

Doktori (Ph.D.) értekezés

Kovács Terézia

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2022

A lipidek szerepe az ősziárpa fényindukált hidegakklimatizációjában

Ph.D. értekezés

Kovács Terézia

Témavezetők:

Dr. Kovács László, Dr. Galiba Gábor, [†]Dr. Gombos Zoltán

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

és

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola



Szeged

2022

1	TARTALOMJEGYZÉK	
1	TARTALOMJEGYZÉK	3
2	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
3	BEVEZETÉS	10
4	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
4.1	A hidegedződés szerepe a télállóság kialakulásában	12
4.2	A CBF transzkripciós faktorok és szerepük a fagyállóság meghatározásában	13
4.3	A növényi fotoreceptorok és a CBF-regulon kapcsolata	14
4.3.1	Fitokrómok	14
4.3.2	Kriptokrómok	15
4.3.3	A fényérzékeny gének transzkripciós szabályozása	15
4.4	A hidegakklimatizáció	16
4.4.1	A különböző lipidosztályok bioszintézise	16
4.4.2	A lipid-anyagcserében résztvevő egyéb fontosabb enzimek	20
4.4.3	A növények levelének membránlipid-összetétele	21
4.4.4	A lipidösszetétel változása a hidegedződés során	24
5	CÉLKITŰZÉSEK	29
6	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
6.1	A növények nevelése	30
6.2	Mérési módszerek	30
6.2.1	Hő- és fénykezelések	30
6.2.2	A fagytűrés meghatározása klorofill-a fluoreszcencia analízis segítségével	31
6.2.3	Konduktanciavizsgálat	32
6.2.4	qPCR mérés	32
6.2.5	Lipidizoláció és -vizsgálat	33
6.2.6	ESI-MS/MS lipidprofil meghatározása	34
6.2.7	Telítetlenségi index (DBI)	34
6.2.8	Statisztikai elemzés	35
7	EREDMÉNYEK	36
7.1	Távolivörös és kék fénnel kiegészített fehér fény hatása az árpalevelek fagytűrésére	36
7.2	Az izolált lipidek tömegspektroszkópiai elemzése	43

7.2.1	Változás a lipidosztályok összetételében	43
7.2.2	A lipid fajták megoszlása a különböző lipidosztályokon belül	51
7.3	A zsírsavak telítetlenségi indexének változásai	58
7.3.1	A zsírsavak kettőskötés eloszlásának változása	61
7.3.2	A tilakoidmembránt alkotó lipidláncok hossza és kettős kötések száma szerinti eloszlása	64
7.3.3	A lizofosfolipid-szint változásai	66
8	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	68
8.1	A különböző módon modulált fénykezelések hatása az őszi árpa „Nure” növények fagytűrésére	68
8.2	A távolivörös és kék fény kiegészítés hatása a lipidmetabolizmus néhány „kulcsgénjének” az expressziójára	69
8.3	A membrán összlipid tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	72
8.3.1	A kloroplaszt tilakoid membrán MGDG/DGDG arányának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	74
8.3.2	A membránt alkotó foszfolipidek változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	75
8.3.3	A plazma membrán PC/PE arányának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	75
8.3.4	A membránt alkotó lipid fajták változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	76
8.3.5	A tilakoidmembránt alkotó lipidláncok lánchossz és kettős kötés szám szerinti összesége	77
8.3.6	A membránt alkotó lipidek zsírsavláncai kettőskötés-tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	78
8.3.7	A levélben található lipidek lizoltartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	79
8.3.8	A levél HexCer tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására	79
9	ÖSSZEFOGLALÁS	81
10	SUMMARY	86
11	IRODALOMJEGYZÉK	90
12	PUBLIKÁCIÓS LISTA	101
12.1	A dolgozat alapját képező közlemény:	101
12.2	Egyéb közlemények, posztterek, konferenciák, előadások:	101
12.2.1	A témához kapcsolódó közlemény:	101

		<u>Tartalomjegyzék</u>
12.2.2	Egyéb közlemények:	101
12.2.3	A témához kapcsolódó posztetek:	102
12.2.4	Egyéb posztetek:	102
12.2.5	A témához kapcsolódó előadás:	102
12.2.6	Egyéb előadás:	102
13	NYILATKOZAT	103
14	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104
15	MELLÉKLET	105

2 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

15°C 10N–tizenöt °C kezelés tizedik napja

15°C 1N–tizenöt °C kezelés első napja

5°C 1N–öt °C kezelés első napja

5°C 7N–öt °C kezelés hetedik napja

ACER1–alkalin *ceramidáz* 1–alkaline *ceramidase* 1

Acyl-ACP – acil-acil carrier fehérje–acyl-acyl carrier protein

ACP – acil carrier fehérje–acyl carrier protein

AD3 – alkohol *dehidrogenáz* 3 – alcohol *dehydrogenase* 3

ARL– NADPH-függő *aldehid reduktáz kötő fehérje* (kloroplasztisz lokalizáció)– NADPH-*dependent aldehyd reduktaz binding protein*

ATS1– glicerín-3-foszfát acil-ACP aciltranszferáz– glycerol-3-phosphate acyl-ACP acyltransferase

ATS2–lizofoszfátid sav aciltranszferáz–lysophosphatidic acid acyltransferase

BL–kettősréteg formáló lipid–bilayer forming lipid

CAMTA–kalmodulin kötő transzkripció aktivátor–calmodulin buiding transcription factor

CAMTA 3–kalmodulin kötő transzkripció aktivátor 3–calmodulin binding transcription factor 3

CBF–C- repeat *kötő faktor*–C-repeat *binding factor*

CDP–citidin-trifoszfát–cytidine triphosphate

CDP-DAG–CDP-diacilglicerín–CDP-diacylglycerol

CDS–CDP-diacilglicerín szintáz–diacylglycerol synt hase

CL–kardiolipin–cardiolipin

CM2–konzervált DNS motívum 2–conserved DNA motif 2

CoA–acetil koenzim A–acetyl coenzyme A

COP1–kaspázokat összegyűjtő domain család 1–caspase recruitment domain family member 1

CTP–citidin-trifoszfát–cytidine triphosphate

CRT/DRE-C– ismétlődés/dehidratációra érzékeny elem– C-repeat/dehydration-responsive element

DAG–diacil-glicerín–diacylglycerol

DB–kettős kötés–double bound

DBI–kettős kötés index–double bound index

DGD1	–digalaktozildiacil glicerín szintáz 1	–digalactosyldiacyl glycerol synthase 1
DGD2	–digalaktozildiacil glicerín szintáz 2	–digalactosyldiacyl glycerol synthase 2
DGDG	–digalaktozildiacilglicerín	–digalactosyldiacylglycerol
DREB	–dehidratációra érzékeny elem-kötő faktor	–dehydration-responsive element binding factor
F ₀	–minimális fluoreszcencia	–minimal fluorescence
F _m	–maximális fluoreszcencia emisszió	–maximum fluorescence emission
F _m '	–fényadaptált állapotra jellemző maximális fluoreszcencia	–maximal fluorescence when all PSII reaction centres are closed in dark and light-acclimated leaves
FR-H2	–fagyálló- <i>Hordeum vulgare</i> 2	–frost resistant- <i>Hordeum vulgare</i> 2
FR-A2	–fagy rezisztencia 2 lokusz	–frost resistant-allele 2
F _s	–egyensúlyi fluoreszcencia	–steady-state fluorescence in light
F _v /F _m	–a PSII maximális fotokémiai hatásfoka	–maximum photochemical efficiency of PSII
G3P	–glicerol-3-foszfát	–glycerol-3-phosphate
GC	–nem-lizoszomális glükozilceramidáz	–non-lysosomal glucosylceramidase
GPAT3	–glicerín-3-foszfát aciltranszferáz 3	–glycerol-3-phosphate acyltransferase 3
HexCer	–ceramidok	–ceramids
HK	–a tilakoidmembránt alkotó lipidek hosszának és kettőskötés számának a megoszlása	
HvPI4K	– <i>Hordeum vulgare</i> fosfatidilinozitol 4-kináz	– <i>Hordeum vulgare</i> phosphatidylinositol 4-kinase
IEM	–ioncserélő membrán (belső membrán)	–ion exchange membrane
LLO2	–linolát 9S-lipoxigenáz 2	–linolát 9S-lipoxigenáz 2
LOC	–lipoxigenáz 2.3, (kloroplaszt lokalizáció)	–lipoxygenase 2.3
LOV	–fény, oxigén vagy elektromossággal szabályozott domain	–light-oxygen-voltage-sensing domain
LOV1	–fény, oxigén vagy elektromossággal szabályozott domain 1	–light-oxygen-voltage-sensing domain 1
LOV2	–fény, oxigén vagy elektromossággal szabályozott domain 2	–light-oxygen-voltage-sensing domain 2
LPC	–lizofosfatidilkolin	–lysophosphatidylcholine
LPE	–lizofoszfátidiletanolamin	–lysophosphatidylethanolamine
LPG	–lizofoszfátidilglicerín	–lysophosphatidilglycerol
LPL	–lizofoszfolidok	–lysophospholipids
Lyso-PA	–lizofoszfátidil sav	–lysophosphatidyl acid

MGD1	monogalaktozil diacilglicerín szintáz 1	monogalactosyl diacylglycerol synthase 1
MGD2	monogalaktozil diacilglicerín szintáz 2	monogalactosyl diacylglycerol synthase 2
MGDG	monogalaktozildiacyl glicerín	monogalactosyldiacyl glycerin
MGDG/DGDG	monogalaktozil diacilglicerín/ digalaktozil diacilglicerín arány	monogalactosyldiacyl glycerin/ digalactosyldiacyl glycerin ratio
NBL	kettős membránt nem alkotó lipidek	non bilayer forming lipids
NC	neutrális ceramidáz	neutral ceramidase
NC1	neutrális ceramidáz 1	neutral ceramidase 1
NC2	neutrális ceramidáz 2	neutral ceramidase 2
NC3	neutrális ceramidáz 3	neutral ceramidase 3
NPH3	nem-fototropikus hipokotil 3F	non-phototropic hypocotyl 3F
OEM	kloroplasztisz külső borító membránja	outer envelope membrane
PA	foszfatidil sav	phosphatidyl acid
PC	foszfatidilkolin	phosphatidylcholine
PC/PE	foszfatidilkolin/foszfatidiletanolamin arány	phosphatidylcholine/ phosphatidylethanolamine ratio
PE	foszfatidiletanolamin	phosphatidylethanolamine
PG	foszfatidilglicerín	phosphatidylglycerol
PGP	foszfatidil-glicerín foszfátáz	phosphatidyl glycerol phosphatase
PGP1	foszfatidil-glicerín foszfátáz 1	phosphatidyl glycerol phosphatase 1
PGP2	foszfatidil-glicerín foszfátáz 2	phosphatidyl glycerol phosphatase 2
PGP-P	foszfatidil-glicerín-foszfát-foszfátáz	phosphatidylglycerol phosphate phosphatase
PHOT	fototropin	phototropin
phot1	fototropin 1	phototropin 1
phot2	fototropin 2	phototropin 2
phyA	fitokróm A	phytochrome A
phyB	fitokróm B	phytochrome B
Pi	pirofoszfát	pyrophosphate
PI	foszfatidilinozitol	phosphatidylinositol
PIF4	fitokróm interakciós faktor 4	phytochrome interaction factor 4
PIF7	fitokróm interakciós faktor 7	phytochrome interaction factor 7
PKS4	fitokróm kináz szubsztrát 4	phytochrome kinase substrate 4
PL	foszfolipidek	phospholipids

PLD α 1–foszfolipáz *D alfa 1*–phospholipase *D alpha 1*

PLD α 2–foszfolipáz *D alfa 2*–phospholipase *D alpha 2*

PLD α 3–foszfolipáz *D alfa 3*–phospholipase *D alpha 3*

PPC–foszfatidilinozitol foszfolipáz *C*–phosphatidilinositol phospholipase *C*

Ppi–pirofoszfát–pyrophosphate

PS–foszfatidilszerin–phosphatidylserine

PSII–II. fotokémiai rendszer–photosystem II

TaCBF14–*Triticum aestivum* C-repeat kötő faktor 14–*Triticum aestivum* C-repeat binding factor 14

TaCBF15–*Triticum aestivum* C-repeat kötő faktor 15–*Triticum aestivum* C-repeat binding factor 15

TAG–triacil-glicerol–triacyl-glycerol

UDP–uracil-difoszfát–uracil diphosphate

WL–fehér fény–white light

WLFR–fehér fény kiegészítve távolivörös fénnel–white light and far-red light

WLFR+410 nm–fehér fény hozzáadott távolivörös és 410 nm-es fénnel–white light, far-red light and 410 nm light

Y(II)–a PSII aktuális fotokémiai hatásfoka–PSII actual yield

3 BEVEZETÉS

A 2019-évi KSH adatok szerint őszi búzát 954 943 hektáron, tavaszi búzát 16 804 hektáron, a második legfontosabb gabonanövényünket, az őszi árpát, 161 711 hektáron, míg a tavaszi árpát 101 235 hektáron termesztettek. Az adatsor híven tükrözi, hogy a növénytermesztők az őszi gabonaféléket előnyben részesítik a tavasziakkal szemben, magasabb termőképességük, így nagyobb hozamuk miatt. Ezzel a döntéssel természetesen vállalják az átteleléssel járó kockázatot. A táplánszentkereshti kutatóállomáson évek óta tesztelik a Magyarországon termesztett őszi árpákat vetésidő kísérletben. Ez alapján a sokéves adatok egyértelműen az október közepi vetést erősítik meg, mint legmegfelelőbbet. Míg az október közepi vetés esetén csak 10% körüli kipusztulási százalék tapasztalható, addig a szeptember és november közepi vetésidőkben 50% fölötti ez az arány. A túl korai vetéseknél gyakran jelentkezik víruskártétel is, melyet a megtelepedő vektorok segítenek elő és további kipusztulást eredményezhet (<http://web.archive.org/web/20160807064318/https://www.agronaplo.hu/szakfolyoirat/2006/08/szantofold/oszi-arpa-termesztes-kulcskerdesei>). Optimálisnak tekintik, ha a kicsírázott növénykéek eléri a háromleveles fejlődési stádiumot a november végi, december eleji fagyok beköszöntéig. Azonban, ha megvizsgáljuk a napi hőmérsékleti fluktuációt is, akkor a meteorológiai adatok alapján azzal szembesülünk, hogy -4°C alatti napok száma októberenként az elmúlt húsz évben (1981-2010) tizenhat volt (Kalapos és *mtsai.*, 2016). Vagyis ezeknek a növényeknek a szántóföldön át kell vészelnüik a fagyos éjszakákat. Ám a genetikailag meghatározott fagyállóságot a gabonanövények több hétig tartó hidegedződés során érik el. Ebben a korai fázisban a csíranövények az edződési folyamat elején tartanak. A Föld mérsékelt égövén a nappalhossz, a hőmérséklet, a napfény erőssége és színeke évszakoktól és napszaktól függően évmilliók óta ciklikusan változik. Feltételezhető tehát, hogy a növények érzékelik ezeket a változásokat és evolúciós besorolásuktól függetlenül hasonló módon reagálnak rá. Nappal például a vörös/távolivörös fény aránya állandó és független a felhők jelenlététől, azonban alkonyatkor szignifikánsan csökken, amikor a Nap a horizont felett kevesebb, mint 10° -on látható. A beeső fény színekében a távolivörös fény aránya megemelkedik, ahogy távolodunk az egyenlítőtől. Ez elsősorban a Föld északi féltekéjének mérsékelt és boreális (szubarktikus) égövein számottevő. Novemberben alacsonyan jár a nap, és jellemzően alkonyatkor hosszú ideig tart a napfény színekének vörös/távolivörös fény arányának csökkenése, amit pedig éjjel fagy követhet. Emiatt megalapozottnak tűnik az a hipotézis, hogy a növények a fény vörös/távolivörös arányának csökkenését egyfajta jelként használhatják, ami beindítja a hidegakklimatizációs

folyamatokat viszonylag magas, még nem hidegakklimatizációs hőmérsékleten, melynek eredménye a megnövekedett fagyállóság lesz. Ezt a hipotézist először lúdfű modellnövényben Franklin és Whitlam igazolta kísérletes módon 2007-ben (Franklin és Whitlam, 2007). Később a martonvásári kollégák őszi gabonaféléken is megerősítették ezt a hipotézist (Novak és mtsai., 2016), ugyanis mesterséges körülmények között +15 °C-on az őszi gabonák (búza és árpa) fagyállóságát sikerült a megvilágításra használt fehér fény színekében a vörös/távolivörös fény arányának csökkentésével növelni.

Korábbi kutatások alapján ismert, hogy a hidegkezelés és a különböző hullámhosszú megvilágítás is változásokat indukál a lipid-összetételben (Chao és mtsai., 2011; Chen és mtsai., 2012; Chen és mtsai., 2008; Falcone és mtsai., 2004; Markham és mtsai., 2011; Saucedo-Garcia és mtsai., 2011; Wang és mtsai., 2008). Leírták azt is, hogy a kék fény hatást gyakorol, a kriptokróm jelátviteli úton keresztül, a hideg rezisztencia kialakulására a lúdfűben (Imai és mtsai., 2021a). Kollégáim korábbi kutatásai alapján tisztázódott, hogy a monokromatikus kék fény indukálja a fagyállóságban szerepet játszó *C-repeat binding factor 14 (CBF14)* gén expresszióját gabonafélékben (Novak és mtsai., 2017). Azonban az a kérdés megválaszolatlanul maradt, hogy milyen metabolomikai változásokat indukál a fehér fény színekének távolivörössel történő kiegészítése a növények leveleiben, melyek eredményeként nő a fagyűrés. Az sem volt ismert, hogy a kék fénnel történő kiegészítés befolyásolja-e a távolivörös fénykezelés hatását. Ezekre a kérdésekre kerestünk választ kutatásaink során.

4 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A hidegedződés szerepe a télállóság kialakulásában

Hosszabb tenyészidejük miatt az őszi gabonafélék 15-25% -kal többet teremnek a tavasziaknál, korai érésük miatt elkerülik a nyáron gyakran fellépő szárazságot és betegségeket, továbbá a tél folyamán megfelelő talajborítást nyújtanak, ezáltal minimálisra csökkentik a talajeróziót. Termesztésük tehát gazdaságosabb és környezetkímélőbb a tavaszi gabonaféléknél. Az őszi árpa hozama a tavaszihoz képest 30-40%-kal nagyobb (Hüner és *mtsai.*, 2016). Azonban a föld északi féltekéjén elterjedésüket a mai napig gátolja a megfelelő télállóság hiánya. Télállóság alatt a növénynek azon tulajdonságát értjük, amely képessé teszi a tél viszontagságait (hideg, oxigénhiány, felfagyás, betegségek) károsodás nélkül elviselni. A télállóság egyik legfontosabb elemét a fagyállóság alkotja (szinonimája a fagytűrés), amely alkalmassá teszi a növényeket arra, hogy fagypont alatti hőmérsékleteket károsodás nélkül vészeljék át. A fagy okozta károsodás kivédéséhez szükség van egy hosszabb ideig tartó, alacsony hőmérsékletű növekedési időszakra, az úgynevezett edződés időszakára (McKersie és Leshem, 1994). Természetes körülmények között hazánkban az edződés ősszel történik, rövidülő megvilágítás és a hőmérséklet fokozatos csökkenése során. Mesterséges körülmények között, növénynevelő kamrákban lehetőség van e folyamat modellezésére, a hidegedzés kivitelezésére. Az ELKH Agrártudományi Kutatócentrum martonvásári Mezőgazdasági Intézetében, a fitotronban, a gabonafélék fagyállóság tesztelését Sutka József (1981) által kidolgozott módszere szerint végzik. Az előnevelést 15 °C körüli hőmérsékleten hajtják végre, és öt hét alatt a növényeket folyamatosan csökkenő hőmérsékleten nevelik. A hatodik hét során a hőmérséklet eléri a 0 °C-t és ezután fagyasztó kamrákban állapítják meg a fagytűrés mértékét.

A múlt évtizedben egyre több információ gyűlt össze annak igazolására, hogy a hidegedződés során jelentős szerepet játszik a nappalhossz, a növényeket megvilágító fény erőssége és színe. A rövidülő nappalhossz, a fényintenzitás és a fény spektrális összetételének változása együttesen jelzi ősszel a tél közeledtét az áttelelő növény számára (Badawi és *mtsai.*, 2007; Franklin és Quail, 2010; Franklin és *mtsai.*, 2014; Kurepin és *mtsai.*, 2008; Majlath és *mtsai.*, 2012; Novak és *mtsai.*, 2017; Sandve és *mtsai.*, 2011). Azt, hogy miként befolyásolja a megvilágítás a növények fagytűrését, számos tanulmány elemezte a közelmúltban, elsősorban a lúdfű modellnövényen végzett kísérletek alapján (Catala és *mtsai.*, 2011; Kim és *mtsai.*, 2002; Maibam és *mtsai.*, 2013). Ezek a tanulmányok rámutatnak arra, hogy a vörös/távolivörös fény arányának érzékelésért felelős fitokrómok, és a fagytűrésben igen fontos *C-repeat binding factor*

(CBF) jelátviteli útvonal interakciója felelős a fény fagyűrést befolyásoló hatásáért. Úgy tűnik, hogy az áttelelő növények esetében a fehér fény színképében a vörös/távolivörös fény arány csökkenésének fagyűrést növelő hatása általános, mivel a munkatársaink Martonvásáron gabonafélék esetében is (búza, árpa, alakor) igazolták ezt a jelenséget (Ahres és mtsai., 2020; Gierczik és mtsai., 2017; Novak és mtsai., 2016).

4.2 A CBF transzkripciós faktorok és szerepük a fagyállóság meghatározásában

Az egyik leginkább kutatott géncsalád, amely a hideg- és szárazságstressz elleni védelem kialakításáért felelős, a transzkripciós faktorokat kódoló *C-repeat binding factor*, vagy más néven *Dehydration-responsive element binding factor* gének (*DREB*) csoportja. Mivel két kutatócsoport szinte egyszerre írta le őket (Liu és mtsai., 1998; Stockinger és mtsai., 1997), ezért ezek a gének kettős elnevezéssel rendelkeznek. A nyugat-európai szakirodalomban a *CBF* elnevezés az elterjedtebb, ezért a továbbiakban ennek használatára szorítkozom.

A *CBF*-ek az *APETALA2* (*AP2*)/etilén-érzékeléséért felelős géncsaládba (*ERF*) tartoznak. Ezek a transzkripciós faktorok tartalmazzák az *AP2* DNS kötő domént, egy körülbelül hatvan aminosavból álló szakaszt. A *CBF*-eket a család más tagjaitól két, az *AP2* domén előtt és mögött elhelyezkedő konzervált motívum, a *PKKP/RAGR_xKFxETRHP* és a *DSAWR* különbözteti meg (Jaglo és mtsai., 2001). A *PKKPAGR* motívum egyben fontos eleme a *CBF*-ek DNS-kötő képességének (Canella és mtsai., 2010), ugyanis a *CBF* transzkripciós faktorok DNS-kötő doménjük segítségével alacsony hőmérséklet hatására a szabályozásuk alatt álló gének promóterében megtalálható *C-repeat* motívumhoz kötődve szabályozzák azok kifejeződését (Baker és mtsai., 1994; Jaglo-Ottosen és mtsai., 1998; Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994).

A *CBF* transzkripciós faktorok lúdfűben jelenlegi ismereteink szerint három (Gilmour és mtsai., 1998), alakorban tizenegy (Miller és mtsai., 2006), árpában húsz (Skinner és mtsai., 2005), míg hexaploid búzában harminchét taggal (Badawi és mtsai., 2007) képviseltetik magukat. Számos tagjukat kódoló gént térképeztek árpában, alakorban és búzában az 5-ös kromoszóma hosszú karjának *Frost Resistant-2* (*FR-2*) lókuszára (Francia és mtsai., 2007; Miller és mtsai., 2006; Vagujfalvi és mtsai., 2005). Pearce és mtsai. (2013) bebizonyították, hogy az *FR-2* régióban bekövetkezett *CBF* géneket is érintő delécio csökkent mértékű fagyűrést eredményez durum búzában (Pearce és mtsai., 2013). Knox és mtsai. (2010) szerint az árpa *Frost Resistant-Hordeum vulgare 2* (*FR-H2*) lókuszán található *C-repeat binding factor 2* (*CBF2*) és *C-repeat binding factor 4* (*CBF4*) gének kópiaszáma nagyobb az őszi habitusú „Nure” esetén a tavaszi

habitusú „*Tremois*”-hoz képest, ami összefüggésben állhat a „*Nure*” nagyobb fagyűrő képességével (Knox és *mtsai.*, 2010; Sieber és *mtsai.*, 2016). A durumbúza fagyűrő képességét az 5A kromoszóma *FR-2* lókuszán lévő *CBF14* gén kópiaszámával hozták összefüggésbe, mintegy megerősítve a Dhillon és Stockinger, (2013) valamint Knox és *mtsai.*, (2010) által diploid és hexaploid búzában leírt jelenséget. Fricano és *mtsai.* (2009) (Fricano és *mtsai.*, 2009) az árpa genotípusok fagyállósága közti különbséget a *CBF14* allélok különbözőségével magyarázták. A *CBF2*, *CBF9* és *CBF14* gének erőteljesebben fejeződnek ki őszi, mint tavaszi búzában, a fagyűrő *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* „*Cheyenne*” *CBF14* gén expressziója pedig négyszerese a hidegérzékeny *Triticum spelta*-ból származó *CBF14* génnek (Galiba és *mtsai.*, 2013; Stockinger és *mtsai.*, 2007; Vagujfalvi és *mtsai.*, 2005). Soltész és *mtsai.* (2013) (Soltész és *mtsai.*, 2013) pedig bizonyították, hogy az árpában túltermeltetett kenyérbúza *TaCBF14* és *TaCBF15* gének hatására a transzgénikus vonalak fagyűrőbbek lettek, mint a vad típus hidegedzés után, illetve hidegedzés nélkül is. A fentiekből következik, hogy az *FR-2* lókuszban található *CBF* klaszter fagyűrő kialakításában meghatározó szerepet tölt be.

4.3 A növényi fotoreceptorok és a CBF-regulon kapcsolata

Amint már fentebb említésre került, az alacsony hőmérséklet mellett a fény, mint környezeti faktor is befolyásolja a fagyállóságot és a *CBF* gének expresszióját (Ahres és *mtsai.*, 2020; Gierczik és *mtsai.*, 2017; Lee és Thomashow, 2012; Novak és *mtsai.*, 2016; Wang és *mtsai.*, 2016). A fény hatásai közül a dolgozatban részletezett kísérleteket a spektrális összetétel hatásának vizsgálatára állítottuk be, ezért az irodalmi áttekintésben is ennek a jelenségnek az ismertetésére koncentrálok. A fény érzékelése a növényekben fotoreceptorokon keresztül történik, ahol a különböző hullámhosszú fény elnyelése különböző fotoreceptor-családok feladata. A vörös ($\lambda_{\max} \sim 660$ nm) és a távolivörös ($\lambda_{\max} \sim 730$ nm) fény elnyeléséért a fitokrómok felelősek, míg a kék és/vagy UV fényét a kriptokrómok, a fototropinok, valamint a ZEITLUPE és az UVR8 fotoreceptorok végzik (Casal, 2000; Demarsy és *mtsai.*, 2018; Kim és *mtsai.*, 2007; Sharrock, 2008).

4.3.1 Fitokrómok

A fitokrómok elsődlegesen vörös fényt érzékelnek, abszorpciós maximumuk 600-700 nm hullámhossz között található. A lúdfű öt fitokróm génnel rendelkezik: fitokróm (*phy*) A, B, C, D és E, míg az árpa hárommal (*phyA*, B és C). A fitokrómok homo-vagy heterodimereket alkotnak

a növényi sejtekben, és két izoformát vehetnek fel. Az inaktív fitokrómforma, fitokromobilin kromofórjának köszönhetően gerjesztési energiát nyel el a beeső vörös fénysugarakból ($\lambda_{\max}$ = 660 nm). Ennek hatására konformációs változást szenved el, így veszi fel biológiailag aktív fitokróm formát (Rudiger és *mtsai.*, 1983). Ezek a sejtmagba vándorolva „sejtmagi testeknek” nevezett képleteket formálnak, melyek fényindukált gének expresszióját végző multiprotein komplexek (Chen, 2008). Az aktív fitokrómforma távolivörös fénnel történő gerjesztéssel ($\lambda_{\max}$ = 730 nm) inaktiválható, de létezik egy fényfüggetlen, ám hőmérsékletfüggő spontán visszaalakulás is, melyet a szakirodalom „sötét reverzióként” említ. Erősebb fényintenzitáson az aktív állapotba került dimerek nagyobb arányban jelentkeznak, és a sejtmagba vándorolva erőteljesebb génexpressziós változást képesek indukálni. A fitokrómok közül a fagyállóság jelátviteli rendszerében a *phyA* és *phyB* játszik meghatározó szerepet. Novak és *mtsai.* (2016) bemutatták, hogy a nap hossza és a fény spektrumának összetétele a hőmérséklettől függetlenül szabályozza a *CBF14* gént expresszióját őszi *Triticum aestivum*-ban, *Hordeum vulgare*-ban. Fehér fényű megvilágítás alkalmával a *phyB* aktív formája gátolja a *CBF14* és a *phyA* expresszióját. Amennyiben a fehér fényt távolivörös fénnel egészítették ki, akkor a legtöbb *phyB* fehérje inaktívvá vált és a *CBF14* vagy a *phyA* felszabadult a gátlás alól. Valamint a *phyA* aktív formája fokozhatja a *CBF14* expresszióját. Hasonló jelenséget írtak le lúdfűben is (Franklin és Whitelam, 2007), viszont a gyengébb fagyűrűsű *Triticum monoccocum*-ban nem tapasztaltak ilyen szabályozást.

4.3.2 Kriptokrómok

A kriptokrómok közé tartoznak a kék fényt és az UV-A-t érzékelő receptorok. A receptorok N terminálisán egy fotoliáz szerű domain található, mely flavin adenin nukleotid és flavin + vagy meteniltetrahidrofolát kromofórokat kötnek. A kriptokróm 1 egy olyan stabilabb fehérje, mely alacsonyabb hullámhosszú fény hatására aktiválódik. Mind e mellett a kriptokróm 2 fehérjét, tulajdonságai alapján, magasabb hullámhosszú fény aktiválja. Ezen fehérjék segítségével a gén expresszió és gátlás finoman szabályozható (Lin és *mtsai.*, 1998).

4.3.3 A fényérzékeny gének transzkripció szabályozása

A fentebb bemutatott fényérzékelő fehérjekomplexek különlegességüket azokban a szekvenciákban hordozzák, melyek adott spektrumú fény hatására reagálnak. Azok a gének, melyek fényérzékenyek, rendelkeznek a promótereikben fényválasz elemekkel (LRE). Az LRE

nélkülözhetetlen a fény által szabályozott transzkripció aktiválásához. A motívumot körülvevő szekvencia és a konszenzus szekvencia is befolyásolja a fényre adott válaszokat (Jiao és *mtsai.*, 2007). Ilyen fényérzékeny gén a dehydrin-ek közé tartozó *COR14b*. Egy kísérlet során öt percig fehér, kék vagy vörös fénnel világították meg a gabonanövényeket, majd hét napos hidegedzés következett sötétben. Ezekből a magoncokból jelentősen magasabb *COR14b* fehérjeszintet detektáltak, mint azokból, amelyeket vörös megvilágítás után távolivörös vagy zöld fénnel világítottak meg. A fehérjeakkumuláció már öt másodperc vörös fénnel történt megvilágítás után detektálható volt (Crosatti és *mtsai.*, 1999).

Fentebb említett LRE-k megismerése során több különböző szekvenciát írtak le, melyek egymás után kapcsolva különböző fényekre aktiválódtak. Olyan LRE szekvenciát azonban nem találtak, mely minden hullámhosszú fény esetében aktiválna. A leírt LRE -k különbözőek a különböző növényi családok esetében (Hudson és Quail, 2003).

4.4 A hidegakklimatizáció

Az alacsonyabb oldottanyag-koncentrációjának köszönhetően az extracelluláris folyadék fagyáspontja magasabb, mint az intracelluláris folyadéké, így már 0 °C alatti hőmérsékleten jégkristály képződés indul el a sejt közötti térben. A vízpotenciál csökken a sejten kívül kialakuló jégkristályok jelenléte miatt, ennek eredményeként a sejtben található víz kiáramlik, majd -10 °C alatti hőmérséklet esetén a víz 90 %-a a szövet közti térbe áramlik. Emiatt a sejten belül dehidratált állapot jelentkezik (Thomashow, 1999). Ettől a jelenségtől sokkal veszélyesebb a jégkristályok által okozott sejtmembránroncsolás, amely visszafordíthatatlan károkat okozhat (Olien és Smith, 1977).

A növényeknek, az életben maradás érdekében, meg kell óvniuk magukat ettől a nagy mértékű kiszáradástól és a membránkárosodásától. Ennek érdekében a hidegakklimatizáció alkalmával transzkriptomikai, metabolomikai és proteomikai változások sorozata megy végbe. Bizonyos aminosavak és cukrok, illetve bomlástermékek (glükóz, rafinóz fruktóz, galaktinol, prolin, putreszcin) valamint krioprotektív fehérjék halmozódnak fel (Cook és *mtsai.*, 2004; Smallwood és Bowles, 2002). E folyamatot nevezik edződésnek, mely eredményeként nő a fagyállóság.

4.4.1 A különböző lipidosztályok bioszintézise

A zsírsavak többféle szerepet töltenek be a biológiai rendszerekben. A szabad zsírsavak

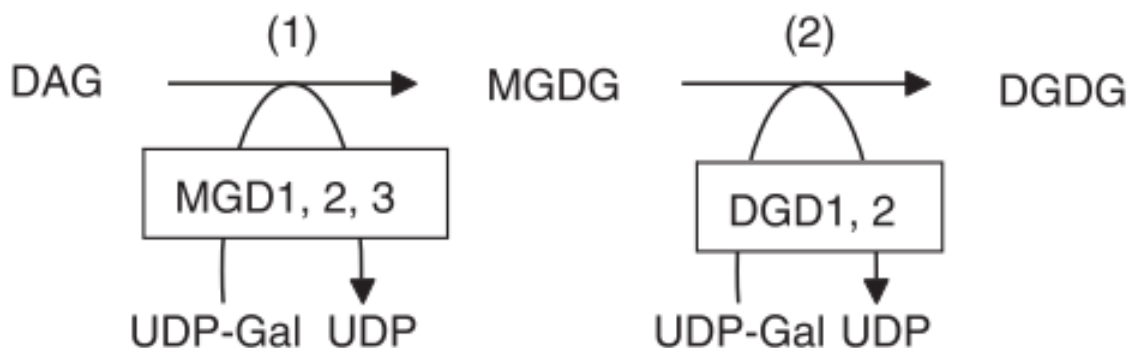
ritkán fordulnak elő a természetben, de helyett gyakran észtereződnek foszfolipiddé (PL), valamint glicerolipiddé vagy szterin gerinccel rendelkező lipiddé. A zsírsavak a membrán szerkezetének fontos alkotóelemei, továbbá lehetnek jelzőmolekulák is (Drobak és Heras, 2002; Feussner és Wasternack, 2002; Lerouge és *mtsai.*, 1990), és jelentős energiatárolók (Murphy, 1990). A válaszreakciók/védelmi stratégiák alappillérei, elősegítik a hőmérséklet-toleranciát az fotoszintetizáló élőlényekben (Gibson és *mtsai.*, 1994; Wada és *mtsai.*, 1990).

A zsírsavak *de novo* bioszintézise a C18-as szénláncig az acetil-koenzim A (CoA) közreműködésével történik két enzimatisz utvonall segítségével, melyek a következők: az acetil-CoA karboxiláz és a zsírsav szintáz. A magasabb rendű növényeknél mindkét szintetizáló útvonall a kloroplasztiszban található. A szintézisben résztvevő polipeptidek nagy része sejtmagi kódolású, emiatt tranzit szekvencia kapcsolódik hozzájuk, mely segítségével jutnak be a kloroplasztiszba.

A kloroplasztisz alkotó lipidek közé tartoznak a monogalaktozil-diacil-glicerinn (MGDG), a digalaktozil-diacil-glicerinn (DGDG), a sulphoquinosil-diacil-glicerinn (SQDG) és a foszfatidil-glicerinn (PG). Ezek a lipidek alapvetők a kloroplasztisz membránszerkezetének fenntartásában. Nélkülözhetetlenek a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működéséhez. A diacil-glicerinn (DAG) általános prekursora a glikolipideknek, melyek a prokariótikus és az eukariótikus útvonallakon is termelődnek. Lúdfűben két típusú MGDG-szintáz található, a *monogalaktozil-diacilglicerinn-szintáz 1* (*AtMGD1*) és a *monogalaktozil-diacilglicerinn-szintáz 2* (*AtMGD2*), ezek funkciója már ismert (4. kieg. ábra). Az *MGD1* szintáz termeli az MGDG nagy részét, míg az *MGD2* foszfáthiányra aktivizálódik. A DGDG esetében is két enzim ismert a *digalaktozil-diacil-glicerinn-szintáz 1* (*DGD1*) és a *digalaktozil-diacil glicerinn-szintáz 2* (*DGD2*). A *DGD1* szintetizálja a DGDG többségét, míg a *DGD2* foszfáthiány esetében aktivizálódik.

