

MAGDALENA GUT

Zakład Roślin Zbożowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Krakowie

Rola genów indukowanych przez niską temperaturę w mrozoodporności zbóż — przegląd literatury

The role of cold-responsive genes in frost resistance of cereals — a review

Mechanizmy adaptacyjne pozwalające zbożom ozimym przeżyć niskie temperatury są zaprogramowane genetycznie i kontrolowane przez liczne geny indukowane i regulowane przez niską temperaturę. W niniejszym przeglądzie opisano ostatnie osiągnięcia dotyczące funkcji genów indukowanych przez niską temperaturę i ich roli w mrozoodporności. Zaprezentowane tutaj wyniki pozwolą zrozumieć mechanizmy wykształcone przez rośliny w toku ewolucji, pomagające przeżyć mróz. W dodatku odkrycia te mają potencjalny aspekt praktyczny w selekcji i hodowli odmian zbóż ozimych odpornych na niekorzystne warunki zimowania.

Słowa kluczowe: geny indukowane niską temperaturą, mrozoodporność, zboża

Acclimation mechanisms that allow winter cereals to survive freezing temperature are genetically programmed and involve a great number of genes, which are induced and regulated by low temperature. In this review recent findings in determining the function of genes induced by low temperature and their role in freezing tolerance are described. These results summarized here allow further understanding the basic mechanisms that plants have evolved to survive freezing temperatures. In addition, these findings have potential practical implications in selection and breeding of winter cereals cultivars resistant to unfavourable winter conditions.

Key words: cold induced genes, cereals, frost resistance

W kontrolę mrozoodporności u pszenicy jest zaangażowanych co najmniej 10 par chromosomów. Zatem, kontrola genetyczna tej cechy jest dość skomplikowana i powoduje rozliczne trudności tak w badaniach naukowych, jak i w atestacji materiałów hodowlanych. W połowie lat osiemdziesiątych stwierdzono, że podczas aklimatyzacji do niskiej temperatury w ekspresji genów związanych z mrozoodpornością zachodzą zmiany (Guy i in., 1985). Jednak dopiero ostatnia dekada przyniosła bardzo wiele prac dotyczących indukcji niektórych genów przez niską temperaturę i ich roli w kształtowaniu się mrozoodporności roślin. Szereg kwestii nie jest jeszcze do końca wyjaśnionych.

Niejednolita jest także nomenklatura. W bogatej literaturze przedmiotu geny indukowane przez niską temperaturę są określane jako:

- COR–Cold Regulated,
- LTI–Low Temperature Induced,
- CIN–Cold Inducible,
- RD–Responsive to Dessication lub ERD–Early Dehydration Inducible.

Z danych Thomashow (1999) wynika, że do roku 1999 zidentyfikowano i opisano 56 genów indukowanych przez niską temperaturę u 10 gatunków roślin (tab. 1). Modelowym gatunkiem do badań jest *Arabidopsis thaliana*, w którym zidentyfikowano ich najwięcej. Prowadzi się jednak prace także na innych gatunkach roślin w tym zbożach, u jęczmienia opisano 9 genów COR, a u pszenicy 7. Geny te kodują:

- białka o znanej, lub domniemanej funkcji, np. enzymy, białka przewodzące sygnały,
- hydrofilowe białka homologiczne do białek produkowanych w dojrzewających nasionach i chroniących zarodek przed wysuszeniem, a określanych skrótem LEA, (Late Embryogenesis Abundant). Jako białka typu LEA określa się również białka chroniące struktury komórkowe przed odwodnieniem podczas wewnątrzkomórkowego tworzenia się lodu.
- niedawno odkryte hydrofilowe lub hydrofobowe białka o nieznanej jeszcze funkcji.

