocTM EZ Imager-ben fényképeztük le.

Az *E. coli*-ból Inoue et al. (1990) módszere szerint készítettük a kompetens sejteket. A DNS szekvenciák meghatározásához a DNS fragmentumokat pGEM[®]-T Easy vektorba (Promega, Madison, WI, USA) klónoztuk, majd *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk Sambrook et al. (1989) szerint. A pGEM[®]-T Easy rekombináns plazmidokat kék-fehér szelekcióval szelektáltuk ampicillinnel, X-Gal-lal és IPTG-vel kiegészített

LB táptalajon. A feltehetően rekombináns plazmidot hordozó fehér telepekből plazmid DNS-t izoláltunk (Sambrook et al. 1989).

A pKSE401 plazmid konstrukciókat Höfgen és Willmitzer (1988) szerint juttattuk be *A. tumefaciens*-be. A felnőtt telepekből plazmid DNS-t izoláltunk és PCR segítségével ellenőriztük őket.

2.5. DNS szekvencia analízis

A DNS szekvenciák meghatározását a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte, a szekvenciák olvasására a BioEdit programot használtuk. Az NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programokat használtuk a szekvenciák elemzéséhez. A kapott szekvenciákat a Potato Genomic Resource Spud DB-ben (<http://spuddb.uga.edu/>) található *S. tuberosum* group Phureja DM1-3 v6.1 genomszekvenciájához hasonlítottuk.

2.6. A *GI* promóterek *in silico* DNS szekvencia analízise

A 4. (SoltuDM.04G027760) és 12. (SoltuDM.12G007510) kromoszómán található két *GI* gén promóter régiójának a translációs starthelytől számított 3000 bp hosszúságú szekvenciáját a Potato Genomic Resource Spud DB-ből nyertük ki, míg az *Arabidopsis thaliana* (AT1G22770.1) *GI* génjének promóter szekvenciáját a TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) webhelyről töltöttük le. A The Plant Regulation Data and Analysis Platform-ot (PlantRegMap) (<http://plantregmap.gao-lab.org/>) használtuk a transzkripciós faktorok kötőhelyeinek predikciójára.

2.7. Transzkriptom analízis

A Stiekema et al. (1988) protokollja alapján izolált RNS-ekből a Novogene Company Ltd (Cambridge, UK, <https://www.novogene.com/eu-en/>) könyvtárakat készített és az Illumina NovaSeq 6000 platformon történt szekvenálás és minőségellenőrzés után a kapott adatokat a *S. tuberosum* group Phureja DM1–3 v.6.1 referencia genomra illesztette. A bioinformatikai elemzést, mint pl. a gén ontológiai (GO) és a ‘Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes’ (KEGG) elemzést szintén a Novogene cég végezte.

2.8. Génszerkesztésre használt konstrukciók létrehozása

A *CDF1* gén CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló célzott mutagenézisére a pAGM4723 vektorba (Weber et al. 2011) épített gRNS-eket használtuk. A konstrukció létrehozásának részletes leírása a Karsai-Rektenwald et al. (2023) közleményben található.

A *GI.04* és *GI.12* gének CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló mutagenéziséhez a gének 3' végéhez közeli („end”) mutációk (eGI.04 és

eGI.12 vonalak) létrehozására alkalmas gRNS-ek a pKSE401 vektorba (Xing et al. 2014) lettek beépítve azonos módszerrel, mint ahogy a gének középső része felé eső („middle”) mutációk (mGI.04 és mGI.12 vonalak) létrehozása is történt. A gRNS-eket a CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) program segítségével terveztük meg. A megszintetizált gRNS oligokat, melyek végükön a pCBC-DT1T2 plazmid néhány bázisát is tartalmazták, a pCBC-DT1T2 templát DNS hozzáadásával Xing et al. (2014) szerint PCR-rel felszaporítottuk, *BsaI* enzimmal hasítottuk, majd ligáltuk a *BsaI* emésztett pKSE401 vektorba és *E. coli*-ba transzformáltuk. Néhány transzformáns telepből plazmid DNS-t tisztítottunk, majd a plazmid DNS-ben az inzertek jelenlétét PCR segítségével ellenőriztük.

2.9. Üvegházi növénynevelés és morfológiai vizsgálatok

In vitro körülmények között nőtt 5-7 hetes burgonya növényeket steril Tabaksubstrat földet tartalmazó cserepekbe ültettük és üvegházi körülmények között neveltük tovább 20-28°C hőmérsékleten. Télen a környezeti fényviszonyok mellett mesterséges megvilágítást is alkalmaztunk. A növények optimális növekedési feltételeit heti kétszeri öntözéssel biztosítottuk. A növényeket hetente Mospilan peszticiddal kezeltük. Üvegházi körülmények között vizsgáltuk a növények magasságát, a levelek morfológiáját (alakját, fejlettségét, hervadását) és a szár vastagságát. A vegetációs időszak elején a fiatal növényeken a gumókat megszámloltuk. A vegetációs időszak végén a gumókat begyűjtöttük, majd meghatároztuk tömegüket és darabszámukat. A gumókat sötétben, szobahőmérsékleten tároltuk, és tárolás során vizsgáltuk a csírázás időpontját és mértékét.

2.10. A gumóhéjak antocián tartalmának meghatározása

Toguri et al. (1993) egyszerűsített módszere alapján végeztük az antocián mérést. Spektrofotometriásan, abszorbancia mérésével (540 nm) határoztuk meg az antocián pigmentek klorid formáinak kontrollhoz viszonyított relatív mennyiségét.

2.11. Statisztikai analízis

Az adatok közötti szignifikáns különbségek kimutatásához a Tukey-próbával kiegészített varianciaanalízist (ANOVA) (<https://astatsa.com/>) alkalmaztuk. A hőtérképek elkészítéséhez a Metaboanalyst 5.0-t (<https://www.metaboanalyst.ca>) használtuk.

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITATÁSA

3.1. A *CDF1* gén jellemzése burgonyában

A *CDF1* gén burgonyában betöltött szerepének megismerésére CRISPR/Cas9 genomszerkesztés segítségével *CDF1* mutánsokat állítottunk elő 'Désirée' burgonyafajtából. A *CDF1* 3'-UTR-ére terveztük a gRNS-eket reménykedve abban, hogy olyan nagyméretű deléciókat kapunk, amelyek elérik a *CDF1* 3' kódoló régióját.

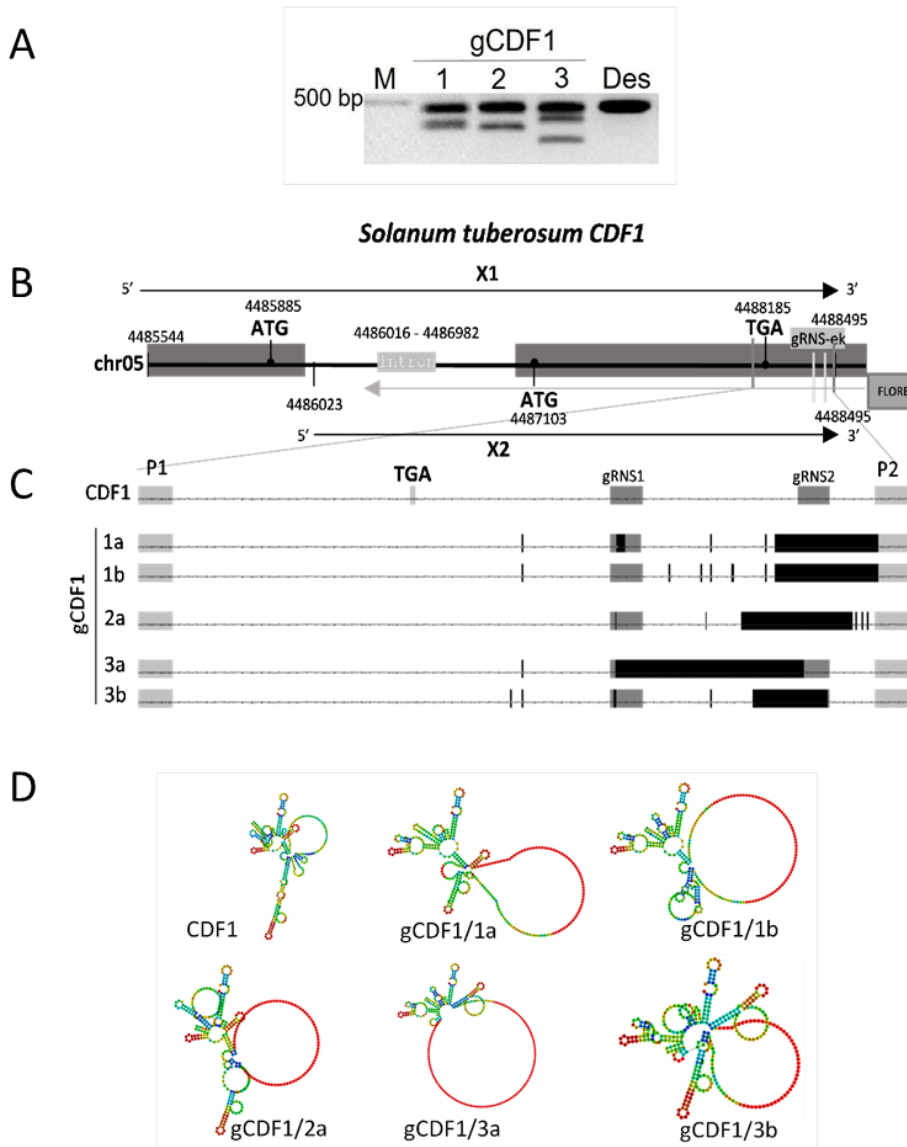
A mutációk keresésére először genomi DNS-t izoláltunk a legyökerezett hajtásokból. 75 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük PCR-rel, melyből 11 olyan mutáns növényt találtunk, amelyekben agaróz gélen is jól látható méretű deléció volt. A *1A ábra* mutatja, mely deléciók alapján választottuk ki azt a három mutáns vonalat (gCDF1/1, gCDF1/2 és gCDF1/3), amiket tovább teszteltünk.

A 'Désirée' tetraploid burgonyafajta. Olyan mutáns növényt nem tudtunk azonosítani, amelyik null mutáns lett volna és nem találtunk olyan mutánst sem, amiben a deléció elérte volna a kódoló régiót (*1B ábra*).

A deléciók meghatározására a PCR fragmentumokat klónoztuk a pGEM[®]-T Easy vektorba és a plazmid DNS PCR fragmentumát megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a *S. tuberosum* Phureja Spud DB-ben található *CDF1* genomszekvenciához hasonlítottuk (*1C ábra*). A gCDF1 mutánsokban a deléciók mérete 49-117 bázispár között volt.