Az *MGD2* részt vesz a fotoszintetikus membránok fő szerkezeti elemeinek szintézisében és a kloroplasztisz membrán biogenezisében. Ez az enzim felhasználhatja az eukarióta (18: 1/16: 0) és a prokarióta (18: 2/18: 2) 1,2-diacil-glicerinn species-t is, de az eukariótát előnyben részesíti. Az *MGD2* érzékeny a foszfáthiányra az MGDG szintézise során, valamint a galaktolipid és a glükolipid szintézisben is részt vesz (Awai és *mtsai.*, 2001). A *DGD1* szintetizál DGDG-t és a tilakoid membránban lokalizálódik. A *DGD1* specifikusan α -glikozidos kapcsolatokat hoz létre és a galaktolipidek fotoszintetikus membránokban való beépülésében vesz részt (Kelly és *mtsai.*, 2003).

A magasabb rendű növényekben az MGDG bioszintézise a plasztiszban játszódik le és az MGDG szintáz katalizálja (Douce és Joyard, 1980). Az MGDG szintáz átszállítja a galaktózt az UDP galaktózzal a DAG-ra, és létrejön az MGDG. Az *MGD1* enzim a prokariotikus úton felépített lipidláncokat, a 18:2/18:2 DAG láncokat, míg az *MGD2* az eukariotikus 18:1/16:0 DAG láncokat használja fel (Govindjee és *mtsai.*, 2009).

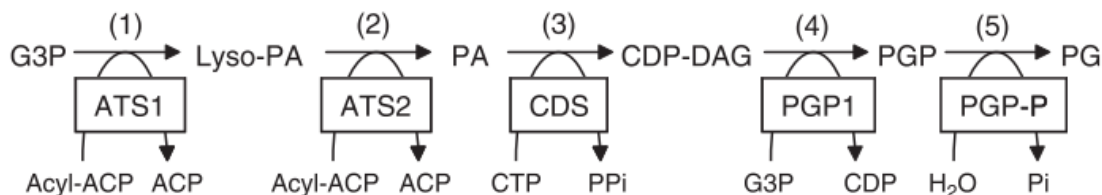


1. ábra: Glükolipid-bioszintézis útvonal. A reakció lúdfüben a következők szerint játszódik le: Diacil-glicerinből (DAG) az (1) *MGDG szintáz* (*MGD1*, 2 vagy 3) UDP-galaktóz (UDP-Gal) felhasználásával monogalaktozil-diacil-glicerint (MGDG) hoz létre. A reakció során az uracil-difoszfát (UDP) lép ki. Az MGDG felhasználásával és az UDP-Gal belépésével a (2) *DGDG szintáz* (*DGD1* vagy 2) di-galaktozil-diacil-glicerint (DGDG) hoz létre. A reakció során az UDP lép ki.

Az első DGDG enzimet lúdfüvből izolálták (Dormann és *mtsai.*, 1995). Később a *DGD2*-t is azonosították (Dormann és *mtsai.*, 1995). Mindkét enzim részt vesz a DGDG szintézisében, szubsztrátjaik pedig az MGDG és az uracil-difoszfát (UDP). Az enzimek különböző szerepet töltenek be a DGDG bioszintézisben (Kelly és Dormann, 2002) (4. kieg. ábra).

A PG a magasabbrendű növényekben három sejtalkotóban szintetizálódik: a plasztiszban, az endoplazmatikus retikulumban és a mitokondriumban (Moore, 1974; Ohlrogge és Browse, 1995). A szintézis útvonala a 2. ábrán látható. Minden zsírsav, valamint acil-acil carrier protein, mely szükséges a PG szintézis útvonalhoz, a plasztiszban szintetizálódik. Az acil-acil carrier proteinek által szállított acil csoport a glicerol-3-foszfát (G3P) sn-1pozíciójába kerül a glicerol-3-foszfát aciltranszferáz segítségével és létrejön az 1-acilglicerol-3-foszfát. A második aciláció az sn-2 pozícióban a lizofoszfatidil-sav-aciltranszferáz segítségével létrehozza a foszfatid savat (PA). A PG zsírsav csoportok sn-1 pozíciójában 18:1 (9Δ) és az sn-2 pozíciójában 16:0 zsírsavláncok találhatók (Nishida és Murata, 1996). A PA egy citidin-trifoszfát (CTP) és egy G3P felhasználásával alakul foszfatidil-glicerol-foszfáttá (PGP) CDP-diacilglicerol szintáz és PGP-szintáz segítségével. Lúdfüben a PGP szintáz izoenzimeket a *foszfatidil-glicerol foszfátáz 1* (*PGP1*) és a *foszfatidil-glicerol foszfátáz 2* (*PGP2*) gének kódolják (Muller és *mtsai.*, 2001).

A *PGP1* gén lúdfűben nélkülözhetetlen a PG szintéziséhez (Babiychuk és *mtsai.*, 2003; Hagio és *mtsai.*, 2002; Xu és *mtsai.*, 2002). Ugyanakkor a PG szintézis a mitokondriumban nem elkerülhetetlen, mivel a mitokondrium képes importálni a PG termékeket az endoplazmatikus retikulumból (Babiychuk és *mtsai.*, 2003). A PG szintézis utolsó lépése a PGP defoszforilációja a PGP foszfatazon keresztül (Andrews és *mtsai.*, 1985; Moor, 1982).



2. ábra: Foszfatidil glicerin bioszintézis útvonal a lúdfű plasztiszában. A PG bioszintézise lúdfűben a következők szerint játszódik le: A glicerín-3-foszfát (G3P) (1) *glicerín-3-foszfát acil-ACP aciltransferáz* (*ATS1*) és acil-acil carrier fehérje (Acyl-ACP) segítségével lizofoszfatidsavat (Lyso-PA) hoz létre, a reakcióból acil carrier fehérje (ACP) lép ki. A Lyso-PA (2) *lizofoszfatidsav aciltransferáz* (*ATS2*) együttműködésével PA-t hoz létre. A reakcióba Acyl-ACP lép be és ACP lép ki. A keletkező PA (3) *CDP-diacilglicerín szintáz* (*CDS*) segítségével CDP-diacilglicerín (CDP-DAG) hoz létre. A reakcióba citozin-trifoszfát (CTP) lép be és pirofoszfát lép ki (pPi). A CDP-DAG glicerín-3-foszfát (G3P) belépésével a *foszfatidil glicerín foszfát 1* (*PGP1*) enzim segítségével foszfatidil-glicerínfoszfátot hoz létre (PGP), a reakcióból citidin-trifoszfát (CDP) lép ki. A PGP-ből víz belépésével a *foszfatidil-glicerín-foszfát-foszfátáz* (*PGP-P*) segítségével foszfatidil-glicerín (PG) jön létre. A reakcióból foszfát (Pi) lép ki.

A növények homeosztázisának fenntartása érdekében a glicerolipid- és foszfolipid-családoknak egyensúlyban kell lenniük a tilakoid membránban (Govindjee és *mtsai.*, 2009) (3. kieg. ábra). Egyes környezeti faktorok, mint a foszfáthiány stimulálja az *MGD2*, a *PGP1* és a *PGP2* enzimeket annak érdekében, hogy a foszfolipideket glikolipidekre cserélje a membránban, ez által szabályozhatja a lipid bioszintézist.

A ceramidok a szfingolipidek egy csoportja, melyekben a zsírsav lánchoz, amid kötésen keresztül, hosszú szénláncok kapcsolódnak. A hidroxiláció és a telítetlenségi szintjük, valamint a zsírsav láncok hossza a ceramidokban változatos. Ez határozza meg a ceramid fajták nagy számát.

A szfingolipidek bioszintézise a növényekben két szintézis-útvonalon megy végbe: a „*de novo*” és az alternatív módon. A ceramidokat a ceramid-szintáz enzim szintetizálja az endoplazmatikus retikulumban, ahol a komplexebb szfingolipidek is létrejönnek (Markham és *mtsai.*, 2013). A szfingolipidek az egyik legváltozatosabb csoportja a lipideknek, számuk az új formák felfedezésével folytonosan nő (Blaas és Humpf, 2013). A ceramidok fontos szerepet játszanak mint jelátviteli lipidek prokariótákban és eukariótákban egyaránt (Markham és *mtsai.*, 2013; Pata és *mtsai.*, 2010; Sperling és Heinz, 2003). Továbbá, a szfingolipidek jelentősek a

növények fejlődésében, az abiotikus és a biotikus stresszekhez való alkalmazkodásban is (Chao és mtsai., 2011; Chen és mtsai., 2012; Chen és mtsai., 2008; Latowski és mtsai., 2012; Markham és mtsai., 2011; Saucedo-Garcia és mtsai., 2011; Wang és mtsai., 2008) (5. és 6. kieg. ábra).

4.4.2 A lipid-anyagcserében résztvevő egyéb fontosabb enzimek

A fentebb leírt szintézis-útvonalakat egyéb enzimek is irányítják, melyek közül csak a számunkra legfontosabbakat emelném ki. A következőkben bemutatottak kapcsolatban állhatnak az általunk megfigyelt jelenségekkel: *neutrális ceramidáz* (NC), *foszfolipáz D α 1* (PLD α 1), *foszfolipáz D α 2* (PLD α 2), *foszfolipáz D alfa 3* (PLD α 3), *linolát 9S-lipoxigenáz 2* (LLO2), *2,3-lipoxigenázok* (LOC), *glükozilceramidáz* (GC), *aldehid-reduktáz* (ARL) és *alkoholdehidrogenáz* (AD3). A felsorolt enzimek jelentős szerepet játszanak a lipid-összetétel szabályozásában és szintézisében hideg kezelés vagy stressz körülmények között (Awai és mtsai., 2001; Kalisch és mtsai., 2016; Li és mtsai., 2015).

Az NC család három tagból áll: a *neutrális ceramidáz 1* (NC1) fenntartja a szfingolipidek homeosztázisát. Részt vesz az oxidatív stressz kezelésében. A *neutrális ceramidáz 2* (NC2) a szfingolipid-ceramidot szfingozinná és szabad zsírsavvá hidrolizálja. A *neutrális ceramidáz 3* (NC3) részt vesz a szfingolipid bioszintézisében (Li és mtsai., 2015) (5. és 6. kieg. ábra).

Stresszkörülmények között a *foszfolipáz D* és *A* szintje megemelkedik (Huo és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2002; Welti és mtsai., 2002). A PLD hidrolizálja a foszfodiészter kötést a PL-ek fejcsoportjainak oldalán és létrejön egy oldható fejcsoport, valamint egy PA. A PLD-t először növényekben írták le és később bebizonyosodott, hogy részt vesz a jelátvitelben stressz körülmények között (CBF-ek, COR47, COR78), valamint az ozmolit felhalmozásban. A magasabb mennyiségű LPE (COR15a, COR47) gátolja a kifejeződését (Rajashekar és mtsai., 2006).

Az LLO2 gén expresszióját elsősorban a rizs növények lipoxigenáz enzim aktivitásának átmeneti növekedése során detektálták. Ez az enzim katalizálja a lipidek hidroperoxidációját. A növényi lipoxigenáz részt vehet a növény fiziológiájának számos aspektusában, ideértve a növekedést és fejlődést, a kártevőkkel szembeni rezisztenciát, valamint az öregedést vagy a sebzésre adott válaszokat. A jázmonsav, amelyet linolénsavból nyernek növényi sejtekben lipoxigenizálás útján, növekedés szabályozóként ismert (Ohta és mtsai., 1992).

A LOC enzimek a növény élettanának számos különböző folyamatában szerepet játszhatnak, ideértve a növekedést és fejlődést, a kártevőkkel szembeni rezisztenciát, valamint az

öregedést vagy a sebzésre adott válaszokat. A jázmonsav sebzés során való szintézise a levelekben nélkülözhetetlen a védekezési folyamatokhoz (Bannenberg és *mtsai.*, 2009; Bell és *mtsai.*, 1995).

Korábbi kutatások szerint a nem lizoszomális GC katalizálja a glükozilceramid hidrolízist szabad glükózzá és ceramiddá (Michaelson és *mtsai.*, 2016). Az ARL katalizálja az aldehid-karbonil-csoportok redukcióját telített és α , β -telítetlen aldehidek esetében, az öt szénatomnál hosszabb láncoknál. Rövid alkohol-poliol-cukor-dehidrogenázként működhet, amely valószínűleg kapcsolódik a szénhidrát-anyagcseréhez és a szárazság tolerancia kialakulásához vezet, de a jelátvitelben is részt vehet (Yamauchi és *mtsai.*, 2011).

A növényi AD3 katalizálja a folyamatot, melynek során folyamatosan NAD^+ keletkezik. Ha a gyökerekben nincs oxigén, az AD3 expressziója jelentősen növekszik. Emelkedett expressziót okoz a kiszáradás, alacsony hőmérséklet is. Ezen kívül fontos szerepet játszik a gyümölcs érésében, a palánták és a pollen fejlődésében is (Jarillo és *mtsai.*, 1993; Thompson és *mtsai.*, 2010).

4.4.3 A növények levelének membránlipid-összetétele

A növények képtelenek a helyváltoztatásra, és néhány kivételtől eltekintve saját hőmérsékletük szabályozására, ám mégis többféle éghajlaton elterjedtek. Ebben segítségükre áll a membránlipidrendszer alkalmazkodó készsége, amely megnyilvánul a membránfluiditásában, amit a zsírsavak telítetlensége és szteroltartalma is befolyásol. A növények a zsírsavakat a kloroplasztiszból szintetizálják, míg más eukarióták a citoplazmában. A növények és a baktériumok lipid-bioszintézisben résztvevő enzimei lazán kapcsolódnak egymáshoz, és könnyen elkülöníthetők.

A növényi zsírsavak enzimjeinek génjei a sejtmagban kódoltak. A szintetizálódó zsírsavak tranzitpeptidekhez kapcsolódnak, melyek a megfelelő kompartmentekbe szállítják azokat. A lipidek az élőlények létfontosságú szerves vegyületei, többnyire glicerin gerincből és zsírsav oldalláncból felépülő apoláris makromolekulák. A lipideket fejcsoportjuk alapján osztjuk családokra, amelyek a növényekben a következők: MGDG, DGDG, SQDG, PG, foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-etanolamin (PE), foszfatidil-inozitol (PI), foszfatidil-szerin (PS), kardiolipin (CL) és triacil-glicerol (TAG).

A növényekben megtalálható zsírsavláncokat két módon írhatjuk le a nevezéktan szerint. A lipid családokon belül ezeket fajtáknak vagy species-nek nevezzük. Amennyiben ismert az egyedi

észterező zsírsavláncok hossza és telítettsége, a fejcsoporthoz kötődő két zsírsavlánc szénatomjainak és a kettőskötéseik számát egyedileg adjuk meg egy zsírsavláncra vonatkozóan, úgy mint: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 (9 Δ , 12 Δ), 18:3 (9 Δ , 12 Δ , 15 Δ). Amennyiben nem ismert, olyankor a zsírsavláncokat 34:0, 34:1, 34:2, 36:0, 36:1, 36:3, 38:0, 38:1 és 38:3 formában, a két zsírsavlánc szénatom számának és az ezekben előforduló kettőskötések számának összegét adjuk meg. Ilyenkor az egyes láncok egyedi hosszára és kettős kötés tartalmára csupán a már ismert szintézis útvonalakból valószínűsíthetünk (Rigaudy és Klesney, 1979). Egyes lipid fajták, mint a 36:2 (18:2 (9 Δ , 12 Δ)) nélkülözhetetlenek a kiegyensúlyozott állati táplálkozáshoz. Valamint a membránok lipid-összetétele eltérő a különböző partikulumokban. Az 1. táblázatban a spenót kloroplasztisz membrán-összetételét láthatjuk (Block és *mtsai.*, 1983).

%	PC	PI	PG	MGDG	DGDG	SQDG
Totál	20	4	9	32	30	6
OEM	32	5	10	17	29	6
IEM	6	1	8	49	30	5
Tilakoid	4,5	1,5	9,5	52	26	6,5

1. táblázat: A kloroplaszt lipid-összetétele spenótban. A táblázat alapján a következő százalékos megoszlás szerint rendeződnek el a lipidek a kloroplasztisz külső membránban (OEM), a belső membránban (IEM), a tilakoid membránban (Tilakoid). Összeségében a kloroplasztisz membránban (Totál) a különböző lipid családok is különböző százalékban oszlanak el. A kloroplasztiszban található lipid családok a következők: foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-inozitol (PI), foszfatidil-glicerol (PG), monogalaktozil-diacil-glicerol (MGDG), digalaktozil-diacil-glicerol (DGDG), szulfoquinosil-diacil-glicerol (SQDG).

A PC és a PE elsősorban a mitokondrium és a plazma membránban található. A PS és a CL csak a mitokondrium membránjában lelhető fel, a PI pedig kizárólag a plazmamembránban. (Harwood és Jones, 1989). A 2. táblázatban az egyéb sejtalkotó membránok lipid-összetétele látható (Farkas, 1984).

Sejthártya	Mitokondrium	Etioplaszt	Mikroszóma	Sejtmag
50%-ban glikolipidek		32 %- ban glikolipidek	Sok galaktolipid	
PC, PE, PI	90 % PC, PE, CL, PI	Kevés PG	70 % Foszfolipidek	Kevesebb foszfolipid
Szabad szterolok			Szabad szterol	
Neutrális zsírok			Neutrális lipidek	

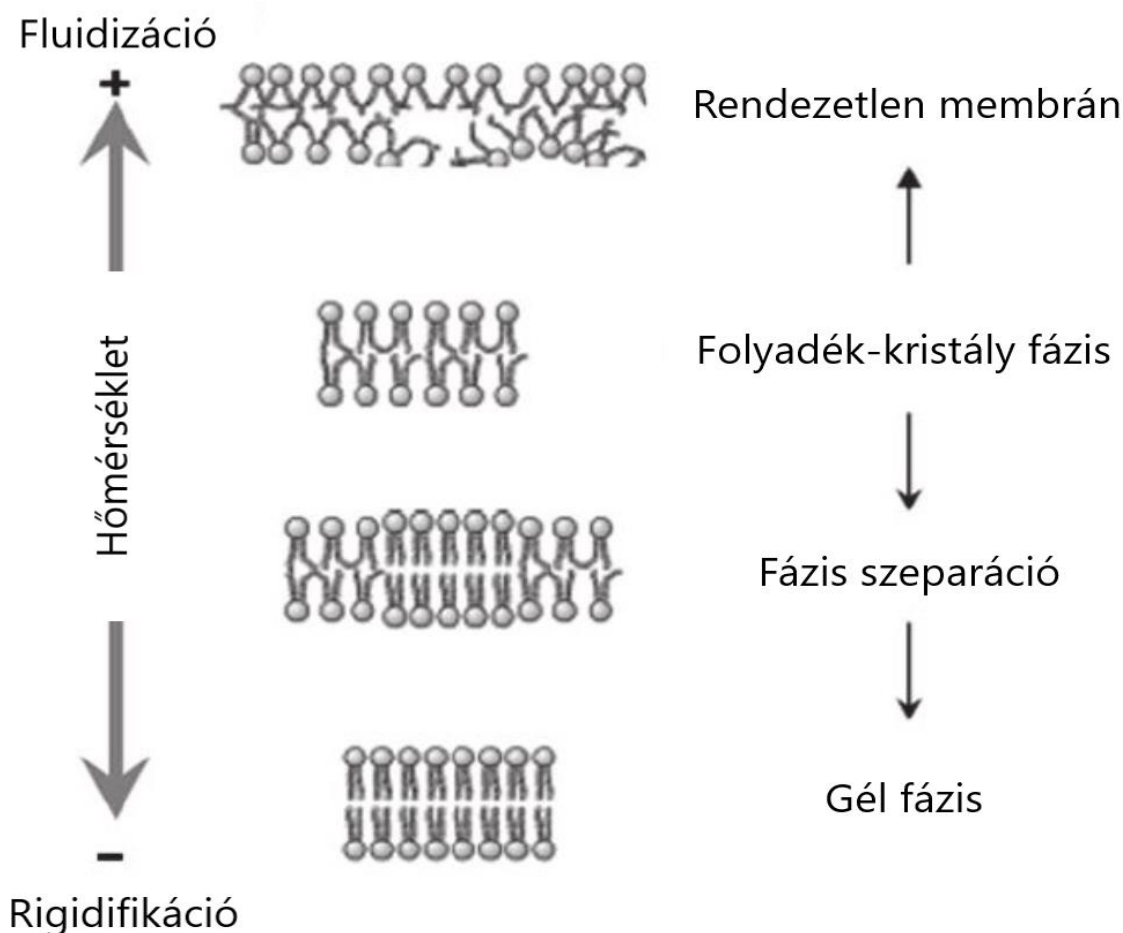
2. táblázat: Egyéb sejtalkotók membrán összetétele: foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-inozitol (PI), foszfatidil-glicerol (PG), monogalaktozil-diacil-glicerol (MGDG), digalaktozil-diacil-glicerol (DGDG), szulfoquinosil-diacil-glicerol (SQDG), kardiopin (CL).

Azok a glicerolipidek, amelyek amfipatikusak, nélkülözhetetlenek a kettős rétegű membrán kialakításához, ezek közül kivételt képez a TAG.

4.4.4 A lipidösszetétel változása a hidegedződés során

Ahogy a hőmérséklet az optimum alá csökken az élőlények membránjainak rigiditása növekszik, és abnormális sejtaktivitás jelentkezik (növekvő membrán permeabilitás, ion szivárgás, deaktivált transzmembrán fehérjék, felborult ion homeosztázis) (Upchurch, 2008). A poikilotherm élőlények, mint a baktériumok, a halak és a növények erre a környezeti változásra a membrán átalakításával reagálnak (Heimburg és Marsh, 1996; Mansilla és *mtsai.*, 2008). A molekulák rendezetlenségét és mozgását a kettős membránban membrán fluiditásnak nevezzük, amire a hőmérsékleti stressz hatást gyakorol. A hideg általában csökkenti a membránfluiditást, amelyet a zsírsavak deszaturáltsági szintjén keresztül az élőlény ellensúlyozni képes (Los és *mtsai.*, 2013).

A PL-ek nagy mennyiségű telített zsírsavat tartalmaznak, ezért gyakran alacsonyabb a tranzíciós hőmérsékletük. Ez különösen annak a ténynek tudható be, hogy a telített acil-láncok szorosan helyezkednek el a membránban, míg a telítetlen zsírsavak sztérikus akadályt képeznek a cisz-kettős kötések merev görbületeivel. Így a telítetlen zsírsavak nagyobb helyet foglalnak el a membránban. A membrán rigiditása és fluiditása a lipidek és a fehérjék szabályozása alatt áll (Kovacs et al., 2019). A membrán módosulásával egyidőben a beágyazott fehérjék is szerkezeti változáson mennek keresztül (Falcone és *mtsai.*, 2004). Gondoljunk csak a fénybegyűjtő antennák vagy a fotoszintetikus elektrontranszportláncot alkotó fehérjekomplexekkel funkcionális egységet alkotó lipidcsaládok mennyiségének megnövekedésére (Krupa és *mtsai.*, 1987; Zakar és *mtsai.*, 2017). Ennek eredményeként a membrán szerkezete közelíteni fog az optimális folyadék kristály állapothoz, alacsony hőmérsékleten is (Mansilla és de Mendoza, 2005), és ezáltal a membrán részleges módosítása hozzájárulhat a hideg okozta károsodások elkerüléséhez (Davy de Virville et al., 2010) (3. ábra).



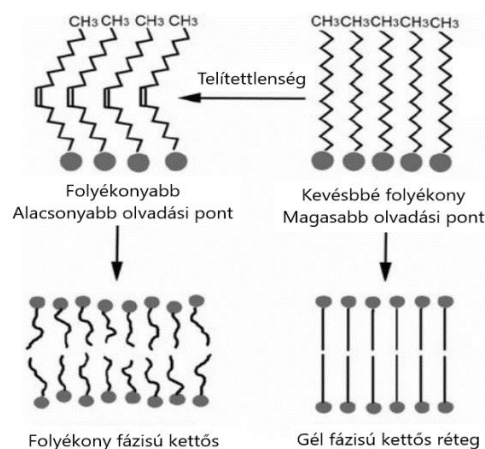
3. ábra: Membrán rendezettségének változása a hőmérséklet függvényében. Magasabb hőmérséklet mellett a membrán rendezetlensége megemelkedik és a folyadék kristály fázisból rendezetlen membrán alakul ki, ezt hívjuk fluidizációnak. Abban az esetben, ha a hőmérséklet csökken, akkor előbb fázis szeparáció majd gél fázis alakul ki, ezt a folyamatot nevezzük rigidifikációnak.

Ezt a folyamatot nagy mértékben szabályozzák a növények (Wang és mtsai., 2006). A membrán fluiditás/rigiditás optimalizálása a glicerolipidszint szabályozásával (Li és mtsai., 2013), továbbá a lipidek telítettségi szintjének módosításával (Marla és mtsai., 2017; Narayanan és mtsai., 2016; Noblet és mtsai., 2017; Zheng és mtsai., 2016; Zheng és mtsai., 2011), a kettős réteget (BL) és a nem kettős réteget képző (NBL) lipidek arányának változtatásával (Miki és mtsai., 2019; Moellering és mtsai., 2010; Villasuso és mtsai., 2010) érik el. Akár 31%-kal is emelkedhet a telítetlen lipidek aránya a membránban hideg kezelés során (Miki és mtsai., 2019). A korábbi vizsgálatok meghatároztak néhány kulcsfontosságú elemet a növények hidegkezelésére adott válaszában. Fontos például az MGDG/DGDG és a PC/PE aránya, a foszfatidsav (PA) növekedése (Wang és mtsai., 2002), a szfingolipidek mennyiségének és összetételének megváltozása (Aubert és mtsai., 2011; Cacas és mtsai., 2012; Dutilleul és mtsai.,

2012; Guillas és *mtsai.*, 2013; Simon-Plas és *mtsai.*, 2011; Yang és *mtsai.*, 2013) és a diacil-glicerin-aciltranszferáz jelátvitel (Arisz és *mtsai.*, 2018). Ezenkívül a ceramidok részt vesznek abban a jelátviteli folyamatban, amely a szfingolipidek mennyiségét és összetételét szabályozza a membránban (Chen és *mtsai.*, 2008; Markham és *mtsai.*, 2011).

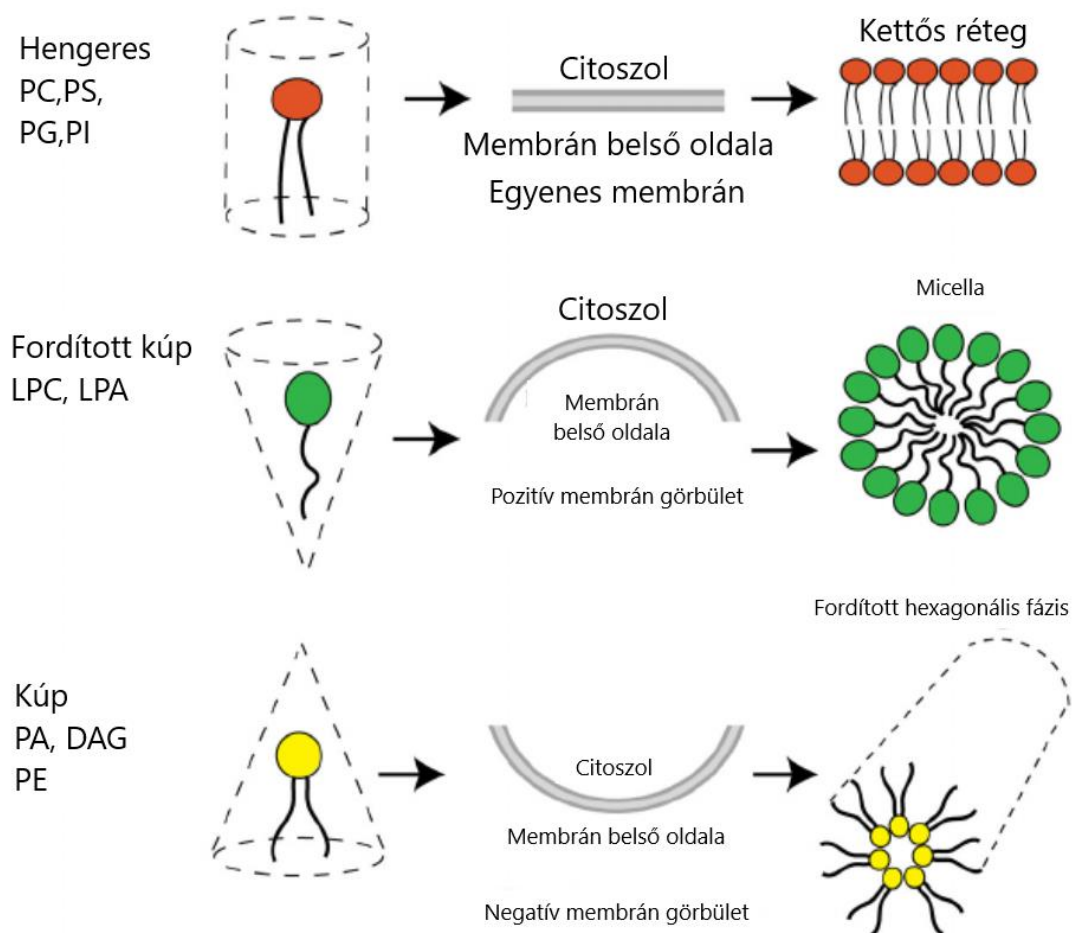
A membránfluiditást a sejt több módon befolyásolhatja. Egyes lipidek, mint a DGDG vagy a PC képesek vizes közegben önmagukban is kettős réteget kialakítani, míg mások, mint a MGDG és a PE, nem. A membrán fizikai tulajdonságait, mint a rigiditás, a fluiditás és a stabilitás ezeknek a lipideknek a mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya határozza meg. Ha például a PC/PE arány magas, akkor arra következtethetünk, hogy a plasztisz membrán merev és esetleg stressznek kitett. Hasonló a jelentése a magas MGDG/DGDG aránynak is, de ebben az esetben a tilakoid membránra kell gondolnunk. Ezen lipidarányok a membrán porozitását is befolyásolják (Bogdanov és Dowhan, 1999; Gounaris és Barber, 1983; Govindjee és *mtsai.*, 2009; Kuster és *mtsai.*, 1994).

A lipidláncok telítettségi szintje leírja, hogy hány kettős kötéssel rendelkeznek. Ezek elhelyezkedése és száma jellemző az adott élőlényre. A telítetlen zsírsavak szerkezetében a láncok nagyobb teret töltenek ki a membránban, ezáltal hatva a membrán fizikai tulajdonságaira (Dong és *mtsai.*, 2016). Amikor nagy mennyiségben előforduló membránlipid, mint az MGDG vagy a DGDG zsírsavláncainak telítettsége megemelkedik, akkor a membrán fluiditása is növekedni fog (Govindjee és *mtsai.*, 2009). Ezen felül a membránt alkotó lipidek zsírsav láncainak hossza is rövidül hidegakklimatizáció során, ez is hozzá járul a membrán fluiditás fenntartásához (Barrero-Sicilia és *mtsai.*, 2017). A hideg hatására megváltozott membránszerkezet jelként szolgál a membránba ágyazott receptor fehérjéknek. Ez pedig jelként viselkedik a megfelelő jelátviteli útvonalak számára, ami serkenti a hideg-válasz géneket (Govindjee és *mtsai.*, 2009). Korábbi eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a 34 szénatomból álló MGDG és PG acil láncok mennyisége megemelkedik hideg kezelés hatására. Ez a folyamat összeköttetésben áll az acil-lipid deszaturáz 2 enzim aktivitásával és jelátviteli folyamatával (Chen és Thelen, 2013).



4. ábra A membrán fluiditásának változása a kettős kötések számának növekedésével. A membrán telítettségét a zsírsav láncokban található kettőskötések száma is meghatározza. Magasabb olvadási ponttal rendelkezik az a membrán, amelyet alkotó membrán lipidek zsírsav láncai kevesebb kettős kötést tartalmaz, valamint kevésbé lesz folyékony, ez által gél fázisú kettős réteget hoz létre. Amennyiben a telítettség csökken a membrán alacsonyabb olvadási ponttal rendelkezik és folyékonyabbá válik, ez által folyékony fázisú kettős réteget hoz létre.

Egyes lipidek adott membránok felépítésében vesznek részt, vagy különleges membrángörbületeket segítenek elő, mint például a tilakoidmembrán gránumszerkezete vagy a plasztiszmembrán aszimmetrikus kapcsolatai (Govindjee és *mtsai.*, 2009; Manoharan és *mtsai.*, 2000; Mansour és *mtsai.*, 2015). Ezeket a görbületeket a lipidek zsírsavláncainak térszerkezete és a fejcsoportok mérete biztosítja (Babiyshuk és *mtsai.*, 2003; Sheng és *mtsai.*, 2018). A szfingolipidek térszerkezetük alapján feloszthatók hengeres, fordított kúp és kúp alakúakra. A hengeres térszerkezetűek közé tartoznak a PC, PS, PG és PI. Ezek a lipidek kettős réteget alakítanak ki. Fordított kúp térszerkezettel rendelkezik a LPA és a LPC. Ezek a lipidek pozitív görbületű membránt alakíthatnak ki. A kúp alakú lipidek a PA, DAG és a PE kialakíthatnak negatív görbületű membránt is. A kúp alakú lipidek a fagyás hatására térszerkezetet váltanak, ez által léziók keletkeznek a plasztiszok membránjaiban (Barrero-Sicilia és *mtsai.*, 2017). Ezek a szerkezetek ugyan akkor képesek a membrán fluiditását is befolyásolni (Gombos és *mtsai.*, 1994; Govindjee és *mtsai.*, 2009).



5. ábra: Fosfolipidek térszerkezet modelje. A lipidek térbeli szerkezetét a zsírsav láncok helyzete is meghatározza. Ez alapján felosztjuk hengeresre (foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-szerin (PS), foszfatidil-inozitol (PI)), fordított kúp (lizo-foszfatidil-kolin (LPC), lizo-foszfatid-sav (LPA)) és kúp (foszfatid sav (PA), diacil-glicerol (DAG), foszfatidil-etanolamin (PE)) alakúakra. A hengeres alakú lipidek egyenes kettős membránt hoznak létre. A fordított kúp alakú lipidek pozitív membrán görbületet hoznak létre és micellát alkothatnak. A kúp alakú lipidek negatív membrán görbületet hoznak létre és fordított hexagonális fázist alakítanak ki.

5 CÉLKITŰZÉSEK

Közismert, hogy a hidegedződés során változik a sejthártya lipidösszetétele, ezáltal csökken a viszkozitás, ami akadályozza a fagy okozta membránkárosodást. A PhD dolgozatban részletezett kísérletek beállításakor azonban semmilyen információ nem állt rendelkezésre arról, hogy milyen lipidomikai változást okoz a növények megvilágítására használt fehér fény távolivörös fénnel, illetve kék fénnel való kiegészítése. Ezért az itt leírt kísérletek célja a hideg, illetve a modulált spektrum hatására bekövetkező membránlipid-változások összehasonlítása volt.

A következő kérdésekre és feltevésekre kerestünk választ:

- ❖ A fehér fény távolivörös és kék fénnel kombinált kiegészítése miként befolyásolja az árpa levelek fagytűrését különböző hőmérsékleteken?
- ❖ A lipidek bioszintézisét meghatározó „kulcsgének” génexpressziós mintázatainak kiderítése megemelt arányú távolivörös megvilágítás mellett.
- ❖ Az alkalmazott mesterséges LED-es fényforrások által létrehozott alacsony vörös/távolivörös, továbbá a kombinált távolivörös + kék fény miként befolyásolja az árpa levelek lipid-összetételét normál (15 °C) és alacsony (5 °C) hőmérsékleten?