Tabela 1

Liczba genów indukowanych niską temperaturą w różnych gatunkach roślin (Thomashow, 1999)
Number of genes induced by low temperature in various plant species (Thomashow, 1999)

Roślina Plant	Liczba genów kodujących białka Number of genes encoding protein			
	O znanej aktywności With demonstrated activities	Typu LEA LEA type	Nowe Novel	Łącznie Total
<i>Arabidopsis thaliana</i>	13	4	4	21
<i>Hordeum vulgare</i>	3	2	4	9
<i>Brassica napus</i>	5		2	7
<i>Triticum aestivum</i>	1	4	2	7
<i>Medicago sativa</i>	1	1	3	5
<i>Spinach oleracea</i>	1	1	1	3
<i>Poncirus trifoliata</i>		1		1
<i>Prunus persica</i>		1		1
<i>Solanum tuberosum</i>		1		1
<i>Vaccinium corymbosum</i>		1		1
Razem Total	24	16	16	56

W oparciu o podobieństwa w sekwencji aminokwasów polipeptydy i białka kodowane przez geny indukowane niską temperaturą zalicza się do licznych rodzin (Thomashow, 1998). Większość z nich ma jednak podobne właściwości, są na ogół hydrofilowe, odporne na gotowanie w wodnym roztworze buforu, mają stosunkowo prostą kompozycję, na którą składa się powtarzający się motyw sekwencji kilku aminokwasów, i posiadają region zdolny do tworzenia spirali typu α -helisy.

U zbóż białka tego typu opisano przede wszystkim u pszenicy i jęczmienia, a ich przykłady podano w tabeli 2.

Tabela 2

Przykłady genów indukowanych niską temperaturą u pszenicy i jęczmienia kodujących produkty o znanej lub domniemanej aktywności (Thomashow, 1999)
Examples of genes induced by low temperature in wheat and barley encoding gene products with demonstrated or putative activities (Thomashow, 1999)

Roślina Plant	Gen Gene	Produkt Gene product	Literatura Reference
Jęczmień Barley	<i>blt801</i>	Białko wiążące RNA RNA binding protein	Dunn i in., 1996
	<i>blt 4.1</i>	Transfer lipidów Transfer of lipids	Dunn i in., 1991 White i in., 1994
	<i>blt63A</i>	Czynnik 1 α uczestniczy w translacji 1 α factor participates in translation	Dunn i in., 1993
Pszenica Wheat	<i>wCOR518</i>	Białko bogate w prolinę Proline rich protein	Danyluk i Sarhan *

* — Osobista informacja uzyskana przez Thomashow

* — Personal communication of Thomashow

Najważniejszą grupą genów indukowanych niską temperaturą u pszenicy jest rodzina określana jako *wcs120*. Grupę białek kodowanych przez te geny nazwano przez analogię WCS120. Zidentyfikowano je używając przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciw białku o masie 50 kDa kodowanemu przez gen *WCS120* (Houde i in., 1992 a, b). Dalsze badania wykazały, że rodzina ta składa się z 5 białek o masie molekularnej 200, 180, 66,50 i 40 kDa. W siewkach ozimych pszenic odmian Fredrick i Norstar 1g świeżej masy zawierał 72 μ g białek z rodziny WCS120 — co stanowi 0,9% wszystkich białek rozpuszczalnych. W 49 dniu aklimatyzacji — okresie, w którym rośliny osiągały maksymalną mrozoodporność ilość ta wzrastała do 1%. Najobficiej występowały białka o masie 50 i 66 kDa — stanowiły one 64% białek rodziny WCS120 (Houde i in., 1995).

Białko WCS120 wykazuje wysoką identyczność z białkiem DHN5 z jęczmienia. Badania Close i wsp. (1995) nad ekspresją genów kodujących białka typu dehydryn podczas aklimatyzacji jęczmienia do chłodu wykazały, że u tego gatunku *dhn5* jest głównym genem indukowanym chłodem, co potwierdza przypuszczenie, że rodzina WCS120 jest główną grupą białek specyficznie indukowanych przez niską temperaturę u tolerancyjnych gatunków *Poaceae*.

Powszechnie znany jest fakt, że zimotrwałość (mrozoodporność) zbóż zależy przede wszystkim od zdolności tkanek merystematycznych węzła krzewienia do przeżycia zimy (Tanino i McKersie, 1984), co prawdopodobnie wiąże się z faktem, że akumulują one więcej białek z rodziny WCS120 niż bazalny region węzła krzewienia, pędy i korzenie (Houde i in., 1992b). Białka z tej rodziny akumulowały się również w dużych ilościach w tkance sitowej. Natomiast nie stwierdzono ich obecności w dojrzałym ksylemie, merystemie apikalnym korzenia oraz bocznych primordiach korzeni (Houde i in., 1995). Białka te odznaczają się również specyficzną lokalizacją w komórce. Występują one