Feltételeztük, hogy a *CDF1* mRNS végszerkezetét a gCDF1 mutánsokban található deléciók megváltoztatták. Ennek igazolására a CentroidFold program (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) segítségével számítógépes predikciót végeztünk. A számítógépes elemzés igazolta feltételezésünket, hogy a *CDF1* mRNS végszekvenciájának szerkezete nagymértékben különbözik a vad típusú *CDF1* mRNS-ének végszekvenciájától (*1D ábra*).

A növények morfológiai és gumóképzési tulajdonságainak vizsgálatára a három gCDF1 mutáns vonalból vegetatívan szaporított 4-hetes egyedeket üvegházi körülmények között neveltük tovább. Kontrollként minden esetben nem transzformált 'Désirée' növényeket használtunk. Az összetett levelek fejlődése mind a három gCDF1 mutáns növény esetében késett a 'Désirée' kontrollhoz képest (*2A ábra*). Ennek ellenére a vegetációs időszak későbbi időszakában, a kontroll növényekhez hasonlóan, a gCDF1 növényeken is összetett levelek alakultak ki. Mind a három gCDF1 mutáns növény szára vékonyabb volt, szártagjaik is megnyúltak a 'Désirée' kontroll növény szártagjaihoz képest (*2B ábra*). A vegetációs időszak közepén a gCDF1 növények és a kontroll növények magassága között azonban szignifikáns különbség nem volt.



I. ábra: (A) A gCDF1 mutánsok azonosítása CDF1.1 3' end FW és CDF1.1 3' end R primerekkel végzett PCR-rel. M, marker; 1, 2, 3, kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll. (B) A *CDF1* gén és transzkriptumainak sematikus rajza. Az X1 (XM_006355049.2), X2 (XM_015312183.1) és *FLORE* (Gonzales et al. 2021) transzkriptumokat a nyilak jelzik. A számok a kromoszómán belüli pozíciót jelölik; chr05, V kromoszóma; ATG, translációs start kodon; TGA, translációs stop kodon. (C) A deléciók elhelyezkedése és mérete a 'Désirée' *CDF1* szekvenciájához hasonlítva. A fekete téglalapok jelzik a deléciókat, a vonalak egy-egy bázispár különbségre utalnak. P1, CDF1.1 3' end FW primer; P2, CDF1.1 3' end R primer; gRNS1, CDF1.1 gRNA1, „guide” RNS; gRNS2, CDF1.1 gRNA2, „guide” RNS. (D) A *S. tuberosum* Phureja és a gCDF1 mutánsok *CDF1* mRNS-ének feltételezett másodlagos szerkezete a translációs stop kodontól a poliadenilációs jelig.

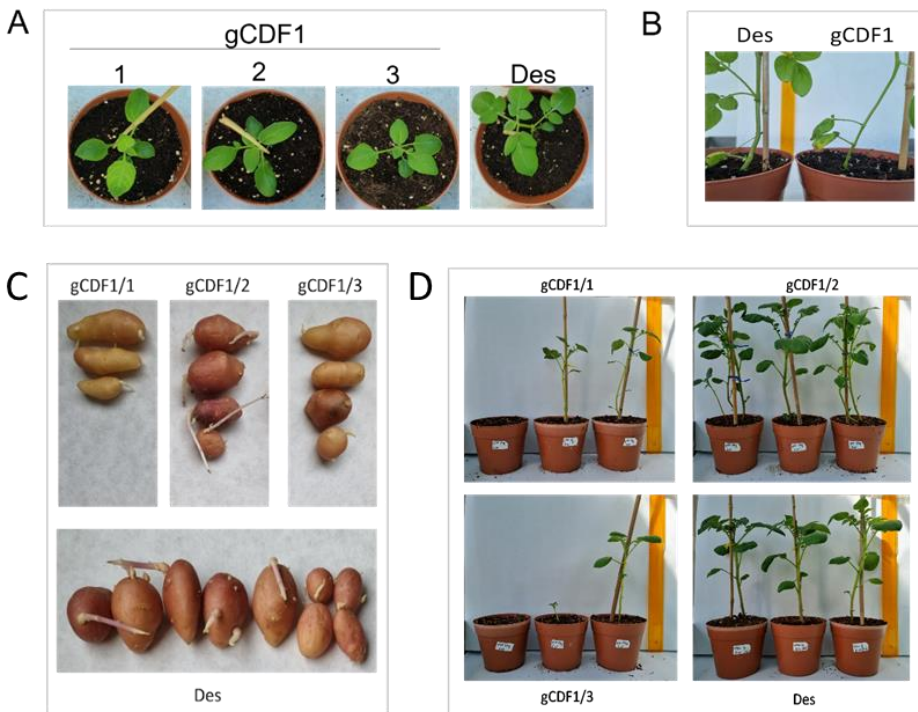
Egy hónapos növények gumóinak megszámlálásával megbecsültük a gumófejlődés koraiságát. A mutánsok gumószáma nem tért el szignifikánsan a kontrollétól. A növényeket a számolást követően visszaültettük és tovább neveltük üvegházi körülmények között, majd a vegetációs időszak végén ismét megszámláltuk a gumókat. A gCDF1/2 növényeken szignifikánsan több gumó volt, mint a kontrollon. A gumóhozam megállapítására a mutáns növényeken és a kontroll növényeken fejlődött gumók tömegét lemértük. A gCDF1/1 gumóhozama szignifikánsan magasabb, míg a gCDF1/2 gumóhozama szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll növényeké.

A 'Désirée' egy piros héjú burgonyafaja. A gCDF1/1 és a gCDF1/3 gumói, bár eltérő mértékben, de világosabbak voltak, mint a kontroll 'Désirée' gumói (2C ábra). Mivel az antociánok határozzák meg a gumók színét, megmértük a gumóhéjak antocián tartalmát. A mérés megerősítette, hogy a gCDF1/1 és gCDF1/3 vonaloknak valóban világosabb a héjszíne, mint a kontrollé, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. A megmért gumókat szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk. A betakarítást követően az 59. napon jelentek meg először a csírák. A felszedést követő 84. napon a gCDF1/1, a gCDF1/2 és a 'Désirée' összes gumóján találtunk csírákat, míg a gCDF1/3 gumóinak csírázása elmaradt a többi vonalétól, itt csak a gumók 50%-án volt csíra. A felszedést követő 129. napon azonban már a gCDF1/3-nak is minden gumója csírázott (2C ábra).

Egy hónappal az ültetés után mind a gCDF1/2, mind a kontroll 'Désirée' összes gumójából megjelentek a hajtások, míg ez később a gCDF1/1 és gCDF1/3 gumók esetében. A legnagyobb késést a gCDF1/3 gumók mutatták (2C ábra).

Hat héttel a kiültetés után már látszódtak a gCDF1 mutánsokon a magasságbeli (2D ábra) és levélmorfológiai különbségek a kontrollhoz képest. A gCDF1/1 és a gCDF1/3 növények alacsonyabbak voltak és fejlődésben is elmaradtak a kontroll növényektől. A vegetációs időszak elején az összetett levelek kialakulása, az *in vitro*-ból kiültetett növényekhez hasonlóan, később.

A vegetációs időszak végén a gumókat felszedtük, majd lemértük őket, hogy megállapítsuk van-e eltérés az *in vitro*-ból kiültetett növények és a gumóról kiültetett növények gumóhozama között. A gCDF1/3 növények gumóhozama szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a 'Désirée'-é. Az *in vitro*-ból kiültetett növényekhez képest a gCDF1/1 és gCDF1/3 gumóhozama alacsonyabb volt, míg a gCDF1/2 gumóhozama kis mértékben növekedett.



2. ábra: (A) Vegetációs időszak elején a gCDF1 mutáns vonalak levélmorfológiája a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva. (B) A vegetációs időszak közepén a gCDF1 mutánsok szárvastagsága a 'Désirée'-hez viszonyítva. (C) A gCDF1 mutáns és 'Désirée' kontroll vonalak csírázott gumói kiültetés előtt. (D) A gumóról kiültetett gCDF1 mutáns növények magassága.

3.2. A gCDF1 mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása

A *CDF1* mutánsok előállítására hatékonyan bizonyult a CRISPR/Cas9 rendszer, mivel 15%-os gyakorisággal kaptunk 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutáns vonalakat. Három különböző méretű és elhelyezkedésű deléziós mutánst (gCDF1/1, gCDF1/2, gCDF1/3) választottunk ki a részletes vizsgálatokhoz. Az *in vitro*-ból, de a gumókból fejlődött gCDF1/1 és gCDF1/3 mutánsokban is késett az összetett levelek kialakulása és az *in vitro*-ból kiültetett növények szára vékonyabb, szártagjaik pedig megnyúltabbak voltak a kontroll 'Désirée' növényekéhez képest. Eddigi publikációk alapján az volt ismert, hogy a *CDF1* a burgonyában részt vesz a gumófejlődés megindításában és gyengíti a szárazságtűrést (Kloosterman et al. 2013. Gonzales et al. 2021), míg más növényfajokban már számos más folyamattal is kapcsolatba hozták, mint pl. a fényre adott reakció vagy a virágzás ideje (Renau-Morata et al. 2020). Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a gumófejlődésen kívül a *CDF1*-nek más szerepe is lehet a burgonyában, mégpedig a hajtásfejlődés befolyásolása.

Mindhárom *CDF1* mutáns vonalban eltérő gumófejlődési jellemzőket kaptunk. Míg az egyik mutáns vonalban később a gumófejlődés, addig a másik vonalban a gumók összömege nagyobb volt, mint a kontrollé. A gumók csírázása is eltérően alakult a három mutánsban. Így nem lehetünk benne biztosak, hogy a *CDF1* szerepet játszik a gumófejlődésben a 'Désirée' burgonyafajtában. A három mutáns vonal eltérő gumófejlődését és csírázását magyarázhatjuk olyan *CDF1* mutációkkal, amiket még nem sikerült azonosítani, de nem zárhatjuk ki az ún. „off target” mutációkat sem. Emellett, mivel a három mutáns közül egyik sem null mutáns, bennük a Cas9 sejt szinten folyamatosan képes újabb mutációkat generálni, amiket bár PCR-rel nem tudunk azonosítani, de a gumófejlődésre és csírázásra hatással lehetnek.

A kimutatott deléciók egyike sem érte el a *CDF1* kódoló régióját, mégis fenotípusos változást okozott. Az mRNS-ek 3' nem-transzlálódó régióinak szerepe lehet az mRNS stabilitásában és transzportjában. Kötődhetnek hozzájuk mikroRNS-ek, fehérjék, amik befolyásolhatják a transzláció hatékonyságát (Nyitra és Pál 2013). A g*CDF1* mutánsokban a deléciók kívül esnek a poliadenilációs jelen, de a mutációk, a számítógépes predikció szerint, jelentős változást okoztak a *CDF1* mRNS 3' végének szerkezetében. Elképzelhető, hogy ez a változás megakadályozza a szabályozó fehérjék kötődését és csökkenti a transzláció hatékonyságát. A FLORE szabályozó lncRNS-t is lerövidítették a deléciók, aminek szintén szerepe lehet a fenotípusos változásokban, viszont ennek a mechanizmusa jelenleg még nem ismert.