6 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

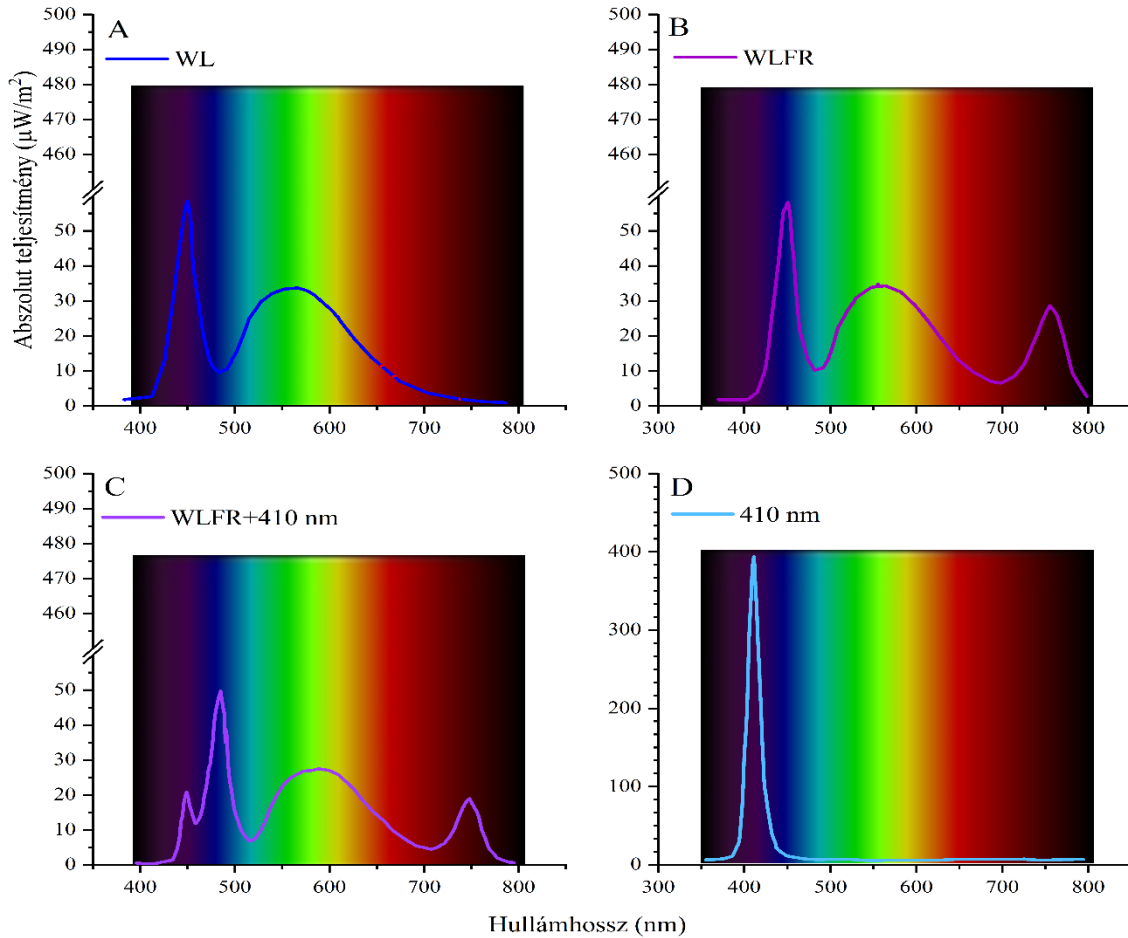
6.1 A növények nevelése

Az általunk kiválasztott modellnövény a *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* őszi árpa volt, annak is a „Nure” genotípusa. Három nappal a sötétben csíráztatás (21 °C) után 480 magot ültettünk el Jiffy-7 36 mm átmérőjű tápkorongokba (Jiffy Group, Oslo, Norvégia). Ezek után a csíranövényeket PGV-36 (Convion PGV36, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, MB, Canada) fitotronkamrában neveltük tovább, ahol a fényt modulálható LED mennyezeti megvilágítás szolgáltatta, 12 órás (12h/12h) fotoperiódussal. A növényeket tizennégy napig fehér fénnel megvilágítva ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PAR)) 15 °C-on neveltük. A növényeket ½ Hoagland-tápoldattal öntöztük (Hoagland és Arnon, 1938), heti háromszor.

6.2 Mérési módszerek

6.2.1 Hő- és fénykezelések

Az előnevelés után, amikor a tizennégy napos növények elérték a háromleveles stádiumot (Zadoks és *mtsai.*, 1974), elkezdtük a kezeléseket. A kísérlet kezeléseit tekintve két eltérő hőmérsékletet (5 és 15 °C) és négy különböző spektrális összetételű fényt (WL (Philips Lumileds, LXZ2-5790), WLFR (Edison Edixeon, 2ER101FX00000001), WLFR+410 nm (P-Tech, PLBT-3535-DP UV), 410 nm (Philips Lumileds, LXZ1-PR01)) alkalmaztunk. A növények ugyanabban a nevelő kamrában növekedtek együtt, párhuzamosan fehér fényű megvilágítás mellett. Az első kísérletsorozat tíz napig tartott. Ekkor a modulálható LED fénypanelt négy elkülöníthető részre osztottuk, a négy eltérő fénykezeléséhez. A megvilágítás erőssége $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotonfluxus-sűrűségű, a R/FR arány ~0,5 míg a kék/vörös arány ~1,8 volt minden esetben (6. ábra). A hőmérséklet változatlan volt a fénykezelések során. A kezelés második szakaszában viszont csak a hőmérsékletet változtattuk meg, azt 5°C-ra csökkentettük, míg a fénykezelések megegyeztek a fentebb leírtakkal. Ez a kezelés hét napig tartott. Mindkét esetben a kezelés első és utolsó napján vettünk mintákat (7. és 10.) a második legfiatalabb levél középső szakaszából.



6. ábra: A felhasznált LED-ek spektruma. Fehér fény (WL) (A), Fehér fény megemelt arányú távoli vörös fénnel (WLFR) (B), Fehér fény megemelt távolivörössel és kék fénnel kiegészítve (WLFR+410 nm) (C) és monokromatikus kék fény (410 nm) (D).

6.2.2 A fagytűrés meghatározása klorofill-a fluoreszcencia analízis segítségével

A vizsgálat előtt fehér, fehérfényhez hozzáadott távolivörös és távoli vörössel kombinált kék fényekkel megvilágított, valamint a 15 és az 5 °C-on nevelt növényeket fagyasztásnak tettük ki. A kezelés 24 órán keresztül tartott és a következő protokollt követte: 9 h 2 °C, 1 h 0 °C, 4 h -2 °C, 1 h -3 °C, 1 h -4 °C, 1 h -5 °C, 5 h -6 °C, 1 h -5 °C, 1 h -3 °C, 1 h 0 °C. A méréseket a fagyasztás előtt (0 h), majd utána, 2 és 24 óra regenerációs fázist követően végeztük el. A klorofill-a fluoreszcencia tranzienszt egy impulzus amplitúdó modulált PAM-2000 fluorométer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) segítségével mértük meg. Az árpa leveleket 30 percen keresztül sötétadaptáltuk, majd ezután óvatosan egyenként rögzítettük a mintákat a tartóra. Gyenge, nem aktinikus hatású mérőfényt ($4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alkalmazva meghatároztuk a kezdeti fluoreszcenciát (F_0), amikor a PSII összes reakciócentruma nyitott. A maximális fluoreszenca emissziót (F_m)

rövid telítési fényimpulzussal határoztuk meg ($2\,000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), melynek hatására a PSII összes reakciócentrumba zárt állapotban kerül. Az F_m meghatározása után aktinikus ($600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fénnel világítottuk meg a mintákat, majd miután a fluoreszencia elérte az egyensúlyi állapotot (F_s) (20 perc), meghatároztuk a fényadaptált állapotra jellemző maximális fluoreszenciát (F_m'). Ezekből az értékekből meghatároztuk a PSII maximális (F_v/F_m) és aktuális hatásfokát ($Y(II)$) a következő képletek szerint:

$$F_v/F_m = ((F_m - F_o) / F_m)$$

(Rolfe és Scholes, 2010; S.A.P. Ower és *mtsai.*, 1981; Scholes és Rolfe, 2009)

$$Y(II) = (F_m' - F_s) / F_m' \text{ (Genty és mtsai., 1989).}$$

6.2.3 Konduktanciavizsgálat

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a növényi minták fagytűrését, meghatároztuk a relatív konduktanciaértéküket az elektrolitok szivárgásából származó elektrolit vezetőképességének mérésével (Webb és *mtsai.*, 1994). A vizsgálatot az árpanövények második levelének közepéből származó levélszegmentumokon végeztük el. Ezeket egy folyadékos Grant GP-200-R4 fagyasztókészülékben (Grant Instruments, Sepreth, UK) fagyasztottuk meg. Három biológiai és öt technikai ismétlést alkalmaztunk vizsgálati pontonként. A fagyasztási hőmérséklet a $15\ ^\circ\text{C}$ -on nevelt növények esetében, -5 , -7 , és $-9\ ^\circ\text{C}$ volt. Azok esetében, amelyek egy hétig $5\ ^\circ\text{C}$ -on voltak tartva ott -8 , -10 és $-12\ ^\circ\text{C}$ fagyasztási hőmérsékleteket alkalmaztunk egy órán keresztül. A mintákban 2 órás rázatást (MQ vízben) követően határoztuk meg az elektromos vezetőképességet egy Multi-Sample Konduktométer segítségével (Mikro KKT, Budapest, Magyarország). Az adatfeldolgozást a Multi-Sample Konduktométer 1.0 verziójú (Intron Software, Biológiai Kutató Intézet Szeged, Mencil L. 2002) program segítségével hajtottuk végre.

6.2.4 qPCR mérés

A begyűjtött levélmintákból össz RNS-t izoláltunk a Direct-zolTM RNA MiniPrep készlet segítségével (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) a gyártó által meghatározott protokoll szerint. Ezt követően cDNS könyvtárakat készítettünk Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverz transzkriptáz és oligo (dT) primerek felhasználásával (Promega Corporation,

Madison, WI, USA). A relatív expressziós szinteket a KAPA SYBR® FAST, Master Mix (2X), Universal qPCR kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA), CFX96 Touch™ valós idejű PCR detektáló rendszer (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország) alkalmazásával határoztuk meg. A PCR primerek az NCBI-Primer Design Tool (Országos Biotechnológiai Információs Központ, Bethesda, MD, USA) szoftver felhasználásával terveztük meg. A relatív expressziós szinteket $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki, ahol referenciagénként ciklophilint használtunk (Livak és Schmittgen, 2001). A primer szekvenciák és referenciák az 1. kiegészítő táblázatban találhatók (Burton és mtsai., 2004).

6.2.5 Lipidizoláció és -vizsgálat

Az összlipid-kivonatot a begyűjtött és lefagyasztott árpalevelekből Welti és mtsai. által leírt módszer szerint vontuk ki, kis módosításokkal. A levélminták friss tömege 0,2 g volt. A lipidextrakcióhoz a leveleket három növényből külön-külön gyűjtöttük össze. A mintavételkor a zászlóslevél középső harmadát levágtuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk feldolgozásig. A mintákat a kivonás első lépéseként 10 ml-es üvegcsőbe tettük, melyeket teflonnal bélelt csavaros kupakkal zártuk le (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Az üvegcsövek 3 ml izopropanolt és 0,01% BHT tartalmaztak. Majd 75 °C-on, 30 percig inkubáltuk. Ezután 1,5 ml kloroformot és 0,6 ml vizet adunk az oldószerhez, szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettük, majd hozzáadtunk 4 ml kloroform/metanol (2:1)/0,01% BHT extraháló oldószert és ráztuk 30 percig. Az extraktumot egy tiszta üvegcsőbe gyűjtöttük. Ötször mostuk át az árpaleveket extraháló szerrel; az utolsó mosás 12 órán át tartott. Az összegyűjtött extraktumokhoz 1,0 ml 1 M KCl-t adtunk. Vortexelés után a fázisokat centrifugálással szétválasztottuk, és a felső fázist leöntöttük. Ezután 2,0 ml vizet adtunk az extraktumhoz és megismételtük a fázisszétválasztást. Az oldószert az extraktumból nitrogénbepárlóban elpárologtattuk. Végül a lipid kivonatot visszaoldottuk 1 ml kloroformban és -80 °C-on tároltuk. A száraztömeg meghatározásához az extrahált levéldarabokat 110 °C-on szárítottuk szárítószekrényben egy éjszakán át, majd lehűtöttük és lemértük. A száraz súlyokat mérleggel határoztuk meg (Mettler Toledo AX, Mettler Toledo International, Inc., Columbus, OH, USA), amelynek detektálási határa 2 µg.

Az összlipid-kivonat tömegspektrometriás elemzését MS-alapú módszerrel végeztük és a Kansas Lipidomics Kutatóközpont elemző laboratóriumában hajtották végre (https://www.kstate.edu/lipid/analytical_laboratory/lipid_profiling/index.html).

6.2.6 ESI-MS/MS lipidprofil meghatározása

Automatizált elektrospray ionizációs-tandem tömegspektrometriás eljárást alkalmaztak. Az adatgyűjtést, az elemzést és az acilcsoport-azonosítást a leírtak szerint hajtották végre (Xiao és *mtsai.*, 2010). A belső standardok pontos mennyiségét a korábban leírtak szerint számszerűsítették (Wolti és *mtsai.*, 2002).

A lipidkivonatokat folyamatos injektálással vezették be az ESI-forrásba triple quadrupole MS/MS-en (API4000, ABSciex, fRamingham, MA, USA). Az adatfeldolgozást a Kansas Lipidomics Kutatóközpont honlapján ismertették:

https://www.k-state.edu/lipid/analytical_laboratory/lipid_profiling/index.html.

A különböző molekulafajtákat az adott fejcsoporthoz tartozó tömegük alapján azonosították. A tömeg általánosságban lehetővé teszi, hogy bizonyos számú acil-szénatomot és DB-t rendeljenek hozzá. Az izotópos meghatározással történő korrekciót követően a spektrumok csúcsait számszerűsítették a belső standardok csoportjával összehasonlítva. Általában az egyes fejcsoporthoz tartozó osztályozásához két belső standardot használnak. A mennyiségeket mol%-ra számították ki. A mintában szereplő csúcsok és a belső standardok csúcsainak összehasonlításához átlag értéket alkalmaztak. 1 jel egység megegyezik 1 nmol belső standarddal ugyanabból a lipidcsoportból (általában a variáció korrekciójával m/z alapján) (https://www.k-state.edu/lipid/analytical_laboratory/protocols_and_methodology/lipid_extract_ion_arabidopsis_leaves/index.html). A termékion-letapogatás felhasználható a képződött fejcsoporthoz vagy más fraktumok meghatározására, valamint a zsírsav-csoportok azonosítására, különösen a poláris lipid fajtákra.

6.2.7 Telítetlenségi index (DBI)

Az egyes lipid molekulák telítetlenségi indexét a lipid molekulák mennyiségének és a kettős kötések/acil lánc átlagos számának szorzataként számoltuk ki, ahol a kettős kötések/acil lánc átlagos számát úgy számoltuk, hogy elosztottuk a lipidekben lévő kettős kötések számát molekuláris speciekben az acilláncok száma szerint. Végül a lipidosztály telítetlenségi mutatóját úgy számoltuk ki, hogy az adott osztályban az egyes lipidfajták telítetlenségi mutatójának összege legyen a következő egyenlet szerint: $DBI = [\sum (a \text{ normalizált jelintenzitás } \%/ \text{lipid fajok száraz tömege} \times \text{kettős kötések száma})] / 100$ (Falcone és *mtsai.*, 2004).

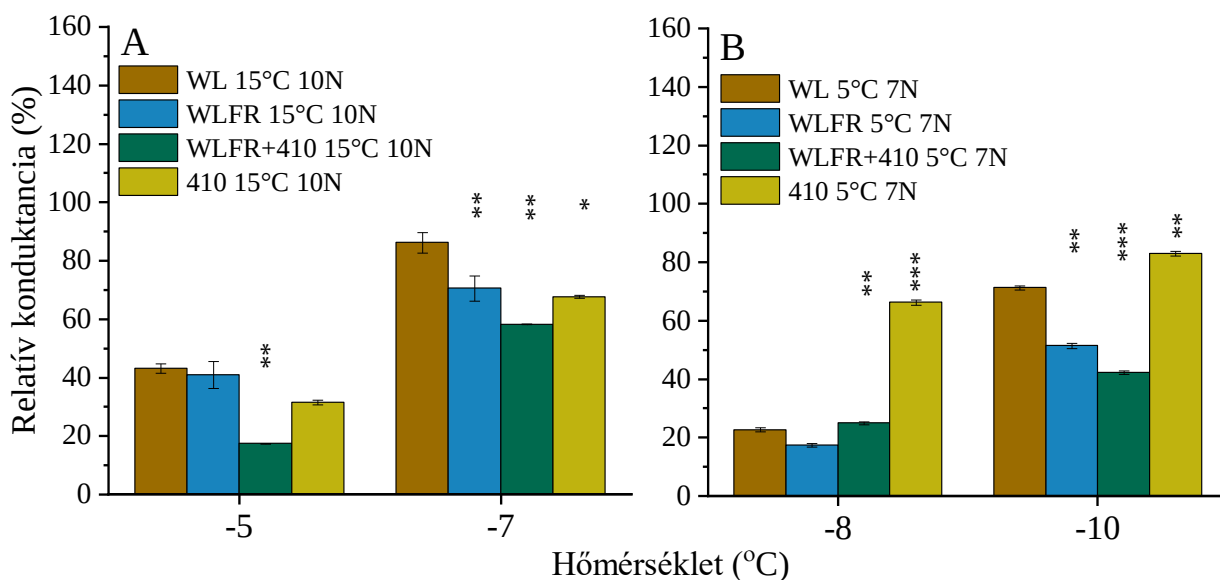
6.2.8 Statisztikai elemzés

A bemutatott eredmények minden esetben legalább három független kísérlet méréseiből számolt átlagok, szórásként pedig az átlaghibát (SE) tüntettük fel. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszttel végeztük el, a 15 °C-on nevelt fehér fényen nevelt egy napos (WL1N) mintákat használva kontrollként. Egyes esetekben t-tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintet az alábbiak alapján állapították meg: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. Az elemzéshez felhasznált programok az OriginPro, Verzió 2021. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA és a IBM SPSS Statistics, Verzió 25.0 voltak.

7 EREDMÉNYEK

7.1 Távolivörös és kék fénnel kiegészített fehér fény hatása az árpalevelek fagyűrűsítésére

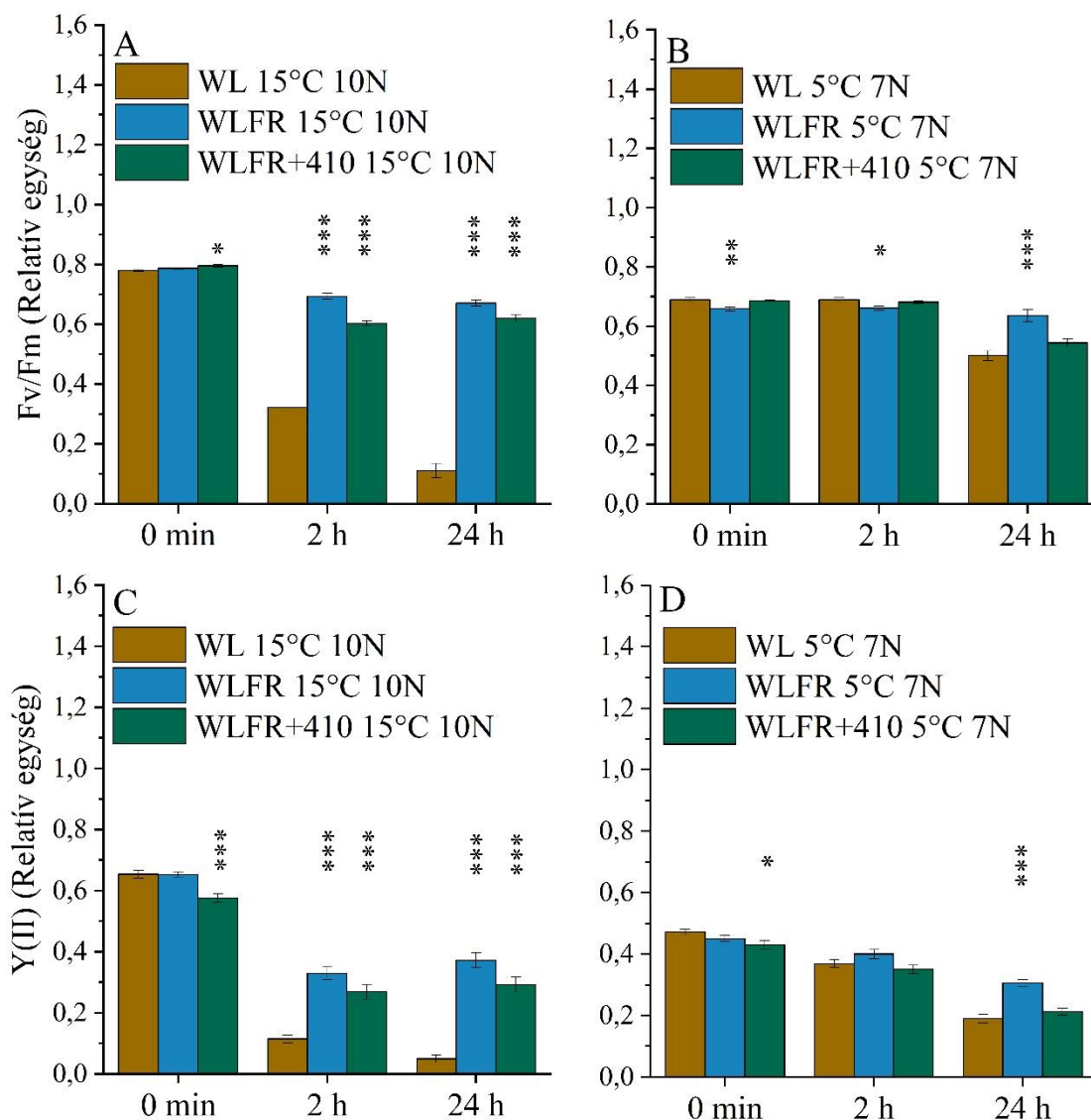
Az árpanövények fagyűrűsítését vezetőképesség-méréssel is teszteltük (7. ábra). A vezetőképesség mérésének eredményei egyértelmű különbségeket mutattak a fénykezelések között. A 15 °C-on nevelt növények esetében szignifikánsan csökkent a levélminták vezetőképessége a kontroll fehér fényben neveltekhez képest a távolivörös fénykiegészítés hatására -7 °C hőmérsékleten történt fagyasztás után. Amikor távolivörössel kombinált kék fényt alkalmaztunk ez tovább növelte a fagyűrűsítést a 15 °C-on nevelt növények esetében (7. ábra A). A monokromatikus kék fény önmagában alkalmazva is növelte a fagyállóságot a 15 °C-on nevelt növények esetében (7. ábra A).



7. ábra A kiegészítő távolivörös és kék fénykezelések hatása az árpa fagyűrűsítésére a levélszegmensek relatív vezetőképességének meghatározása alapján. Az X tengely a fagyasztási hőmérsékleteket, míg az Y tengely a relatív vezetőképességi értékeket (a letalitás százalékban) mutatja. Mindegyik esetben a mintákat a kezelések utolsó napján gyűjtöttük be. A megvilágítás: kontroll fehér fény (WL), fehér fény távolivörös fénnel való kiegészítése (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény (WLFR+410) és monokromatikus kék fény (410). A kezelés napjainak száma (N). A 15°C-on 10 napig nevelt mintákat az A míg az 5°C-on 7 napig nevelteket a B panelen mutatjuk be. A statisztikai elemzést student t-tesztel végeztük a fehér fényen nevelt növények leveleit (WL) használva kontrollként. A hibaértéket öt független biológiai ismétlés átlagértéke ($\pm$ SE) látható. A szignifikancia szinteket * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ jelöli.

Az árpanövények egy hétig tartó 5 °C-on való nevelése önmagában hidegedzésnek tekinthető és növelte a növények fagyállóságát a megvilágításra használt fény színképétől függetlenül. A modulált színképek hatása -10 és -12 °C-on való fagyasztás után vált kifejezetté. Bár az alacsony vörös/távolivörös fény arány is hatékony volt, az ehhez adott kék fény kiegészítés szignifikánsan

tovább növelte a fagyállóságot mindkét hőmérsékleten való fagyasztás után (7. ábra B).



8. ábra Fény és hőkezelés hatása az ősziárpa levelek fotoszintetikus paramétereire. Az árpa levelek fluoreszcencia paramétereit a fagyasztás előtt (0 min), és a fagyasztás után 2 és 24 óra regenerációs fázis elteltével mértük meg. A növények nevelése tíz napon (10 N) keresztül 15 °C-on történt (A, C), ezt követően hét napig 5°C-on történt a hidegedzés (B, D). A megvilágításra használt fények a következők voltak: fehér fény (WL), fehér fény távolivörös fénnel való kiegészítése (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény (WLFR+410). A statisztikai elemzést student-t teszttel vizsgáltuk. Minden esetben a WL-on nevelt mintákat használtuk kontrollként. Hibaértékként tíz független biológiai ismétlés átlagértéke ($\pm$ SE) látható. A szignifikanciaszinteket * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ jelöli.

Összehasonlítottuk a különböző hőmérsékleteken és fényviszonyok mellett nevelt árpa levelek fagyűrő képességét a fotoszintézis hatékonyságát jelző fluoreszcencia értékek mérése alapján is. A fehér, az alacsony vörös/távolivörös arányú fény, valamint az ehhez adott kék fény megvilágítás mellett 15 és 5 °C-on nevelt növények (Lásd: 5.2.2) esetében a 2, illetve a 24 órás regenerációs fázis után meghatároztuk az F_v/F_m és $Y(II)$ értékeket (8. ábra A, B). Az F_v/F_m érték a PSII maximális hatásfokát, míg a $Y(II)$ a PSII aktuális hatásfokát jellemzi, és nagymértékben függ a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyéb tagjaitól is. Mindkét paraméter érzékeny a stresszhatásokra. A kontroll mintáknál a 15 °C-on nevelt növényekből közvetlenül a fagyteszt előtt vett minták (8. ábra „0 min” fagyasztás) F_v/F_m értékei nem különböztek lényegesen az adott nevelési hőmérsékleten mérve. Az alacsony vörös/távolivörös fény arányának és az ehhez hozzáadott kék megvilágítás hatására az F_v/F_m értéke a különböző hőmérsékleteken történt levélfagyasztás után szignifikánsan nagyobb volt a fehér megvilágítással kezelt növényekhez képest 2, illetve 24 órás regeneráció után is.

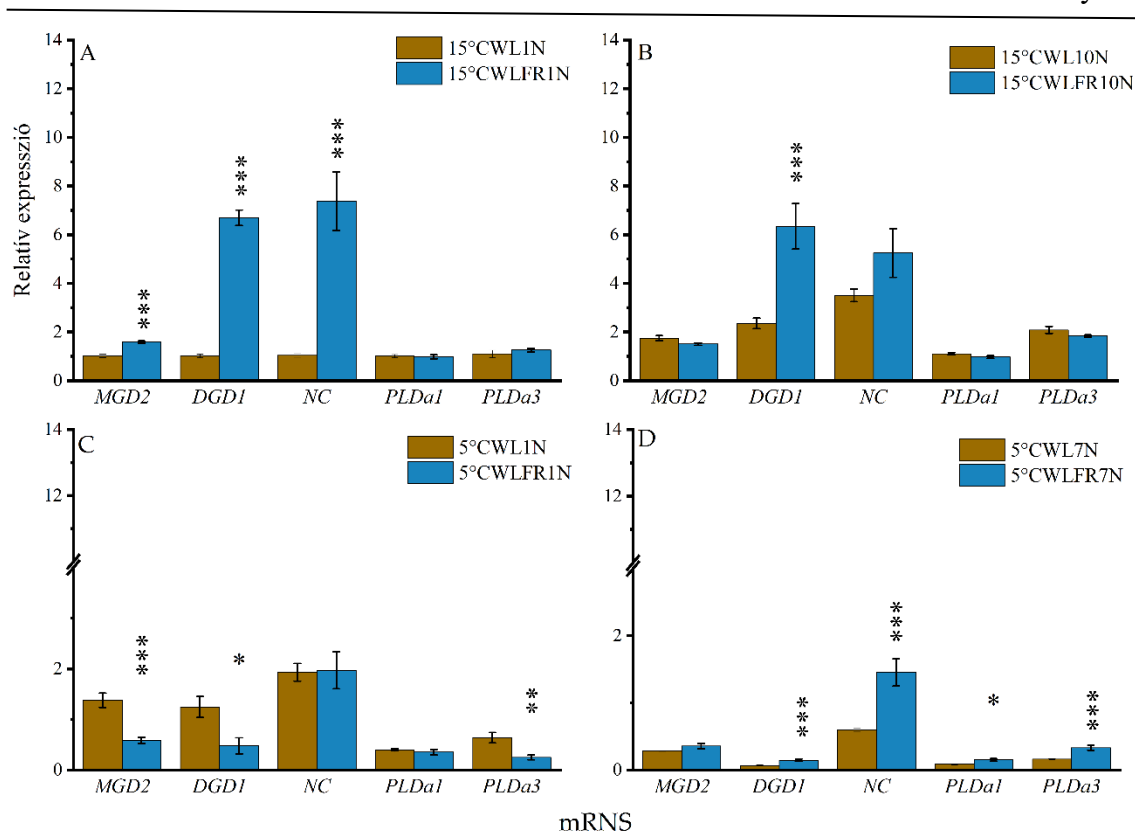
A kontroll fehér fénnel megvilágított mintáknál az $Y(II)$ érték szignifikánsan alacsonyabb volt a tíz napig tartó kék fénykiegészítés hatására, míg a távolivörös fény kiegészítésnek egyedül nem volt hatása erre a paraméterre a 15 °C-on nevelt növények esetében (8. ábra C). A levélfagyasztást követően a $Y(II)$ értéke csökkent minden minta esetében, függetlenül a megvilágító fény színekétől. Azonban mindkét (2 és 24 óra) regenerációs időszakot követően az alacsony vörös/távolivörös arányú fény és az ezt kiegészítő kék fényű megvilágítás során az $Y(II)$ értéke szignifikánsan nagyobb volt a kontroll fehér fényen nevelt mintákénál (8. ábra C). Az 5 °C-on nevelt növények esetében a $Y(II)$ értékét nem befolyásolták jelentősen a módosított színek. A fagyasztást követően 24 óra regeneráció után a távolivörös fénykiegészítéssel megvilágított növények levelei a kontroll fehér fényen nevelt mintákénál magasabb (bár nem szignifikáns) $Y(II)$ értékkel rendelkeztek (8. ábra D).

A fehérfény távolivörössel vagy távolivörössel kombinált kék fénnel való kiegészítése szignifikánsan növelte a fagyállóságot mindkét hőmérsékleten (7. ábra). A vörös/távolivörös fény arányának csökkenésének és az ehhez hozzáadott kék megvilágításnak a hatására az F_v/F_m (8. ábra A, B) és az $Y(II)$ (8. ábra C, D) értéke a különböző hőmérsékleteken történt levélfagyasztás után szignifikánsan megemelkedett a kontroll növényekhez képest 2, illetve 24 órás regeneráció után is. Ezen eredmények alapján elindulva megvizsgáltuk a kezelt árpa levelek génjeinek kifejeződését, ebből pedig kiemeltük a lipid módosításban és előállításban résztvevő géneket, melyek génexpressziójára hatást gyakorol a fény és a hőmérséklet.

Megvizsgáltuk egyes, a lipidmetabolizmussal összefüggésben álló gének relatív expresszióját különböző fényviszonyok és hőmérséklet kezelés hatására. Az *MGD2* mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedett távolivörös fénykiegészítés hatására 15 °C-on egy nap elteltével (9. ábra A). A különbség a tizedik napra lecsökkent, mivel az mRNS mennyisége a fehér fénnel megvilágított kontroll mintákban is növekedett 15 °C-on. Amikor a hőmérséklet 15 °C-ról 5 °C-ra süllyedt, az *MGD2* expressziója is szignifikánsan csökkent (9. ábra C) egy napnyi távolivörös fénykiegészítés hatására. A *DGD1* expressziója szignifikánsan növekedett a távolivörös fénykiegészítés miatt, mind egy napos (9. ábra A), mind tíz napos kezelés során 15 °C-on (10. ábra B). Az egy napig 5 °C-on nevelt kontroll fehér fénnel megvilágított mintákhoz viszonyítva a *DGD1* mRNS-szintje csökkent a távolivörös fény kiegészítés következtében (9. ábra C). Hét nap elteltével 5 °C-on a *DGD1* gén expressziója drasztikusan csökkent, a beeső fény spektrális összetételétől függetlenül (9. ábra D).

Az *NC* expressziós profil nagyon hasonló volt a *DGD1*-hez 15 °C-on (9. ábra A, B), míg az *NC* mRNS-szint változása 5 °C-on egy nap után nem volt észlelhető a távolivörös kiegészítés mellett (9. ábra C), de hét nap elteltével a gén expresszió megemelkedett a távolivörös megvilágítás hatására (9. ábra D).

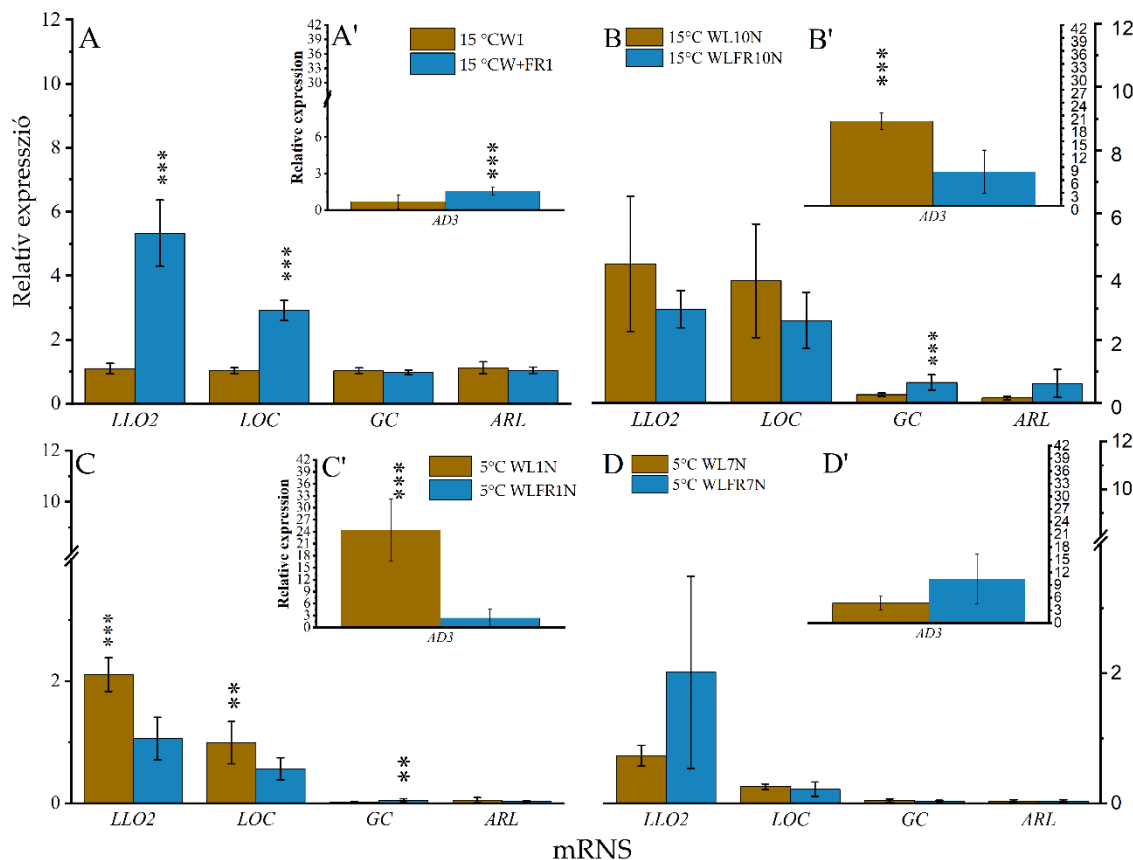
A távolivörös fénykiegészítés nem befolyásolta szignifikánsan a *PLD α 1* és *PLD α 3* génexpressziós szintjét (9. ábra), azonban mindkettő hőmérséklet érzékenynek bizonyult, mivel expressziós szintjük hét napig tartó 5 °C-on történő nevelés után csökkent (9. ábra D). Nevezetesen a *PLD α 2* mRNS expressziós szintje a kezelés alatt alig volt kimutatható.



9. ábra A kiegészítő távolivörös fény és az alacsony hőmérséklet hatása a lipidmetabolizmusban szerepet játszó néhány gén relatív expressziójára “Nure” őszi árpa levelekben. Az árpanövények nevelése 12 óras fotoperióduson történt. A levélminták a megvilágítás megkezdése után 6-8 órával kerültek begyűjtésre. A kezelések hossza napokban (N) kifejezve: 15 °C-on egy nap (A) és tíz nap (B); 5 °C-on egy nap (C) és hét nap (D). A megvilágítás a következő fénykeverékekkel történt: fehér fény (WL), fehér fény távolivörös fénnel való kiegészítése (WLFR). A statisztikai elemzést student-t teszttel végeztük a WL-t használva kontrollként. Átlag értéke ($\pm$ SE), kilenc független biológiai ismétlésnek. A szignifikancia szinteket: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ jelöli.