mianowicie zarówno w cytoplazmie jak i w nukleoplazmie. Nie znaleziono ich natomiast w ścianie komórkowej, organellach i gęstej chromatynie. Dystrybucja omawianych białek w tkankach i komórkach dostarcza wskazówek przy określaniu ich funkcji. Komórki wrażliwe lub szczególnie narażone na działanie mrozu, tak jak np. tkanki merystematyczne węzła krzewienia wymagają wyższej ilości białek z rodziny WCS120, które mogą pomóc złagodzić odwodnienie, a zatem zwiększają tolerancję na mechaniczne uszkodzenia powodowane tworzeniem się lodu. Wysoki poziom akumulacji białek z rodziny WCS120 w komórkach otaczających tkanki sitowe sugeruje, że białka te odgrywają rolę w podtrzymaniu lub poprawieniu transportu metabolitów w niskiej temperaturze. Lepszy wzrost i zdolność do fotosyntezy roślin mrozoodpornych potwierdza tę hipotezę (Huner i in., 1993). Interesujące, że akumulacja białek tej rodziny w komórkach towarzyszących naczyniom sitowym zbiega się z lokalizacją syntazy sacharozowej (Crespie i in., 1991). Enzym ten wykazujący największą aktywność podczas aklimatyzacji reguluje przemiany sacharoza — skrobia oraz skrobia — sacharoza i może odgrywać kluczową rolę w akumulacji sacharozy jako krioprotektanta (Guy i in. 1992).

Przy pomocy kultur *in vitro* wykazano, że białko WCS120 w stężeniu 0,2 μ M jest tak efektywne jak albumina z osocza i sacharoza w ochronie dehydrogenazy mleczanowej przed denaturacją mrozową (Houde i in., 1995). Autorzy ci sugerują, że białko WCS120 otacza białka komórek osłaniając tym samym ich strukturę trzeciorzędową i chroni je niejako przed „rozprostowaniem” lub tworzeniem agregatów podczas mrożenia lub odwodnienia.

Badania prowadzone na ditelocentrycznych liniach heksaploidalnej pszenicy Chinese Spring, w których w każdej brakowało jednej homologicznej pary ramion chromosomu przy zastosowaniu kombinacji analiz DNA i białka techniką hybrydyzacji DNA (Southern) i odcinków białek, tj. wykrywania białek w reakcji ze specyficznymi przeciwciałami (metoda Western) doprowadziły do zmapowania genów z rodziny *wcs120* na chromosomach. Stwierdzono, że gen *wcs120* znajdował się na długim ramieniu chromosomu 6D, gen *wcs200* na długim ramieniu chromosomu 6A, a gen *wcs66* na długim ramieniu chromosomu 6B. Stwierdzono, że inne geny z tej rodziny również są związane z 6 grupą homeologiczną chromosomów, ale ich zmapowanie nie było możliwe (Limin i in., 1997).

Oznaczenia akumulacji białek WCS120 w liniach substytucyjnych pszenicy, w których jedną parę chromosomów Cheyenne zastąpiono homologiczną parą Chinese Spring (Limin i in., 1997) tylko w linii 5A wykazały wyższe nagromadzenie białka WCS120 niż w Chinese Spring. Chromosom ten jest najczęściej wymieniany w literaturze jako wywierający największy wpływ na mrozoodporność (Galiba i in., 1993; Roberts, 1990; Sutka, 1994), co wydaje się słuszne, w świetle prac Danyluk i wsp. (1994, 1996), według których dwa odpowiadające na niską temperaturę geny pszenicy *wCOR410* i *wCOR719* były regulowane przez czynnik zlokalizowany także na chromosomie 5A. Wydaje się, że chromosom 5A niesie gen (geny) regulatorowe, które kontrolują ekspresję rodziny genów *wcs120* i innych reagujących na niską temperaturę genów skorelowanych z mrozoodpornością.