3.3. A *GI* gének azonosítása és *in silico* promóter elemzése burgonyában

A burgonyában a *GI* gének azonosításához az NCBI Blast segítségével az *A. thaliana GI* (*AtGI*) NM_102124 homológját kerestük meg. Két olyan transzkriptum variánst találtunk, melyek 71,8 és 72,9%-ban azonosak voltak az *AtGI*-vel. Meglepő módon két *GI* gént találtunk a burgonyában, míg az *Arabidopsis*-ban és sok más növényfajban csak egy *GI* gén van. Az egyik a 4. kromoszómán (*GI.04*), a másik a 12. kromoszómán helyezkedett el (*GI.12*). A két változat kódoló régiója 83,7%-os azonosságot mutatott.

A *S. tuberosum* Phureja Spud DB-ben kikerestük a két *GI* variáns promóter szekvenciáját. A két promóter szekvenciát az NCBI BLAST-tal összehasonlítottuk egymással és az *AtGI* promóterével. Nem találtunk szignifikáns hasonlóságot sem a két burgonya *GI* promótere, sem az *AtGI* és a burgonya *GI* promóterek között.

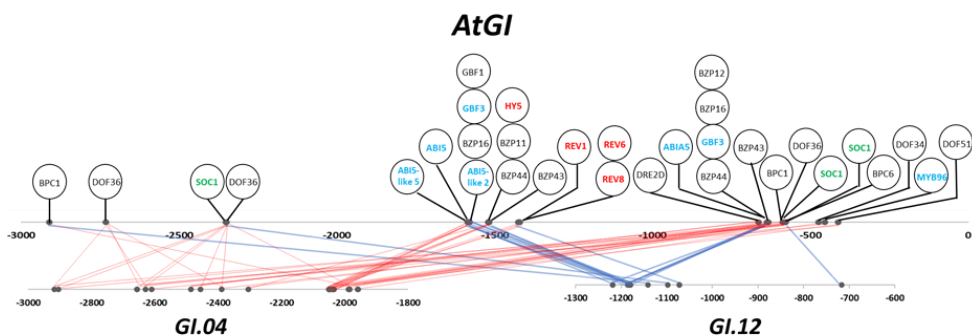
A *GI.04* és *GI.12* feltételezett promóter régiójának megismeréséhez a 'Désirée' burgonyából DNS-t izoláltunk és primereket terveztünk a *S. tuberosum* Phureja 4. és 12. kromoszómáján lévő *GI* promóter szekvenciája alapján. Klónoztuk és megszekvenáltattuk őket. A szekvenálás eredménye

alapján a 'Désirée' *GI.04* promótere, néhány bázispár eltéréssel, megegyezett a Phureja *GI.04* génjének promóterével. A 'Désirée' *GI.12* promótere nagymértékben hasonlított a Phureja-éhoz, azonban a Phureja-hoz képest 3 klónban volt egy 14 bázispáros inszerció hozzávetőlegesen -1,7 kb-nál és négy klónban pedig egy 8-9 bázispáros inszerció -0,3 kb körül. Mivel nem mind a négy klónban volt -1,7 kb-nál inszerció, arra a következtetésre jutottunk, hogy a 'Désirée'-nek legalább két *GI.12* alléja van.

A PlantRegMap program segítségével elemeztük a burgonya *GI* gének promóterének szekvenciáját, hogy megtaláljuk a transzkripció faktorok (TF-ok) kötőhelyeit. A PlantRegMap 73 kötőhelyet prediktált a *GI.04* promóterben, amihez 14 családba tartozó 45 TF kötődhet. Míg a *GI.12* promóterben 32 kötőhelyet találtunk, a kötőhelyekhez 13 családba tartozó, 27 különböző TF tud csatlakozni. A *GI.04* és *GI.12* promóterekben az ABA-hoz, a cirkadián órához és a virágfejlődéshez kapcsolódó TF kötőhelyeket azonosítottunk, illetve találtunk pl. stresszel kapcsolatos TF kötőhelyeket is.

Annak megállapítására, hogy a burgonya *GI* gének szabályozása mennyire hasonló az *Arabidopsis GI* génjéhez, az *Arabidopsis GI* génjének -3,0 kb-os szekvenciájában is azonosítottuk a PlantRegMap segítségével a TF kötőhelyeket és összehasonlítottuk a *S. tuberosum* Phureja *GI* gének promóter kötőhelyeivel (3. ábra). A program 160 kötőhelyet jósolt 106 TF számára az *AtGI* promóter régiójában. Számos TF ugyanahhoz a családhoz tartozott és átfedő kötőhelyeket is felismert.

Az *AtGI* és a *GI.04* promóterekhez kapcsolódó összes TF család azonos volt. Az *AtGI* és a *GI.12* között a legnagyobb hasonlóság az *AtGI* promóter két helyére koncentrált. Az *AtGI* promóterben három olyan különböző TF kötőhelyét is megtaláltunk, amelyek részt vesznek a cirkadián ritmus szabályozásában (LHY1, a REV1 és/vagy a REV8). Az *AtGI* promóterben cirkadián ritmushoz kapcsolódó TF kötőhelyeket a *GI.04* promóterben is megtaláltuk, viszont a *GI.12*-ben csak a REV1/8 kötőhelyek voltak jelen. Az *AtGI* részt vesz a virágzási idő szabályozásában (Rédei 1962). Virágfejlődést befolyásoló TF kötőhelyeket találtunk az *AtGI* promóterben. A burgonya *GI.04* promóterben a virágzáshoz kapcsolódóan a SOC1-like (Lee et al. 2000), MYB17, REV1/8 (Singh és Mas 2018) és a CMB1-like kötőhelyeit találtuk meg. A *GI.12* promóterben a virágzáshoz kapcsolódóan a bHLH30, ATHB51, SOC1, FBP1 és a REV1/8 kötőhelyeket találtuk. A gumózással kapcsolatba hozható POTH20 (KNOX1) kötőhelyet mindkét *GI*-ben megtaláltuk. Az *AtGI* promóter -1,8 kb szakaszától 5' irányban már alig találtunk hasonló motívumokat az *Arabidopsis* és *GI.04* között. A *GI.12* esetében nem volt kimutatható homológia az *AtGI* promóterrel -1,3 kb-tól 5' irányban.



3. ábra: Az *Arabidopsis* és a *S. tuberosum* Phureja *GI.04* és *GI.12* promóteréhez egyaránt kötődő transzkripciósfaktorok elhelyezkedésének sematikus rajza. A cirkadián ritmushoz, a virágfejlődéshez és az ABA-ra adott válaszhoz kapcsolódó TF-ok neve piros, zöld és kék színnel van kiemelve. BPC1, BASIC PENTACYSTEINE 1; DOF36, DNA BINDING WITH ONE FINGER 36; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1; ABIS-like5, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE 5; ABIS, ABA-INSENSITIVE 5; GBF1, G-BOX BINDING FACTOR 1; GBF3, G-BOX BINDING FACTOR 3; BZP16, BASIC LEUCINE-ZIPPER 16; ABIS-like2, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE2; HYS, LONG HYPOCOTYL 5; BZP11, BASIC LEUCINE-ZIPPER 11; BZP44, BASIC LEUCINE-ZIPPER 44; BZP43, BASIC LEUCINE-ZIPPER 43; REV1, REVERSIONLESS 1; REV6, REVERSIONLESS 6; REV8, REVERSIONLESS 8; DRE2D, DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT 2D; BZP12, BASIC LEUCINE-ZIPPER 12; BPC6, BASIC PENTACYSTEINE 6; DOF34, DNA BINDING WITH ONE FINGER 34; MYB96, MYELOBLASTOSIS 96; DOF51, DNA BINDING WITH ONE FINGER 51

3.4. A *GI* gének promóter elemzéséből kapott eredmények megvitatása

Megállapítottuk, hogy a 'Désirée' burgonyafajtában két *GI* gén található, melyek eltérést mutatnak mind a promóter-, mind pedig a kódoló régióban. A különböző növényfajok *GI* génjeinek expressziója napi szabályozási ciklust mutat, ami így van a *S. tuberosum* ssp. Andigena-ban és a Neo-Tuberosum burgonyában is (Morris et al. 2014). A 'Désirée' mindkét *GI* génjének promóterében megtaláltuk a REV1/8 kötőhelyét, melyek működése a cirkadián szabályozáshoz kapcsolható. Feltételezzük tehát, hogy a *GI.04* és a *GI.12* expressziójának szabályozása is a napi ciklushoz köthető.

A *GI* gének kulcsszerepet játszanak a virágzási jelátviteli útvonal szabályozásában (Brandoli et al. 2020). A PlantRegMap mindkét burgonya *GI* promóter esetében talált virágfejlődésben résztvevő TF-ok (pl. a SOC1 vagy az ABIS) számára kötőhelyeket, pedig korábban Odgerel (2022) azt találta, hogy a *GI.04* minden virágszervben expresszálódik, míg a *GI.12* egyik virágszervben sem. A *GI.12* valószínűleg a virágfejlődés korai szakaszában aktív, míg a kifejlett virágban már nincs szükség a működésére.

A *GI* gén a *S. tuberosum* ssp. Andigena-ban kulcsszerepet játszik a gumófejlődésben (Kloosterman et al. 2013). A 'Désirée' mindkét *GI* génjének promóterében megtaláltuk a POTH20 kötőhelyét. Rosin et al. (2003) kimutatták, hogy a POTH1, a POTH20-szal 73%-ban azonos. A

POTH1 túltermeltetése fokozza az *in vitro* gumósodást mind rövid nappalos, mind hosszú nappalos körülmények között a *S. tuberosum* ssp. Andigenában. Ha a POTH20 helyettesíteni tudja a POTH1-et 'Désirée'-ben, akkor a *GI* expressziójának, és ezáltal a gumófejlődésnek is, alternatív, pozitív szabályozója lehet.

A *GI* részt vesz az abiotikus stresszre adott válaszok szabályozásában és néhány növényfajnál kimutatták, hogy a *GI* levelekben történő expresszióját a stressz befolyásolja (Jose és Bánfalvi 2019). A *GI.04* expresszióját a hideg, a hó és az ozmotikus stressz indukálja, míg a *GI.12*-t az ABA felfelé, a só, a hideg, a meleg és az ozmotikus stressz lefelé szabályozza, azaz a két *GI* gén eltérő módon reagál a stresszre (Odgerel, 2022). A különbségek egyik oka lehet az, hogy a *GI.04* promóterben vannak MYB TF kötőhelyek, míg a *GI.12* promóterben nincsenek.