A távolivörös fénykiegészítés jelentősen növelte az *LLO2* expresszióját egy napos kezelést követően 15 °C-on. Ez az emelkedés átmenetinek bizonyult, mivel tíz nap elteltével a távolivörös fénykiegészítés nem befolyásolta szignifikánsan az *LLO2* expressziót (10. ábra A és B). A távolivörös fénykiegészítés hatása az *LLO2* expressziójára hőmérséklet függőnek bizonyult, ugyanis 5 °C-on, az expressziós mintázat megfordult. Ekkor a fehér fény távolivörössel való kiegészítésének hatására számottevően csökkent az *LLO2* gén expressziója mind egy, mind hét napig tartó kezelés után (10. ábra C, D). A *LOC* és az *AD3* gén expressziós profilja nagyon hasonló volt a fent leírt *LLO2*-hez (10. ábra), azzal a különbséggel, hogy 5 °C-on a *LOC* mRNS szintje hét nap elteltével nem növekedett a távolivörös fény arányának megemelésével.

A távolivörös fénykiegészítés csak tíz nap elteltével növelte 15 °C -on a *GC* és *ARL* expressziós szintjét a kontrollhoz képest (10. ábra A, B), míg ez a kezelés 5 °C -on egy nap után okozott hangsúlyos növekedést. A távolivörös fénykiegészítés tranziensen növelte egy nap után a *GC* expresszióját 5 °C -on (10. ábra C, D).



10. ábra Néhány további lipid-metabolizmusban szerepet játszó kiválasztott gén relatív expressziós szintje a távolivörös fény és a hidegkezelések után “Nure” őszi árpa levelekben. Az árpanövények nevelése 12 órás fotoperióduson történt. A levélminták a megvilágítás megkezdése után 6-8 órával kerültek begyűjtésre. A kezelések hossza napokban (N) kifejezve: 15 °C-on egy nap (A) és tíz nap (B); 5 °C-on egy nap (C) és hét nap (D). A megvilágítás: fehér fény (WL), fehér fény távolivörös fénnel való kiegészítése (WLFR). A statisztikai elemzést t-teszttel végeztük a WL használva kontrollként. Átlag értéke ($\pm$ SE), kilenc független biológiai ismétlésnek. A szignifikancia szinteket * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ jelöli.

A génexpressziós szintek hierarchikus csoportosítása szerint (1. kiegészítő ábra) a legjellemzőbb génexpressziós változásokat a távolivörös fénykiegészítés függvényében figyeltük meg hét nap elteltével 5 °C-on. A hideg és a távolivörös fénykiegészítés közötti szinergikus kapcsolatot mutatjuk be ezen az ábrán. A génexpresszió összefoglaló diagramja a 2. kiegészítő ábrán látható.

A fény és a hideg kezelés is jelentősen megemelte azon gének kifejeződését, melyek termékei részt vesznek a membrán fluiditásának növelésében, az átalakító és jelátviteli folyamatokban. Ez az emelkedés 15 °C-on is bekövetkezett a kiegészítő megvilágítás hatására.

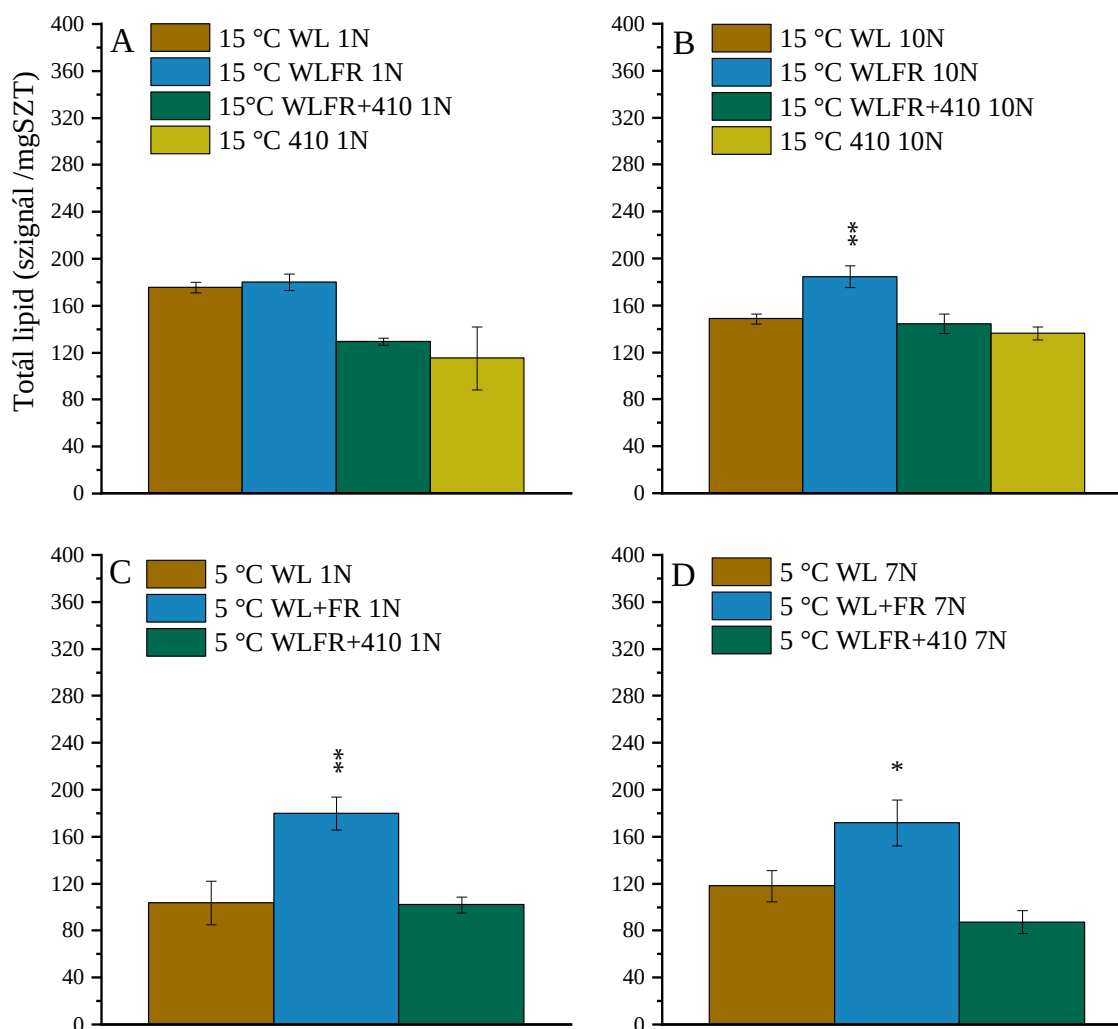
Ezek az eredmények arra mutattak rá, hogy az árpalevelek lipidösszetételének meghatározása nélkülözhetetlen a jelenség megértéséhez. Mivel nem csak a főbb lipid családok mennyiségi meghatározása volt fontos számunkra, hanem a kis mennyiségben előforduló jelátviteli folyamatokban résztvevőké is, ezért ESI-MS technikát alkalmaztunk a meghatározáshoz.

7.2 Az izolált lipidek tömegspektroszkópai elemzése

Az expresszióanalízis után megvizsgáltuk az árpa levelek lipid-összetételét tömegspektroszkópai eljárással. A lipidanalízishez az árpalevelek teljes lipidkivonatát használtuk fel. Electrospray ionizációs hármass kvadrupól tömegspektrometriát alkalmaztunk a lipid változások kimutatására. A lipidek mennyiségi és minőségi összetételét hasonlítottuk össze 5 és 15 °C-on, valamint négy eltérő megvilágítás (WL, WLFR, WLFR+410 nm és 410 nm) mellett nevelt árpanövények levelein.

7.2.1 Változás a lipidosztályok összetételében

A 11. ábra mutatja a minták összlipid-tartalmát, melyet a jel érték száraz tömeggel való korrigálásával határoztunk meg. Láthatjuk, hogy a megvilágítás hatást gyakorol a mintáink összlipid-tartalmára. Az alacsony vörös/távolivörös arányú fény megvilágítás hatására az összlipid-tartalom megemelkedett, mind 15 °C-on a kezelés tizedik napjára, mind 5 °C-on az első és a hetedik napjára (11. ábra, A, B, C, D). Ugyan akkor a kombinált távolivörös + kék és a monokromatikus kék fény megvilágítás mellett hőmérséklettől függetlenül csökkent a mintákban az összlipid tartalom (11. ábra, A, B, C, D).



Totál lipid tartalom fény és hő kezelések szerint

11. ábra: Az össz lipid tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét detektált szignál/mg száraz tömeg mértékegység formában fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fényel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fényel (410) (X tengely). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os hőkezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszttel hajtottuk végre a fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

Mivel az összlipid-tartalom változott az egyes fénykezelések hatására, kiszámoltuk az egyes lipidcsaládok mennyiségi változásait is. Az MGDG össz mennyisége nem változott az távolivörös fénykiegészítés hatására. Ha azonban a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítést (WLFR+410), illetve a monokromatikus kék fény megvilágítást alkalmaztunk, akkor ezen fényviszonyok alatt nőtt a mennyisége függetlenül a mintavételek időpontjától (12. ábra A, B, C, D). A DGDG össz mennyisége nem változott jelentősen a kezelések hatására.

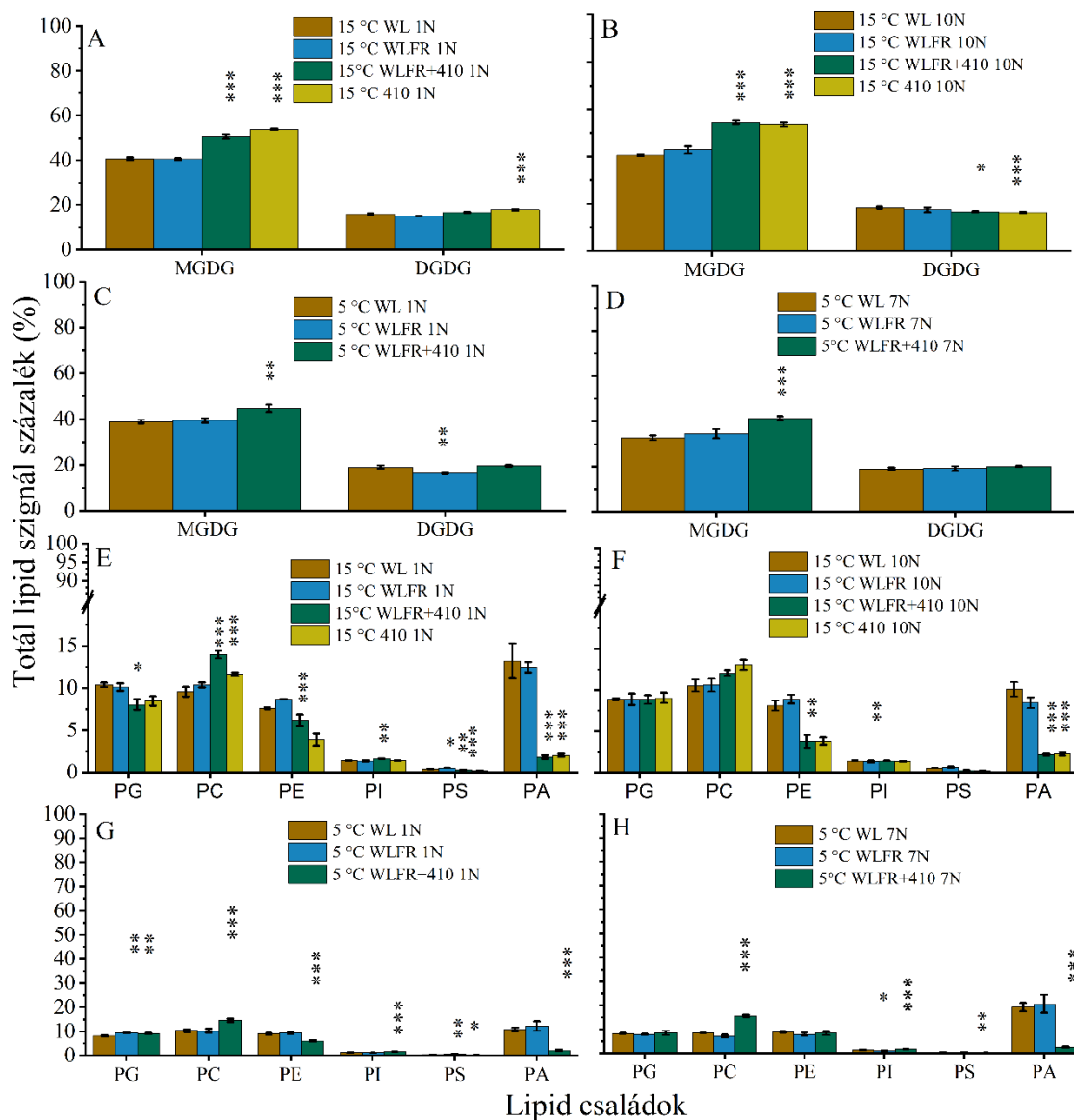
A kisebb mennyiségben előforduló lipidcsaládok közül a PG-tartalom csökkent egy napnyi kék fénykezelések hatására a kontrollhoz hasonlítva. Ezzel ellentétben a hőmérséklet 5 °C-ra történő csökkenését követő első napon mind a távolivörös, illetve a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítés (WLFR+410 nm) hatására megemelkedett a mennyisége (12. ábra G, H).

A PC esetében láthatjuk, hogy a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítés hatására egy nap után a mennyisége megnövekedett a hőmérséklettől függetlenül (12. ábra, E, F, G, H). Hasonló emelkedést láthatunk a monokromatikus kék megvilágítás hatására is 15 °C-on (12. ábra E, F).

A PE hideg kezelés mellett minden általunk alkalmazott megvilágítás hatására csökkent (12. ábra, G, H). 15 °C-on a kék fény szintén csökkentette a PE mennyiségét, azonban a többi megvilágítás megemelte (12. ábra, E, F). A PI mennyisége a kezelések során nem változott (12. ábra, E, F, G, H).

Ismert az irodalomból, hogy a PS meghatározó szerepet játszik a hideg és a fagy elleni védekezésben (Welti és *mtsai.*, 2002), mégis azt láthatjuk, hogy az össz mennyisége nem változott jelentősen a kezelések hatására őszi árpában (12. ábra, E, F, G, H).

Az irodalomban több olyan leírást is találhatunk, ahol kiemelik a PA jelentőségét a különböző stressz folyamatokban és a különböző lipid szintézis útvonalainak építőköveiként szolgál (Govindjee és *mtsai.*, 2009). A kezeléseink során láthatjuk, hogy a PA mennyisége csökkent a távolivörös kiegészítés mellett és ez a csökkenés határozottabb volt hozzáadott monokromatikus kék fényű megvilágítás hatására hőmérséklettől függetlenül (12. ábra, E, F, G, H).



12. ábra: A lipidcsaládok változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után “Nure” őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410), valamint monokromatikus kék fényel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengelyen a lipid családokat láthatjuk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszttel végeztük az egy napos fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

A DGDG és az MGDG lipidek a kloroplaszt fő lipid komponensei. Ennek a két lipidnek az aránya a tilakoid membrán rigiditásának egyik meghatározó tényezője (Shimajima és Ohta, 2011). A DGDG/MGDG arány a kezelések mellett a hőmérséklettől függetlenül csökkenést mutat a kontrollhoz képest (3. táblázat). Összehasonlítva az egyes kezeléseket az arány a legkifejezettebben a kék fénykiegészítés hatására csökkent.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,39±0,00	0,37±0,01	0,33***±0,01	0,33***±0,00
15 °C 10 N	0,46±0,01	0,41***±0,01	0,31***±0,00	0,31***±0,00
5 °C 1 N	0,49±0,01	0,42*±0,01	0,44**±0,03	
5 °C 7 N	0,58±0,01	0,56±0,00	0,49±0,01	

3.táblázat: A DGDG/MGDG arány változása a távolivörös és kék megvilágítás, valamint hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. Minden esetben a kezelések az egy napos fehér fénnel megvilágított 15 °C-on nevelt (15 °C 1N WL) mintákhoz hasonlítottuk. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszttel végeztük a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A PC/PE aránya indexként szolgál a membrán lebomlásának, illetve a sérülése mértékének meghatározáshoz. Minél magasabb ez az arány, annál kevésbé sérült a membrán (Jia és Li, 2015). A PC/PE arányt a hozzáadott távolivörös kezelés nem változtatta meg szignifikánsan. Azonban a kék fénykiegészítés hatására 15 °C-on mind egy nap, mind tíz nap után megemelkedett, és ugyan ez látható 5 °C mellett is. A monokromatikus kék megvilágítás eredményezte a legmagasabb PC/PE arányt (4. táblázat).

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	1,3±0,1	1,2±0,0	2,3 ^{***} ±0,1	3,4 ^{***} ±0,6
15 °C 10 N	1,3±0,0	1,2±0,0	3,7 ^{***} ±0,5	3,5 ^{***} ±0,1
5 °C 1 N	1,2±0,0	1,1±0,0	2,4 ^{***} ±0,0	
5 °C 7 N	1,0±0,0	0,9±0,0	1,9 ^{***} ±0,1	

4. táblázat: A PC/PE arány változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. Minden esetben a kezelések az egy napos fehér fénnel megvilágított 15 °C-on nevelt (15 °C 1N WL) mintákhoz hasonlítottuk. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszttel végeztük a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

Megvizsgáltuk a PC+PE összegét is, mivel ezek a lipidek a szintézis-útvonaluk alapján egymáshoz közel állnak, kompetitív útvonalak termékei (Govindjee és *mtsai.*, 2009) (5. táblázat). A megemelt arányú távolivörös kezelés hatására a PC+PE összege hosszabb hidegkezelés hatására csökkent. A távolivörössel kombinált kék fényű kezelés esetében minden megvilágítás és hőmérsékelt mellett megemelkedett, kivéve a 15 °C-os tíz napos kezelés alkalmával. Monokromatikus kék fényű megvilágítás mellett 15 °C-on csökkent PC+PE összeget detektálhattunk (5. táblázat).

	WL	WLFR	WLFR+410nm	410 nm
15 °C 1 N	17,2±0,7	19,1±0,3	20,2 [*] ±0,4	15,6±0,8
15 °C 10 N	18,7±1,3	19,5±1,3	15,8±1,0	16,9±0,7
5 °C 1 N	19,4±1,0	19,6±0,0	20,8±0,5	
5 °C 7 N	17,4±0,3	15,1±1,2	24,0 ^{***} ±1,1	

5. táblázat: A PC+PE összegének változása a távolivörös és a kék fény, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki, majd a PC és PE lipid családok mennyiségét összegeztük. Minden esetben a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákhoz hasonlítottuk. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410), valamint monokromatikus kék fénnel (410nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli a WL-hez képest.

Az MGDG és a PC is jelentős szerepet játszik a membrán kialakításában és alkalmazkodásában a környezeti hatásokhoz (Govindjee és mtsai., 2009). Az MGDG/PC arány a fehér fényű megvilágítás mellett 5 °C hatására csökkent. Ugyanakkor a távolivörös megvilágítás mellett enyhe emelkedést mutatott. A kombinált távolivörös + kék fénykezelés hatására enyhe csökkenést fedezhetünk fel 15 °C-on egy napnyi megvilágítás után, de tíz nap elteltével ez az arány megemelkedett. Ellenben, az MGDG/PC arány 5 °C mellett már egy nap után csökkent a megvilágító fény minőségétől függetlenül. Egy hét elteltével azonban a távolivörös fény hatására kiemelkedően nőtt. Ugyanakkor, a monokromatikus kék megvilágítás hatására az arány értéke 15 °C-on kissé megemelkedik (6. táblázat).

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	4,3±0,2	3,9±0,1	3,6**±0,1	4,6±0,1
15 °C 10 N	3,9±0,3	4,1±0,4	4,5±0,2	4,1±0,2
5 °C 1 N	3,8±0,3	3,9±0,3	3,1±0,2	
5 °C 7 N	3,9±0,1	4,9**±0,3	2,6*±0,1	

6.táblázat: A MGDG/PC arányának változása a távolivörös és a kék fény, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényvel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fényvel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fényvel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A 7. táblázat a kettős és a kettős membránt nem alkotó lipidek változását mutatja. A BL lipidek mennyisége jelentősen megemelkedett a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítés (WLFR+410 nm), illetve monokromatikus kék megvilágítás esetén, függetlenül a környezet hőmérsékletétől. A távolivörös megvilágítás önmagában nem volt hatékony.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C1 N	37,39±0,75	37,00±0,55	40,50**±0,81	39,50±0,67
15 °C10 N	39,40±0,84	38,30±1,39	39,1±0,71	39,9±0,91
5 °C1 N	39,16±0,99	37,50±0,87	45,30***±0,77	
5 °C1 N	37,27±0,74	35,50±1,23	46,20***±1,06	

7. táblázat: A BL képző lipidek változása a távolivörös és a kék fény, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. Minden esetben a kezelések az egy napos fehér fénnel megvilágított 15 °C-on nevelt (15 °C 1N WL) mintákhoz hasonlítottuk. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételtsből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

Az NBL lipidek mennyisége jelentősen csökkent kombinált távolivörös + kék kezelés hatására 15 °C-on tíz nap elteltével, míg 5 °C-on mind a két mintavételi időpontban (8. táblázat). Önmagában a távolivörös, illetve a monokromatikus kék megvilágításnak nem volt meghatározó hatása.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1N	62,0±2,2	62,2±0,8	59,1**±1,2	60,1±0,8
15 °C10N	59,5±1,1	60,9±1,8	60,7±1,1	59,9±1,0
5 °C 1N	59,4±1,2	61,8±5,6	53,6**±1,6	
5 °C 7N	61,5±2,1	63,7±6,7	52,6***±1,3	

8. táblázat: A NBL képző lipidek változása a távolivörös és a kék fény, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk, a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételtsből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

Az árpa levelek PL tartalma függetlenül a környezet hőmérsékletétől jelentősen lecsökkent a kombinált távolivörös + kék fénykezelés hatására (9. táblázat). Hasonlóan ehhez a kezeléshez, a monokromatikus kék megvilágítás is hatékony volt. A távolivörös fény kiegészítés önmagában nem hatott számottevően a PL tartalomra.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1N	42,70±2,19	43,65±0,80	32,0***±1,06	27,70***±0,96
15 °C 10N	39,72±1,28	38,9±1,35	28,6***±1,02	29,8***±0,99
5 °C 1N	40,45±1,05	43,40±2,18	34,4**±0,85	
5 °C 7N	46,87±1,80	45,40±3,91	37,30**±1,31	

9. táblázat: Az össz PL lipid tartalom változása a távolivörös fény, a kék fény és a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), távolivörössel és kék fénnel kiegészített fehér fénnel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

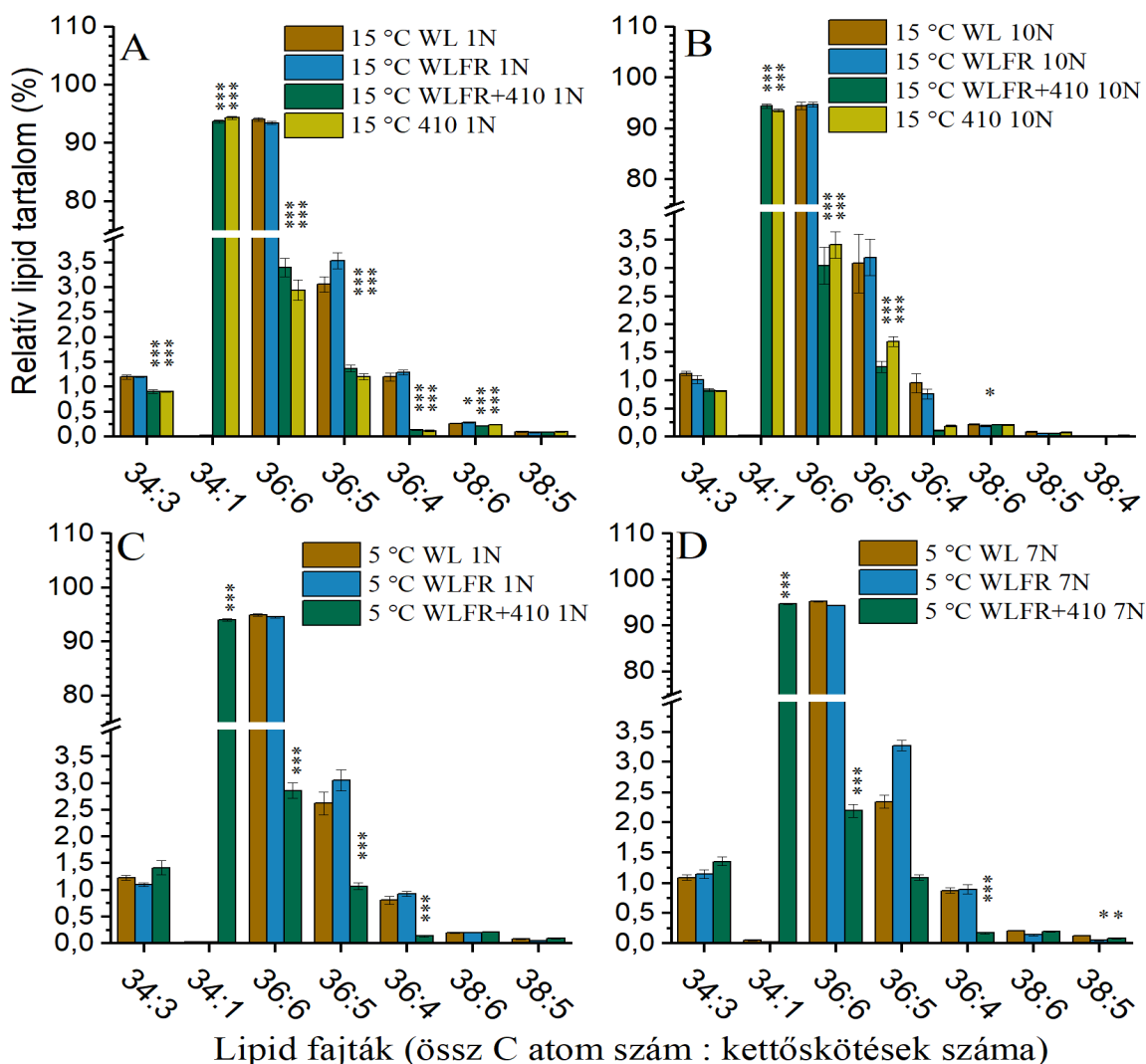
A megemelt arányú távolivörös, távolivörössel kombinált kék megvilágítás mellett 15°C-on megemelkedett a membrán fluiditásával kapcsolatba hozható lipid családok mennyisége. Abban az esetben, ha 15°C-on csak kék kiegészítő fényt alkalmaztunk akkor az MGDG emelkedett jelentősen, míg a PG, a PS és a HexCer csökkent.

A távolivörös fény kiegészítéssel kezelt 5°C-on nevelt növények esetében a PG, a PS és a HexCer mennyisége emelkedett meg és csökkent a DGDG-é. Ugyan akkor, ha kék fény kiegészítést is alkalmaztunk akkor, az MGDG, a PG és a PC értéke emelkedett, valamint a PA, a HexCer, a PI, és a PE értéke csökkent. A kombinált távolivörös és kék kezelés minden esetben befolyásolta a BL, a NBL, a PL, a PC/PE, az MGDG/PE és a PC+PE értékeket.

A kék megvilágítás hatást gyakorolt a PL és a PC/PE értékekre.

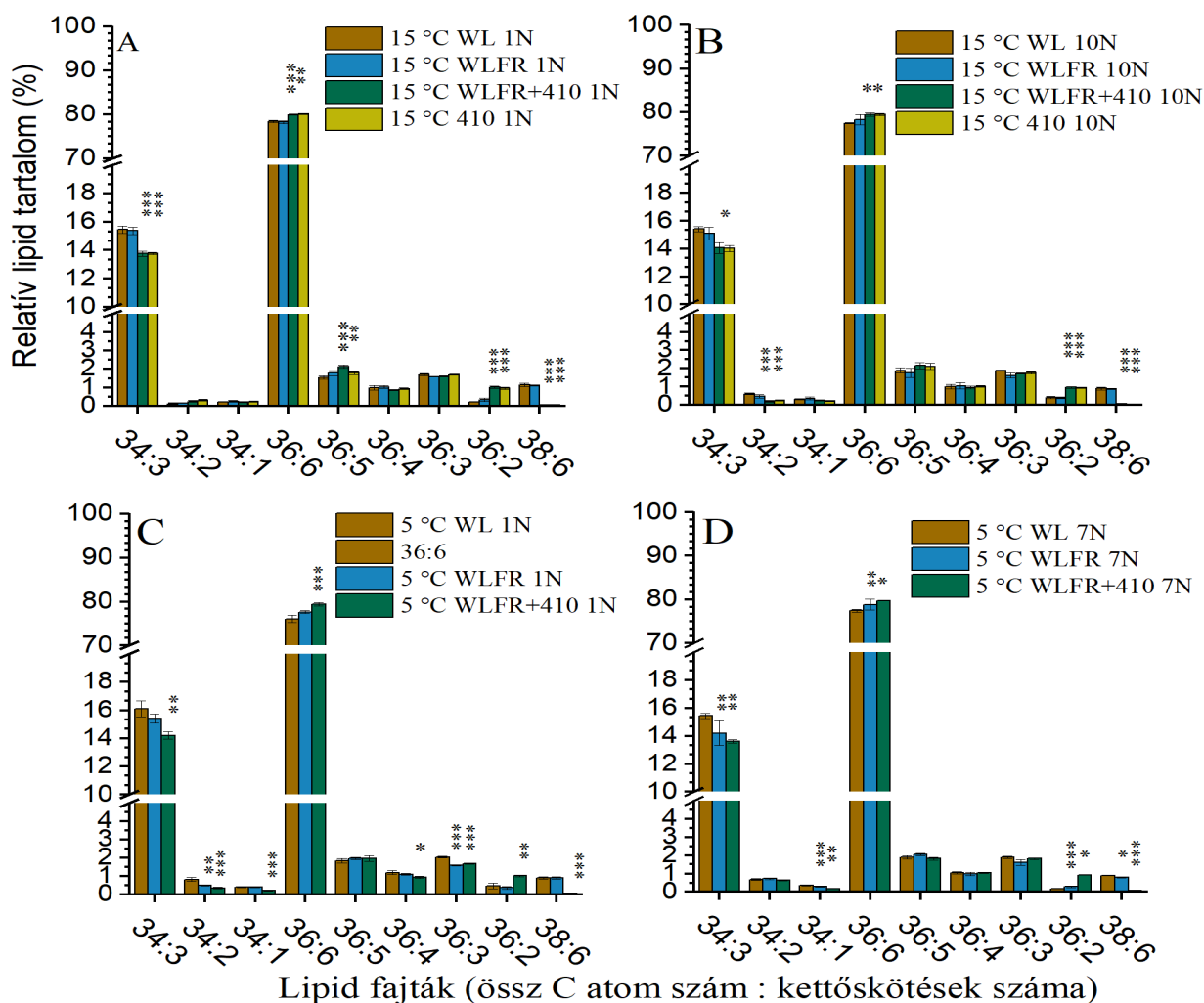
7.2.2 A lipid fajták megoszlása a különböző lipidosztályokon belül

A kezelések során az MGDG családon belül a 34:4 fajta egyenletesen alacsony jelet adott. A 36:6, a 36:5 és a 36:4 mennyisége a távolivörössel kombinált kék vagy a monokromatikus kék fényű megvilágítás mellett lecsökkent a hőmérséklettől függetlenül. A 34:1 fajta mennyiségét szignifikánsan növelte a kék fény monokromatikus formában és a távolivörös fénnel való kombinációban egyaránt. A 36:5 alfajta mennyiségére a távolivörös fénykiegészítés nem hatott jelentősen (15. ábra).



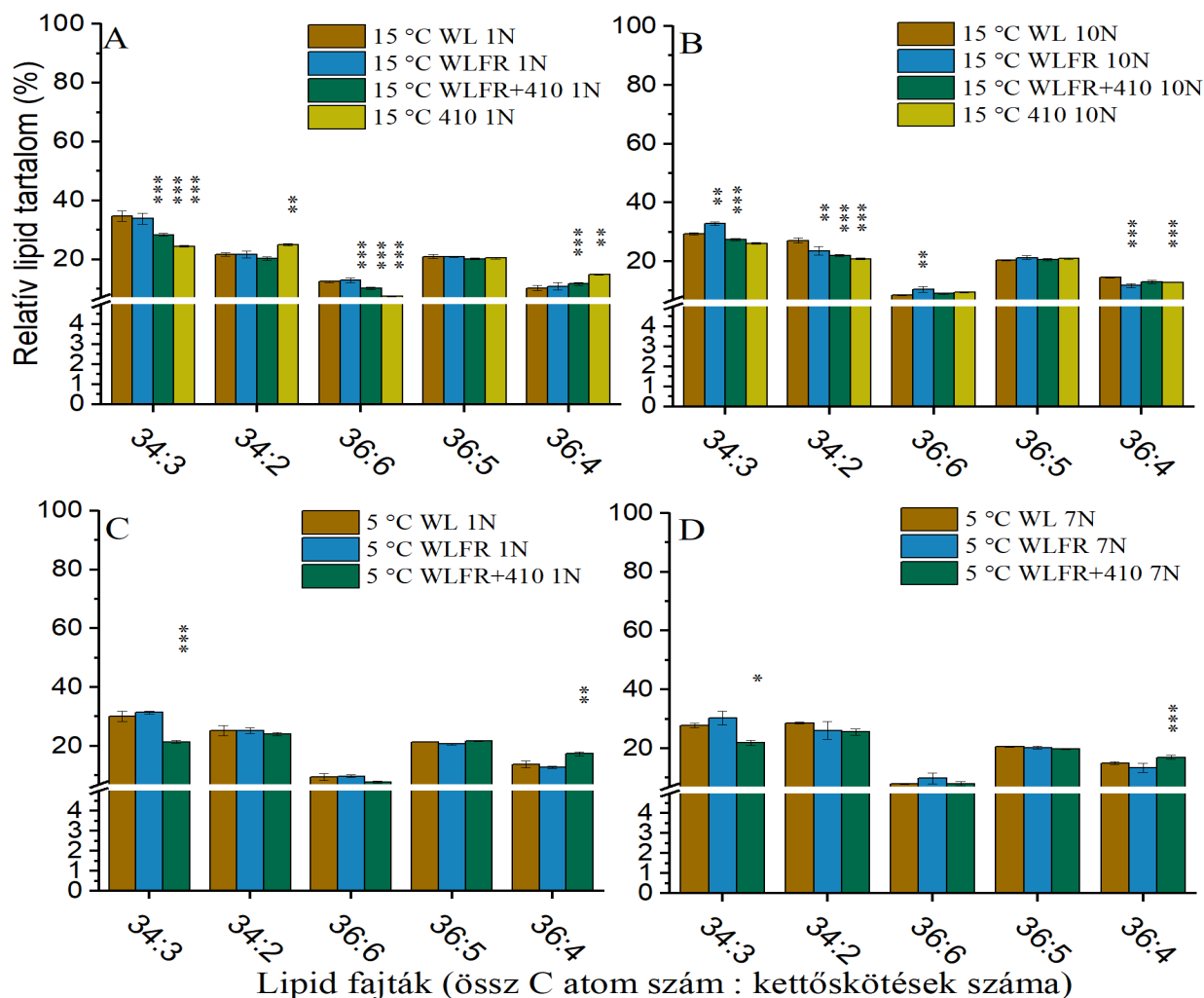
15. ábra: Az MGDG fajták eloszlásának változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fénnel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengelyen az MGDG család főbb fajtáit láthatjuk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el, a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételtsből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket: * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

A 16. ábrán mutatjuk be a kezeléseinknek a DGDG lipid család összetételére gyakorolt hatását. Jelentős csökkenést tapasztaltunk a 34:3, 34:2, 34:1, 36:4 és 36:3 csoportok esetében alacsony hőmérsékleten. A 36:6 és 36:2 csoportok mennyisége megemelkedett, mind alacsony vörös/távolivörös arányú fény, mind kombinált távolivörös + kék, valamint monokromatikus kék megvilágítás mellett hőmérséklettől függetlenül. Ugyan akkor 5 °C-on a 38:6 lipidek mennyisége alacsony vörös/távolivörös arányú megvilágítás hatására csökkent, míg kombinált távolivörös + kék, valamint monokromatikus kék megvilágítás mellett emelkedett.