U jęczmienia Hayes i wsp. (1993) stwierdzili, że najwięcej loci cech ilościowych (QTL) dla przeziimowania w polu, LT_{50} , typu wzrostu i zawartości fruktanów w węzłach krzewienia znajdowało się na długim ramieniu chromosomu 7, będącego ekwiwalentem chromosomu 5 u pszenicy. Możliwe, że chromosom ten odgrywa w przypadku jęczmienia tę samą rolę co chromosom 5A u pszenicy, a zatem może regulować ekspresję genów indukowanych przez niską temperaturę. Geny te oznaczone jako *dhn3*, *dhn4*, *dhn5* kodujące białka zaliczone do rodziny dehydryn (odpowiadającej rodzinie WCS120) zlokalizowano na 6 homologicznym chromosomie. Prawdopodobnie zarówno u pszenicy, jak i u jęczmienia 6 grupa chromosomów jest miejscem lokalizacji wielu genów strukturalnych zaangażowanych w reakcję na stres niskiej temperatury i odwodnienia (Close, 1996; Limin i in., 1997; Welin i in., 1994)

Badania Jaglo-Ottosen i wsp. (1998) prowadzone na transgenicznym roślinaх *Arabidopsis thaliana*, odznaczających się ekspresją licznych genów indukowanych niską temperaturą wykazały, że ich indukcja była związana z ekspresją aktywatora transkrypcji CBF1, (CBF1 = CRT/DRE Binding Factor 1). Białko to wiąże się z elementem odpowiedzi na dehydratację obecnym w promotorach genów indukowanych chłodem i określanym jako CRT/DRE (CRT = C — repeat, DRE = Drought Responsive Element). Wydaje się, że jest ono ważnym regulatorem reakcji na niską temperaturę kontrolującym ekspresję genów COR, a tym samym poprawiającym poziom mrozoodporności. Wyniki te potwierdzili ostatnio niezależnie Liu i wsp. (1998) oraz Gilmour i wsp. (1998), którzy stwierdzili, że CBF1 jest członkiem małej rodziny białek oznaczanych jako CBF1, CBF2, i CBF3 (Gilmour i in., 1998, cyt. za Thomashow, 1999), lub odpowiednio jako DREB1B, DREB1C, DREB1A (Liu i in., 1998). Często określa się je jako białka CBF/DREB. Ekspresja genów kodujących CBF/DREB jest zależna od dwustopniowej kaskady aktywatorów transkrypcyjnych. Zgodnie ze schematem podanym przez Thomashow (1999) przebiega ona następująco. Nieznany aktywator oznaczony próbnie „ICE” (Inducer of CBF Expression) w wyższej (cieplej) temperaturze pozostający w stanie nieaktywnym pod wpływem niskiej temperatury ulega aktywacji. W stanie aktywnym rozpoznaje on element regulowany przez niską temperaturę określony umownie jako „ICE Box” obecny w promotorach każdego genu CBF (regulon CBF). Ten z kolei aktywuje element CRT/DRE, który wpływa bezpośrednio na poziom ekspresji genów COR, a tym samym na mrozoodporność. Możliwe, że ICE może nie tylko regulować ekspresję genów CBF, ale także indukować ekspresję innych genów, które także mogą odgrywać rolę w reakcji na niską temperaturę. Przedstawiona wyżej „kaskada” została opracowana dla *Arabidopsis*. Dane dotyczące występowania tego mechanizmu u innych gatunków roślin nie są jeszcze pełne. Prawdopodobnie jednak występuje on u zbóż, gdyż jak donoszą Vazquez-Tello i wsp. (1998) gen *wcs120* u pszenicy ma indukowanego chłodem promotora. Wyniki te potwierdzają Ouellet i wsp. (1998), którzy prezentują dane wskazujące, że promotor *wcs120* jest indukowany chłodem zarówno w roślinach jednoliściennych — jęczmieniu, życie i ryżu, jak i dwuliściennych — lucernie lub kapuście.

Wiedza o białkach kodowanych przez geny z rodziny *wcs120* ma także aspekt praktyczny. Rodzinę genów *wcs120* u pszenicy i żyta wykorzystano do badania na

poziomie molekularnym zagadnienia wzajemnych powiązań między odpornością na mroz a wymaganiami jaryzacyjnymi (Fowler i in., 1996).