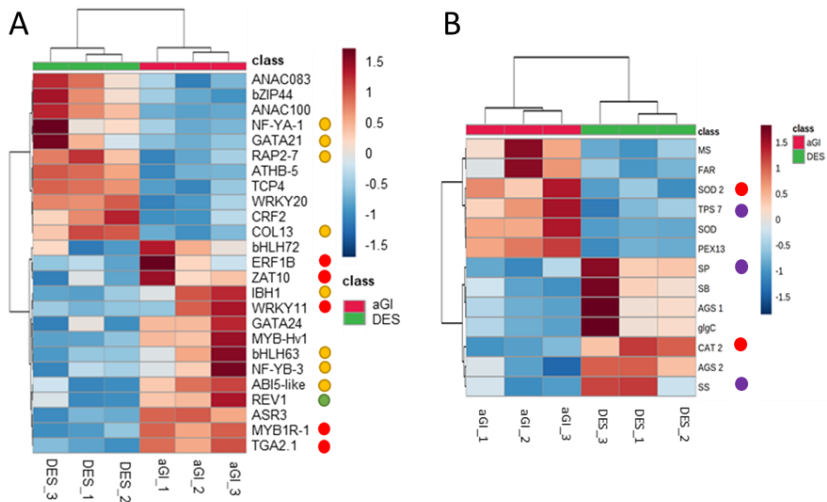
A *GI.12* expressziós szintje a gyökér- és a hajtásszervekben kb. ötszöröse, a gumókban pedig harmincszorosa volt a *GI.04* expressziós szintjének (Odgerel, 2022). A transzkripció szabályozása összetett folyamat, ami a TF-ok elérhetőségétől, aktivitásától, valamint a promóterben és környékén jelenlévő szabályozóelemek típusától, számától, helyzetétől és kombinációjától függ (Hernandez-Garcia és Finer 2014). Így feltételezzük, hogy a *GI.12* magasabb aktivitása azzal magyarázható, hogy a *cis* szabályzó elemek nagyobb közelségben vannak a translációs starthelyhez a *GI.12* promóter régióban, mint a *GI.04* promóterben.

3.5. Az aGI52 levelek transzkriptom elemzése

A *GI.04* funkciójának megismerésére Jose (2019) *GI.04* expresszióban gátolt 'Désirée' vonalakat hozott létre, melyek közül a legnagyobb gátlás a 'Désirée' kontrollhoz képest az aGI52 növényekben volt, ahol 49%-os, viszonylag stabil csökkenés volt kimutatható a *GI.04* expressziójában (Odgerel 2022). Ezért ezt a vonalat választottuk ki a további vizsgálatokra.

A *GI.04* gátlás transzkriptom szintű hatásának vizsgálatára RNS szekvencia analízist végeztünk a Novogene céggel üvegházban nevelt aGI52 levelekből izolált RNS-ekből. 454 olyan gént találtunk, ami csak a 'Désirée'-ben és 247 olyat, ami csak az aGI52-ben fejeződött ki. 488 differenciálisan expresszálódó gént (DEG-et) kaptunk. A GO elemzés kimutatta, hogy a fotoszintézishez kapcsolódó gének megnyilvánulása magasabb, míg a peptidázok és a peptidáz inhibitorok expressziója gátolt volt az aGI52-ben. A KEGG elemzés alapján az egyes útvonalak, mint pl. a szénhidrát metabolizmus aktiválódtak, míg egyes aminosavak metabolizmusa, mint pl. a nitrogén metabolizmus gátlódott. Az aGI52-ben 14 TF, köztük az *IBH1*, *REVI* és a növényi védekezésben részt vevő egyes TF-ok (*ERF1B*, *ZAT10*, *WRKY11*, *MYB1R1*, *TGA2.1*) expressziója felfelé, míg 11 TF (pl. az etilénre reagáló *RAP2-7*) expressziója lefelé

szabályozódott (4A ábra). A keményítőszintézis kulcsfontosságú enzimeit kódoló gének, az *AGS* (*ADP-GLUCOSE SYNTHASE*) és *SS* (*STRACH SYNTHASE*), *SP* (*STARACH PHOSPHORYLASE*) átírása gátlódott, de a *TPS* (*TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE*) expressziója nőtt. A védekezésben szerepet játszó gének közül a *SOD* (*SUPEROXIDE DISMUTASE*) aktiválódott, viszont a *CAT* (*CATALASE*) represszálódott (4B ábra).



4. ábra: (A) Az aGI52 levelekben eltérően expresszálódó TF-ok a nem transzformált kontroll 'Désirée' levelekhez viszonyítva és hőterképen ábrázolva. Sárga pöttyel a virágfejlődéshez, zölddel a cirkadián órához, pirossal a stresszhez kapcsolódó TF-ok vannak jelölve. (B) Az aGI52 levelekben eltérően expresszálódó gének a nem transzformált 'Désirée' kontroll levelekhez viszonyítva, amelyek részt vesznek a glioxilát- és dikarboxilát anyagcserében, a szénhidrát anyagcserében és a peroxiszómális útvonalakban. Piros pöttyel a stresszhez, lilával a szénhidrát anyagcserével kapcsolódó TF-ok vannak jelölve.

3.6. A transzkriptom elemzés eredményeinek megvitatása

A GI szerepét számos növényfajban vizsgálták és úgy tűnik, hogy a virágzási idő szabályozása és a cirkadián óra szabályozása a GI általános funkciója (Liu et al. 2024). A transzkriptom elemzés kimutatta, hogy a *GI.04* gátlása befolyásolja a virágzás szabályozásában résztvevő számos TF kifejeződését. A *GI.04* gátlása pl. a *REV1* expressziójának növekedését idézte elő. A *REV1* összekapcsolja a cirkadián órát és az auxin hálózatokat az auxin bioszintetikus gén, a *YUCCA8* expressziójának pozitív szabályozásával és ezáltal elősegíti a növények növekedését (Rawat et al. 2009). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy más növényfajokhoz hasonlóan, a GI a burgonyában is részt vesz a cirkadián óra szabályozásában.

A virágzás mellett a GI a növények környezeti stresszre adott válaszaiban is részt vesz. Védekezési mechanizmusban résztvevő, aktiválódott TF-okat azonosítottunk az aGI52-ben, köztük az *ERF1B*-t, *WRKY11*-et és *TGA2.1*-et. Kimutatták, hogy az *ERF1* és a *WRKY11* aktiválása az *Arabidopsis*-ban és a paradicsomban a *Bacillus* fajaival szembeni tolerancia növekedéséhez vezet (Lorenzo et al. 2003, Jiang et al. 2016). Ezzel szemben a *TGA2.1* aktivitása késlelteti a rizs növényeket a *Xanthomomas oryzae* elleni védekezésben (Fitzgerald et al. 2005).

A SOD és CAT antioxidáns enzimek a növények védekező mechanizmusainak szerves részei, azért hogy elkerüljék az aktív oxigénfajták által okozott károkat. Érdekes módon azonban, míg a SOD felfelé szabályozott, a CAT lefelé szabályozott volt az aGI52 levelekben. A GI a SOD represszora az *Arabidopsis*-ban is, ahogy ezt a *gi-3* mutáns fokozott toleranciája is jelzi az oxidatív stresszel szemben (Cao et al. 2006). A burgonyával ellentétben azonban a CAT gének expressziós szintje az *Arabidopsis*-ban 1,5–2-szer magasabb volt a *gi* mutánsokban, mint a vad típusban (Cha et al. 2019).

A keményítőszintézis kulcsfontosságú génjei, az *AGS1*, *AGS2*, *SS* és *SP* gátlódtak, míg a *TPS*, egy cukorhírvivő, aktiválódott az aGI52-ben. Ismert, hogy az *Arabidopsis* cirkadián rendszere érzékeny a szacharózra, a GI fehérjét éjszaka a szacharóz stabilizálja, a GI mutánsok keményítőtartalma pedig megnő (Dalchau et al. 2011, Eimert et al. 1995, Haydon et al. 2017). Olyan rizsnövényekben, ahol a GI-re null mutáció mutatható ki, a levelekben szignifikánsan megnövekedett a szacharóz és a keményítőtartalom (Izawa et al. 2011). Transzkriptom eredményeink arra utalnak, hogy a burgonya lehet a harmadik olyan ismert növényfaj, amelyben a *GI.04* expresszió visszaszorítása csökkenti a levelek keményítőtartalmát. Egy közelmúltban végzett tanulmány a *TPS8*-at a GI közvetlen interaktoraként azonosította *Arabidopsis*-ban (Krahmer et al. 2018) és mi a *TPS7*-et a felfelé szabályozott gének között találtuk. Így tehát eredményünk alátámasztja azt a korábbi következtetést, hogy a TPS részt vesz a GI hatások közvetítésében.

3.7. A GI mutánsok izolálása és jellemzése

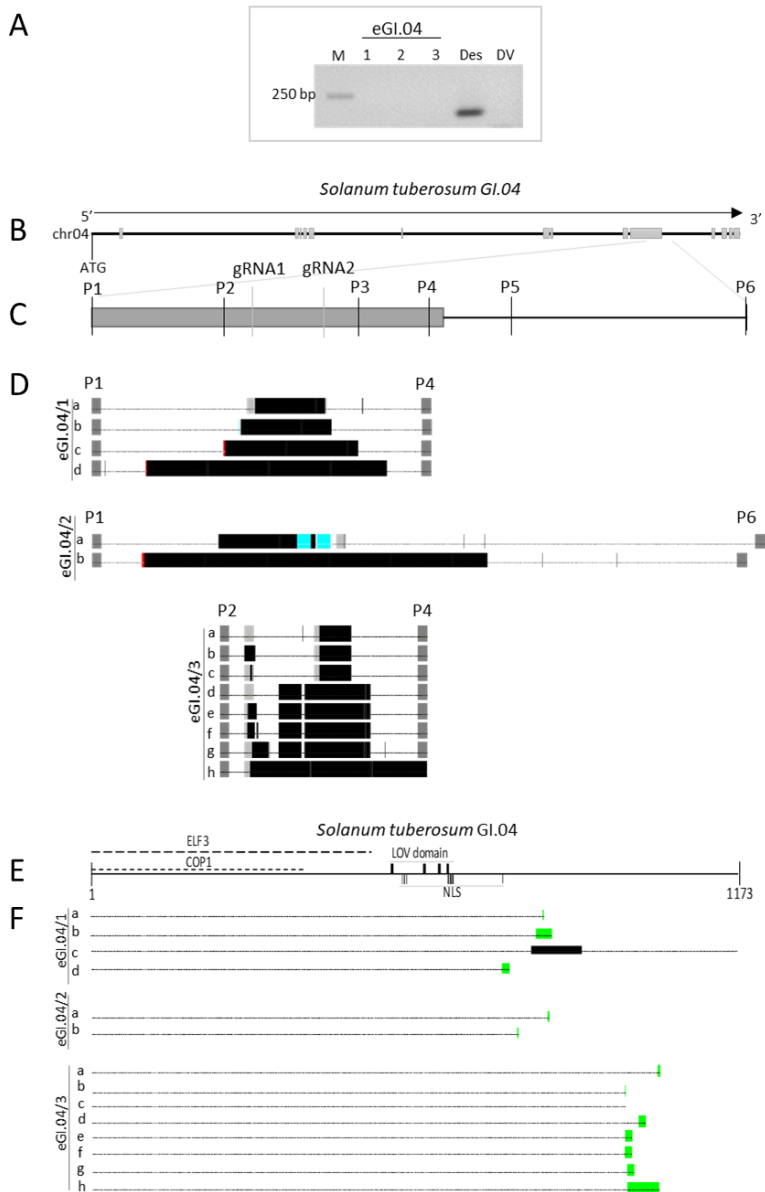
A GI gének burgonyában betöltött szerepének megismeréséhez CRISPR/Cas9 genomszerkesztés segítségével *GI.04* és *GI.12* mutánsokat állítottunk elő 'Désirée'-ből. A *GI.04* szekvenciájának nagy része azonos a *GI.12* szekvenciájával, ezért először a gRNS-eket a 3' véghez közeli részbe terveztük, ahol a két GI gén leginkább eltérő régióval rendelkezik.