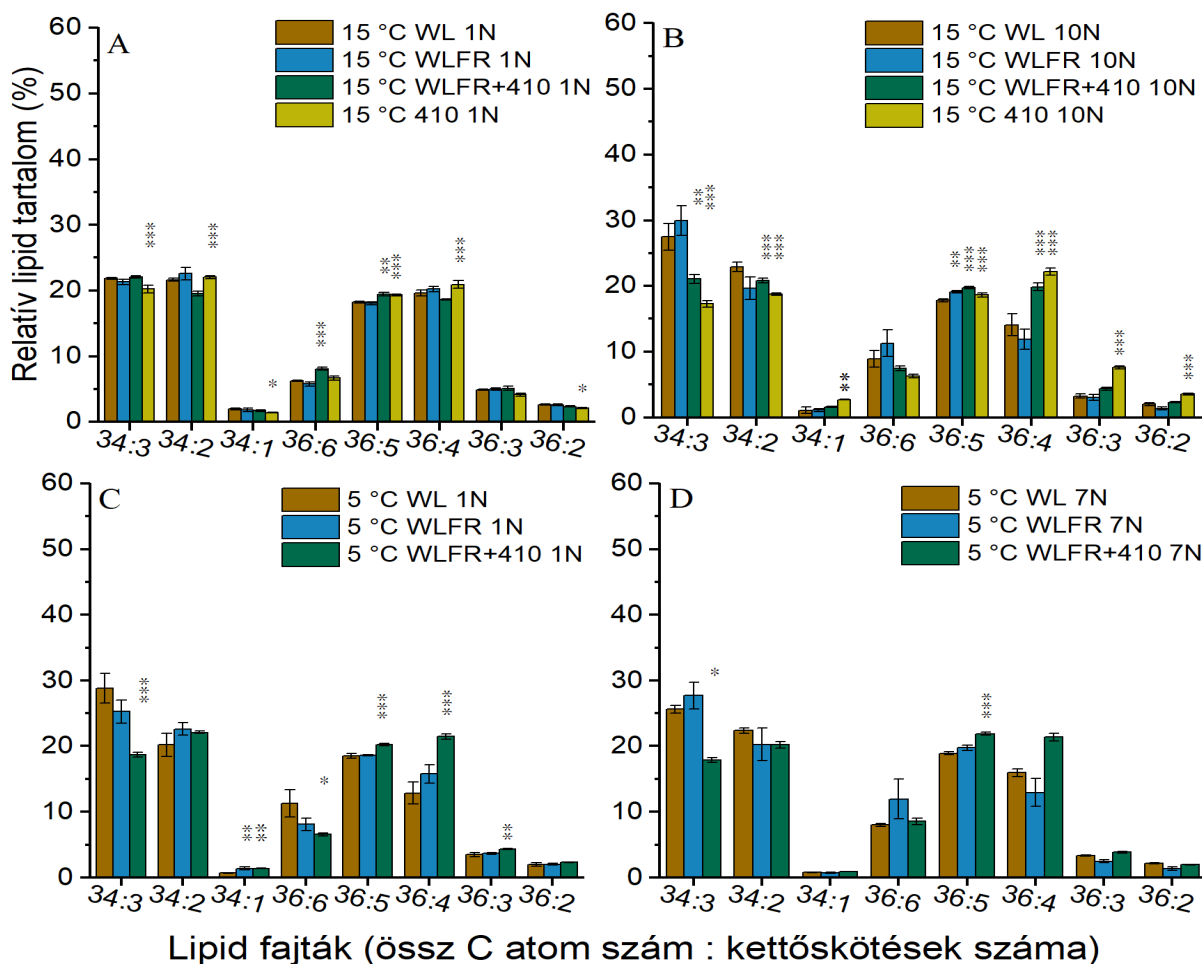
16. ábra: A DGDG fajták eloszlásának változása a távolivörös és a kék, valamint a hidegkezelések után “Nure” őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fényel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengelyen a DGDG család főbb fajtáit láthatjuk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el, a fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

A 17. ábrán a PE lipid család összetételét mutatjuk be. A 34:3, 36:6 mennyisége csökkent 15°C-on, míg 36:3 mennyisége megemelkedett. A 34:2 mennyisége megemelkedett távolivörös, kombinált távolivörös + kék, valamint monokromatikus kék megvilágítás mellett függetlenül a hőmérséklettől. A 36:4-es csoport mennyisége megemelkedett a kombinált távolivörös + kék fénykezelés alkalmával 5°C-on, de csökkent távolivörös kezelés hatására 15°C-on a tíz napos mintákban.



17. ábra: A PE specicsinek eloszlásának változása a távolivörös és a kék fény, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényvel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410), valamint monokromatikus kék fényvel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengelyen a PE család főbb fajtáit láthatjuk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint közepső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egy utas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el, a fehér fényvel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

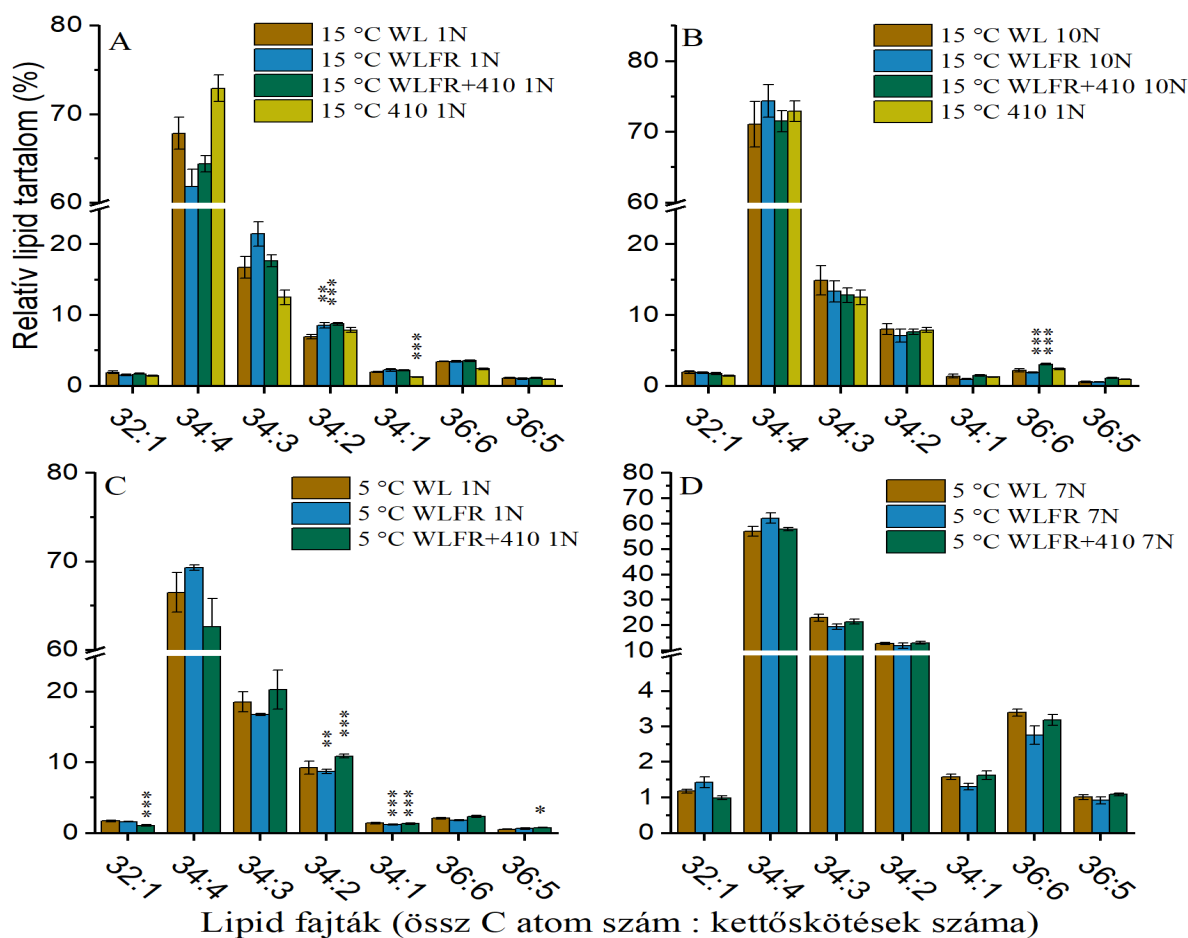
A PC lipid család összetételét a 18. ábrán mutatjuk be. A 36:6, 36:5, 34:4 és 34:1 mennyisége megemelkedett a kezelések hatására, míg a 36:2, 36:3 és 34:3 mennyisége lecsökkent. A 36:4 mennyisége megemelkedett a kombinált távolivörös + kék (WLFR+410) kezelés mellett, míg ezzel ellentétesen változva monokromatikus kék fény hatására lecsökkent. A 34:2 mennyisége hasonlóan változott 5 °C-on.



18. ábra: A PC specioseinek eloszlásának változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényvel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fényvel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el, a fehér fényvel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

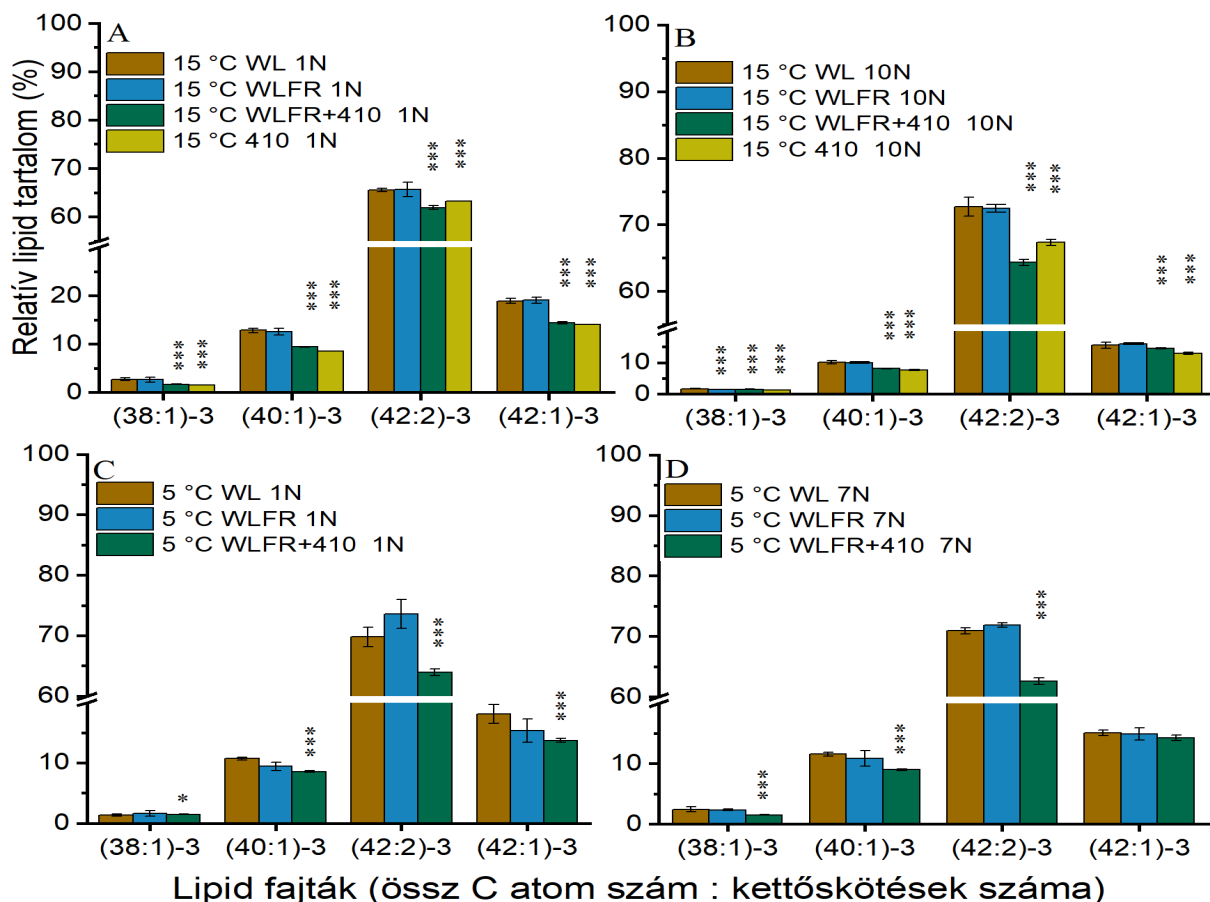
A PG család lipid-összetétele a következők szerint változott (19. ábra). A 34:3 mennyisége csökkent 15°C-on, míg a 34:2 mennyisége megemelkedett 5°C-on. A 34:4

mennyisége hőmérséklettől függetlenül megemelkedett kombinált távolivörös + kék fénykezelés mellett, de lecsökkent monokromatikus kék megvilágítás mellett. 15 °C-on a 36:6 és a 34:2 mennyisége megemelkedett a kombinált távolivörös + kék fénykezelés hatására és lecsökkent monokromatikus kék alkalmazása esetén. A 34:3-as lipid csoport mennyisége 5 °C-on lecsökkent a kombinált távolivörös + kék fénykezelés hatására, és megemelkedett a monokromatikus kék megvilágítás esetén.



19. ábra: A PG specioseinek eloszlásának változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR), távolivörössel és kék fényel kiegészített fehér fényel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fényel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengelyen a PG család főbb fajtáit mutatjuk be. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint közepső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket: * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

Minden esetben hőmérséklettől független csökkenést tapasztaltunk a bemutatott HexCer lipid család fajtainál a kombinált távolivörös + kék, illetve a monokromatikus kék kezelés hatására (20. ábra). Önmagában a fehér fény távolivörös fénnel való kiegészítésének nem volt kiemelkedő hatása.



20. ábra: A HexCer specieseknek eloszlásának változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki (Y tengely). A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410) valamint monokromatikus kék fénnel (410). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. Az X tengely a HexCer család főbb fajtaát mutatjuk be. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket: * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

7.3 A zsírsavak telítetlenségi indexének változásai

A sejtmembrán lipid telítetlenségének meghatározása céljából a kettős kötés indexet (DBI) alkalmaztuk, valamint meghatároztuk a vizsgált lipidek össz kettős kötés értékét. Az eddigi kutatásokkal ellentétben, a kontroll fehér fénnel megvilágított mintákban nem tapasztaltunk jelentős eltérést a hőmérséklet függvényében totál DBI-ben (Zheng és *mtsai.*, 2011) (10. táblázat). Bizonyos lipid osztályokban azonban a fénykezelések szignifikáns különbségeket okoztak.

A 10. táblázatban a megvizsgált lipidek össz kettős kötés indexét mutatjuk be. A DBI mennyisége jelentősen megemelkedett távolivörös és kék, valamint monokromatikus kék kezelés hatására, függetlenül a hőmérséklettől. Mind e mellett a távolivörös kezelés hatására a DBI a 15 °C-os fehér fényű megvilágítás mellett kapott értékekre hasonlít a leginkább.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15°C 1 N	4,81±0,24	4,77±0,24	5,03***±0,29	5,12***±0,31
15°C 10N	4,82±0,24	4,90±0,25	5,13***±0,31	5,07***±0,30
5°C 1 N	4,80±0,24	4,77±0,24	4,91±0,27	
5°C 7 N	4,63±0,21	4,72±0,22	4,84*±0,25	

10. táblázat: Az össz DBI tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

Az MGDG DBI mennyisége hideg kezelés hatására csökken fehér fényű megvilágítás mellett. A távolivörös megvilágítás esetében az MGDG DBI mennyisége megemelkedett a kontrollhoz képest. A kombinált távolivörös + kékfény kezelés hatására már 15 °C-on egy napnyi kezelés alkalmával megemelkedett a DBI, ez az érték pedig a hideg kezelés mellett is megmaradt (11. táblázat).

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	2,40±0,05	2,39±0,04	3,00***±0,05	3,19***±0,02
15 °C 10N	2,40±0,03	2,53±0,11	3,22***±0,05	3,16***±0,05
5 °C 1 N	2,30±0,06	2,33±0,07	2,64**±0,10	
5 °C 7 N	1,95±0,08	2,04±0,15	2,44***±0,06	

11. táblázat: Az MGDG DBI tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A DGDG minták kettős kötés indexét a 12. táblázatban mutatjuk be. Fehér fénnel megvilágított kontroll mintákban a hőmérsékletváltozása hatástalan volt a DGDG DBI-re. Ellenben távolivörös fénykiegészítés hatására csökkenést mutatott a DBI. A kombinált távolivörös + kék fény kezelés mellett 15 °C -on tranziensen megemelkedett egy napnyi megvilágítást követően. 5 ° -on enyhe emelkedést tapasztalhatunk, mind egy, mind hét nap után. A monokromatikus kék fénykezelés hatására szignifikánsan nőtt a DBI tartalom 15 °C-on (12. táblázat).

	WL	WL+FR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,87±0,03	0,82±0,01	0,92±0,01	0,98***±0,01
15 °C 10N	1,00±0,03	0,95±0,07	0,91±0,02	0,9**±0,02
5 °C 1 N	1,02±0,05	0,88**±0,02	1,08±0,02	
5 °C 7 N	1,03±0,05	1,04±0,08	1,10±0,01	

12. táblázat: A DGDG DBI tartalom változása a távolivörös fény, a kék fény és a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket: * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A 13. táblázatban a PC DBI-t mutatjuk be. Láthatjuk, hogy első sorban a kombinált távolivörös + kék fény kezelés hatására emelkedik meg a DBI 15 °C-on, bár a kontrollhoz viszonyítva a különbség csak 5 °C-on szignifikáns. A távolivörös fénykiegészítés önmagában nem okozott jelentős változást. Monokromatikus kék fény hatására is nőtt mind a két mintavételi időpontban a DBI 15°C-on.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,33±0,03	0,36±0,01	0,50 ^{**} ±0,01	0,41±0,01
15 °C 10N	0,37±0,03	0,39±0,03	0,43±0,01	0,46 ^{***} ±0,02
5 °C 1 N	0,38±0,02	0,36±0,04	0,52 ^{***} ±0,02	
5 °C 7 N	0,30±0,01	0,26±0,03	0,58 ^{***} ±0,01	

13. táblázat: A PC DBI tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A 14. táblázatban a PE DBI-t tekinthetjük át. A távolivörös fénykiegészítés hatására a DBI kis mértékben nőtt 15°C-on (nem szignifikáns) és 5°C-on egy nap elteltével. Viszont a kombinált távolivörös + kék, valamint monokromatikus kék kezelés hatására nagy mértékű csökkenést tapasztaltuk majdnem minden mintavétel esetében.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,28±0,01	0,32±0,00	0,23±0,02	0,14 ^{***} ±0,02
15 °C 10N	0,29±0,02	0,32±0,02	0,14 ^{***} ±0,03	0,14 ^{***} ±0,02
5 °C 1 N	0,32±0,02	0,34±0,03	0,22 ^{***} ±0,01	
5 °C 7 N	0,31±0,01	0,28±0,03	0,30±0,03	

14.táblázat: A PE DBI tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A távolivörös fénykiegészítés hatására a PG DBI értéke nem változott jelentősen, ám a kombinált távolivörös + kék, valamint monokromatikus kék világítás esetében előbb csökkent majd kis mértékben emelkedett (15. táblázat).

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,38±0,01	0,36±0,02	0,29*±0,02	0,31±0,02
15 °C 10N	0,32±0,00	0,33±0,03	0,33±0,02	0,33±0,02
5 °C 1 N	0,29±0,01	0,34±0,00	0,33±0,01	
5 °C 7 N	0,29±0,01	0,28±0,00	0,30±0,03	

15. táblázat: A PG DBI tartalom változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A táblázatban a minták PE DBI változását mutatjuk be. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fényel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket: * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

A kék fény kiegészítés jelentős mértékben befolyásolta a DGDG DBI értékét 15 °C-on. A PE DBI és a PG DBI mennyisége pedig távolivörössel kombinált kék fény kezelés hatására csökkent. Az MGDG DBI és a PC DBI értéke a távolivörössel kombinált kék fény hatására emelkedett, valamint a PG DBI értéke a kék megvilágítás mellett is magasabb volt 15 °C-on.

7.3.1 A zsírsavak kettőskötés eloszlásának változása

A PC totál lipid kettőskötés számának eloszlása eltérő a különböző hidegkezelések és megvilágítások mellett. A 16. táblázatban láthatjuk, hogy míg a távolivörös fénykiegészítés nem okoz szignifikáns változást a kettős kötések számában, addig a kombinált távolivörös + kék, valamint a monokromatikus kék fény többnyire szignifikánsan megemeli (16. táblázat).

		WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	6	0,04±0,02	0,04±0,02	0,07 ^{**} ±0,03	0,05±0,02
	5	0,09±0,05	0,1±0,06	0,14 ^{**} ±0,06	0,12 [*] ±0,06
	4	0,08±0,04	0,09±0,05	0,11 ^{***} ±0,05	0,1 ^{***} ±0,05
	3	0,08±0,05	0,08±0,05	0,12 [*] ±0,05	0,09±0,04
	2	0,05±0,03	0,05±0,03	0,06±0,03	0,06±0,03
15 °C 10 N	6	0,06±0,03	0,07±0,04	0,06±0,02	0,05±0,03
	5	0,1±0,06	0,11±0,06	0,12±0,06	0,13±0,06
	4	0,06±0,04	0,07±0,03	0,10±0,05	0,12±0,05
	3	0,1±0,06	0,11±0,06	0,09±0,04	0,1±0,05
	2	0,05±0,03	0,05±0,03	0,06±0,03	0,06±0,03
5 °C 1 N	6	0,7±0,04	0,05±0,03	0,06±0,03	
	5	0,1±0,06	0,1±0,06	0,15 ^{**} ±0,07	
	4	0,06±0,03	0,07±0,04	0,13 ^{**} ±0,06	
	3	0,1±0,06	0,09±0,05	0,1±0,05	
	2	0,05±0,03	0,05±0,03	0,07±0,03	
5 °C 7 N	6	0,04±0,02	0,05±0,03	0,08 ^{***} ±0,04	
	5	0,08±0,05	0,07±0,04	0,18 ^{***} ±0,08	
	4	0,06±0,03	0,04±0,02	0,14 ^{***} ±0,06	
	3	0,07±0,04	0,07±0,04	0,11 ^{***} ±0,05	
	2	0,04±0,02	0,03±0,02	0,07 ^{***} ±0,03	

16. táblázat: A PC kettős kötéseinek eloszlásának a változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. 6-2 számmal jelöltük a lipid láncokban előforduló kettős kötések számát. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levélszint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételéből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

A 17. táblázatban a PE lipid család kettős kötés eloszlását mutatjuk be. A távolivörös fénykiegészítés hatására a minták kettőskötés mennyisége kis mértékben megemelkedett 15 °C-on egy és tíz nap után is, de 5 °C-on enyhe csökkenést tapasztaltunk hosszabb kezelés után. Abban az esetben, ha kombinált távolivörös + kék fénykiegészítés alkalmaztunk, akkor a kettős kötések mennyisége megemelkedett 15 °C-on egy és tíz nap után is, míg 5 °C-on csak a négy kettős kötéssel rendelkező láncok mennyisége csökkent egy nap elteltével. Amikor a megvilágításhoz csak monokromatikus kék fényt alkalmaztunk, akkor 15 °C-on egy és tíz nap után is csökkenést tapasztaltunk a hat, az öt és a három kettős kötéssel rendelkező láncok mennyiségében. Ugyanakkor a négy kettős kötéssel rendelkező láncok mennyisége csak tíz nap után csökkent jelentősen 15 °C-on.

		WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	6	0,06±0,03	0,07±0,04	0,04±0,02	0,02***±0,01
	5	0,08±0,05	0,09±0,05	0,07±0,03	0,04*±0,02
	4	0,03±0,02	0,03±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01
	3	0,08±0,05	0,09±0,05	0,06±0,03	0,03***±0,01
	2	0,03±0,02	0,03±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01
15 °C 10 N	6	0,04±0,02	0,06±0,03	0,02±0,01	0,02**±0,01
	5	0,08±0,05	0,1±0,06	0,04*±0,02	0,04**±0,03
	4	0,05±0,03	0,05±0,03	0,02**±0,01	0,02**±0,01
	3	0,07±0,04	0,09±0,05	0,04*±0,02	0,04**±0,02
	2	0,04±0,03	0,05±0,03	0,02±0,01	0,02±0,01
5 °C 1 N	6	0,05±0,03	0,04±0,02	0,03±0,01	
	5	0,09±0,05	0,08±0,05	0,07±0,03	
	4	0,05±0,03	0,05±0,03	0,05±0,02	
	3	0,07±0,04	0,07±0,04	0,04***±0,02	
	2	0,04±0,03	0,04±0,03	0,03±0,01	
5 °C 7 N	6	0,05±0,03	0,05±0,03	0,04±0,02	
	5	0,09±0,05	0,09±0,05	0,09±0,04	
	4	0,05±0,03	0,04±0,03	0,06±0,03	
	3	0,08±0,04	0,08±0,05	0,06±0,03	
	2	0,05±0,03	0,04±0,03	0,05±0,02	

17. táblázat: A PE kettős kötéseinek eloszlásának a változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényvel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fény kiegészítéssel (WLFR+410 nm), valamint monokromatikus kék fényvel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. 6-2 számmal jelöltük a lipid láncokban előforduló kettős kötések számát. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fényvel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg ($\pm$ SE). A szignifikancia szinteket: * $p < 0,1$ és ** $p < 0,05$ és *** $p < 0,01$ jelöli.

A PC lipid családban a hat, az öt, a négy és a három kettőskötést tartalmazó lipidláncok mennyisége emelkedett távolivörössel kiegészített kék fény hatására, míg kék fény mellett a négy és az öt emelkedett 15 °C-on. 5 °C-on távolivörössel kiegészített kék megvilágítás alkalmával a hat, az öt, a négy, a három és a kettő kettős kötést tartalmazó lipid láncok mennyisége csökkent le.

A PE lipid család esetében a távolivörössel kiegészített kék fény hatására az öt, a négy és a három kettős kötéssel rendelkező lipid láncok mennyisége csökkent 15 °C-on, de csak a három kettős kötésé 5 °C-on.

7.3.2 A tilakoidmembránt alkotó lipidláncok hossza és kettős kötések száma szerinti eloszlása

A tilakoid membrán felépítésében az MGDG, DGDG, SQDG és PG vesz részt. Ezen lipidek acil régióinak hossza jellemzően 18:0 és 16:0 között oszlik meg. Kettős kötések száma 0-3 között változhat a zsírsav láncon belül (Govindjee és *mtsai.*, 2009). Ezen zsírsavcsaládok abundanciája meghatározza a tilakoid membrán integritását és fluiditását. Ennek leírására használhatjuk a DB, DBI és a lipidláncok hossz és kettős kötés száma szerinti összegét is. Korábbi eredmények szerint a lipidláncok hosszának csökkenése a hidegedződés során fagy esetén hozzájárul a membrán integritásának megőrzéséhez (Rawat és *mtsai.*, 2021).

Ezen ismeretek alapján a kontrollként használt, egy napig fehér fénnel megvilágított 15 °C-on nevelt, mintákhoz képest a kombinált távolivörös + kék, valamint a monokromatikus kék fénnel megvilágított minták esetében egy nap után 15 °C-on a 34:3, 36:6, 36:5, 36:4, 36:3, 38:6 és 38:4 láncok mennyisége megemelkedett. Valamint tíz nap megvilágítás után a kontrollhoz képest a 34:3, 36:6, 36:4, 36:3 és 38:6 lipidláncok mennyisége is jelentősen megemelkedett távoli vörös és hozzáadott kék, valamint monokromatikus kék fény megvilágítás hatására. Kiegészítő távolivörös megvilágítás alkalmazva a 34:3, 36:5 hosszúságú lipidláncok mennyisége tíz nap után megemelkedett 15°C-on. Míg tíz napnyi monokromatikus kék fényű megvilágítás után a 38:4-es lipid lánc mennyisége továbbra is magasabb volt a kontrollhoz képest 15°C-on (18. táblázat). Ezek az eredmények összecsengenek a hideg akklimatizáció során lejátszódó változásokkal, melyeket fentebb említettünk.

Amennyiben a minták hidegkezelésnek is ki voltak téve, akkor a kontrollhoz képest a 34:3, 34:2, 36:4, 36:3, 38:6 és 38:4 lipidláncok mennyisége emelkedett meg nagy mértékben monokromatikus kék fényű megvilágítás hatására egy napnyi megvilágítás mellett. Ez az emelkedés hét nap után az 5°C-on nevelt minták közül csak a 36:4 lipidlánc esetében maradt meg. A kontrollhoz képest a 34:3 és 34:2 lipidláncok mennyisége jelentősen emelkedett távoli vörös fényű kiegészítés hatására 5°C-on hét nap után. A 36:3, 38:6 és 38:4 lipidláncok mennyisége is magasabb volt kombinált távolivörös + kék megvilágítás hatására (19. táblázat).

Ezek az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy mind a távolivörös, a távolivörös + monokromatikus kék és a monokromatikus kék fény önmagában megemelte az alacsonyabb zsírsavláncú lipid alfajtak arányát, illetve egyetemlegesen a láncok telítetlenségét, ez pedig a pre-hardening szempontjából előnyös folyamat.

	WL	WLFR	WLFR+410 nm	410 nm
15°C1N	34:4	5,28±1,56	4,14±0,19	4,78±0,29
	34:3	1,64±0,49	1,5±0,03	3,85***±0,15
	34:2	0,50±0,14	0,56±0,03	0,68±0,05
	34:1	0,14±0,04	0,1±0,00	0,19±0,02
	36:6	35,13±10,26	33,12±2,05	55,97*±0,86
	36:5	1,3±0,38	1,35±0,07	1,98***±0,07
	36:4	0,48±0,14	0,44±0,01	0,81***±0,03
	36:3	ND	ND	0,31***±0,01
	38:6	0,12±0,03	0,09±0,01	0,26***±0,01
	38:4	ND	ND	0,02***±0,00
15°C10N	34:4	4,2±1,21	1,25***±0,06	5,94**±0,35
	34:3	1,39±0,4	3,58**±0,21	3,65***±0,08
	34:2	0,49±0,14	0,69±0,13	0,65±0,05
	34:1	0,09±0,03	0,34***±0,06	0,16**±0,1
	36:6	33,18±9,59	15,32**±1,26	60,3***±1,02
	36:5	1,19±0,35	20,71***±0,81	1,96*±0,18
	36:4	0,37±0,11	0,82**±0,05	0,83***±0,06
	36:3	ND	ND	0,32***±0,01
	38:6	0,09±0,03	0,05**±0,00	0,26***±0,01
	38:4	ND	ND	0,1***±0,00

18. táblázat: Az azonos lánc hosszúságú és kettős kötésű lipid csoportok összegei 15°C-on. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörsszel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fénnel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A megvilágítás mellett 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

		WL	WLFR	WLFR+410 nm
5°C1N	34:4	3,81±1,12	4,05±0,34	5,22*** ±0,23
	34:3	1,50±0,44	1,07±0,14	4,79*** ±0,27
	34:2	0,58±0,17	0,41±0,07	0,96*** ±0,04
	34:1	0,09±0,0,03	0,06±0,01	0,15** ±0,1
	36:6	30,65±8,93	31,87±1,9	52,49*** ±1,6
	36:5	0,94±0,3	1,14±0,05	1,57* ±0,08
	36:4	0,31±0,06	0,34±0,03	0,65** ±0,2
	36:3	ND	ND	0,35*** ±0,1
	38:6	0,08±0,02	0,08±0,00	0,27*** ±0,00
	38:4	ND	ND	0,04*** ±0,00
5°C7N	34:4	2,64±0,95	3,51±0,35	4,57±0,47
	34:3	0,97±0,3	1,36±0,08	4,67*** ±0,16
	34:2	0,35±0,11	0,64±0,07	1,14*** ±0,11
	34:1	0,04±0,01	0,07* ±0,00	0,16*** ±0,02
	36:6	28,44±8,57	29,9±1,72	50,88** ±0,77
	36:5	0,81±0,25	1,17±0,08	1,25* ±0,04
	36:4	0,28±0,08	0,31±0,01	0,67*** ±0,03
	36:3	ND	ND	0,4*** ±0,01
	38:6	0,07±0,02	0,06±0,00	0,25*** ±0,01
	38:4	0,00±0,00	ND	0,04*** ±0,00

19. táblázat: Az azonos lánc hosszúságú és kettős kötésű lipid csoportok összegei 5°C-on. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fényel (WLFR) és kombinált távolivörös + kék fényel (WLFR+410 nm). A megvilágítás mellett 5°C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fényel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismétlésből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket * p < 0,1 és ** p < 0,05 és *** p < 0,01 jelöli.

A távolivörös, a kék és a kombinált megvilágítás hatására emelkedett a rövidebb zsírsavláncú lipid fajták mennyisége.

7.3.3 A lizofoszfolid-szint változásai

A lizofoszfatidil lipidek lehetnek PC és PE bioszintézis prekurzorai, de származhatnak ezek bomlásából is (Wolti és mtsai., 2002). Ezeket a molekulákat a különböző mintákból származó lipid-extrakció pontosságának mutatóinak is tekintik. Jelentős csökkenést láthatunk az össz LPC tartalomban 15 °C egy nap távolivörös, 15 °C tíz nap kombinált távolivörös + kék és monokromatikus kék fények esetében (20. táblázat). Technikai szempontból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a LPC és LPE lipidek alacsony mennyisége a mintákban azt jelzi, hogy az

extrahálási eljárásunk megfelelő volt (lásd: Anyagok és módszerek).

	WL	WL+FR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,21±0,10	0,28±0,15	0,22±0,05	0,20±0,02
15 °C 10N	0,47±0,05	0,45±0,12	0,09**±0,03	0,10**±0,02
5 °C 1 N	0,59±0,30	0,27±0,10	0,44±0,17	
5 °C 7 N	0,38±0,10	0,32±0,12	0,53±0,12	

20. táblázat: A LPC változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), távolivörössel és kék fénnel kiegészített fehér fénnel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételéből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket: * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01.

Az össz LPE esetében azt láthatjuk, hogy a kezelések hatására 15 °C-on egy nap után, csak kék megvilágításra változott jelentősen a lipidek mennyisége, míg tíz nap után jelentős csökkenés tapasztalható, első sorban a távolivörös és kék, valamint monokromatikus kék esetében. Csökkenést láthatunk a távolivörös kezelés hatására 5 °C -on, ezt a csökkenést, a kombinált távolivörös + kék fény erősítette (21. táblázat).

	WL	WL+FR	WLFR+410 nm	410 nm
15 °C 1 N	0,15±0,03	0,21±0,07	0,04±0,01	0,02**±0,02
15 °C 10N	0,26±0,02	0,26±0,03	0,03***±0,01	0,02***±0,01
5 °C 1 N	0,32±0,12	0,20±0,06	0,06±0,03	
5 °C 7 N	0,30±0,08	0,24±0,06	0,12±0,04	

21. táblázat: A LPE változása a távolivörös és a kék megvilágítás, valamint a hidegkezelések után "Nure" őszi árpa levelekben. A jel értékét a detektált teljes lipid tartalom százalékos értékében (totál lipid szignál százalék (%)) fejeztük ki. A mintákat megvilágítottuk távolivörössel kiegészített fehér fénnel (WLFR), a kombinált távolivörös + kék fénnel (WLFR+410 nm) valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett 5 és 15 °C-os kezelést is alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első és utolsó napján vettük le. A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metszettük ki. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el a fehér fénnel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A méréseket 3-5 független biológiai ismételéből határoztuk meg (±SE). A szignifikancia szinteket: * p <0,1 és ** p <0,05 és *** p <0,01 jelöli.

Az LPC és az LPE mennyisége jelentős mértékben csökkent távolivörössel kiegészített kék és kék megvilágítás hatására 15 °C-on tíz napnyi kezelés után.