Badania wykazały, że odmiany jare podczas przetrzymywania w 4°C nie są w stanie utrzymać poziomu mrozoodporności porównywalnego z odmianami ozimymi. Zjawisko takie sugerowało zależność między ekspresją genów indukowanych chłodem a reakcją na jaryzację (Sarhan i in., 1997). Obserwowano ścisły związek między punktem pełnej jaryzacji i początkiem obniżania się poziomu białek z tej rodziny, co wskazuje że geny jaryzacji określane jako *vrn1* grają ważną rolę w determinowaniu czasu trwania ekspresji genów związanych z niską temperaturą.

Okazało się, że loci genów *vrn1* (jaryzacja) i *fr1* (mrozoodporność) są zlokalizowane w ścisłym sprzężeniu na końcowym fragmencie długiego ramienia chromosomu 5A i w przeciwieństwie do wcześniejszych obserwacji znaleziono rekombinację między nimi (Galiba i in., 1995). Lokalizacja *vrn1* sugeruje, że jest on homeologiczny w stosunku do innych genów odpowiadających za wiosenny typ wzrostu u pszenicy i gatunków pokrewnych. Grupa ta obejmuje geny jaryzacji *vrn1*, *vrn4*, *vrn3* na chromosomach 5A, 5B, 5D u pszenicy, *sh2* na 7 chromosomie jęczmienia i *sp1* na 5 chromosomie żyta (Galiba i in., 1995; Pan i in., 1994).

Badania prowadzone na liniach rekombinantów uzyskanych z krzyżowań linii substytucyjnych Chinese Spring (Cheyenne 5A) i Chinese Spring (*Triticum spelta* 5A) wykazały, że geny regulujące akumulację sacharozy podczas hartowania również są ściśle związane z loci *vrn1* i *fr1*, przy czym *vrn1* wywiera tu efekt plejotropowy (Galiba i in., 1997). Wydaje się, że związek mrozoodporność — wymagania jaryzacyjne może okazać się znacznie głębszy niż się na ogół przypuszcza — gen *vrn1* wpływa bowiem i na mrozoodporność jako taką (sprzężenie z *fr1*) i na gromadzenie podstawowego krioprotektanta jakim jest sacharoza.

Zdaniem Storlie i wsp. (1998) 71–91% zmienności w LT_{50} między badanymi genotypami można było wytłumaczyć odległością loci *vrn1* od *fr1*, a zależność ta może być wykorzystana w hodowli. W krzyżowaniach pszenicy jarej z odmianami ozimymi (odporną i wrażliwą na mroz) uzyskano mieszańce różniące się odległością *vrn1*–*fr1* i wykazujące różny typ wzrostu (jary lub ozimy) i różną mrozoodporność. Istotne i perspektywiczne dla hodowli może okazać się ścisłe sprzężenie z obu loci trzech markerów RFLP — oznaczonych symbolami Xpsr 426, Xcdo 504 i Xwg 644 (Galiba i in., 1995).

Ostatnio prowadzone są prace nad mapą locus *fr2* z użyciem molekularnych markerów systemu RFLP i AFLP. Wstępna analiza wskazuje, że gen *fr2* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 5D jest homeologiczny do *fr1* i sprzężony z *vrn3* (Snape i in., 1997).

Akumulacja białek z rodziny WCS120 w ponad 20 genotypach pszenicy i innych zbóż w okresie aklimatyzacji była pozytywnie skorelowana z ich mrozoodpornością. Białka te gromadziły się głównie w tkankach o większej odporności na mrozenie. Stwierdzono, że ich synteza nie jest związana ze stadium rozwojowym rośliny, występowały one zarówno w kulturach *in vitro* (kalus), jak i w kielkach, lub siewkach w różnych stadiach rozwoju (Houde i in., 1992 a), przy czym ekspresja genów odpowiedzialnych za ich syntezę była indukowana na tym samym poziomie w ciemności i na świetle. W oparciu o te fakty Houde i wsp. (1992 b) rekomendują tę rodzinę białek jako markery mrozoodporności. Autorzy ci

otrzymali przeciwciała określone mianem anty-wcs120, rozpoznające większość białek indukowanych podczas aklimatyzacji do niskich temperatur. Przeciwciała to stanowi ważne narzędzie przy identyfikacji odmian zbóż o wysokiej zdolności do aklimatyzacji. Ostatnio przeciwciała anty-wcs120 jest używane do oceny segregacji pod względem mrozoodporności w materiałach mieszańcowych z różnych krzyżowań i do badania odziedziczalności zawartości tej rodziny białek u pszenicy i żyta (tab. 3).