A *GI.04* esetében 82, a *GI.12* esetében 86 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük. A *GI.04*-ben 29, a *GI.12*-ben 18 nagy deléciót hordozó mutáns vonalat kaptunk, melyeket „end” mutánsoknak neveztünk el (eGI.04, eGI.12).

Három kiválasztott eGI.04 mutáns vonalról feltételeztük a gélkép alapján (*5A ábra*), hogy null mutánsok (eGI.04/1, eGI.04/2, eGI.04/3). A deléciók méretének és elhelyezkedésének meghatározására a PCR fragmentumokat klónoztuk a pGEM-T® Easy vektorba és megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a Spud DB-ben található *GI.04* genomszekvenciához (*5B és C ábra*) hasonlítottuk. Az eGI.04 mutáns vonalakban különböző méretű (3-711 bp között) és elhelyezkedésű deléciókat találtunk (*5D ábra*). A *GI.04* fehérje 1173 aminosavból áll. Vázlatos rajza az *5E ábrán* látható. A mutánsok nukleotid sorrendjének aminosavakká történő fordításával kimutattuk, hogy egy allél kivételével, minden deléció korai stophoz, a *GI.04* fehérje megrövidüléséhez vezetett (*5F ábra*).

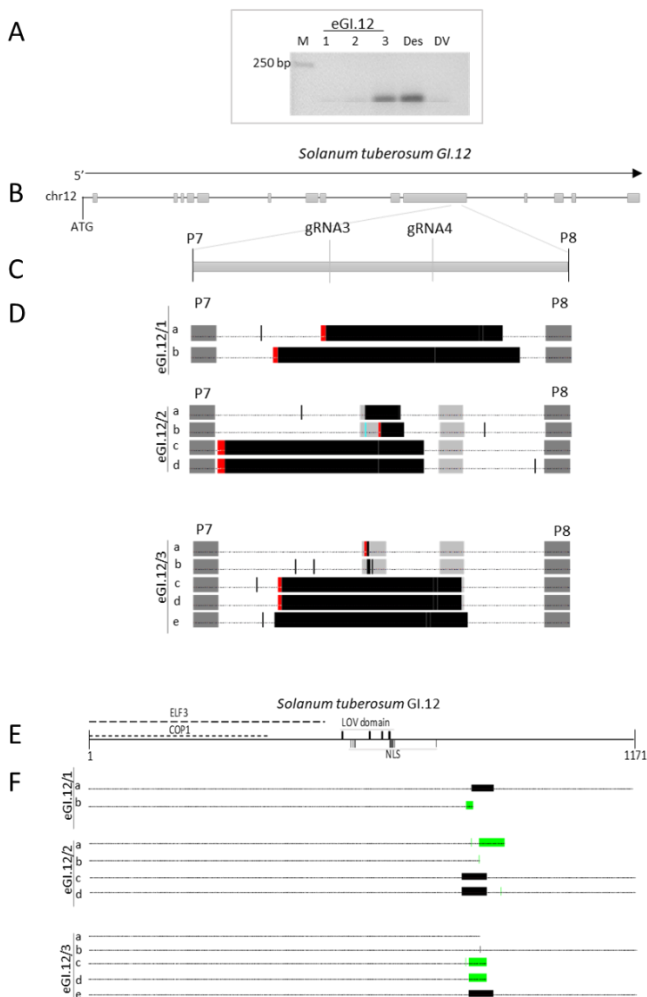
A nagy deléciót hordozó eGI.12 mutáns vonalak közül hármat a grNS primerekkel végzett PCR-rel is leteszteltünk. Megállapítottuk, hogy a három mutáns vonalból (eGI.12/1, eGI.12/2, eGI.12/3) kettő nagy valószínűséggel null mutáns, míg a harmadik vonalban feltételezhetően nincs mindegyik allélban mutáció (*6A ábra*). A deléciók méretének és elhelyezkedésének meghatározására hasonlóan jártunk el, mint az eGI.04 esetében. A kapott szekvenciákat a Spud DB-ben található *GI.12* genomszekvenciához hasonlítottuk (*6B és C ábra*). Akárcsak az eGI.04 mutánsokban, az eGI.12 mutánsokban is különböző méretű (2-197 bp között) és elhelyezkedésű deléciókat kaptunk a vad típusú szekvenciához viszonyítva (*6D ábra*).

Az eredeti *GI.12* fehérje 1171 aminosavból áll és vázlatos rajza a *6E ábrán* látható. Az eGI.12 mutánsokban is a deléciók általában korai stophoz, a *GI.12* fehérje megrövidüléséhez vezetettek, de volt olyan eset is, ahol a deléciót követően visszaállt az eredeti aminosav sorrend, vagy ahol a deléció csak 1 aminosav eltéréshez vezetett (*6F ábra*).



5. ábra: (A) Az eGI.04 mutánsok azonosítása GI04 gRNA1 Fw és GI04 gRNA2 R primer párral végzett PCR-rel. M, marker; 1, 2, 3, a kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz. (B) Vad típusú *GI.04*. chr04, 4. kromoszóma; ATG, translációs start kodon; téglalapok, exonok (C) A 10. exon egy részének nagyított rajza a gRNS-ekkel és primerekkel (P1-P6). (D) A deléciók elhelyezkedése és mérete az eGI.04 mutáns vonalakban. A deléciókat a fekete téglalapok jelzik, a függőleges vonalak egy-egy bp különbségre utalnak. A primerek sötétszürke-, a gRNS-ek világosszürke téglalapok. Piros színnel a deléció mindkét oldalára elhelyezhető, míg kézzel a megduplázódott szekvencia részek vannak kiemelve; a-h betűk a különböző allélokat jelölik. Az eGI.04/2-ben legalább

egy mutáns allél még nincs betérképezve. (E) Vad típusú GI.04 a funkcionális doménekkal. Az ELF3 (EARLY FLOWERING 3) és a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORHOGENIC 1) kötődési szakaszát a szaggatott vonalak jelzik, a LOV domént (light-oxygen-voltage domain) és az NLS-t (nucleus localisation signal) fekete téglalapok mutatják. A számok a fehérje első és utolsó aminosavára utalnak. (F) Az eGI.04 mutáns vonalak fehérjéi. A fekete kiemelés jelzi a deléció helyét és méretét, zöld színnel a megváltozott fehérje szekvencia látható, az a-h betűk a különböző allélokat jelölik.



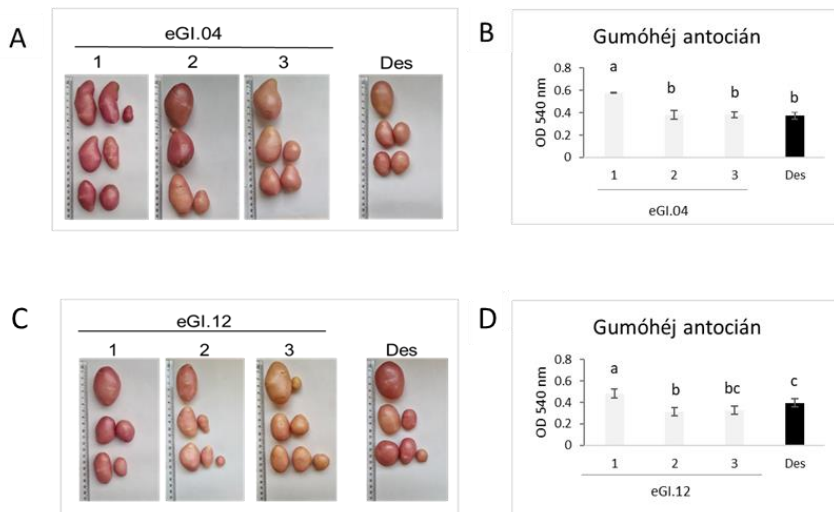
6. ábra: (A) Az eGI.12 mutánsok azonosítása GI12 gRNA1 Fw és GI12 gRNA2 R primerekkel végzett PCR-rel. A jelölések azonosak az 5. ábrával. (B) A burgonya *GI.12* génjének vázlatos rajza. A vad típusú *GI.12*. chr12, 12. kromoszóma. (C) A 10. exon egy részének nagyított rajza a gRNS-ekkel és primerekkel (P7, P8). (D) A deléciók elhelyezkedése és mérete az eGI.12 mutáns vonalakban. Az eGI.12/3-ban valószínűleg van egy vad típusú allél is, ami az ábrán nincs feltüntetve. (E) A vad típusú és eGI.12 mutáns fehérjék vázlatos rajza. (F) Az eGI.12 mutáns vonalak fehérjéi.

Az eGI.04 és eGI.12 mutáns növények fenotípusát és gumóképzési tulajdonságait két kísérletben üvegházi körülmények között vizsgáltuk. Kontrollként mind a két esetben nem transzformált 'Désirée' növényeket használtunk.

A gumófejlődés koraiságában egyik eGI.04 mutáns sem tért el szignifikánsan a kontrolltól. A gumók száma az eGI.04/1 és az eGI.04/2 mutánsokon az első kísérletben szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontroll növényeken, de a második kísérletben egyik mutáns gumószáma sem tért el a kontrolltól. Az első kísérletben a gumóhozamban szignifikáns eltérést egyik vonal esetében sem kaptunk, de a második kísérletben az eGI.04/1 vonal gumóhozama szignifikánsabb alacsonyabb volt, mint a kontrollé.

Az eGI.12 mutánsokból sem kaptunk szignifikáns különbséget a korai és a késői gumószámban egyik vonal esetében sem a kontrollhoz viszonyítva. Az eGI.12/2 mutánsnak viszont az első kísérletben szignifikánsan alacsonyabb volt a gumóhozama, mint a 'Désirée'-nek. A második kísérletben nemcsak az eGI.12/2, de az eGI.12/3 vonal gumóhozama is szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollé.