8 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

8.1 A különböző módon modulált fénykezelések hatása az őszi árpa „Nure” növények fagyűrűzésére

A fagyállóság meghatározására többféle módszert alkalmaznak világszerte. A teljes növény szintű fagyasztási tesztek esetén, amikor a cél a növények genetikailag determinált fagyűrűzésének meghatározása, növények előnevelése és a fagyasztást megelőző hidegedzés programozható növénynevelő kamrákban történik. A kamrákban használt klímaprogramok általában a természetes időjárási körülményeket szimulálják. Ilyenek például a Martonvásáron kidolgozott M29, FDA és FDS programok, melyeket az őszi kalászosok fagyűrűzésének tesztelésére használnak (Tischner és mtsai., 1998). Egy ilyen program körülbelül 6 hétig tart és jellemzően fokozatosan csökkentik a nevelési hőmérsékletet és a megvilágítás hosszát. A program végén eléri a 0°C-t, és ezt követi egy fagyasztási protokoll. Az általunk alkalmazott protokoll szerint a hidegedződési folyamatot modulált fény alkalmazásával váltottuk ki, ami fagyállóságot indukált rövid idő alatt, az edződés kezdeti fázisában (pre-hardening). A fagyállóság meghatározására két módszert alkalmaztunk. Az egyik a vezetőképesség mérés. E módszer alapja a következő: a sejteket körülvevő folyadék vezetőképességének mértéke fordítottan arányos a fagyasztás okozta membránkárosodás mértékével. Minél jobban sérült a levél annál több elektrolit áramlik ki a sejtekből és ezáltal nő a desztillált víz vezetőképessége, melyben a levélszegmentek úsznak (Minami és mtsai., 2015; Webb és mtsai., 1994). Kutatócsoportunk ezt a módszert már sikeresen alkalmazta a távolivörös fénykiegészítés fagyállóságot növelő hatásának igazolására (Ahres és mtsai., 2020; Novak és mtsai., 2016). A másik módszer a PSII fotoszintézis hatékonyságának indikátoraként használt klorofill fluoreszcencia analízisből származtatott F_v/F_m paraméter meghatározásán alapszik. E módszer megbízhatóságát a fagyállóság meghatározására a kétszikű lúdfű modellnövény és árpa esetében is igazolták (Ehlert és Hinch, 2008; Rizza és mtsai., 2011). Mindkét módszer alkalmazásának indoka a következő volt. Ismert, hogy a fitokrómok részt vesznek abban a jelátviteli folyamatban, melyeknek során a növények érzékelik a nappalok rövidülését és a vörös távolivörös arányának csökkenését, ami elindítja a hidegakklimatizációs folyamatokat (Ahres és mtsai., 2020; Franklin és Whitlam, 2007; Kim és mtsai., 2002; Lee és Thomashow, 2012; Novak és mtsai., 2016). A kék fény fagyállóságot befolyásoló hatásáról azonban nagyon kevés az elérhető információ. Korábbi ismereteink szerint a kék fény indukálja a *COR14b* gén expresszióját árpában (Crosatti és mtsai., 1999) és a *CBF14* gén expresszióját búza és árpa esetében (Novak és mtsai., 2017). A

közelmúltban megjelent több publikáció is, amely leírja a kék fény hatását a hidegakklimatizáció korai szakaszában lúdfűben (Imai és *mtsai.*, 2021b). Ellentétben a gabonaféléknél ismert részletekkel, egy nap elteltével a kék fény növelte a fagyállóságot az F_v/F_m értékek alapján, de nem csökkentette az elektrolitkiáramlást a vezetőképesség mérések alapján. A szerzők feltételezése szerint ennek oka az, hogy a lúdfű esetében kék fény hatására nem nő a *CBF* és a *COR*-gének expressziója, így a membrán átalakulása nem következik be ez idő alatt. Lúdfű esetében a kék fény az antociánok felhalmozódását növeli és ez az oka a fagyállóság emelkedésének (Imai és *mtsai.*, 2021b). Jól látható, hogy az árpa esetében egészen más folyamatok állnak a kék fény fagyállóságot indukáló jelensége mögött. Kísérletünk során mind a két fagyállósági teszt alkalmazása esetében nőtt az árpanövények fagyállósága (7. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy a kék fény mind a *CBF*-regulon expresszióját, mind a lipidanyagcserét szignifikánsan befolyásolta. Ezzel megváltoztatta a kloroplasztisz és a sejtmembránok fluiditását.

A kék fény a növények fagyállóságára gyakorolt hatásának tesztelésére monokromatikus kék fénnel világítottuk meg az árpanövényeket 15 °C-on. A fagyasztási tesztek alapján kiderült, hogy a kék fény 15 °C-on növeli az árpanövények fagyállóságát a kezelések ideje alatt, míg 5 °C-on csökkenti. A konduktanciatesztek azt igazolták, hogy a kombinált távolivörös + monokromatikus kék fény kiegészítés tovább növeli az alacsony vörös/távolivörös arányt tartalmazó fehér fény hatását a fagyállóságot 15 °C-on (7. ábra), viszont 5 °C-on a monokromatikus, 15 °C-on alkalmazott kék fényhez hasonlóan csökkenti azt. Ha a fehér fényt csak távolivörös fénnel egészítjük ki, akkor ez hatékonyabban védte meg a PSII fotoszintetikus aktivitását fagyasztás során (8. ábra A). Az *Y(II)* értéke is hasonló tendenciát mutatott az F_v/F_m értékekhez (8. ábra C). A 15 °C-on a kék fény kiegészítés csökkentette az árpa levelek fotoszintetikus aktivitásának fagyasztás okozta csökkenését. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kék fény kiegészítés elősegíti a kloroplasztisz- és a tilakoidmembránok integritásának megtartását a fagyasztás alatt. Erre a legvalószínűbb magyarázat az, hogy a kék a távolivörös fényhez hasonlóan szignálként szolgál a lipid metabolizmus befolyásolására.

8.2 A távolivörös és kék fény kiegészítés hatása a lipidmetabolizmus néhány „kulcsgénjének” az expressziójára

Korábbi ismeretek alapján elmondhatjuk, hogy a lipid kettősréteg mozaik membrán az élőlényekben érzékenyen reagál a környezeti hatásokra, így a hőmérséklet csökkenésére is (Nicolson, 2014; Vereb és *mtsai.*, 2003). Hideg hatására a membrán rigidebbé válik, mely folyamat szélsőséges esetben a kettős membrán felbomlását okozhatja (Quinn, 1988). Ennek

elkerülése érdekében az élőlény alkalmazkodik a hideg körülményekhez: a sejtmembrán fluiditásának növelésével elkerüli a fagy okozta membrán sérüléseket. A mi esetünkben feltételezzük, hogy a fehér fény modulálása távolivörös, illetve a kék fénnel hasonló hideg akklimatizációs változásokat okoz, mint maga a hidegedződés. Ennek igazolására összehasonlítottuk mind a hideg, mind a modulált fénykezelések során néhány, a lipidmetabolizmusban fontos kulcsgén expresszióját.

Az *MGD1* enzim az MGDG (nem alkot kettősmembránt (NBL)) galaktolipid szintézisének egyik meghatározó komponense. Az *MGD1* szerepének fontosságát a lúdfűben létrehozott mutáció bizonyítja. Az enzim aktivitásának 75 %-os csökkenésének eredményeként a sejtek MGDG tartalma 42%-kal csökkent, törpe növéssé lettek a növények, a klorofilltartalom, továbbá a kloroplasztiszok tilakoidtartalma csökkent, és a lamellák szerkezete lazábbá vált (Jarvis és *mtsai.*, 2000). Mindezen felül nem sikerült *MGD1* nullmutánst megalkotni, mivel a mutáció letális lúdfűben (Awai és *mtsai.*, 2001).

A DGDG galaktolipid (kettősmembránt alkot (BL)) legfontosabb szintetizáló enzime a *DGD1*, ennek pontmutációval való inaktiválása lúdfűben 90%-os csökkenést okozott a szintézisben. A mutáció fenotipikus hatása kifejeződött az MGDG-nél már leírtak formájában, valamint a fotoszintézis hatásfoka is csökkent ((Chen és Li, 1998{Dormann, 1995 #483; Hartel és *mtsai.*, 1997; Härtel és *mtsai.*, 1998; Reifarth és *mtsai.*, 1997}).

A génexpresszió változását először a megemelt arányú távolivörös megvilágításnak kitett 15 és 5°C-on nevelt növényeken vizsgáltuk meg. A távolivörössel kombinált kék, valamint monokromatikus kék fénnel kezelt levélminták eredményei még feldolgozás alatt állnak.

Korábban már leírták, hogy a távolivörös fény az *MGD2* mRNS és az enzim aktivitás mértékét növelte etiolált uborka sziklevél esetében, ami arra mutat rá, hogy a *phyA* fotoreceptor szerepet játszik a folyamat szabályozásában (Blaas és Humpf, 2013). A mi esetünkben a távolivörös megvilágítás többszörösére növelte a *DGD1* expresszióját 15°C-on függetlenül a megvilágítás hosszától. Ellentétben a fent idézet uborka kísérlettel, minimális hatással volt, és csak az első napon, a *MGD2* gén expressziójára. Alacsony hőmérsékleten (5 °C) a távolivörös fény kevésbé hatott, sőt az egy napos kezelés még gátolta is e gén expresszióját (9. ábra). Azonban, az MGDG és a DGDG mennyisége nem korrelált az *MGD2* és a *DGD1* gén kifejeződésével, mivel össz mennyiségüket nem befolyásolta a távolivörös fénykezelés (9. ábra).

Az *NC* gén a ceramidáz enzimet kódolja, amely a ceramid hidrolízisét végzi. Érdekes

módon az *NC* gén expressziója a *DGD1* expressziójával parallel változott (9. ábra). Ez a változás igazolja, hogy a ceramidok, mint jelátviteli lipidek fontos szerepet játszhatnak a hidegakklimáció fényregulációjában. Fontosságukat, mint jelátviteli lipidek a prokariótákban és az eukariótákban már egyaránt igazolták (Markham és mtsai., 2013; Pata és mtsai., 2010; Sperling és Heinz, 2003).

A hidegakklimatizáció folyamán a membrán degradációja mérvadó lehet. Az alacsony hőmérséklet aktiválja lúdfüben a foszfolipáz-A-t és a foszfolipáz-D-t (Welti és mtsai., 2002). Azt is leírták, hogy rövid távú hideg kezelés hatására a növény galaktolipid szubsztrátokkal képes aktiválni mindkét foszfolipázt (Buseman és mtsai., 2006; Narvaez-Vasquez és mtsai., 1999). A növényi hidegakklimatizáció sikertelensége esetén csökkenhet a membrán stabilitása, membrán fúzió jöhet létre és végső soron sejthalál is bekövetkezhet (Cullis és de Kruijff, 1979; Welti és mtsai., 2007). A kísérleteink során a megemelt arányú távolivörös kezelés átmenetileg csökkentette a *PLDa3* expresszióját egy napnyi 5 °C-os kezelés után (9. ábra C). Azonban, ez a pozitív hatás egy hét elteltével elmúlt. Bár, a génexpresszió még mindig kisebb volt a 15 °C-on tartott kontroll mintákhoz képest, de magasabb volt, mint a fehér fénnel megvilágított 5 °C-on tartott kontroll mintáké (9. ábra D). Ez a jelenség arra utal, hogy az FR kiegészítés ebben a tekintetben ellentétesen hat a hidegkezeléshez viszonyítva.

A *LOC* relatív expressziója (10. ábra A, C) a megemelt arányú távolivörös megvilágítás szabályozása alatt állhat hőmérsékletfüggő módon. 5 °C-on a *LOC* mRNS expressziója lecsökkent a távolivörös kiegészítő fény alkalmazása során. Ebből levonható az a következtetés, hogy a megemelt arányú távolivörös megvilágítás hatására a növény lipidbontó folyamatai gátlódnak. Feltételezhető, hogy e módon a távolivörös fény hozzájárul a fagytűrés növeléséhez.

8.3 A membrán összlipid tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A monokromatikus kék fény, illetve a kombinált távolivörös+kék fény alkalmazása növelte 15 °C-on az árpalevelek fagyállóságát, azonban a konduktancia mérések szerint ezek 5 °C-on való alkalmazása káros volt (7. ábra). Emiatt a lipidomikai vizsgálatokat csak a 15 °C-on alkalmazott monokromatikus kék fénykezelések esetében végeztük el. A távolivörössel kiegészített fehér fényű megvilágítás hatására megemelkedett a totál lipid mennyiség 15 és 5 °C-on is, ugyanakkor lecsökkent kék fényű megvilágítás mellett (11. ábra). Az MGDG mennyiségére a fehér fény színeképének távolivörös fénnel való kiegészítése nem volt hatással. Abban az esetben, ha rövidebb hullámhosszú kék fényt is alkalmaztunk a fehér megvilágítás mellett, akkor függetlenül a környezet hőmérsékletétől az MGDG (12. ábra A, B, C és D) mennyisége megemelkedett. A távolivörös fénykiegészítés a DGDG mennyiségére nem volt hatással 15 °C-on. A monokromatikus kék megvilágítás szintén szignifikánsan megemeli az MGDG mennyiségét, míg a DGDG családét csökkenti 15 °C-on. A kétszikű lúdfű modellnövény esetében arról számoltak be, hogyha csökken az MGDG/DGDG aránya, akkor az megnövekedett szárazság, illetve fagytűrést eredményezett (Degenkolbe és *mtsai.*, 2012; Gigon és *mtsai.*, 2004). Azonban, egy másik publikációban, ahol egyszikű fűfélék *Lolium multiflorum* (Olaszperje)×*Festuca arundinacea* (Nádképű csenkesz) keresztezéséből származó különböző kromoszóma introgressziós vonalak szárazságtűrését hasonlították össze, a lúdfűvön kapott eredmény ellenkezőjét tapasztalták. A szárazság stressz hatására megnövekedett MGDG tartalom pozitívan korrelált a szárazságtűréssel (Perlikowski és *mtsai.*, 2016). Eszerint fűfélék stresszadaptációjának mechanizmusa ebben az esetben eltér a kétszikű modellnövényétől. Tehát valószínűsíthető, hogy a távolivörös és a kék fénykiegészítés által indukált MGDG koncentráció növekedés a kloroplasztisz membránban hozzájárulhatott az árpa levelek fagytűrésének növekedéséhez.

A foszfolipid családok közül az árpa levelek PG tartalma egy nap elteltével csökkent a hidegkezelés hatására, azonban ez a csökkenés nem történt meg a távolivörös, illetve a kék fénykiegészítéssel megvilágított növények esetében (12. ábra G). Egy hetes hideg (5 °C) kezelés után az összes minta esetében alacsonyabb volt a PG tartalom, mint a 15 °C-on nevelt mintákénál (12. ábra H). A PG a kloroplasztiszban előforduló egyetlen foszfolipid (7-10% (Joyard és *mtsai.*, 1998)), a tilakoid membrán szerkezetének és működésének fenntartásában nélkülözhetetlen (Hagio és *mtsai.*, 2000). A mitokondrium belső membránjában a PG a kardiolipin szintézisének

prekurzora, a kloroplasztisz külső borító membránjában pedig részt vesz a genomban kódolt fehérjék kloroplasztiszba történő transzportjában (van't Hof és *mtsai.*, 1993). A PG bioszintézise során képződő PA intermedier felhasználódhat glikolipidek, MGDG, DGDG és SQDG szintéziséhez is. A PG-t szintetizáló enzimek hiánya első sorban a tilakoid membrán és a kloroplasztisz felépítésében mutatkozik meg (Sheng és *mtsai.*, 2018). A növények mérete, valamint fotoszintetikus aktivitásuk lecsökkent, míg a tilakoidok rendezetlensége megemelkedett (Babiychuk és *mtsai.*, 2003). Feltételezzük, hogy a fénykezelések által indukált tranziensen magasabb PG tartalom (12. ábra G) elősegíthette a tilakoid membrán megfelelő működését 5 °C-on. Ezzel a feltevással összecseng, hogy a különböző fénykezelések hatására a Y(II) és az F_v/F_m teljesítménye magasabb volt a fagyasztás után (8. ábra).

A PS szerepet játszhat a só stressz válaszokban, a sejthalálban, az aszimmetrikus kapcsolatok kialakításában a plazmamembránban, valamint az éhezésben (Manoharan és *mtsai.*, 2000; Mansour és *mtsai.*, 2015). Érdekes megemlíteni, hogy a távolivörös, illetve a kék fénykezelések hatására a PS tartalom ellentétesen változott. A távolivörös fény hatására a mennyisége a környezet hőmérsékletétől függetlenül egy napos kezelés hatására tranziensen emelkedett, míg a kék fénykezelések hatására csökkent (12. ábra). Nagy valószínűséggel ezek a változások függetlenek a hidegakklimációs folyamatoktól.

A membránok integritása szempontjából sokkal fontosabbnak tűnnek azok a változások, melyek a PC és a PE tartalmat érintették. Korábbi kutatások alapján ismert, hogy a rozs, a lúdfű és a búza levelek PC és PE össz mennyisége megnőtt a hidegakklimatizáció során (Bohn és *mtsai.*, 2005; Uemura és *mtsai.*, 1995a; Uemura és Steponkus, 1994). Esetünkben a PC mennyisége hőmérséklettől függetlenül szignifikánsan emelkedett kék fénykezelés hatására, míg a távolivörös fény nem hatott rá (12. ábra). A PC-nek köztudottan jelentős szerepe van a kettősmembrán kialakulása során és annak integritásának fenntartásában (Govindjee és *mtsai.*, 2009). Valószínű tehát, hogy mennyiségének növekedése jelentősen hozzájárul ahhoz, hogy a kék fény hatékonyan növeli a fagyűrést. Hasonlóan a PC-hez a PE tartalmat a távolivörös fénykezelés nem befolyásolta szignifikánsan. Ellenben változott a kék fénykezelések hatására, mennyisége csökkent (12. ábra). Mivel a PE elleneben a PC-vel nem kettősmembrán alkotó foszfolipid (Govindjee és *mtsai.*, 2009) ez a változás is hozzájárulhat a fagyűrés növeléséhez.

Ismeretes, hogy a PA a foszfolipázok és/vagy lipid-kinázok segítségével képződik. Sok tanulmány a PA-t, mint kulcsfontosságú jelzőmolekulát említi a növényi só stressz során

(Ruelland és *mtsai.*, 2014; Yu és *mtsai.*, 2010). Az *Eutrema salsugineum*-ban a PA szint magasabb volt. Ez a növény hidegtűrő akár csak a „Nure”, bár eltér a fagyállóság mértéke (Zhang és *mtsai.*, 2013). Kísérleteink során a hozzáadott távolivörös kezelés hatására a PA szint nem változott, viszont a távolivörös fényhez hozzáadott kék fény és a monokromatikus kék hatására lecsökkent. Ez a tendencia független volt a hőkezeléstől (12. ábra). A PA szinteket 5 °C-on megemelte a hozzáadott távolivörös kezelés egy nap után. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a hozzáadott távolivörös megvilágítás szignáltranszdukciós utat indukálhat, ezáltal növelve az 5 °C-on nevelt növény életképességét. A PA mennyisége hasonlóan több lipid családdhoz jelentősen változott a kezelésekre, mely összefügghet azzal, hogy fontos prekürzora alapköve a lipidek szintézisének.

8.3.1 A kloroplaszt tilakoid membrán MGDG/DGDG arányának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

Az MGDG nem kettősmembrán alkotó (NBL), míg a DGDG kettősmembrán alkotó (BL) lipid. Ezen lipidek arányának csökkenését figyelték meg alacsony hőmérsékleten nevelt növények esetében (Li és Yu, 2018; Moellering és *mtsai.*, 2010; Welti és *mtsai.*, 2002). A NBL és a BL képző lipidek aránya meghatározó a fehérjék sejten belüli szállítása, a membránba ágyazódása és a konformációja szempontjából (Bogdanov és Dowhan, 1999; Gounaris és Barber, 1983; Kuster és *mtsai.*, 1994). Korábbi kutatások kimutatták, hogy az árpa kloroplaszt membránok teljes lipid-összetételének a legnagyobb hányadát az MGDG és a DGDG adja (Liu, 2011). Ismert, hogy a hőmérséklet változása befolyásolja a tilakoid membrán lipid-összetételét annak érdekében, hogy az elektrontranszportlánc megfelelő energiaellátást tudjon biztosítani a növény számára (Gombos és *mtsai.*, 1994; Kovacs és *mtsai.*, 2019). A hideg kezelésekre az MGDG/DGDG arány csökkenése és az alacsony hőmérséklet által kiváltott PG szintjének változása általában felfedezhető, de a növényfajtól függően eltérő lehet (Kenchanmane Raju és *mtsai.*, 2018; Skupien és *mtsai.*, 2017; Zheng és *mtsai.*, 2016). Kísérleti eredményeink szerint a fénykezelésre a DGDG/MGDG (3. táblázat) arány csökkent, ennek pedig nem volt negatív hatása az árpa levelek membrán stabilitására (7. ábra). A kék fény megvilágítás erőteljesebben csökkentette ezt az arányt mint a távolivörös kiegészítés és ez a változás valószínűleg lényegesen hozzájárulhatott a fagyteszt után a kontrollénál jobb fotoszintézis hatékonysághoz (8. ábra). Ezt a feltételezésünket alátámasztja, egy a lúdfüben etilén kezeléssel előidézett, levél-öregedési modellkísérlet eredménye. A kísérletből azt a következtetést vonták le, hogy a kloroplasztizok

magasabb MGDG tartalma meghatározó a fotoszintetikus aktivitás fenntartásához (Jia és Li, 2015).

8.3.2 A membránt alkotó foszfolipidek változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A foszfolipidek a töltöttségük miatt nélkülözhetetlenek a membránok felépítésében, ugyan akkor foszfát raktár funkciót is betöltenek (Andersson és *mtsai.*, 2003; Benning, 1998; Dormann és Benning, 2002; Essigmann és *mtsai.*, 1998; Jouhet és *mtsai.*, 2003; Kelly és *mtsai.*, 2003). Korábbi eredményeink alapján a PL-k a legfontosabb alkotóelemek, legalábbis jelmolekulákként, ezen egyedülálló fényminőséggel szabályozott akklimatizációs folyamat során (Gierczik és *mtsai.*, 2017). A PL mennyisége kis mértékben megemelkedett megemelt arányú távolivörös megvilágítás hatására (9. ábra), ami utalhat a szabad szterinek mennyiségének emelkedésére, ez pedig javíthatja a hidegtűrést (Uemura és *mtsai.*, 1995b).

8.3.3 A plazma membrán PC/PE arányának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

Érdeemes szem előtt tartanunk, hogy a kísérlet során a növények csak egy előedzési állapotot képesek elérni, mivel ahhoz, hogy a teljes hideg akklimatizáció kialakuljon, 3-5 hét hidegkezelésre lenne szükség (Bohn és *mtsai.*, 2005). A PC/PE arány nem változott szignifikánsan a távolivörös fény kezelés hatására, ellenben a kék fény önmagában vagy a távolivörös fénykiegészítéssel kombinálva szignifikánsan csökkentette a PE mennyiségét, ugyanakkor növelte a PC tartalmat és egyúttal ennek arányát (12. ábra., 4. táblázat). A PC ellentétben a PE-vel a kettősmembránt alkotó lipidek csoportjában tartozik, és ráadásul az egyszikű növények esetében a legnagyobb mennyiségben található membrán lipid alkotó (Umeura és Steponkus 1994). Valószínű, hogy a PC/PE arány megnövelése az egyik oka annak, hogy a kék fénykiegészítés hatékonyan növeli az árpanövények fagyűrését (Takahashi és *mtsai.*, 2016).

8.3.4. A membrán lipidek DBI-ének változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

Többszörösen megerősítették, hogy a zsírsavak fejcsoportjához kapcsolódó acil láncoknak telítetlensége döntő szerepet játszik a hidegakklimatizáció kifejlődésében a membrán

fluiditásának modulálásával (Falcone és *mtsai.*, 2004). Ennek a jelenségnek a leírására alkalmazhatjuk a DBI-t, melynek magasabb értéke fluidabb membrán szerkezetre utal. Az össz DBI alapján elmondhatjuk, hogy míg a megemelt arányú távolivörös fénykezelés nem befolyásolta ezt a paramétert, addig a távolivörös fényhez hozzáadott kék fény és a monokromatikus kék fény igen (10. táblázat). A lipidek össz kettőskötés mennyiségének az indexe megemelkedett a kiegészítő fények alkalmazása során (10. táblázat).

Részletes elemzés azonban kiderítette, hogy a megemelt arányú távolivörös fény hatására a DGDG (12. táblázat), az MGDG (11. táblázat), a PE (14. táblázat) és a PC DBI (13. táblázat) értékeiben változás ment végbe. Ezek a lipid családok képviseltetik magukat a legnagyobb mértékben a membrán dinamikájának szabályozásában (Harwood és Jones, 1989). Amíg 15 °C-os megemelt arányú távolivörös kezelés hatására a DGDG DBI (12. táblázat) csökkent, addig az MGDG DBI (11. táblázat) megemelkedett, ami 5 °C-on is felfedezhető, ugyanakkor a PC DBI (13. táblázat) és a PE DBI (14. táblázat) nem változott ellentétesen. Ehhez képest a távolivörös + kék, valamint a monokromatikus kék kezelések a DGDG DBI mennyiségét megemelték 15 °C-on egy nap után, viszont csökkentették a tizedik napra. Azonban 5 °C-on a távolivörös fényhez hozzáadott kék fény hatására a DGDG DBI mennyisége megemelkedik (12. táblázat), továbbá ezzel párhuzamosan az MGDG DBI mennyisége minden esetben magasabb volt (11. táblázat).

Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a kék fény hatására megemelkedett a PG DBI értéke (15. táblázat). Korábbi eredmények szerint a membrán lipidek telítetlenségének növelése megnövelte az alacsony hőmérsékletű fotoinhibícióval szembeni toleranciát transzformált cianobaktériumokban (Gombos és *mtsai.*, 1994). Hasonló emelkedést tapasztalhattunk a vizsgált őszi árpa levelek lipid tartalmában a kiegészítő fények alkalmazása során. Murata és munkatársai kimutatták, hogy magasabb rendű növényekben a PG-molekulák zsírsavláncainak telítetlensége befolyásolja a növény hidegérzékenységét (Gombos és *mtsai.*, 1994; Murata és *mtsai.*, 1982). A telítetlen PG jelentőségét az alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció elleni védelemben más szerzők is megerősítették (Ariizumi és *mtsai.*, 2002; Moon és *mtsai.*, 1995).

8.3.4 A membránt alkotó lipid fajták változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A szénláncok hossza és telítetlensége szerinti felosztás alapján az MGDG (13. ábra) esetében fénykezelésre adott válasznak tekinthetjük a 36:6, 36:4 és 36:5 csoportok mennyiségének csökkenését, 15 °C -on pedig a 34:1 és a 34:3 csoportok azok, melyek mennyisége

megemelkedett távolivörös fényhez hozzáadott kék fénykezelés hatására.

DGDG (14. ábra) esetében a 36:6 és 36:2 csoportok mutatnak hőmérséklettől független emelkedést, míg a 38:6 ellentétesen reagál a hozzáadott távolivörös megvilágítás és a távolivörös fényhez hozzáadott kék fénykezelésre. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kék fényű megvilágítás mellett a tilakoid membrán lipidjeinek szaturáltsági szintje megemelkedett, de ez nem általánosan következett be.

A PE (15. ábra) család zsírsav láncai közül a 34:3 és a 36:4 melyek a fénykezelés mellett változtak. A 36:6 minden esetben megemelkedett, míg a 34:3 15 °C-on lecsökkent, de 5 °C-on megemelt arányú távolivörös megvilágítás hatására megemelkedett, viszont távolivörössel kombinált kék fény hatására lecsökkent.

A PC lipid család zsírsav láncai közül a 36:6 minden esetben megemelkedik, míg a 36:4 15 °C-on lecsökken, de 5 °C-on a megemelt arányú távolivörös megvilágítás mellett megemelkedett, viszont távolivörössel kombinált kék fény hatására lecsökkent. Ugyanakkor jelenleg nem ismert a pontos funkciójuk ezeknek a fajtáknak.

Az eredményeink alapján a különböző spektrumú hozzáadott fény- és hőmérsékletkezelés hatására jellemzően a legnagyobb mennyiségben előforduló lipid fajta mennyisége emelkedett meg a lipid családokban. Ezek a változások szerint nem csak a kloroplasztisz, de a tilakoid membránszerkezete, fluiditása is megváltozott.

A lipidcsaládok telítetlenségének eloszlása is meghatározható a rendelkezésre álló adatokból. Ezek alapján láthatjuk, hogy melyek azok a jellemző változások, amelyek végbe mennek a kettős kötések számának eloszlásában a különböző zsírsav láncokban.

8.3.5 A tilakoidmembránt alkotó lipidláncok lánchossz és kettős kötés szám szerinti összesége

A 18. és 19. táblázatban látható eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a megemelt arányú távolivörös fény, valamint ennek kiegészítése monokromatikus kék fénnel, de önmagában a kék fény is megemelte egyes lipidláncok össz mennyiségét (34:3, 34:2, 36:6, 36:5, 36:4, 36:3, 38:6 és 38:4). A felsorolt lipidláncokat felbonthatjuk 18:0 és 16:0 hosszúságúakra, melyek 0-3 közötti kettős kötés számmal rendelkezhetnek egy láncon belül. Az általunk alkalmazott LC-MS technika használatakor nem határoztuk meg sem a láncok elhelyezkedését, sem azok egyedi hosszát. Ugyanakkor ismerjük azok össz hosszát és mind a két láncban

megtalálható kettős kötések számát. Ez alapján elmondhatjuk, hogy többségében a kisebb láncosszú, illetve a több kettőskötést tartalmazó lipidfajták mennyisége nőtt a kezelés hatására, emiatt a hosszú (38) szénláncú frakció aránya csökkent. Ez összecseng azzal a nézettel, mely szerint a lipidláncok hosszának csökkenése a hidegedződés során fagy esetén hozzájárul a membrán integritásának megőrzéséhez (Rawat és *mtsai.*, 2021). Ebből kiindulva feltételezhetjük, hogy a megvilágításra használt kiegészítő fények elősegítették a növények pre-hardening folyamatait a tilakoid membránban. Ezáltal támogatva a fotoszintetikus membrán alkalmazkodását az elkövetkező fagyos időszakhoz.

8.3.6 A membránt alkotó lipidek zsírsavláncai kettőskötés-tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A PC acilláncok DB (13. táblázat) eredményeinek vizsgálata során láthatjuk, hogy a megemelt arányú távolivörös megvilágítás mellett az öt és kettő kettőskötéssel rendelkező láncok mennyisége csökkent 15 °C-on, viszont 5 °C-on elsősorban a három és a kettő kettőskötéssel rendelkezőké csökkent. A távolivörössel kombinált kék fény és a monokromatikus kék kezelés hatására ugyanezek az értékek megemelkedtek. A távolivörös és kék, valamint monokromatikus kék megvilágítás is hatást gyakorolt a PC és a PE lipidek alcsaládjainak kettős kötéseinek számára. A kettős kötések számának növekedésével szinte bizonyos, hogy a membrán fluiditása is megváltozott, ami összecseng a hideg elleni védekezés folyamatával. A nagyobb kettőskötési számmal rendelkező láncok mennyisége megemelkedett a hidegkezelés hatására kiegészítő távolivörös megvilágítás mellett, ettől erőteljesebb emelkedést tapasztalhatunk távolivörössel kombinált kék fény hatására. Ugyanezt a változást okozta a monokromatikus kék fény megvilágítás 15 °C-on is (16. táblázat). Korábban leírták, hogy a lipidláncok telítetlenségének a növekedése a PE esetében összefüggésben áll a gabonafélék és a lúdfű hidegakklimatizációval (Alberdi és *mtsai.*, 1993; Lichtenthaler, 1987; Uemura és *mtsai.*, 1995b; Zuniga G. E. és *mtsai.*, 1990). A fagyálló „Onice” őszi árpa jóval magasabb főleg telítetlen szabadzsírsav-tartalommal rendelkezik, mint a „Gitane” fagyérzékeny árpa (Murelli és *mtsai.*, 1995).

Bhon és munkatársai (2005) azt javasolták, hogy a PE család lipidfajtaiban a hideg hatására bekövetkező változásokat gabonafélékben diagnosztikai markerként alkalmazhatjuk a fagytüró képesség előrejelzésére (Bohn és *mtsai.*, 2005). Eredményeink összecsengenek ezzel az állítással. Valamint feltételezzük, hogy a megemelt arányú távolivörös, a távolivörössel kombinált kék fény és a monokromatikus kék a PE fajták változtatásával már 15 °C-on megemelte a „Nure” fagytüró

őszi árpa hidegakklimatizációs szintjét (15. ábra).

8.3.7 A levélben található lipidek lizoltartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A lipidek lebontási és felépítési folyamatai során lizolszármazékok is keletkeznek. Ezek mennyisége az izolálási folyamat során bekövetkező oxidálódás alkalmával is megemelkedhet, de a membrán sérülését is mutathatja a hideg kezelés hatására. Hideg vagy fagystressz során a membrán lipid összetételében változások következnek be, mely befolyásolja a jelátvitelben szerepet játszó lipidek képződését. A sejt receptorai a lipidmolekulákat fejcsoportjaik alapján ismerik fel (Sheng és *mtsai.*, 2015). Korábbi eredmények szerint a hideg kezelés hatására a LPC és a LPE megemelkedett lúdfű esetében (Wolti és *mtsai.*, 2002). Kísérleteink alapján a megemelt arányú távolivörös kezelés hatására az LPC mennyisége 15 °C-on nem változott, míg a kék fénykezelések hatására 10 nap elteltével szignifikánsan csökkent. Alacsony hőmérsékleten a fénykezeléseknek nem volt szignifikáns hatása az LPC tartalomra (20. táblázat). Az LPE mennyisége hasonlóan az LPC esetében tapasztaltakhoz megemelt arányú távolivörös fénymegvilágítás hatására nem változott lényegesen. A kombinált távolivörös és kék fény kiegészítés hatására azonban szignifikánsan csökkent (21. táblázat).

Ezek az eredmények utalhatnak arra, hogy az általunk alkalmazott kék fénykezelés lipid átalakulásokat indukált, melynek hatására a lizolszármazékok beépülnek a membránba, ezzel növelve azok stresszel szembeni ellenálló képességét.

8.3.8 A levél HexCer tartalmának változása különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására

A HexCer lipidcsaládról ismert, hogy részt vehet a különféle stresszfolyamatokban és a sejthalál szabályozásában, valamint az abszcizinsav jelátvitel szabályozásában is (Jarillo és *mtsai.*, 1993; Thompson és *mtsai.*, 2010). Eredményeink szerint a megemelt arányú távolivörös kezelés hatására a (42:2)-3 fajta mennyisége megemelkedett 5 °C-on hét nap után, ami arra utalhat, hogy a megemelt arányú távolivörös fény szabályozhatja ennek a csoportnak a bioszintézisét (18. ábra D). A távolivörössel kombinált kék fény és a monokromatikus kék fény hatására lecsökkent a (38:1)-3, a (40:1)-3, a (42:2)-3 és a (42:1)-3 lipidfajták mennyisége (18. ábra). Ezeket a változásokat hidegakklimatizációs folyamatoknak tekinthetjük, melyet a megemelt arányú távolivörös, a távolivörös fényhez hozzáadott kék fény és a monokromatikus kék fénykezelések

váltak ki. Abban az esetben, ha távolivörös fényhez hozzáadott kék fény és a monokromatikus kék fénykezelést alkalmaztunk, akkor a bemutatott lipid fajták mennyisége minden esetben csökkent (18. ábra).

Az eddigi eredmények rámutatnak arra a tényre, hogy a fehér fényű megvilágítás során a vörös/távolivörös arány csökkenése vagy a kék fény hozzáadása (Imai és *mtsai.*, 2021a) hozzájárul a pre-hardening kialakulásában őszi árpában az által, hogy a membrán fluiditását megemeli (telítettség növelése a lipidoldalláncokban, DGDG/MGDG arány változás), a tilakoid membránt alkotó lipidek oldalláncai lerövidülnek, a jelmolekulaként szolgáló lipidek (PA, PS, HexCer) mennyisége megemelkedik, valamint a lipid láncok előállításában és átalakításában résztvevő szintáz és foszfolipáz gének átíródásának mértéke megemelkedik (*MGDI*, *NC*, *LOC*, *PLD α -1*). .

9 ÖSSZEFOGLALÁS

A növények genetikailag meghatározott fagyűrésének kialakulásához egy hosszú akklimatizációs folyamat szükséges (hidegdedződés), melyet döntően a külső hőmérséklet és a fényviszonyok határoznak meg. A kísérleteink elkezdésekor az már ismert volt, hogy ha az árpanövények megvilágítására használt fehér fényt távolivörös fénnel egészítik ki, akkor az növeli a növények fagyállóságát még viszonylag magas hőmérsékleten is (15 °C). Arról is volt már információ, hogy a kék fény is pozitívan befolyásolja a fagyállóságot. Azonban arról még nem voltak közölt eredmények, hogy milyen metabolikus folyamatok vezetnek a modulált színek hatására bekövetkező fagyűrés növeléséhez. E jelenség felderítése érdekében növénynevelő kamrákban modulált spektrumú LED megvilágítás mellett különböző hőmérsékleteken (15 és 5 °C) fiatal „Nure” őszi árpanövényeket neveltünk és ezt követően végeztük el a fagytesztet. Tanulmányoztuk a kezelt növények leveleinek vezetőképességét, valamint néhány fotoszintetikus paraméterét és lipidösszetételét.