Tabela 3

Przykłady genów indukowanych niską temperaturą u pszenicy i jęczmienia kodujących nowe hydrofilowe białka oraz białka typu LEA (Thomashow, 1999)
Examples of genes induced by low temperature in wheat and barley encoding novel hydrophilic protein and LEA-protein Thomashow, 1999)

Roślina Plant	Gen Gene	Białko Protein	Literatura References
Geny kodujące nowe hydrofilowe białka Genes encoding novel hydrophilic protein			
Jęczmień Barley	<i>Blt14</i>	Hydrofilowe	Dunn i in., 1990; Philips i in., 1997
	<i>COR14</i>	Hydrofilowe	Crosatti in., 1995
	<i>CR1</i>	Hydrofilowe	Cattivelli i Bartels 1990
	<i>blt101</i>	Hydrofilowe	Goddard i in., 1993
Pszenica Wheat	<i>wcs19</i>	Hydrofilowe	Chauvin i in., 1993
Geny kodujące białka typu LEA Genes encoding LEA-protein			
Jęczmień Barley	<i>Dhn5</i>	LEA II	Van Zee i in., 1995
	<i>HVA1</i>	LEA III	Hong i in., 1992
Pszenica Wheat	<i>wcs120</i>	LEA II	Houde i in., 1992; Chauvin i in., 1994
	<i>wCOR726</i>	LEA II	Danyluk i Sarhan*
	<i>COR410</i>		Danyluk i in., 1994, Danyluk i Sarhan*
	<i>wCOR615</i>	LEA III	Danyluk i Sarhan*

* — Osobista informacja uzyskana przez Thomashow

* — Personal communication of Thomashow

Interesująca z praktycznego punktu widzenia wydaje się również praca, w której porównywano spektrum białek z rodziny *wcs120* w trzydniowych siewkach pszenicy hartowanych w laboratorium i w roślinach wysiewanych w polu w różnych terminach, i przechodzących proces aklimatyzacji w warunkach naturalnych (Borowski i in., 1999). Stwierdzono, że termostabilne frakcje białek o masie 209, 196, 66 i 50 kDa występowały zarówno w siewkach uzyskanych w laboratorium, jak i w roślinach wyrosłych w polu, a znajdujących się w stadium trzeciego liścia lub krzewienia. Rośliny wyrosłe z nasion sianych później, a więc młodsze zawierały ich mniej niż morfologicznie lepiej rozwinięte. Od października do początków zimy jakościowy zestaw wymienionych wyżej frakcji białkowych był taki sam u wszystkich roślin, niezależnie od stadium ich rozwoju. Po stopnieniu śniegu (początek kwietnia) zaczynały się zmiany ilościowe, a różnice między roślinami z różnych terminów siewu stawały się coraz wyraźniejsze. W tym okresie obraz zawartości białek 209, 196, 66, 50 kDa był przeciwny do jesienno. Rośliny siane wcześniej przed wejściem w zimę mającej najwięcej białek wiosną traciły je wyraźnie szybciej, wracając do stanu nie hartowanych, a w roślinach młodych było ich więcej niż w

starszych. W maju różnice w ilości i jakości wyrównywały się, z wyjątkiem piku białka 50 kDa, ale i one były niewielkie.

Wydaje się, że badania tego rodzaju mogą stanowić wstęp do opracowania szybkiej i prostej metody atestacji materiałów hodowlanych, w której materiał do badań będzie po prostu pobierany z pola.