Mint ahogy azt már említettük, a 'Désirée' egy piros héjú burgonyafajta, aminek színét az antociánok adják. Szemmel láthatóan az eGI.04/1 és az eGI.04/2 gumók, bár eltérő mértékben, de sötétebbnek tündek, mint a 'Désirée' gumói (7A ábra). Az eGI.04/3 gumók színe nem tért el a kontrollétól. Az antocián tartalom mérés megerősítette, hogy az eGI.04/1 gumók héjszíne valóban intenzívebb, mint a kontrollé. Az eGI.04/2 és az eGI.04/3 gumóhéjak antocián tartalma viszont nem tért el szignifikánsan a kontrollétól (7B ábra). Szemmel az eGI.12/1 gumók sötétebbnek, míg az eGI.12/2 gumók világosabbnak tündek, mint a 'Désirée' gumók (7C ábra) és ezt az antocián mérés is megerősítette (7D ábra).



7. ábra: Az eGI.mutáns vonalak gumói és gumóhéjuk antocián tartalma a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva. **(A)** Az eGI.04 és 'Désirée' gumók. **(B)** Az eGI.04 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma. **(C)** Az eGI.12 és 'Désirée' gumók. **(D)** Az eGI.12 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma.

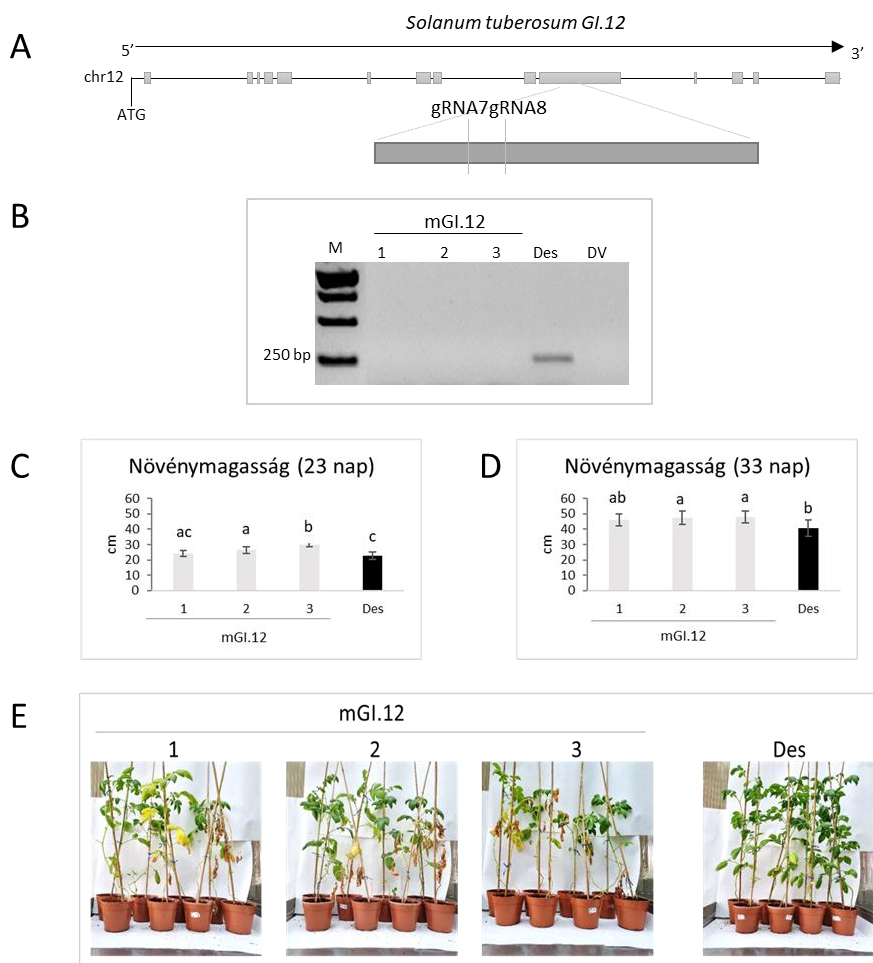
Mivel a 'Désirée' *GI* génjeinek végére tervezett gRNS-ekkel kapott mutánsok nem mutattak lényeges eltérést a vadtypushoz képest, újabb mutánsokat hoztunk létre. A GI fehérje középső részén helyezkedik el az úgy nevezett LOV domén, amihez három fotoreceptor, a ZTL, az LKP2 és az FKF1 is kötődni képes (Kwon et al. 2022). Megpróbáltuk ezt a középső részt megcélolni és „middle” (mGI) mutáns vonalakat létrehozni. Ehhez *GI.04* és *GI.12* specifikus gRNS-eket terveztünk, de megpróbáltuk mindkét gént is egyszerre eltalálni a gRNS-ek egyszerre történő bevitelével a 'Désirée'-be ko-transzformáció segítségével. Az így kapott *GI.04* mutáns vonalakat mGI.04-nek, a *GI.12* mutáns vonalakat mGI.12-nek és a mindkét *GI*-re is mutáns vonalakat mGI.4/12-nek neveztük el. Az mGI.04 esetében 148, az mGI.12 esetében 22, az mGI.4/12 esetében 108 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük. Az mGI.04 és az mGI.12 esetében csak olyan mutánsokra koncentráltunk, ahol mind a négy allélban keletkezett mutáció.

Az mGI.12 mutánsokat gRNS primerekkel (8A ábra) végzett PCR-rel tesztelve 14 null mutánst találtunk, amiből hármat választottunk ki a további vizsgálatokhoz (mGI.12/1, mGI.12/2 és mGI.12/3) (8B ábra).

Üvegházi kísérleteket indítottunk az mGI.12 mutánsok fenotípusának és gumóképzésének vizsgálatára. Kontrollként nem transzformált 'Désirée' növényeket ültettünk. A vegetációs időszak elején, a kiültetés után 23 nappal, majd 10 nappal később is, lemértük a növények magasságát. A kiültetés után 23 nappal és 33 nappal is az mGI.12/2 és az mGI.12/3 mutáns növények szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll 'Désirée' (8C és

D ábra). Sem a korai, sem a késői gumószámban, de a gumóhozamban sem volt szignifikáns eltérés az mGI.12 és a kontroll növények között. A gumók alakja és színe sem tért el a kontrollétól.

A vegetációs időszak végén, mielőtt felszedtük a gumókat, láttuk, hogy az mGI.12 mutánsok elkezdtek sárgulni, a levelük megszáradt, míg ez a 'Désirée' növényeken még nem volt észlelhető. Az mGI.12 mutáns vonalak tehát előbb mutatták az elhalás/öregedés jeleit, mint a kontroll növények (*8E ábra*).



8. ábra: (A) A burgonya *Gl.12* génjének vázlatos rajza és a 10. exon egy részének nagyított képe a primerként is használt gRNS-ekkel. chr12, 12. kromoszóma; ATG, translációs start kodon; téglalapok, exonok. (B) Az mGI.12 mutánsok azonosítása *Gl.12* gRNS-ekkel végzett PCR-rel és a PCR fragmentumok agaróz gélen történt szétválasztásával. M, marker; számok, a kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz. (C) Az mGI.12 növények magassága a 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva a kiültetés után 23 nappal

(D) és a kiültetés után 33 nappal. (E) Az mGI.12 mutánsok morfológiája a vegetációs időszak végén a nem transzformált 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva.

3.8. A GI mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása

A *GI* gének burgonyában betöltött szerepének megismeréséhez több CRISPR/Cas9 konstrukciót hoztunk létre, amelyeket egy kereskedelmi burgonyafajtába, a 'Désirée'-be, juttattunk, majd megvizsgáltuk a mutációk hatását a növények fejlődésére és gumóképzésére.

A CRISPR/Cas9 rendszer eredményesnek bizonyult a *GI* mutánsok előállítására is. Az eGI.04 esetében a látható, nagy deléciók megjelenési gyakorisága 35% volt, míg az eGI.12 mutánsok esetében ilyen mutánsokat 21%-ban kaptunk. Az mGI mutánsok esetében csak null mutánsokat kerestünk. Az mGI.04-ben 2%-os, a mGI.12-ben 63%-os, az mGI.4/12-ben a *GI.04*-re nézve 5%-os, a *GI.12*-re nézve 15%-os gyakorisággal kaptunk olyan mutánsokat, amelyben mindegyik allélban keletkezett mutáció.

A gumók tömege eltérő módon alakult a *GI* mutánsokban a nem transzformált kontrollhoz viszonyítva. Egyes vonalak esetében (eGI.04/1, eGI.12/2, eGI.12/3) szignifikánsan alacsonyabb gumóhozamot mértünk, míg mások nem mutattak különbséget a kontrollhoz képest. Kiemelendő ezek közül az eGI.12/2, ami mindkét kísérletben azonos eredményt adott, míg a többiek esetében az alacsonyabb gumóhozam nem volt ismételhető. Az eGI.12/2 alacsonyabb gumóhozama nem biztos, bár lehet, hogy összefügg a deléció méretével, mivel abban két csonka fehérje és két olyan fehérje szintetizálódik, amiben egy szakasz kiesik, majd visszaáll az eredeti aminosavsorrend. Az eGI.12/1-ben is van legalább egy-egy, az eGI.12/3-hoz hasonló mutáns allél, de a többi fehérjekópia aminosavsorrendje még nem pontosan ismert. Az eGI.12/3-ban pedig van egy olyan fehérjekópia, amiből csak egy aminosav hiányzik. Tehát lehet, hogy az eGI.12/2 és az eGI.12/3 gyengébb mutánsok, mint az eGI.12/3 és ezzel magyarázható, hogy nem, vagy nem minden üvegházi körülmény között mutatnak gumóhozam csökkenést. De az se kizárt, hogy az eGI.12/2-ben van egy „off target” mutáció és ez okozza a gumóhozambeli különbséget.

Ahogy már azt többször említettük, a 'Désirée' egy piros héjú burgonyafajta. Az antiszensz aGI vonalak gumóhéjának alacsonyabb az antocián tartalma, mint a kontroll 'Désirée' gumóhéjának. Bár eltérő mértékben és nem mindegyikben, de az eGI mutánsok esetében mi is tapasztaltunk antocián tartalom változást. Az eGI.04/1 és az eGI.12/1 gumóhéjak antocián tartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollé, viszont az eGI.12/2 mutánsé szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollé, amire egyelőre nem tudunk magyarázatot adni.