A növények hideghez történő alkalmazkodása során dinamikusan változik sejtjeik lipidmembránjainak összetétele. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a fehér fény távolivörössel és kék fénnel kombinált kiegészítése miként befolyásolja az árpa levelek membránlipid-összetételét különböző hőmérsékleteken. Ezen a kérdéskörön belül elsősorban az árpa levelek lipidbioszintézisben résztvevő főbb gének expressziós mintázatát, lipid-összetételét és a lipidek zsírsavláncainak kettős kötés tartalmát vizsgáltuk.

Megfigyeléseinket a 19. ábrán foglaltuk össze.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat vonhatjuk le:

- 1 A fagyűrés meghatározására alkalmazott vezetőképességen alapuló módszer és a klorofil fluoreszcencia vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a hozzáadott távolivörös és kék fény növeli az árpa fagyűrő képességét. A kék fénykiegészítés 15 °C-on elősegíti a kloroplasztisz és a tilakoidmembránok egységének megőrzését. A lipid metabolizmust képes befolyásolni a kék és a távolivörös fény, mely szignálként szolgál.*
- 2 A távolivörös fény hatást gyakorol a lipid metabolizmus néhány meghatározó génjének az expressziójára. Esetünkben a távolivörös megvilágítás többszörösére növelte a DGD1 expresszióját 15 °C-on, függetlenül a megvilágítás hosszától. Alacsony hőmérsékleten (5 °C) a távolivörös fény kevésbé hatott, sőt az egy napos kezelés még gátolta is e gének expresszióját. Azonban, az MGDG és a DGDG mennyisége nem korrelált az MGD2 és a DGD1 gének kifejeződésével, mivel össz mennyiségüket nem befolyásolta a távolivörös*

fénykezelés.

Az *NC* gén expressziója a *DGD1* expressziójával parallel változott. Ez a változás igazolja, hogy a ceramidok, mint jelátviteli lipidek fontos szerepet játszhatnak a hidegakklimáció fényregulációjában.

A megemelt arányú távolivörös kezelés átmenetileg csökkentette a *PLDa3* expresszióját egy napnyi 5 °C-os kezelés után. Azonban ez a pozitív hatás egy hét elteltével elmúlt. Bár, a génexpresszió még mindig kisebb volt a 15 °C-on tartott kontroll mintákhoz képest, de magasabb volt, mint a fehér fénnel megvilágított 5 °C-on nevelt kontroll mintáké. Ez a jelenség arra utal, hogy a távolivörös kiegészítés ebben a tekintetben ellentétesen hat a hidegkezeléshez viszonyítva.

A *LOC* relatív expressziója a megemelt arányú távolivörös megvilágítás szabályozása alatt állhat hőmérsékletfüggő módon, mivel 5 °C-on a *LOC* mRNS expressziója lecsökkent a távolivörös kiegészítő fény alkalmazása során. Ebből levonható az a következtetés, hogy a megemelt arányú távolivörös megvilágítás hatására a növény lipidbontó folyamatai gátlódnak. Feltételezhető, hogy e módon a távolivörös fény hozzájárul a fagytürés növeléséhez.

- 3 A „Nure” őszi árpa levél membránjainak összlipid tartalma változik különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására. Valószínűsíthető, hogy a távolivörös fény és a kék fény kiegészítés által okozott MGDG koncentráció növekedés a kloroplasztisz membránban hozzájárulhatott az árpa levelek fagytürésének növekedéséhez.

Feltételezzük, hogy a fénykezelések által kiváltott átmenetileg magasabb PG-tartalom elősegíthette a tilakoidmembrán megfelelő működését 5 °C-on.

Esetünkben a PC mennyisége hőmérséklettől függetlenül szignifikánsan emelkedett kék fénykezelés hatására, míg a távolivörös fény nem hatott rá.

Kísérleteink során a hozzáadott távolivörös kezelés hatására a PA szint nem változott, viszont a távolivörössel kombinált kék fény és a monokromatikus kék hatására lecsökkent. Ez a tendencia független volt a hőkezeléstől. A PA mennyisége a többi lipid családdhoz hasonlóan jelentősen változott a kezelések hatására, mely összefügghet azzal, hogy a PA a lipidszintézis egyik legfontosabb prekursora.

- 4 A különböző spektrális összetételű megvilágítás hatást gyakorol a membrán DGDG/MGDG arányára. Kísérleti eredményeink szerint a fénykezelésre a DGDG/MGDG arány csökkent, ennek pedig nem volt negatív hatása az árpa levelek membrán stabilitására. A kék fény megvilágítás erőteljesebben csökkentette ezt az arányt, mint a távolivörös kiegészítés és ez

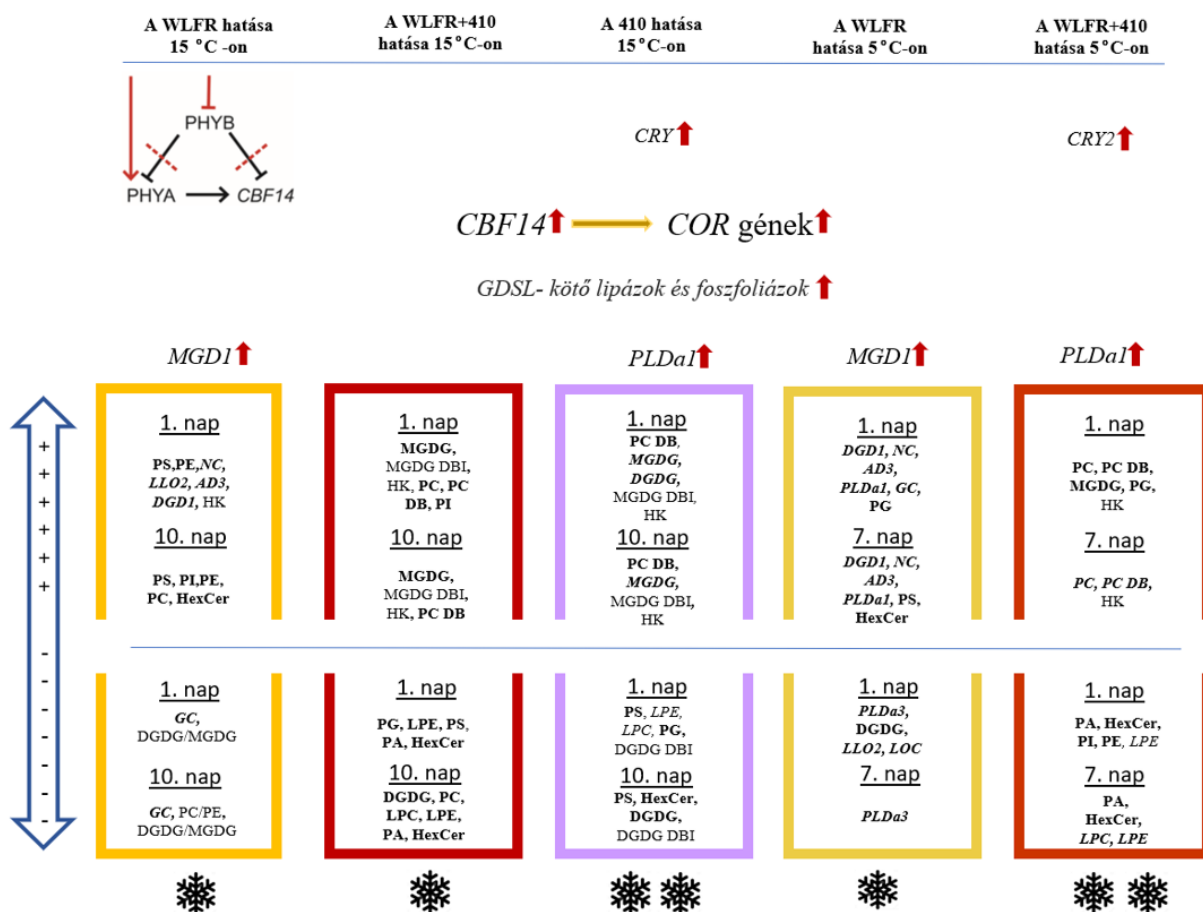
a változás lényegesen hozzájárulhatott a fagyűrös növekedéséhez.

- 5 *A sejtmembránt alkotó foszfolipidek mennyisége különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására változik.* A foszfolipidek mennyisége kis mértékben megemelkedett a nagyobb arányú távolivörös megvilágítás hatására, ami utalhat a szabad szterinek mennyiségének emelkedésére, ez pedig javíthatja a hidegtűrést. *A távoli vörös kiegészítés alkalmazása során mind a PC, mind a PE mennyisége megemelkedik, de PC/PE arány nem változik.* Ugyanakkor a távolivörössel kombinált kék fénykezelés hatására a PC és a PE mennyisége ellentétes irányba változik, a PC/PE arány növekedését eredményezve. Ez a változás nagy valószínűséggel az egyik lényeges oka annak, hogy a kék fény hozzáadva a fehér + távolivörös fény kombinációhoz, tovább növeli a fagyállóságot. A PC köztudottan alkotó eleme a kettős-lipidmembránnak, míg a PE nem. A PC/PE arány növekedése stabilizálhatja a membránt stressz körülmények között.
- 6 *A membránt alkotó lipidek zsírsavláncainak kettőskötés-tartalmára is hatást gyakorol a különböző spektrális összetételű megvilágítás.* Korábbi megállapítások szerint a PE lipid család telítetlenségének változása együtt jár a gabonák fagyűrő képességének emelkedésével. Eredményeink összecsengenek ezzel az állítással. Valamint a megemelt arányú távolivörös, a távolivörössel kombinált kék és a monokromatikus kék fény a PE fajták változtatásával már 15 °C-on megemelte a „Nure” fagyűrő őszi árpa hidegakklimatizációs szintjét. *A kettőskötések számának növekedése következtében természetesen a membránlipidek kettős kötés indexének értéke is nőtt a különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására.* Már 15 °C-on is megemelkedett a vizsgált őszi árpa levelek össz kettős kötés indexe hozzáadott fény kiegészítés hatására.
Kiemelendő a PG kettős kötés indexének emelkedése, kék fény hatására, mely elősegítheti a tilakoid membránban helyet foglaló fotoszintetikus elektrontranszportláncot alkotó fehérjekomplexek kiegyensúlyozott működését.
- 7 *Bizonyos esetekben a membránt alkotó lipid fajták változása következik be, valamint a rövidebb lipidláncok mennyisége és azok telítetlensége megnő különböző spektrális összetételű megvilágítás hatására.* Az eredményeink alapján a különböző színekű hozzáadott fény-és hőmérsékletkezelés hatására jellemzően a legnagyobb mennyiségben előforduló lipid fajták szintje emelkedett meg a lipid családokban, mint a 36:6, 36:5, 36:4, 36:2, 34:3 és 34:1. Ezek a változások elősegítik a kloroplasztisz lipidmembránok fluiditásának növelését.
8. *A kék monokromatikus megvilágítás, illetve a távolivörös fénykezeléssel kombinált kék*

fénykiegészítés hatására a vizsgált levelek lizol tartalma csökken. Ez az alkalmazott fénykezelés által indukált összlipid mennyiség megemelkedésével, valamint az átépítő folyamatok serkentésével magyarázható.

9. *A levelek HexCer tartalmának változása figyelhető meg különböző spektrális összetételű megvilágítás mellett.* Egyes HexCer fajták jelentősen megemelkedtek a fehér fényt kiegészítő távolivörös fény alkalmazása során. Ezeknek a csoportoknak szerepük lehet a jelátvitelben.

A fent leírt eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a fényösszetétel által indukált fagytolerancia fontos része az előedzési folyamatoknak. Összeségében elmondható, hogy a hideg kezelés által indukált lipidóm változása jól korrelál a hidegakklimatizációval és a megvilágítás összetétele hatást gyakorol a fagy tolerancia kialakulására. Az eredményeinket a következő sematikus modellben foglalhatjuk össze (9. ábra).



9. ábra A hidegkezelés és a különböző megvilágítások hatásának összesítése. A mintákat megvilágítottuk távolivörsszel kiegészített fehér fénnel (WLFR), kombinált távolivörös + kék fénnel (WLFR+410), valamint monokromatikus kék fénnel (410 nm). A fénykezelés mellett két fajta nevelési hőmérsékletet (5 és 15 °C) alkalmaztunk. A mintákat a kezelés első (1. nap) és utolsó napján vettük le, amely a 15 °C esetében tíz nap (10. nap) volt, míg az 5 °C esetében hét (7. nap). A levélmintákat minden esetben a harmadik levél szint középső részéből metsztük ki. Az eredményeket az ábrákon a kezelések szerint csoportosítottuk, valamint az értékek változása, a génexpresszió, a lipid családok és a kalkulált értékek szerint. Minden kezelés alatt bemutatjuk az eddig felderített

ismereteket. Úgy mint, hogy a megemelt arányú távoli vörös fény kiegészítés gátolja a PHYB átíródását, ez által a PHYA átíródása felszabadul a gátlás alól és serkenti a CBF14 géncsalád átíródását. A 410 nm-es megvilágítás mind 15 mind 5 °C-on aktiválja a CRY-t. A CBF14 aktiválása elindítja a COR génekét is, ez a folyamat hatást gyakorol a GDGL-kötő lipázok és foszfolipázok aktivitására. Továbbá ismert, hogy a távolivörös fény hatására az MGD1 enzim mennyisége megemelkedik hőmérséklettől függetlenül. Kék fény hatására a PLD α 1 enzim mennyisége emelkedik meg szintén hőmérséklettől függetlenül. A statisztikai elemzést egy utas ANOVA és Dunnett post-hoc tesztel végeztük a fehér fényvel megvilágított (WL) mintákat használva kontrollként. A statisztikai próbát 3-9 független biológiai ismétlésen végeztük el. Az ábrán azok a paraméterek találhatók meg, melyek legalább 0,1 szignifikanciaértékkel térnek el a kontroll (WL) mintáktól.

Rövidítések: alkalin ceramidáz 1 (ACER1); alkohol dehidrogenáz 3 (AD3); NADPH-függő aldehid reduktáz kötő protein, kloroplasztisz (ARL); digalaktozildiacil glicerol szintáz 1 (DGD); digalaktozil diacilglicerol (DGDG); nem-lizoszomális glükózilceramidáz (GC); ceramid (HexCer); a tilakoid membránt alkotó lipidek hosszának és kettőskötés számának a megoszlása (HK); linolát 9S-lipoxigenáz 2 (LLO 2); lipoxigenáz 2.3, kloroplaszt (LOC); monogalaktozil diacilglicerol szintáz 2 (MGD2); monogalaktozil-diacil-glicerol (MGDG); mono-galaktozil-diacil-glicerol/ di-galaktozil-diacil-glicerol arány (MGDG/ DGDG); neutrális ceramidáz (NC); foszfatidil-kolin (PC); foszfatidil-kolin/ foszfatidil-etanolamin arány (PC/ PE); foszfatidil-etanolamin (PE); foszfatidil-glicerol (PG); foszfatidil-inozitol (PI); foszfolipáz-D-alfa 1 (PLD α 1); foszfolipáz-D alfa 2 (PLD α 2); foszfolipáz-D alfa 3 (PLD α 3); foszfatidil-szerin (PS)

10 SUMMARY

The degree of the frost hardiness determined by the inherent genetic background of the plants highly depends on two environmental factors, namely temperature and light quality and quantity during the period of cold acclimation (cold hardening). When we started the experiments, described in this thesis, it was already known that the substitution of the incident white light by additional far-red light increased the frost tolerance of cereals including barley even in relative high acclimation temperature (15 °C). In addition, the positive effect of blue light on frost hardiness was also published. But there was no any available publication about the possible metabolic changes caused by the application of modulated white light spectra. To elucidate that process, winter barley ('Nure' cv.) plantlets were raised in plant growth chambers using adjustable LED light sources at different temperatures (15 and 5 °C) and these plants were subjected to frost testing. The degree of the injury caused by the freezing temperatures on the barley leaves was determined by two methods i.e. ion leakage test of the leaves of the treated plants as well as measurement of photosynthetic parameters such as F_v/F_m and $Y(II)$ by fast chlorophyll-a fluorescence transient method.

As plants adapt to the cold, the composition of the lipid membranes of their cells changes dynamically. We sought the answer to the question of how the addition of white light combined with far-red and blue light affects the membrane lipid composition of barley leaves at different temperatures. Within the scope of this question, we primarily examined the expression pattern of major genes involved in barley leaf lipid biosynthesis, lipid composition, and double-binding content of lipid fatty acid chains.

Based on our results, we can draw the following conclusions:

1. *Far-red light supplementation has an effect on the expression of some key genes in lipid metabolism.* Far-red light supplementation multiplied the expression of *DGD1* at 15°C regardless of the length of illumination. At low temperatures (5°C), far-red light supplementation had less effect, although one-day treatment already inhibited the expression of these genes. However, the amounts of MGDG and DGDG did not correlate with the expression of the *MGD2* and *DGD1* genes, as their total amounts were not affected by far-red light treatment.

The expression of the *NC* gene changed in parallel with the expression of *DGD1*. This change demonstrates that ceramides as signaling lipids may play an important role in the light regulation of cold acclimatization.

Elevated rates of far-red treatment transiently reduced *PLD α 3* expression after one day of 5°C treatment. However, this positive effect passed after a week. Although, gene expression was still lower compared to control samples kept at 15°C, it was higher than that of control samples grown at 5°C illuminated with white light. This phenomenon suggests that far-red supplementation has the opposite effect in this respect compared to cold treatment.

The relative expression of *LOC* may be under the control of elevated rates of far-red illumination in a temperature-dependent manner, as at 5°C, the expression of *LOC* mRNA decreased during the use of far-red supplementary light. From this it can be concluded that the increased lipid degradation processes of the plant are inhibited by the increased ratio of far-red illumination. It can be assumed that in this way the far-red light contributes to the increase of frost tolerance.

2. *The total lipid content of “Nure” winter barley leaf membranes changes under different spectral compositions of illumination.* It is likely that the increase in MGDG concentration induced by high far-red/red-light ratio and blue light supplementation in the chloroplast membrane may have contributed to the increase in frost tolerance of barley leaves.

It is hypothesized that the transiently higher PG content induced by light treatments may have contributed to the proper functioning of the thylakoid membrane at 5°C.

The amount of PC increased significantly regardless of temperature under the effect of blue light treatment, while it was not affected by far-red light.

In our experiments, PA levels did not change with the addition of far-red treatment, but combined far-red and blue, and monochromatic blue light changed it. This trend was independent of heat treatment.

The amount of PA, like other lipid families, changed significantly with treatment, which may be related to the fact that PA is one of the most important precursors of lipid synthesis.

3. *Different spectral compositions have an effect on the membrane DGDG/MGDG ratio.* According to our experimental results, the DGDG/MGDG ratio decreased by light treatment. Blue light illumination reduced this ratio more strongly than the far-red supplement and this change may have contributed significantly to increase frost tolerance.

4. *The amount of phospholipids that make up the cell membrane changes under different spectral compositions of illumination.* The amount of phospholipids is slightly increased due to the higher rate of far-red illumination, which may indicate an increase in the amount of free sterols, which may improve cold tolerance. *The PC/PE ratio of the membrane*

depends on the spectral composition of the illumination. With far-red supplementation, the amount of both PC and PE increases, but the PC/PE ratio does not change. However, the combined far-red and blue light changes the amount of PC and PE in the opposite direction resulting in an increase in the PC/PE ratio. This change is most likely one of the main reasons why adding blue light to the white+far-red light combination further increases frost resistance. PC is a well-known component of the bilayer lipid membrane while PE is not. An increase in the PC/PE ratio can stabilize the membrane under stress conditions.

5. *The double bond content of the fatty acid chains of the lipids forming the membrane was also influenced by the different spectral compositions.* Previous findings suggest that changes in the unsaturation of the PE lipid family are associated with an increase in the frost tolerance of grains. Our results are consistent with this statement. Also, the combined far-red and blue light increased the cold acclimatization level of “Nure” winter barley at as high as 15 °C by the alteration of PE species distribution. As a result of the increase in the number of double bonds, the value of the double bond index of the membrane lipids also increased under the influence of different spectral compositions. Even at 15 °C, the total double bond index of the studied winter barley leaves increased as a result of added light supplementation.

The increase in the PG double bond index under the influence of blue light may promote the balanced function of the protein complexes forming the photosynthetic electron transport chain embedded in the thylakoid membrane.

6. *In some cases, changes in the lipid species that make up the membrane have occurred under different spectral compositions of illumination.* Based on our results, the levels of the most abundant lipid subspecies in the lipid families, such as 36:6, 36:5, 36:4, 36:2, 34:3 and 34:1. These changes help to increase the fluidity of chloroplast envelope and thylakoid membranes.

7. *As a result of blue or far-red+blue light combined illumination, the lysol content of the examined leaves decreased.* The light treatment we used induced lipid transformations. This increase is accompanied by an increase in total lipid content as well as stimulation of transformation processes.

8. *Changes in the HexCer content of the leaves were detected under different spectral compositions of illumination.* Some HexCer species were significantly elevated with the use of far-red light in addition to white light. These groups may play a role in signal transduction.

Based on the results described above, we can say that frost tolerance induced by light composition is an important part of pre-hardening processes. Overall, the change in lipidom induced by cold treatment correlates well with cold acclimatization and the spectral composition of illumination has an effect on the development of frost tolerance. Our observations are summarized in Figure 9.

11 IRODALOMJEGYZÉK

- Ahres M, Gierczik K, Boldizsar A, Vitamvas P, Galiba G.** 2020. Temperature and Light-Quality-Dependent Regulation of Freezing Tolerance in Barley. *Plants (Basel)* **9**.
- Alberdi M, Corcuera LJ, Maldonado C, Barrientos M, Fernández J, Henríquez O.** 1993. Cold acclimation in cultivars of *Avena sativa*. *Phytochemistry* **33**, 57-60.
- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS.** 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* **537**, 128-132.
- Andrews J, Ohlrogge JB, Keegstra K.** 1985. Final step of phosphatidic Acid synthesis in pea chloroplasts occurs in the inner envelope membrane. *Plant Physiol* **78**, 459-465.
- Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, Nishida I, Murata N, Toriyama K.** 2002. An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant Cell Physiol* **43**, 751-758.
- Arisz SA, Heo JY, Koevoets IT, Zhao T, van Egmond P, Meyer AJ, Zeng W, Niu X, Wang B, Mitchell-Olds T, Schranz ME, Testerink C.** 2018. DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE1 Contributes to Freezing Tolerance. *Plant Physiol* **177**, 1410-1424.
- Aubert A, Marion J, Boulogne C, Bourge M, Abreu S, Bellec Y, Faure JD, Satiat-Jeunemaitre B.** 2011. Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J* **65**, 958-971.
- Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J.** 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10960-10965.
- Babiychuk E, Muller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S.** 2003. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J* **33**, 899-909.
- Badawi M, Danyluk J, Boucho B, Houde M, Sarhan F.** 2007. The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Mol Genet Genomics* **277**, 533-554.
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF.** 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol* **24**, 701-713.
- Bannenberg G, Martinez M, Hamberg M, Castresana C.** 2009. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* **44**, 85-95.
- Barrero-Sicilia C, Silvestre S, Haslam RP, Michaelson LV.** 2017. Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Sci* **263**, 194-200.
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE.** 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8675-8679.
- Benning C.** 1998. Biosynthesis and Function of the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 53-75.
- Blaas N, Humpf HU.** 2013. Structural profiling and quantitation of glycosyl inositol phosphoceramides in plants with Fourier transform mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **61**, 4257-4269.
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R.** 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II.

Biochemical characterization. *J Biol Chem* **258**, 13281-13286.

Bogdanov M, Dowhan W. 1999. Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem* **274**, 36827-36830.

Bohn M, L  thje S, Sperling P, Heinz E, D  rffling K. 2005. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *Journal of Plant Physiology*.

Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ, Fincher GB. 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiol* **134**, 224-236.

Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R. 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **142**, 28-39.

Cacas JL, Furt F, Le Guedard M, Schmitter JM, Bure C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule JJ, Simon-Plas F, Mongrand S. 2012. Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* **51**, 272-299.

Canella D, Gilmour SJ, Kuhn LA, Thomashow MF. 2010. DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the PKKP/RAGR  KFK  ETRHP signature sequence. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 454-462.

Casal JJ. 2000. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol* **71**, 1-11.

Catala R, Medina J, Salinas J. 2011. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16475-16480.

Chao DY, Gable K, Chen M, Baxter I, Dietrich CR, Cahoon EB, Guerinot ML, Lahner B, Lu S, Markham JE, Morrissey J, Han G, Gupta SD, Harmon JM, Jaworski JG, Dunn TM, Salt DE. 2011. Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **23**, 1061-1081.

Chen LJ, Li HM. 1998. A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant J* **16**, 33-39.

Chen M. 2008. Phytochrome nuclear body: an emerging model to study interphase nuclear dynamics and signaling. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 503-508.

Chen M, Markham JE, Cahoon EB. 2012. Sphingolipid Delta8 unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. *Plant J* **69**, 769-781.

Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB. 2008. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 1862-1878.

Chen M, Thelen JJ. 2013. ACYL-LIPID DESATURASE2 is required for chilling and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 1430-1444.

Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15243-15248.

Crosatti C, Polverino de Laureto P, Bassi R, Cattivelli L. 1999. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene cor14b and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol* **119**, 671-680.

Cullis PR, de Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **559**, 399-420.

Degenkolbe T, Giavalisco P, Zuther E, Seiwert B, Hinch DK, Willmitzer L. 2012. Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **72**, 972-982.

- Demarsy E, Goldschmidt-Clermont M, Ulm R.** 2018. Coping with 'Dark Sides of the Sun' through Photoreceptor Signaling. *Trends Plant Sci* **23**, 260-271.
- Dong CJ, Cao N, Zhang ZG, Shang QM.** 2016. Characterization of the Fatty Acid Desaturase Genes in Cucumber: Structure, Phylogeny, and Expression Patterns. *PLoS One* **11**, e0149917.
- Dormann P, Benning C.** 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* **7**, 112-118.
- Dormann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C.** 1995. Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* **7**, 1801-1810.
- Douce R, Joyard J.** 1980. Lipids: structure and function. In: Stumpf PK (ed), *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, New York **4**, 321-362.
- Drobak BK, Heras B.** 2002. Nuclear phosphoinositides could bring FYVE alive. *Trends Plant Sci* **7**, 132-138.
- Dutilleul C, Benhassaine-Kesri G, Demandre C, Reze N, Launay A, Pelletier S, Renou JP, Zachowski A, Baudouin E, Guillas I.** 2012. Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytol* **194**, 181-191.
- Ehlert B, Hinch DK.** 2008. Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. *Plant Methods* **4**, 12.
- Essigmann B, Guler S, Narang RA, Linke D, Benning C.** 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1950-1955.
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR.** 2004. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* **4**, 17.
- Farkas G.** 1984. Növényi biokémia. Akadémia Kiadó.
- Feussner I, Wasternack C.** 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297.
- Francia E, Barabaschi D, Tondelli A, Laido G, Rizza F, Stanca AM, Busconi M, Fogher C, Stockinger EJ, Pecchioni N.** 2007. Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theor Appl Genet* **115**, 1083-1091.
- Franklin KA, Quail PH.** 2010. Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J Exp Bot* **61**, 11-24.
- Franklin KA, Toledo-Ortiz G, Pyott DE, Halliday KJ.** 2014. Interaction of light and temperature signalling. *J Exp Bot* **65**, 2859-2871.
- Franklin KA, Whitelam GC.** 2007. Light-quality regulation of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* **39**, 1410-1413.
- Fricano A, Rizza F, Faccioli P, Pagani D, Pavan P, Stella A, Rossini L, Piffanelli P, Cattivelli L.** 2009. Genetic variants of HvCbf14 are statistically associated with frost tolerance in a European germplasm collection of Hordeum vulgare. *Theor Appl Genet* **119**, 1335-1348.
- Galiba G, Stockinger EJ, Francia E, Milc J, Kocsy G, Pecchioni N.** 2013. Freezing Tolerance in the Triticeae. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **990**, 87-92.
- Gibson S, Arondel V, Iba K, Somerville C.** 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **106**, 1615-1621.
- Gierczik K, Novak A, Ahres M, Szekely A, Soltesz A, Boldizsar A, Gulyas Z, Kalapos B, Monostori I, Kozma-Bognar L, Galiba G, Vagujfalvi A.** 2017. Circadian and Light Regulated Expression of CBFs and their Upstream Signalling Genes in Barley. *Int J Mol Sci* **18**.
- Gigon A, Matos AR, Laffray D, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT.** 2004. Effect of drought stress

- on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann Bot* **94**, 345-351.
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF.** 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.
- Gombos Z, Wada H, Murata N.** 1994. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8787-8791.
- Gounaris K, Barber J.** 1983. MGDG The Most Abundant Polar Lipid in Nature. *TIBS*.
- Govindjee, Elton-Rye J., Folyer H.C., Knaff B. D., Moore L. A., Merchant S., Niyogi K., Parson W., Raghavendra A., Renger A., Hajime W., Norio M.** 2009. Lipid in photosynthesis, Essential and regulatory functions. *Springer* **30**.
- Guillas I, Guellim A, Reze N, Baudouin E.** 2013. Long chain base changes triggered by a short exposure of *Arabidopsis* to low temperature are altered by AHb1 non-symbiotic haemoglobin overexpression. *Plant Physiol Biochem* **63**, 191-195.
- Hagio M, Gombos Z, Varkonyi Z, Masamoto K, Sato N, Tsuzuki M, Wada H.** 2000. Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol* **124**, 795-804.
- Hagio M, Sakurai I, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada H.** 2002. Phosphatidylglycerol is Essential for the Development of Thylakoid Membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1456-1464.
- Hartel H, Lokstein H, Dormann P, Grimm B, Benning C.** 1997. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**, 1175-1184.
- Härtel H, Lokstein H, Dörmann P, N.Trethewey R, Benning C.** 1998. Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*.
- Harwood LJ, Jones AL.** 1989. Lipid Metabolism in Algae. *Advances in Botanical Research* **16**, 1-53.
- Heimburg T, Marsh D.** 1996. Thermodynamics of the Interaction of Proteins with Lipid Membranes. *Biological Membranes*, 405-462.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1938. The water-culture method for growing plants without soil / THE WATER-CULTURE METHOD FOR GROWING PLANTS WITHOUT SOIL Professor of Plant Nutrition and Chemist in the Experiment Station. 2 Instructor in Truck Crops and Junior Plant Physiologist in the Experi. . Smithsonian Institution Annual Report, 1884-1949.
- Hudson ME, Quail PH.** 2003. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol* **133**, 1605-1616.
- Huo C, Zhang B, Wang H, Wang F, Liu M, Gao Y, Zhang W, Deng Z, Sun D, Tang W.** 2016. Comparative Study of Early Cold-Regulated Proteins by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Reveals a Key Role for Phospholipase D α 1 in Mediating Cold Acclimation Signaling Pathway in Rice. *Mol Cell Proteomics* **15**, 1397-1411.
- Hüner NPA, Keshav Dahal, Rainer Bode, Kurepin LV, Ivanov AG.** 2016. Photosynthetic acclimation, vernalization, crop productivity and ‘the grand design of photosynthesis’. *Journal of Plant Physiology* **203**, 29-43.
- Imai H, Kawamura Y, Nagatani A, Uemura M.** 2021a. Effects of the blue light-cryptochrome system on the early process of cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **183**.

- Imai H, Kawamura Y, Nagatani A, Uemura M.** 2021b. Effects of the blue light–cryptochrome system on the early process of cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF.** 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF.** 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol* **127**, 910-917.
- Jarillo JA, Leyva AJ, Salinas JM, Martinez-Zapater.** 1993. Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiol* **101**, 833-837.
- Jarvis P, Dormann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J.** 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8175-8179.
- Jia Y, Li W.** 2015. Characterisation of Lipid Changes in Ethylene-Promoted Senescence and Its Retardation by Suppression of Phospholipase Ddelta in *Arabidopsis* Leaves. *Front Plant Sci* **6**, 1045.
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW.** 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**, 217-230.
- Jouhet J, Marechal E, Bligny R, Joyard J, Block MA.** 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* **544**, 63-68.
- Joyard J, Marechal E, Mieg C, Block MA, Dorne A-J, Douce R.** 1998. Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts. In P-A.Siegenthaler, N.Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 21-52.
- Kalapos B, Dobrev P, Nagy T, Vitamvas P, Gyorgyey J, Kocsy G, Marincs F, Galiba G.** 2016. Transcript and hormone analyses reveal the involvement of ABA-signalling, hormone crosstalk and genotype-specific biological processes in cold-shock response in wheat. *Plant Sci* **253**, 86-97.
- Kalisch B, Dormann P, Holz G.** 2016. DGDG and Glycolipids in Plants and Algae. *Subcell Biochem* **86**, 51-83.
- Kelly AA, Dormann P.** 2002. DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* **277**, 1166-1173.
- Kelly AA, Froehlich JE, Dörmann P.** 2003. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell* **15**, 2694–2706.
- Kenchanmane Raju SK, Barnes AC, Schnable JC, Roston RL.** 2018. Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Sci* **276**, 73-86.
- Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J.** 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**, 693-704.
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE.** 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356-360.
- Knox AK, Dhillon T, Cheng H, Tondelli A, Pecchioni N, Stockinger EJ.** 2010. CBF gene

- copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. *Theor Appl Genet* **121**, 21-35.
- Kovacs T, Szalontai B, Klodawska K, Vladkova R, Malec P, Gombos Z, Laczko-Dobos H.** 2019. Photosystem I oligomerization affects lipid composition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**, 1384-1395.
- Krupa Z, Huner NP, Williams JP, Maissan E, James DR.** 1987. Development at Cold-Hardening Temperatures : The Structure and Composition of Purified Rye Light Harvesting Complex II. *Plant Physiol* **84**, 19-24.
- Kurepin LV, Qaderi MM, Back TG, Reid DM, Pharis RP.** 2008. A rapid effect of applied brassinolide on abscisic acid concentrations in *Brassica napus* leaf tissue subject and to short-term heat stress. *Plant Growth Regulation* **55**, 165-167.
- Kuster GM, Drexel H, Bleisch JA, Rentsch K, Pei P, Binswanger U, Amann FW.** 1994. Relation of cyclosporine blood levels to adverse effects on lipoproteins. *Transplantation* **57**, 1479-1483.
- Latowski D, Goss R, Bojko M, Strzalka K.** 2012. Violaxanthin and diadinoxanthin de-epoxidation in various model lipid systems. *Acta Biochim Pol* **59**, 101-103.
- Lee CM, Thomashow MF.** 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15054-15059.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC, Denarie J.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Li HM, Yu CW.** 2018. Chloroplast Galactolipids: The Link Between Photosynthesis, Chloroplast Shape, Jasmonates, Phosphate Starvation and Freezing Tolerance. *Plant Cell Physiol* **59**, 1128-1134.
- Li HX, Xiao Y, Cao LL, Yan X, Li C, Shi HY, Wang JW, Ye YH.** 2013. Cerebroside C increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in wheat roots. *PLoS One* **8**, e73380.
- Li J, Bi FC, Yin J, Wu JX, Rong C, Wu JL, Yao N.** 2015. An *Arabidopsis* neutral ceramidase mutant *ncer1* accumulates hydroxyceramides and is sensitive to oxidative stress. *Front Plant Sci* **6**, 460.
- Lichtenthaler FW.** 1987. Karl Freudenberg, Burckhardt Helferich, Hermann O. L. Fischer: a centennial tribute. *Carbohydr Res* **164**, 1-22.
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR.** 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2686-2690.
- Liu K.** 2011. Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species. *J Food Sci* **76**, C334-342.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 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.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI.** 2013. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res* **116**, 489-509.
- Maibam P, Nawkar GM, Park JH, Sahi VP, Lee SY, Kang CH.** 2013. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance. *Int J Mol Sci* **14**, 11527-11543.