LITERATURA

- Borovskii G. B., Stupnikova I. W., Peszkova A. A., Dorofeev N. W., Wojnikov W. K. 1999. Termostabilnyje bielki prorostkov i uzlov kushchenija rastenij ozimoj pszenicy. *Fiz. Rast.* 46, 5: 777 — 783.
- Close T.J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97: 795 — 803.
- Close T. J., Meyer N. C., Radik J. 1995. Nucleotide sequence of a gene encoding a 58.5 kDa barley dehydrin that lacks a serine tract. *Plant Physiol.* 107: 289 — 290.
- Crespi M. D., Zabaleta E. J., Pontis H. G., Salerno G. L. 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 96: 887 — 891.
- Danyluk J., Houde M., Rassart É., Sarhan F. 1994. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant *Gramineae* species. *FEBS Lett.* 344: 20 — 24.
- Danyluk J., Carpentier É., Sarhan F. 1996. Identification and characterization of a low temperature regulated gene encoding and actin-binding protein from wheat. *FEBS Lett.* 389: 324 — 327.
- Fowler D.B., Chauvin L. P., Limin A. E., Sarhan F. 1996. The regulatory role of the vernalization in the expression of low-temperature induced genes in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 93: 554 — 559.
- Galiba G., Tuberosa R., Kocsy G., Sutka J. 1993. Involvement of chromosomes 5A and 5D in cold-induced abscisic acid accumulation and frost tolerance of wheat calli. *Plant Breed.* 110: 237 — 242.
- Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape, J.W. 1995. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90(7/8): 1174 — 1179.
- Galiba G., Kerepesi I., Snape J.W., Sutka J. 1997. Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1/2: 265 — 270.
- Gilmour S. J., Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression. *Plant J.* 16: 433 — 442.
- Guy C.L., Niemi K.J., Brambl R. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3673 — 3677.
- Guy C. L., Huber J.L.A., Huber S.C. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* 100: 502 — 508.
- Hayes P.M., Blake T., Chen T. H. H., Tragoonrun S., Chen S., Pana Liu B. 1993. Quantitative trait loci on barley *Hordeum vulgare* L. Chromosome 7 associated with components of winter hardiness. *Genome*, 36: 66 — 71.
- Houde M., Danyluk J., Laliberte J.F., Rassart E., Dhindsa R.S., Sarhan F. 1992 a. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding a 50 kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 99: 1381 — 1387.
- Houde M., Dhindsa R.S., Sarhan F. 1992 b. A molecular marker to select for freezing tolerance in *Graminae*. *Mol. Gen. Genet.* 234: 43 — 48.
- Houde M., Daniel C., Lachapelle M., Allard F., Laliberte S., Sarhan F. 1995. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.* 8: 583 — 593.
- Huner N. P. A., Öquist G., Hurry V. M., Krol M., Falk S., Griffith M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth. Res.*, 37: 19 — 39.
- Jaglo-Ottosen K. R., Gilmour S. J., Zarka D. G., Schabenberger O., Thomashow M. F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280: 104 — 106.

- Limin A. E., Danyluk J., Chauvin L. P., Fowler D. B., Sarhan F. 1997. Chromosome mapping of low-temperature induced family genes and regulation of cold-tolerance expression in wheat. *Mol. Genet.* 253: 720 — 727.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S. 1998. Two transcription factors DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391 — 1406.
- Ouellet F., Vazquez-Tello A., Sarhan F. 1998. The wheat *wcs120* promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Lett.* 423: 324 — 328.
- Pan A., Hayes P. M., Chen F., Chen T. H. H., Blake T., Wright S., Karsai I., Bedo Z. 1994. Genetic analysis of the components of winterhardiness of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 89: 900 — 910.
- Roberts D. W. A. 1990. Identification of loci on chromosome 5A involved in control of cold hardiness, vernalization, leaf length, rosette growth habit and height of hardened plants. *Genome*, 39: 247 — 259.
- Sarhan F., Ouellet F., Vazquez-Tello A. 1997. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol. Plant.* 439 — 445.
- Snape J. W., Semikhodskii A., Fish L., Sharma R. N., Quarrie S. A., Galiba G., Sutka J. 1997. Mapping frost tolerance loci in wheat and comparative mapping with other cereals. *Acta Agron. Hung.* 45: 265 — 270.
- Storlie E. W., Allan R. E., Walker-Simmons M. K. 1998. Effect of the *vrn1 -fr1* interval on cold hardiness levels in near-isogenic wheat lines. *Crop Sci.* 38 (2): 483 — 488.
- Sutka J. 1994. Genetic control of frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 77: 277 — 282.
- Tanino K., McKersie B. D. 1984. Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.* 63: 432 — 436.
- Thomashow M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1 — 7.
- Thomashow M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571 — 599.
- Vazquez-Tello A., Ouellet F., Sarhan F. 1998. Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of *Wcs120* a cold-specific gene in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 257: 157 — 166.
- Welin B. V., Olson A., Nylander M., Palva E. T. 1994. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab* — like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26: 131 — 144.