A fehérje módosulások az eGI mutánsok esetében nem érték el a GI fehérje középső részén elhelyezkedő LOV domént, amihez fotoreceptorok kötődnek és az NLS szekvenciákat sem, ami a GI sejtmagba történő

bejutását teszi lehetővé. Ezért újabb konstrukciókat terveztünk, amikkel a *GI* gének középső részét céloztuk meg (mGI mutánsok). Az első kísérlet alapján megállapítottuk, hogy az mGI.12 mutánsok valamivel magasabbra nőnek, mint a 'Désirée' és életciklusuk rövidebb, hamarabb elsárgulnak, mint a kontroll. Ugyanakkor a gumókötés idejét, a gumóhozamot és a gumók színét és alakját tekintve nem térnek el 'Désirée' kontrolltól. A deléciók térképezése folyamatban van.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

A gumófejlődés megindulásának molekuláris szabályozását a rövid nappalos gumózású *S. tuberosum* Andigena tájfajtaival végzett kísérletekből ismerjük. A gumók kialakulását befolyásoló legfontosabb gének: az *SP6A*, a *BEL5* és a *CDF1*. A *CDF1* közvetítő szerepet játszik a cirkadián óra jelei és az *SP6A* mobilizációs jel között a levélben. Közvetett módon a *GI* is szerepet játszik a gumóképzésben, mert az *FKF1*-gyel komplexet alkotva elszállítja a *CDF1*-et a „bontóba”, a proteaszómákhoz (Dutta et al. 2024). Kísérleteink célja az volt, hogy megállapítsuk, milyen szerepe lehet a *CDF1*-nek és *GI*-nek egy naphossztól független gumózású, termesztett burgonyafajtában, a 'Désirée'-ben.

A kérdés megválaszolására célzott mutációkat hoztunk létre a *CDF1*-ben és a *GI*-ben, amiből két allélt is találtunk a 'Désirée'-ben, egyiket a 4. (*GI.04*) másikat a 12. (*GI.12*) kromoszómán. A mutánsokat a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével hoztuk létre. A módszer hatékonynak bizonyult, mivel 15%-os gyakorisággal kaptunk 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutáns vonalakat a *CDF1* esetében, a *GI.04* végére tervezett gRNS-ekkel pedig 35%, míg a *GI.12* végére tervezett gRNS-ekkel 21% gyakorisággal kaptunk nagy deléciókat hordozó e*GI.04*, illetve e*GI.12* mutánsokat. Ezek közül három e*GI.04* és két e*GI.12* null mutáns volt. Mivel sikerült a *GI* gének végére tervezett gRNS-ekkel null mutánsokat is izolálni a *GI* gének középső részére tervezett gRNS-ekkel transzformált növények (m*GI.04* és m*GI.12*) között már csak null mutánsokat kerestünk. Az m*GI.04*-ből ilyen mutánsokat csak alacsony gyakorisággal (2%) kaptunk. Ezzel szemben az m*GI.12* null mutánsok gyakorisága 64% volt. A nagy különbséget magyarázhatja a gRNS-ek hatékonysága, de lehet, hogy a *GI.04* fontosabb szerepet játszik a 'Désirée'-ben, mint a *GI.12*, így, ha a deléció egy bizonyos pontot elér a *GI.04*-ben, a növény életképtelen. A mutációk térképezése, ami folyamatban van, talán közelebb vihet ennek a gyakoriságbeli különbségnek a megértéséhez.

A *CDF1* mutánsainkban a deléciók a 3' nem transzlált régióra korlátozódtak. Ez, bár a gumófejlődés megindulási idejét, a gumószámot és hozamot lényegesen nem befolyásolta, de a mutánsok szárvastagságában különbségeket fedeztünk fel, melyek a kontrollokhoz képest vékonyabbak lettek, ezen felül az összetett levelek kialakulása is késett. Ebből arra következtetünk, hogy a *CDF1* a 'Désirée'-ben szerepet játszik a hajtásfejlődésben. A három vizsgált mutáns közül kettőben hosszabb volt a gumók nyugalmi időszaka, kisebb csírák voltak a gumókon, mint a kontrollon, mikor elültettük őket. Így, ezzel összhangban, késett a gumókból a hajtások fejlődése. A keményítő lebontása, a szacharóz elérhetősége a csírázás egyik előfeltétele. A másik fontos tényező a merisztéma aktivitás

változása, ami kulcsszerepet játszik a csírázásban. A merisztéma funkció újraaktiválása egybeesik a nyugalmi állapot végével (Ferreira et al. 2017). Ezért érdemes lenne a CDF1 mutáns gumókat metabolit szinten elemezni és a merisztéma aktivitással összefüggésbe hozható gének transzkripciós szintjét megvizsgálni.

A két *GI* gén, a *GI.04* és *GI.12*, eltérést mutatott mind a promóter-, mind pedig a kódoló régióban, de sok hasonlóság is volt köztük. Például mindkét *GI* gén promóterében megtaláltuk a cirkadián szabályozáshoz kapcsolható REV1/8 kötőhelyet. Ez alapján feltételezzük, hogy a 'Désirée' két *GI* génjének expressziója is napi ciklushoz köthető, akárcsak a *S. tuberosum* Andigena és a Neo-Tuberosum *GI* génjének átírása (Morris et al. 2014). Ezt érdemes lenne kísérletesen is bizonyítani.

Egy *GI.04* expresszióban 50%-ban gátolt vonal, az aGI52 levelének transzkriptom elemzése kimutatta, hogy a *GI.04* gátlása a *REV1* expressziójának növekedését idézi elő. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy más növényfajokhoz hasonlóan (Liu et al. 2024), a *GI* a burgonyában is részt vesz a cirkadián óra szabályozásában és negatív hatással van a *REV1* expressziójára, ami viszont visszahat mindkét *GI* transzkripciójára. A *REV1* kötődését a *GI* promóterekhez élesítő 1-hibrid rendszerben lehetne vizsgálni, illetve *REV1* gátolt antiszensz vonalak előállításával, és ezekben a *GI* gének expressziós mintázatának vizsgálatával bizonyítani a feltételezett kölcsönhatást.

A PlantRegMap mindkét *GI* promóterében talált virágzással kapcsolatos TF kötőhelyeket (pl. SOC1, ABI5) és a *GI.04* expressziójának gátlása 7 virágzással kapcsolatba hozható TF mRNS-ének szintjét is megváltoztatta a levélben. Ez arra utal, hogy más növényfajokhoz hasonlóan (Liu et al. 2024), a *GI* a burgonyában is részt vesz a virágfejlődés szabályozásában. A jövőben érdemes lenne virágzáshoz kapcsolódó kísérleteket végezni, amelyek bizonyítani vagy cáfolni tudnák ezt a feltételezést.

Odgerel (2022) megállapította, hogy a két *GI* gén különböző módon reagál a stresszre. Míg a *GI.04* expressziót a hő, hideg és az ozmotikus stressz aktiválja, addig a *GI.12* expressziót csak az ABA emeli meg, az abiotikus stresszek gátló hatással vannak rá. Ennek egyik magyarázata lehet az, hogy a *GI.04* promóterében vannak MYB TF kötőhelyek, míg a *GI.12*-ben nincsenek. Annak ellenére, hogy ABA-ra reagáló TF-ok kötőhelyét mindkét promóterben megtaláltuk a *GI.04* nem reagál az ABA-ra. A *GI* mutánsokkal tervezett stresszhez kapcsolódó kísérletek segíthetnek a két *GI* gén stresszválaszainak megismerésében.

A *GI* gének promóterében POTH20 TF kötőhelyeket is azonosítottunk. A POTH20 a POTH1-gyel 73%-ban azonos (Rosin et al. 2003). A POTH1 a BEL5-tel heterodimert alkotva magának a *BEL5*-nek és a *GA2-OXIDASE 1*-nek a transzkripcióját is szabályozza, és ezáltal a gumóképzést befolyásolja

(Lin et al. 2013). Kérdés, hogy a POTH20 helyettesíteni tudná-e a POTH1-et és valóban kapcsolódik-e a *GI* gének promóteréhez. Ennek megválaszolására élesztő hibrid rendszereket lehetne használni.

Eddig sem a *CDF1*, sem az eddig vizsgált *GI* mutánsok nem mutattak semmilyen változást a gumófejlődés megindulásának időpontját illetően. Ez azonban még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy szerepük lehet a gumófejlődés megindításában, mert a *CDF1* deléciók a kódoló régió kívül vannak, az eGI mutánsokban pedig lehet, hogy nem érik el a fehérje működése szempontjából fontos régiót. Figyelembe véve azonban, hogy az mGI.12 mutánsok sem változtak meg a gumófejlődés megindulásának időpontját illetően, feltételezzük, hogy a *CDF1*-nek, és vele kapcsolatban a *GI*-nek, nincs akkora jelentősége a gumóképzés szempontjából a naphossztól független gumózású 'Désirée'-ben, mint a csak rövid nappalos körülmények között gumót fejlesztő *S. tuberosum* Andigena tájfajtában. Ennek alátámasztására azonban folytatnunk kell az mGI mutánsokban a deléciók térképezését és tesztelni kell üvegházi körülmények között a mGI.04 mutánsokat.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- A termesztett 'Désirée' burgonyafajtában sikeresen alkalmaztuk a CRISPR/Cas9 genomszerkesztési rendszert a *CDF1*, a *GI.04* és a *GI.12* gének célzott mutagenézisére.
- A gCDF1 mutánsokban a deléciók jelentős változást okoztak a *CDF1* mRNS 3' végének szerkezetében és megállapítottuk, hogy a 'Désirée'-ben a *CDF1* szerepet játszik a hajtásfejlődésben.
- A 'Désirée'-ben két *GI* gént (*GI.04*, *GI.12*) találtunk, melyek sok azonosságot, de eltérést is mutatnak mind a promóter-, mind a kódoló régióban.
- Mindkét *GI* gén promoterében jelenlévő elemekből arra következtettünk, hogy a 'Désirée' két *GI* génjének expressziója a napi ciklushoz köthető és a *GI* géneknek szerepe van a virágzás megindításában és a stresszválaszokban, amit megerősített egy *GI.04* expresszióban gátolt vonalban a virágzással és stresszel kapcsolatos TF-ok 'Désirée'-től eltérő mRNS szintje is.
- Létrehoztunk olyan null mutáns vonalakat, amelyek a *GI.04* és a *GI.12* 3' végéhez közeli deléciókat hordoztak. A deléciókat DNS szekvencia szinten behatároltuk és megállapítottuk, hogy a *GI* gének 3' végén található deléciók nincsenek hatással a gumófejlődés megindulására.
- Létrehoztunk olyan null mutánsokat, amelyek a *GI.04* és a *GI.12* középső részén deléciót hordoznak, és olyanokat is, melyek az egyik génre nézve null mutánsok, a másik génben pedig nagy deléció(kat) hordoznak.
- Kimutattuk, hogy a *GI.12* középső részén deléciót hordozó mutánsok magasabbak, mint a 'Désirée', életciklusok rövidebb, de a gumófejlődés megindulásának időpontját tekintve nem térnek el tőle.

6. A TÉMAKÖRHÖZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Szakkikkek:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2022): *In silico* characterization and expression analysis of *GIGANTEA* genes in potato. *Biochemical Genetics*, 60(6):2137-2154.