- Majlath I, Szalai G, Soos V, Sebestyen E, Balazs E, Vankova R, Dobrev PI, Tari I, Tandori J, Janda T.** 2012. Effect of light on the gene expression and hormonal status of winter and spring wheat plants during cold hardening. *Physiol Plant* **145**, 296-314.
- Manoharan K, Chae HS, Cha JM, Cho SH, Shin SH, Cho BH, Lee WS.** 2000. Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant Cell Physiol* **41**, 1143-1148.
- Mansilla MC, Banchio CE, de Mendoza D.** 2008. Signalling pathways controlling fatty acid desaturation. *Subcell Biochem* **49**, 71-99.
- Mansilla MC, de Mendoza D.** 2005. The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol* **183**, 229-235.
- Mansour MMF, Karima SHA, Hasan AYH.** 2015. Role of the Plasma Membrane in Saline Conditions: Lipids and Proteins.
- Markham JE, Lynch DV, Napier JA, Dunn TM, Cahoon EB.** 2013. Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 350-357.
- Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hematy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-Jeunemaitre B, Faure JD.** 2011. Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 2362-2378.
- Marla SR, Shiva S, Welti R, Liu S, Burke JJ, Morris GP.** 2017. Comparative Transcriptome and Lipidome Analyses Reveal Molecular Chilling Responses in Chilling-Tolerant Sorghums. *Plant Genome* **10**.
- McKersie BD, Leshem YY.** 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Michaelson LV, Napier JA, Molino D, Faure JD.** 2016. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochim Biophys Acta* **1861**, 1329-1335.
- Miki Y, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M.** 2019. Temporal proteomics of *Arabidopsis* plasma membrane during cold- and de-acclimation. *J Proteomics* **197**, 71-81.
- Miller AK, Galiba G, Dubcovsky J.** 2006. A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-Am2* in *Triticum monococcum*. *Mol Genet Genomics* **275**, 193-203.
- Minami A, Tominaga Y, Furuto A, Kondo M, Kawamura Y, Uemura M.** 2015. *Arabidopsis* dynamin-related protein 1E in sphingolipid-enriched plasma membrane domains is associated with the development of freezing tolerance. *Plant J* **83**, 501-514.
- Moellering ER, Muthan B, Benning C.** 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* **330**, 226-228.
- Moon BY, Higashi S, Gombos Z, Murata N.** 1995. Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6219-6223.
- Moor TSJ.** 1982. Phospholipid Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 235-259.
- Moore TS.** 1974. Phosphatidylglycerol synthesis in castor bean endosperm: kinetics, requirements, and intracellular localization. *Plant Physiol* **54**, 164-168.
- Muller P, Li XP, Niyogi KK.** 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* **125**, 1558-1566.
- Murata N, Sato N, Takahashi N, Hamazaki Y.** 1982. Compositions and positional distributions of fatty-acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiology* **23**, 1071-1079.
- Murelli C, Rizza F, Albini FM, Dulio A, Terzi V, Cattivelli L.** 1995. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiology Plantarum* **94**, 87-93.

- Murphy DJ.** 1990. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog Lipid Res* **29**, 299-324.
- Narayanan S, Prasad PV, Welte R.** 2016. Wheat leaf lipids during heat stress: II. Lipids experiencing coordinated metabolism are detected by analysis of lipid co-occurrence. *Plant Cell Environ* **39**, 608-617.
- Narvaez-Vasquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA.** 1999. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**, 2249-2260.
- Nicolson GL.** 2014. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1451-1466.
- Nishida I, Murata N.** 1996. CHILLING SENSITIVITY IN PLANTS AND CYANOBACTERIA: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 541-568.
- Noblet A, Leymarie J, Bailly C.** 2017. Chilling temperature remodels phospholipidome of Zea mays seeds during imbibition. *Sci Rep* **7**, 8886.
- Novak A, Boldizar A, Adam E, Kozma-Bognar L, Majlath I, Baga M, Toth B, Chibbar R, Galiba G.** 2016. Light-quality and temperature-dependent CBF14 gene expression modulates freezing tolerance in cereals. *J Exp Bot* **67**, 1285-1295.
- Novak A, Boldizar A, Gierczik K, Vagujfalvi A, Adam E, Kozma-Bognar L, Galiba G.** 2017. Light and Temperature Signalling at the Level of CBF14 Gene Expression in Wheat and Barley. *Plant Mol Biol Report* **35**, 399-408.
- Ohlrogge J, Browse J.** 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957-970.
- Ohta H, Shirano Y, Tanaka K, Morita Y, Shibata D.** 1992. cDNA cloning of rice lipoxygenase L-2 and characterization using an active enzyme expressed from the cDNA in Escherichia coli. *Eur J Biochem* **206**, 331-336.
- Olien CR, Smith MN.** 1977. Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiol* **60**, 499-503.
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK.** 2010. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol* **185**, 611-630.
- Pearce S, Zhu J, Boldizar A, Vagujfalvi A, Burke A, Garland-Campbell K, Galiba G, Dubcovsky J.** 2013. Large deletions in the CBF gene cluster at the Fr-B2 locus are associated with reduced frost tolerance in wheat. *Theor Appl Genet* **126**, 2683-2697.
- Perlikowski D, Kierszniowska S, Sawikowska A, Krajewski P, Rapacz M, Eckhardt A, Kosmala A.** 2016. Remodeling of Leaf Cellular Glycerolipid Composition under Drought and Re-hydration Conditions in Grasses from the Lolium-Festuca Complex. *Front Plant Sci* **7**, 1027.
- Quinn PJ.** 1988. Effects of temperature on cell membranes. *Symp Soc Exp Biol* **42**, 237-258.
- Rajashekar CB, Zhou HE, Zhang Y, Li W, Wang X.** 2006. Suppression of phospholipase D α 1 induces freezing tolerance in Arabidopsis: response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation. *J Plant Physiol* **163**, 916-926.
- Rawat N, Singla-Pareek SL, Pareek A.** 2021. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiol Plant* **171**, 653-676.
- Reifarth F, Christen G, Seeliger AG, Dormann P, Benning C, Renger G.** 1997. Modification of the water oxidizing complex in leaves of the dgd1 mutant of Arabidopsis thaliana deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry* **36**, 11769-11776.
- Rigaudy J, Klesney S, P.** 1979. Nomenclature of organic chemistry. Pergamon Press.
- Rizza F, Pagani D, Gut M, Prasil IT, Lago C, Tondelli A, Orru L, Mazzucotelli E, Francia F, Badeck FW, Crosatti C, Terzi V, Cattivelli L.** 2011. Diversity in the response to low temperature in representative barley genotypes cultivated in Europe *Crop Crop Science*.
- Rolfe SA, Scholes JD.** 2010. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions.

Protoplasma **247**, 163-175.

Rudiger W, Thummler F, Cmiel E, Schneider S. 1983. Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6244-6248.

Ruelland E, Pokotylo I, Djafi N, Cantrel C, Repellin A, Zachowski A. 2014. Salicylic acid modulates levels of phosphoinositide dependent-phospholipase C substrates and products to remodel the Arabidopsis suspension cell transcriptome. *Front Plant Sci* **5**, 608.

S.A.P. Ower, J.F.Farrar, Whitbread R. 1981. Growth and photosynthesis in barley infected with brown rust. *Physiological Plant Pathology* **18**, 79-90.

Sandve SR, Kosmala A, Rudi H, Fjellheim S, Rapacz M, Yamada T, Rognli OA. 2011. Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. *Plant Sci* **180**, 69-77.

Saucedo-Garcia M, Gonzalez-Solis A, Rodriguez-Mejia P, Olivera-Flores Tde J, Vazquez-Santana S, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz M. 2011. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Signal Behav* **6**, 1616-1619.

Scholes JD, Rolfe SA. 2009. Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective. *Funct Plant Biol* **36**, 880-892.

Sharrock RA. 2008. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* **9**, 230.

Sheng X, Xiuying L, Cao G, Li M, Zhenfeng L. 2018. Structural roles of lipid molecules in the assembly of plant PSII–LHCII supercomplex. *Biophysics Reports* **4**, 189-203.

Sheng X, Yung YC, Chen A, Chun J. 2015. Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development* **142**, 1390-1395.

Shimojima M, Ohta H. 2011. Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog Lipid Res* **50**, 258-266.

Sieber AN, Longin CF, Leiser WL, Wurschum T. 2016. Copy number variation of CBF-A14 at the Fr-A2 locus determines frost tolerance in winter durum wheat. *Theor Appl Genet* **129**, 1087-1097.

Simon-Plas F, Perraki A, Bayer E, Gerbeau-Pissot P, Mongrand S. 2011. An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 642-649.

Skinner JS, von Zitzewitz J, Szucs P, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen TH, Hayes PM. 2005. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Mol Biol* **59**, 533-551.

Skupien J, Wojtowicz J, Kowalewska L, Mazur R, Garstka M, Gieczewska K, Mostowska A. 2017. Dark-chilling induces substantial structural changes and modifies galactolipid and carotenoid composition during chloroplast biogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Plant Physiol Biochem* **111**, 107-118.

Smallwood M, Bowles DJ. 2002. Plants in a cold climate. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **357**, 831-847.

Soltesz A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W, Vagujfalvi A. 2013. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *J Exp Bot* **64**, 1849-1862.

Sperling P, Heinz E. 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 1-15.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1035-1040.

- Stockinger EJ, Skinner JS, Gardner KG, Francia E, Pecchioni N.** 2007. Expression levels of barley Cbf genes at the Frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at Fr-H1 and Fr-H2. *Plant J* **51**, 308-321.
- Takahashi D, Imai H, Kawamura Y, Uemura M.** 2016. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology* **72**, 123-134.
- Thomashow MF.** 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571-599.
- Thompson CE, Fernandes CL, de Souza ON, de Freitas LB, Salzano FM.** 2010. Evaluation of the impact of functional diversification on Poaceae, Brassicaceae, Fabaceae, and Pinaceae alcohol dehydrogenase enzymes. *J Mol Model* **16**, 919-928.
- Tischner T, Koszegi B, Veisz O, Sutka J.** 1998. Environmental control of plant growth in the Martonvasar phytotron. *Növénytermelés* **47**, 87-96.
- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL.** 1995a. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant physiology*
- Uemura M, Steponkus PL.** 1994. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol* **104**, 479-496.
- Uemura MR, Joseph A, Steponkus PL.** 1995b. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant physiology*
- Upchurch RG.** 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* **30**, 967-977.
- Vagujfalvi A, Aprile A, Miller A, Dubcovsky J, Delugu G, Galiba G, Cattivelli L.** 2005. The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol Genet Genomics* **274**, 506-514.
- van't Hof R, van Klompenburg W, Pilon M, Kozubek A, de Korte-Kool G, Demel RA, Weisbeek PJ, de Kruijff B.** 1993. The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane lipids. *J Biol Chem* **268**, 4037-4042.
- Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S.** 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8053-8058.
- Villasuso AL, Wilke N, Maggio B, Machado E.** 2010. The surface organization of diacylglycerol pyrophosphate and its interaction with phosphatidic acid at the air-water interface. *Chem Phys Lipids* **163**, 771-777.
- Wada H, Gombos Z, Murata N.** 1990. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* **347**, 200-203.
- Wang F, Guo Z, Li H, Wang M, Onac E, Zhou J, Xia X, Shi K, Yu J, Zhou Y.** 2016. Phytochrome A and B Function Antagonistically to Regulate Cold Tolerance via Abscissic Acid-Dependent Jasmonate Signaling. *Plant Physiol* **170**, 459-471.
- Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye JY, Mi H.** 2006. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiol* **141**, 465-474.
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S.** 2008. An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 3163-3179.
- Wang X, Wang C, Sang Y, Qin C, Welti R.** 2002. Networking of phospholipases in plant signal transduction. *Physiol Plant* **115**, 331-335.

- Webb MS, Uemura M, Steponkus PL.** 1994. A Comparison of Freezing Injury in Oat and Rye: Two Cereals at the Extremes of Freezing Tolerance. *Plant Physiol* **104**, 467-478.
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X.** 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 31994-32002.
- Welti R, Shah J, Li W, Li M, Chen J, Burke JJ, Fauconnier ML, Chapman K, Chye ML, Wang X.** 2007. Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Front Biosci* **12**, 2494-2506.
- Xiao S, Gao W, Chen QF, Chan SW, Zheng SX, Ma J, Wang M, Welti R, Chye ML.** 2010. Overexpression of Arabidopsis acyl-CoA binding protein ACBP3 promotes starvation-induced and age-dependent leaf senescence. *Plant Cell* **22**, 1463-1482.
- Xu C, Hartel H, Wada H, Hagio M, Yu B, Eakin C, Benning C.** 2002. The *pgp1* mutant locus of Arabidopsis encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. *Plant Physiol* **129**, 594-604.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-264.
- Yamauchi Y, Hasegawa A, Taninaka A, Mizutani M, Sugimoto Y.** 2011. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *J Biol Chem* **286**, 6999-7009.
- Yang H, Richter GL, Wang X, Mlodzinska E, Carraro N, Ma G, Jenness M, Chao DY, Peer WA, Murphy AS.** 2013. Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the Arabidopsis ABCB19 auxin transporter. *Plant J* **74**, 37-47.
- Yu W, Liu C, Liu Y, Zhang N, Xu W.** 2010. Mannan-modified solid lipid nanoparticles for targeted gene delivery to alveolar macrophages. *Pharm Res* **27**, 1584-1596.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF.** 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* **14**, 415-421.
- Zakar T, Herman E, Vajravel S, Kovacs L, Knoppova J, Komenda J, Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Laczko-Dobos H.** 2017. Lipid and carotenoid cooperation-driven adaptation to light and temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1858**, 337-350.
- Zhang XD, Wang RP, Zhang FJ, Tao FQ, Li WQ.** 2013. Lipid profiling and tolerance to low-temperature stress in *Thellungiella salsuginea* in comparison with *Arabidopsis thaliana*. *BIOLOGIA PLANTARUM* **57**, 149-153.
- Zheng G, Li L, Li W.** 2016. Glycerolipidome responses to freezing- and chilling-induced injuries: examples in Arabidopsis and rice. *BMC Plant Biol* **16**, 70.
- Zheng G, Tian B, Zhang F, Tao F, Li W.** 2011. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant Cell Environ* **34**, 1431-1442.
- Zuniga G. E., Fernandez J., Cristi R., Alberdi M., J. CL.** 1990. Lipid changes in barley seedlings subjected to water and cold stress. *Phytochemist* **29**, 3087-3090.

12 PUBLIKÁCIÓS LISTA

12.1 A dolgozat alapját képező közlemény:

Kovács T, Ahres M, Pálmai T, Kovács L, Uemura M, Crosatti C, Galiba G. (2020) Decreased R:FR Ratio in Incident White Light Affects the Composition of Barley Leaf Lipidome and Freezing Tolerance in a Temperature-Dependent Manner-Int. J. Mol. Sci., Issue 21, Vol. 7557, DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21207557>

IF: 5,92

12.2 Egyéb közlemények, posztterek, konferenciák, előadások:

12.2.1 A témához kapcsolódó közlemény:

The effect of white light supplemented with decreased red/far red light ratio on the lipid composition and frost tolerance of barley leaves, (2021), MNBT, ISBN 978-615-01-2350-9

12.2.2 Egyéb közlemények:

Kovacs T, Szalontai B, Kłodawska K, Vladkova R, Malec P, Gombos Z, Laczko-Dobos H. (2019) Photosystem I oligomerization affects lipid composition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids, Vol. 1864, Issue 10, Pages 1384-1395, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.013>

IF: 4,52

Sindhuja V, Laczkó-Dobos H, Petrova N, Herman É, Kovács T, Zakar T, Todinova S, Taneva S, Kovács L, Gombos Z, Tóth T and Krumova S. (2020) Phycobilisome integrity and functionality in lipid unsaturation and xanthophyll mutants in *Synechocystis*. Photosynthesis Research, Vol. 145, Pages 179-188, DOI: 10.1007/s11120-020-00776-1

IF: 3,57

A *synechocystis* sp. PCC6803 *cytb/6f* komplexének PetD fehérjében mutáns törzsének feltérképezése, (2019), SZAB pályázat

A *synechocystis* sp. PCC6803 *cytb/6f* komplexének PetD fehérjének az állapot átmenetekben betöltött szerepének feltérképezése, (2020), XXIII. Tavaszi Szél Konferencia Absztrakt kötet I., Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, ISBN: 978-615-5586-70-5

12.2.3 A témához kapcsolódó posztetek:

How the membrane lipid composition changes on the effect of distant red and white light as well as cold stress, (2019), International Symposium on Plant Photobiology

Increased far-red light ratio in white light and temperature dependent changes in the composition of membrane lipids, (2019), Plant Biology CS

Increased proportion of far-red in the incident white light modifies membrane lipid composition by temperature dependent manner in winter barley, (2019), CBB5-Budapest

12.2.4 Egyéb posztetek:

The structural roles of carotenoids and lipids in cyanobacterial photosynthetic complexes characterized by CD spectroscopy, (2018), Straub Napok

The structural roles of carotenoids and lipids in cyanobacterial photosynthetic complexes characterized by CD spectroscopy, (2018), FECPR, ePS-1

Red-light and cold stress-induced changes in the composition of membrane lipids, (2019), Straub Napok

12.2.5 A témához kapcsolódó előadás:

The effect of white light supplemented with decreased red/far red light ratio on the lipid composition and frost tolerance of barley leaves, (2021), MNBT, ISBN 978-615-01-2350

A lipidek szerepe az ősziárpa fényindukált hidegakklimatizációjában, (2022), THHEM, ISBN 978-615-82054-3-6

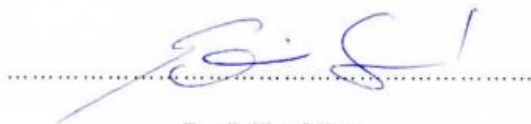
12.2.6 Egyéb előadás:

A *synechocystis* sp. PCC6803 cytb/6f komplexénekének PetD fehérjéjének az állapot átmenetekben betöltött szerepének feltérképezése, (2020), XXIII. Tavaszi Szél Konferencia

13 NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy **Kovács Terézia** Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisben közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Kovács T., Ahres M, Pálmai T, Kovács L, Uemura M, Crosatti C, Galiba G. (2020) Decreased R:FR Ratio in Incident White Light Affects the Composition of Barley Leaf Lipidome and Freezing Tolerance in a Temperature – Dependent Manner – Int. J. Mol. Sci., Issue 21, Vol. 7557, DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21207557>



Dr. Galiba Gábor

Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet

ELKH

14 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

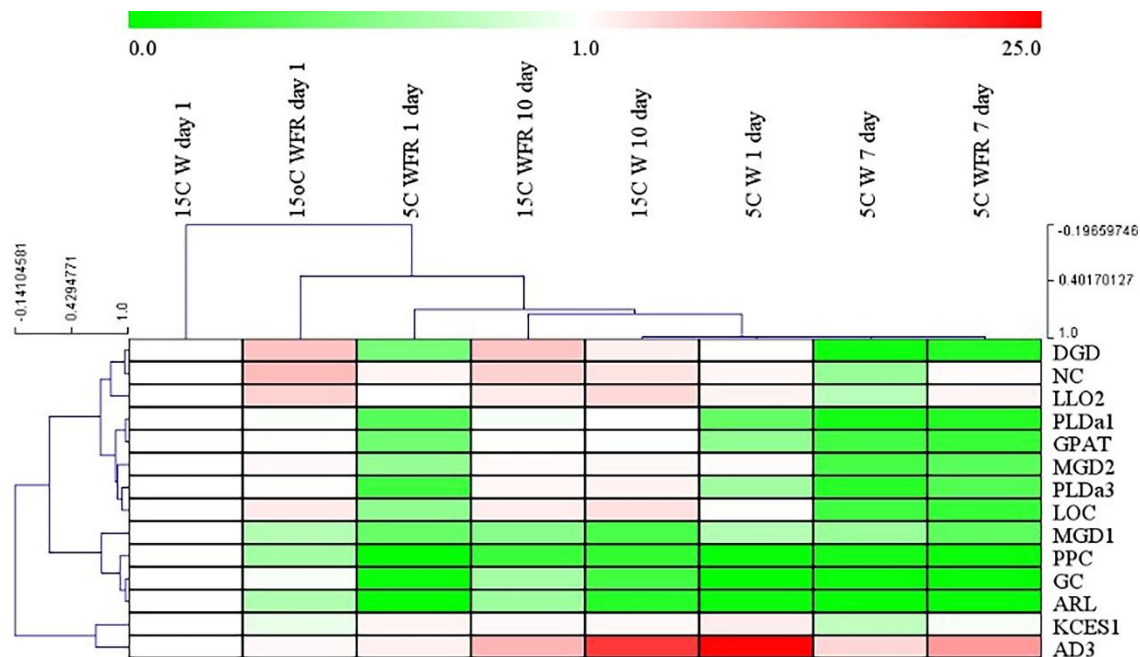
Először is köszönetet szeretnék mondani lelkiismeretes, precíz, segítőkész témavezetőimnek Dr. Gombos Zoltának, Dr. Galiba Gábornak és Dr. Kovács Lászlónak, akik tanácsaikkal és útmutatásukkal eredményessé tették munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Domonkos Ildikónak, Károlyi Mariannak, Dr. Kiss Mihálynak, Dr. Laczkó-Dobos Hajnalkának, Dr. Zakar Tomášnak, Herman Évának, Széles Eszternek, Zsámboki Tibornak és Zsámboki Péternek tanácsaikért és segítségükért.

Kiemelném Dr. Vass Imre Gyula, Dr. Tóth Szilvia Zita és Dr. Szabados László, valamint az általuk vezetett csoportok tagjainak támogatását.

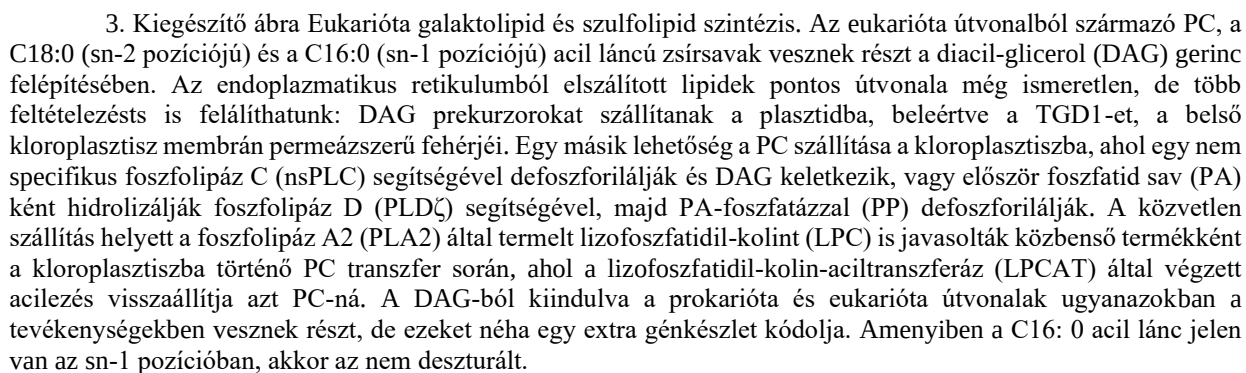
A kutatásunkat támogatta: a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFIH [K124922, K128575 és PD128280], a Magyar Állami Támogatás [támogatási szám: GINOP-2.3.2-15-2016-00001] és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008. A projektet az Európai Unió és az Európai Szociális Alap társfinanszírozta. A közölt lipid elemzést a következő helyen végeztük: Kansas Lipidomics Research Center Analytical Laboratory. A műszer megszerzését és a lipidomikai módszer fejlesztését a Nemzeti Tudományos Alapítvány támogatta (EPS 0236913, MCB 1413036, MCB 0920663, DBI 0521587, DBI1228622), Technology Enterprise Corporation, az orvosbiológiai kutatás kiválóságának K-IDeA hálózata (INBRE) Nemzeti Egészségügyi Intézet (P20GM103418) and Kansas State Egyetem.

15 MELLÉKLET

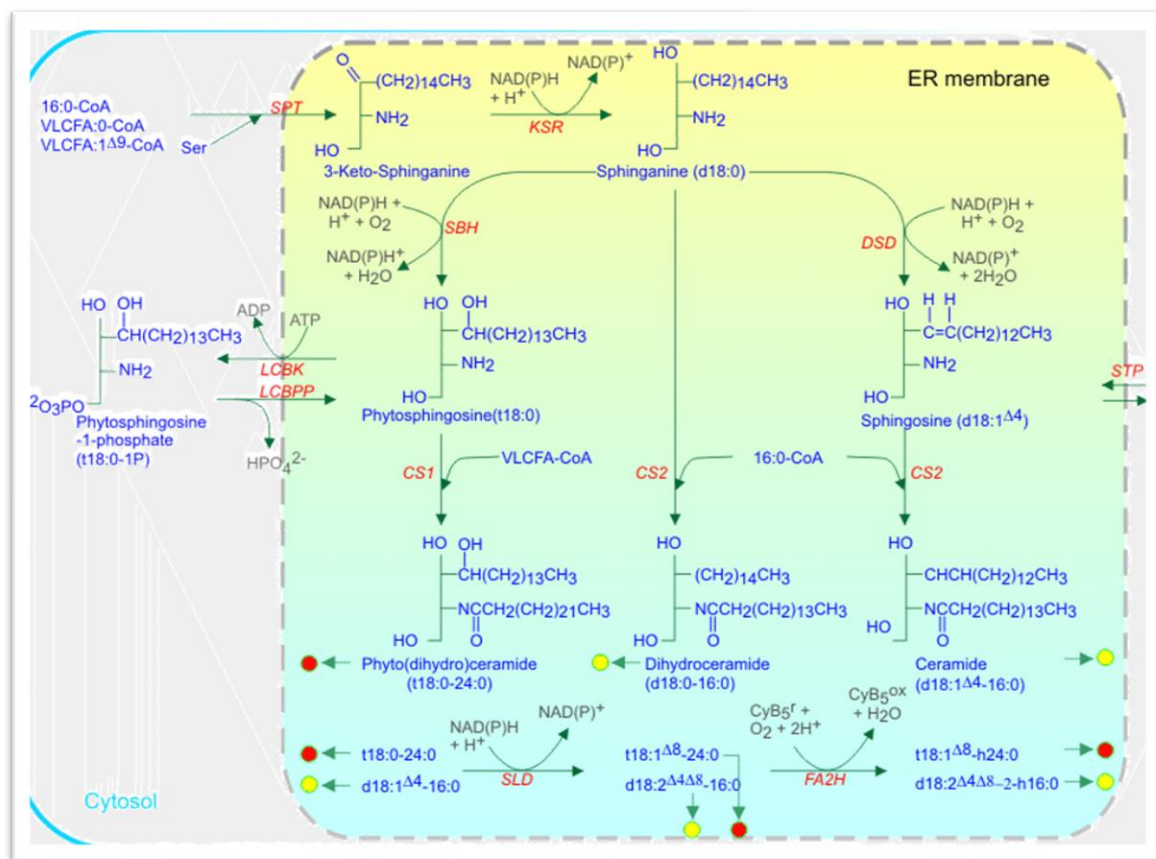


1. Kiegészítő ábra Az őszi árpa levelekben kimutatott gén expressziós szintek hierarchikus csoportosítása 15°C egy nap és tíz nap valamint 5°C-on egy és hét nap után fehér fény (WL) és hozzáadott távolivöröst tartalmazó fehér fényű (W+FR) megvilágítás mellett. Digalactosildiacil glicerinn szintáz (DGD); neutrál ceramidáz (NC); linoleát 9S-lipoxigenáz 2 (LLO2); Foszfoplipáz D alfa 1 (PLD α 1); glicerinn-3-foszfát aciltranszferáz 3 (GPAT); monogalactozil diacilglicerinn szintáz 2 (MGD2); foszfoplipáz D alfa 1 (PLD α 1); lipoxigenáz 2.3 kloroplasztikus (LOC); monogalaktózn diacilglicerinn szintáz 1 (MGD1); foszfatinilinozitol foszfatáz C (PPC); nem lizoszómális glükózilceramidáz (GC); NADPH-függő aldehyd redukáz kötő fehérje, kloroplasztikus (ARL); alkohol dehidrogenáz (AD3). Három független biológiai és technikai ismétlés nyomán.

Rövidítések: LPA, lizofoszfatidsav; PI, foszfatidil-inozitol; LPC, lizofoszfatidil-kolin; PG, foszfatidil-glicerin; CCT, CTP: foszforil-kolin – citidilil-transzferáz; CDP-DAGS, CDP-diacil-glicerin-szintetáz; PECT, CTP: foszfo- etanol-amin – citidil-transzferáz; DAG-CPT, CDP-kolin: diacil-glicerin-kolin – foszfortranszferáz; DAG-EPT, PGPS, foszfatidil-glicerin-foszfát-szintáz; DHAP: dihidroxi-aceton-foszfát; FAD2, oleát-deszaturáz; FAD3, linolát-deszaturáz; GPDH, glicerin-foszfát-dehidrogenáz; GPAT, glicerin-3-foszfát-aciltranszferáz; LACS, hosszú láncú acil-CoA szintetáz;



107

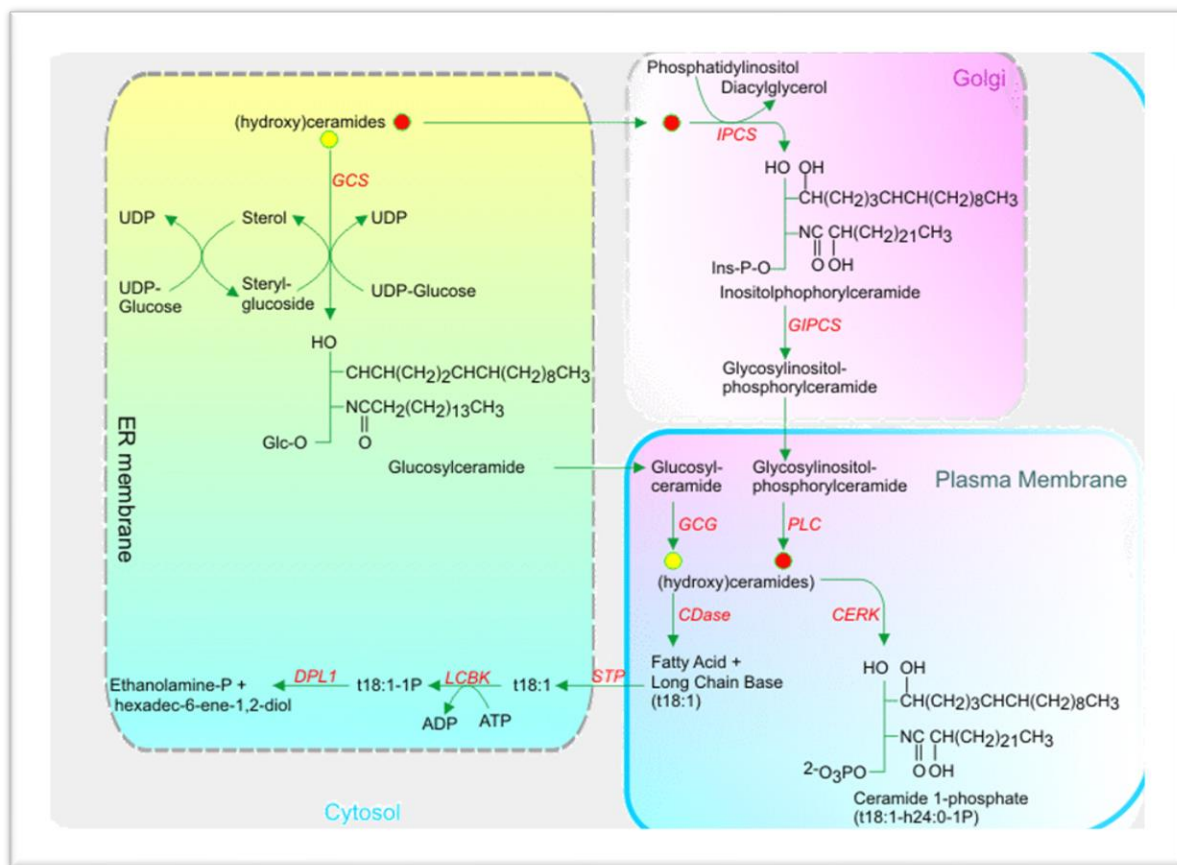


4. Kiegészítő ábra Szfingolipid bioszintézis. A szfingobázisok és a ceramidok bioszintézise az endoplazmatikus retikulumban (ER). A szerin-palmitoil-transzferáz (SPT) reakcióhoz és a ceramid-szintézishez szükséges palmitoil-CoA-t SPT rögzíti az ER membrán citoszolikus felületén. A nagyon hosszú láncú zsírsavakat (VLCFA), amelyek az ER citoszolikus felületén való lánchosszabbodás során keletkeznek. A ceramidokba a ceramid szintáz (CS) építi be. A szfingobázisok hosszú láncú báziskínáz (LCBK) általi foszforilálása megkönnyítheti a ceramidok termelődését a citoszolban.

Rövidítések: dihydro-sphinganine- Δ^4 -deszaturáz (DSD); zsírsav-2-hidroxiláz (FA2H); 3 – keto-szfinganine-reduktáz (KSR); hosszú láncú bázikus foszfát-foszfátáz (LCBPP); szfingoid bázis hidroxiláz (SBH); szfingolipid Δ^8 -deszaturáz (SLD); szfingozin transzfer fehérje (STP).

Jonathan Markham nyomán.

http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/sphingolipid_biosynthesis



5. Kiegészítő ábra Szfingolipid bioszintézis-a ceramidok sorsa a sejtben. A ceramid szintézise az endoplazmatikus retikulumban (ER) két különálló ceramid – csoportot alkot. Az egyik csoportot a glükózil-ceramid-szintáz (GCS) glikozilezi. A másik csoportot a golgiba szállítják, ahol az inositol-foszforil-ceramidszintáz (IPCS) hatására foszfo – inozit fejcsoporthoz kap a foszfatidil-inozitoltól. Mindkét komplex szfingolipid és a plazmamembránba szállítódik, ahonnan végül hidrolízissel bontódik le.

Rövidítések: glükózil-inozitol-foszfo-ceramidszintáz, (GIPCS); glükózil-ceramid-glükózidáz (GCG); foszfolipáz C, (PLC); ceramidáz (CES); ceramid kináz (CERK); szfingozin transzfer fehérje (STP); hosszú láncú báziskináz (LCBK); dihidro-szfingozin-foszfát-liáz (DPL1). Jonathan Markham után.

http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/sphingolipid_biosynthesis_2

Rövidítések	Gének teljes neve	Forward szekvenciák 5'-3'	Reverse szekvenciák 5'-3'	Referenciák / Gén ID EnsemblPlants- ban
<i>HvCycl</i>	Cyclophilin	CCTGTCGTGT CGTCGGTCTA AA	ACGCAGATCC AGCAGCCTAA AG	Burton et al. (2004)
<i>HvMGD1</i>	Monogalaktozil diacil-glycerin szintáz 1	ATCGCCAGAA CACATCGCAA	TGGGCGAGCT AGTTTCAGGG	HORVU5Hr1G 064090
<i>HvMGD2</i>	Monogalaktozil diacil-glycerin szintáz 2	ATGTACCTCA CCGCTCTCGC	GCAGGTGTTG AGGTCGGTGA	HORVU4Hr1G 044140
<i>HvDGD1</i>	Digalactosil diacil- glycerin szintáz 1	ACGGGCTCAA GGATTTTCGAG	AAGAATGGTC CAGACTGCCG	HORVU2Hr1G 073850
<i>HvPLDα1</i>	Fosfolipáz-D- α 1	CTCACCTTCTT CTGCCTCGG	ACGTAGATCA TGAACCGGCG	HORVU1Hr1G 025370
<i>HvPLDα3</i>	Fosfolipáz-D- α 3	CCAGAGGAAA TCGAGGCGTT	GCACCACCAC ATAGACCACA	HORVU7Hr1G 089960
<i>HvPPC</i>	Foszfatidil-inozitol foszfolipáz C	GGGCAGTCCT TCACCAAGAT	GAGCCATCCC ACGTTCTTGT	HORVU4Hr1G 056550
<i>HvACER1</i>	Alkalin ceramidáz	ACAGACGAAA GACCAGGCTG	CTTGCAGAAG ACGCGATCAA	HORVU4Hr1G 005780
<i>HvNC</i>	Neutrális ceramidáz	AGTCCGTGGT TTTGGTTCGT	CTGCTGGCCC TGTTATGTCA	HORVU3Hr1G 055870
<i>HvGPAT</i>	Feltételezett glicerín-3- foszfát-aciltranszferáz 3	GAGATGAAGG TGCTGTGGGG	GGTGAAGCCG ACGACATCAT	HORVU5Hr1G 022500
<i>HvLLO2</i>	Linolát-9S-lipoxigenáz 2	AGGAGTTCGC CAGGGAGAT	TCATGGTGCT GGTGTGGTC	HORVU5Hr1G 093700
<i>HvLOC</i>	Lipoxigenáz 2.3, (kloroplasztikus)	GACGACAACA ACCCACCA	ATGTGCTCCT TGTGGCTCC	HORVU5Hr1G 001180
<i>HvGC</i>	Nem lizoszómás glükózil-ceramidáz	TGCCGTCAAA TATCGCCCTT	GCTCCCAGAA TTTTGCACCG	HORVU7Hr1G 076480
<i>HvARL</i>	NADPH-függő aldehid-reduktáz-szerű fehérje	GGATCGTCAC CTTCTCGTCG	GGATCCTCGT CATGGTCTCC	HORVU5Hr1G 094940
<i>HvAD3</i>	Alkohol-dehidrogenáz 3	CGGAACCTCT ACCTTCAGCG	ACCAGTTGAG ATACCGCAGC	HORVU4Hr1G 016770

1. kiegészítő táblázat Primer szekvenciák és referenciák.