ODGEREL, K., JOSE, J., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, FICZEK, G., SIMON, G., VÉGVÁRI, GY., BÁNFALVI, Z. (2022): Effects of the repression of *GIGANTEA* gene *StGI.04* on the potato leaf transcriptome and the anthocyanin content of tuber skin. *BMC Plant Biology*, 22:249.

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, Zs. (2023): A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* gén szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. *Kertgazdaság*, 55(2023)2.

Konferencia kiadványok:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J. (2021): Regulation of *GIGANTEA* genes in potato. In: Scientific Conference of PhD Students of FAFR, FBFS and FHLE SUA in Nitra with international participation. Proceedings of abstracts on occasion of the Science and Technology Week in the Slovak Republic. November 10, Nitra, Slovak Republic, Abstract pg. 14.

VILLÁNYI, V., ODGEREL, K., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, BÁNFALVI, Zs. (2021): Az oltvány hatása a burgonya koraiságára és a gumók metabolit összetételére. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, március 24-25. (ISBN 978-963-8351-48-7)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2022): Regulation and function of the *GIGANTEA* gene *StGI.04* in potato. Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája, Gödöllő, április 11-12. (ISBN 978-963-269-999-8)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Zs. (2022): A *GIGANTEA* gének szerepe és szabályozása burgonyában. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Keszthely, május 11-12. (ISBN 978-963-269-987-5)

BÁNFALVI, Z., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, ODGEREL, K., JOSE, J. (2022): Regulation and function of *GIGANTEA* genes in *Solanum tuberosum* cultivar 'Désirée'. Book of Abstracts, 4th International Conference on Plant

Biology – 23rd SPPS Meeting. 6-8 October, Belgrade, Serbia. (ISBN 978-963-269-987-5)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, Zs. (2023): A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* hajtásfejlődést befolyásoló szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. XXIX. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, április 26-27. (ISBN: 978-963-8351-49-4)

Előadások:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Zs. (2021): A *GIGANTEA* génnek szerepe és szabályozása burgonyában. GBI Napok, Gödöllő, december 14-15.

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., BÁNFALVI, Zs. (2023): Burgonya *GIGANTEA* mutánsok izolálása és jellemzése. GBI Napok, Gödöllő, november 30-december 1.

KARSAI-REKTENWALD, F. (2024): A *GIGANTEA* génnek szabályozása és szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. Új Nemzeti Kiválósági program Konferencia, Gödöllő, március 20.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- BRANDOLI, C., PETRI, C., EGEA-CORTINES, M., WEISS, J. (2020): Gigantea: Uncovering new functions in flower development. In: *Genes*, 11 (10) 1142. p.
- CAO, S., JIANG, S., ZHANG, R. (2006): The role of *GIGANTEA* gene in mediating the oxidative stress response and in *Arabidopsis*. In: *Plant Growth Regulation*, 48 261-270. p.
- CHA, J-Y., LEE, D-Y., ALI, I., JEONG, S.Y., SHIN, B., et al. (2019): *Arabidopsis GIGANTEA* negatively regulates chloroplast biogenesis and resistance to herbicide butafenacil. In: *Plant Cell Reports*, 38 793-801. p.
- DALCHAU, N., BAEK, S.J., BRIGGS, H.M., ROBERTSON, F.C., DODD, A.N., et al. (2011): The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. In: *PNAS*, 108 (12) 5104-5109.
- DIETZE, J., BLAU, A., WILLMITZER, L. (1995): *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In: *GENE TRANSFER TO PLANTS. Berlin, Germany*, 24-29. p.
- DUTTA, M., MALI, S., RATURI, V., ZINTA, G. (2024): Transcriptional and post-transcriptional regulation of tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Journal of Plant Growth Regulation*, 43 1-24. p.
- EIMERT, K., WANG, S.M., LUE, W.I., CHEN, J. (1995): Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell*, 7 (10) 1703-1712. p.
- FERREIRA, S.J., SENNING, M., FISCHER-STETTLER, M., STREB, S., AST, M., et al. (2017): Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype. In: *Plos ONE*, 12 (7).
- FITZGERALD, H.A., CANLAS, P.E., CHERN, M-S., RONALD, P.C. (2005): Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In: *The Plant Journal*, 43 (3) 335-347. p.
- GONZALES, L.R., SHI, L., BERGONZI, S.B., OORTWIJN, M., FRANCO-ZORRILLA, J.M., et al. (2021): Potato *CYCLING DOF FACTOR 1* and its lncRNA counterpart *StFLORE* link tuber development and drought response. In: *The Plant Journal*, 105 (4) 855-869. p.
- HAYDON, M.J., MIELCZAREK, O., FRANK, A., ROMÁN, A., WEBB, A.A.R. (2017): Sucrose and ethylene signaling interact to modulate the circadian clock. In: *Plant Physiology*, 175 (2) 947-958. p.
- HERNANDEZ-GARCIA, C. M., FINER, J. J. (2014): Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. In: *Plant Science*, 217–218 109–119. p.
- HÖFGEN, R., WILLMITZER, L. (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. In: *Nucleic Acid Research*, 16 (20) 9877 p.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene*, 96 (1) 23-28 p.
- IZAWA, T., MIHARA, M., SUZUKI, Y., GUPTA, M., ITOH, H., et al. (2011): Os-*GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. In: *The Plant Cell*, 23 (5) 1741-1755. p.

- JIANG, C-H., HUANG, Z-Y., XIE P., GU, C., LI, K., et al. (2016): Transcription factors WRKY70 ad WRKY11 served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemix resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis*. In: *Journal of Experimental Botany*, 67 (1) 157-174. p.
- JOSE, J. (2019): Molecular genetic studies on *GIGANTEA* gene in potato (*Solanum tuberosum* L.). MSc szakdolgozat, MATE, Gödöllő.
- JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2019): The role of *GIGANTEA* in flowering and abiotic stress adaptation in plants. In: *Columella*, 6 7-18 p.
- KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, ZS. (2023): A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* gén szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. In: *Kertgazdaság*, 55(2023)2.
- KLOOSTERMAN, B., ABELANDA, J. A., CARRETERO-GOMEZ, M., OORTWIJN, M., DE BOER, J. M., et al. (2013): Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. In: *Nature*, 495 246-250. p.
- KRAHMER, J., GORALOGIA, G.S., KUBOTA, A., ZARDILIS, A., JOHNSON, R.S., et al. (2018): Time-resolved interaction proteomics of the *GIGANTEA* protein under diurnal cycles in *Arabidopsis*. In: *FEBS Letters*, 593 (3) 319-338. p.
- KWON, E., PATHAK, D., DAHAL, P., TANDUKAR, S., JUNG, H. S., et al. (2022): Structural analysis of the regulation of blue-light receptors by *GIGANTEA*. In: *Cell Reports*, 39 (3) 110700.
- LEE, H., SUNG-SUK, S., PARK, E., CHO, E., AHN, J.H., et al. (2000): The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. In: *Genes and Development*, 14 2366-2376. p.
- LIN, T., SHARMA, P., GONZALEZ, D.H., VIOLA, I.L, HANNAPEL, D.J. (2013): The impact of the long-distance transport of a *BEL1*-like messenger RNA on development. In: *Plant Physiology*, 161 (2) 760-772. p.
- LIU, L., XIE, Y., YAHAYA, B.S., WU, F. (2024): *GIGANTEA* unveiled: exploring its diverse roles and mechanisms. In: *Genes*, 15 (1) 94. p.
- LORENZO, O., PIQUERAS, R., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., SOLANO, R. (2003): ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. In: *The Plant Cell*, 15 (1) 165-178. p.
- MORRIS, W. L., HANCOCK, R. D., DUCREUX, L. J., MORRIS, J. A., USMAN, M., et al. (2014): Day length dependent restructuring of the leaf transcriptome and metabolome in potato genotypes with contrasting tuberization phenotypes. In: *Plant Cell and Environment*, 37 (6) 1351-1356. p.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum*, 15 (3) 473-497. p.
- NYITRAY, L., PÁL, G. (2013): A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Elméleti e-könyv. ELTE, TTK, Budapest
<https://ttk.elte.hu/dstore/document/836/A%20biok%C3%A9mia%20%C3%A9s%20molekul%C3%A1ris%20biol%C3%B3gia%20alapjai.jav.pdf>

- ODGEREL, K. (2022): Molecular genetics and metabolomic studies related to tuberization and metabolite composition of cultivated potatoes. Doktori értekezés, MATE, Növénytudományi Doktori Iskola, Gödöllő.
- ODGEREL, K., JOSE, J., KARSAI-REKTENWALD, F., FICZEK, G., SIMON, G., et al. (2022): Effects of the repression of *GIGANTEA* gene *StGL04* on the potato leaf transcriptome and the anthocyanin content of the tuber skin. In: *BMC Plant Biology*, 22, 249. p.
- RAWAT R., SCHWARTZ, J., JONES, M.A, SAIRANEN, I., CHENG, Y., et al. (2009): REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. In: *PNAS*, 106 (39) 16883-16888. p.
- RÉDEI, G. P. (1962): Supervital mutants of *Arabidopsis*. In: *Genetics*, 47 (4) 443-460 p.
- RENAU-MORATA, B., CARRILLO, L., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., VICENTE-CARBAJOSA, J., et al. (2020) CDF transcription factors: plant regulators to deal with extreme environmental conditions. In: *Journal of Experimental Botany*, 71 (13) 3803-3815. p.
- ROSIN, F. M., HART, J. K., HORNER, H. T., DAVIES, P. J., HANNAPEL, D. J. (2003): Overexpression of a *Knotted-Like* homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. In: *Plant Physiology*, 132 (1) 106-117. p.
- SAMBROOK, J., FRITCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning. A LABORATORY MANUAL (2nd edition). In: *Creative Education*, New York, USA.
- SHURE, M., WEESLER, S., FEDOROFF, N. (1983): Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus of maize. In: *Cell*, 35 (1) 225-233. p.
- SINGH, M., MAS, P. (2018): A functional connection between the circadian clock and hormonal timing in *Arabidopsis*. In: *Genes*, 9 (12) 567. p.
- STIEKEMA, W. J., HEIDEKAMP, F., DIRKSE, W. G., BECKUM, J., HAAN, P., et al. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. In: *Plant Molecular Biology*, 11 255-269. p.
- TOGURI, T., UMEMOTO, N., KOBAYASHI, O., OHTANI, T. (1993): Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. In: *Plant Molecular Biology*, 23 933-946. p.
- WEBER, E., ENGLER, C., GRUETZNER, R., WERNER, S., MARILLONNET, S. (2011): A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. In: *PLoS ONE*, 6(2) e16765.
- XING, H., DONG, L., WANG, H., HAN, C., LIU, B., et al. (2014): A CRISPR/CAS9 toolkit for multiplex genome editing in plants. In: *BMC Plant Biology*, 14 327. p.