

FOSZFOLIPIDEK SZEREPE A BUZÁK FAGYÁLLÓSÁGÁBAN

Doktori dolgozat

Horváth Ibolya

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Biokémiai Intézet

1979



## TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
I. AZ ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	
II. BEVEZETÉS	1
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
1. A lipidtartalom növekedése és a zsirsavak telítetlenségének szerepe a télállósodás során	4
2. A foszfolipidek "degradációja" a fagyhatás után	6
3. A foszfatidil kolin, mint krioprotektív foszfolipid	7
4. Membránmódosítás és önszabályozás	9
5. Mágneses rezonancia spektroszkópiai alkalmazása a lipidek mozgékonyságának vizsgálatában	11
IV. CÉLKITŰZÉS	14
V. A FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	
1. Anyagok	
1.1. A természetben télállósított növények	16
1.2. A fitotronban télállósított növények	17
1.3. A NEM télállósított növények nevelése	18
1.4. Kolin klorid tápoldaton nevelt Miranovskaja 808	18
2. Az alkalmazott módszerek	
2.1. A lipidek kivonása, elválasztása és analízise	19
2.2. A foszfolipidek degradációjának mérése	22
2.3. Fagytűrési vizsgálatok a vezetőképesség mérésén alapuló módszerrel	23
2.4. Deuteráltvizes liposzóma-szuszpenzió készítése NMR spektroszkópiás vizsgálatokhoz	24
2.5. Protoplaszt izolálása a kolin klorid oldaton nőtt Miranovskaja 808-ból	25
2.6. BSA-hoz kötött spinjelölt zsirsavak készítése	26
2.7. A protoplaszt jelölése a spinjelölt sztearinsavval	26
VI. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE	
1. A zsirsavak és foszfolipidek vizsgálata a fagytűrő rozsban és a különböző érzékenységu búzafajtákban	28

2. Az alapvető foszfolipidek hidrolizisének mértéke, mint módszer a fagytörés tesztelésére	32
3. A lipidek NMR spektroszkópiás vizsgálata	36
4. Kísérletek a foszfatidil kolin szintjének növelésére a Miranovskaja 808-ban	42
5. Fluiditás mérése a megnövekedett PC tartalmu növény plazmamembránjában	52
6. Mesterséges fagyállóság indukció	58
VII. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	61
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	67
IX. IRODALOMJEGYZÉK	69

## I. AZ ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

16:0	palmitinsav
18:0	sztearinsav
18:1	olajsav
18:2	linolsav
18:3	linolénsav
MGDG	monogalaktozil diglicerid
DGDG	digalaktozil diglicerid
PC	foszfatidil kolin
PA	foszfatidsav
PE	foszfatidil etanolamin
PG	foszfatidil glicerol
PI	foszfatidil inozitol
LPC	lizo foszfatidil kolin
DPG	difoszfatidil glicerol
DPPC	dipalmitoil foszfatidil kolin
DPPE	dipalmitoil foszfatidil etanolamin
BSA	marha szérum albumin
CC	kolin klorid
I/1,14/	2-/14-karboxi-tetradecil/-2-etil-4,4- -dimetil-3-oxazolidinoxil
I/12,3/	2-/3-karboxipropil/-4,4-dimetil-2-2- -tridecil-3-oxazolidinoxil
NMR	magmágneses rezonancia spektroszkópia
ESR	elektronspin rezonancia spektroszkópia
DSC	"differencial scanning" kalorimetria
MIR	Triticum aestivum L., Miranovskaja 808 fajtája

BEZ	Triticum aestivum L., Bezostaja 1 fajtája
SH. MEX.	Triticum aestivum L., Short mexican fajtája
PEN	Triticum aestivum L., Penjamo 62 fajtája

## II. BEVEZETÉS

Közismert az a tény, hogy a növények változatos eloszlásában az éghajlati viszonyoknak és legfőképpen a környezet hőmérsékletének döntő szerepe van. Ez a hőmérséklet okozta szelekció különösen jelentős a táplálkozás szempontjából nélkülözhetetlen gabonafélék esetében. A kontinentális éghajlatu országokban, így hazánkban is, az egyes haszonnövényeket tekintve, nemcsak a hidegtűrés, de a fagytűrés képességének maximumát is pontosan ismernie kell azoknak a szakembereknek, akik új, nagy hozamu fajok ill. fajták meghonosításával foglalkoznak.

A növények eltérő fagyállóságának oka, biokémiai hátterének felderítése évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat. A témával foglalkozó nagyszámu közleményből megállapítható, hogy az egyes növények fagytűrőképessége - amely a télállósítás során alakul ki - egyedenként igen eltérő, de eredete lényegében azonos és az alábbiakban leirt elvek alapján magyarázható.

Alacsony,  $10^{\circ}\text{C}$  alatti/ hőmérsékleteken a szövetekben levő víz először a sejtek közötti térben fagy meg. A keletkező jég legtöbbször még nem okozza a növények pusztulását. Ez csak akkor következik be, ha a fagyás a sejten belül is bekövetkezik. Ebben az állapotban a fehérjék és más makromolekulák azt az ún. kötött vizet is elveszítik, amely még



nélkülözhetetlen nativ konformációjuk fenntartásához. Másrészt, a keletkező mechanikai károsodás szintén pusztuláshoz vezet. A sejten belüli fagyás késleltetése tehát döntően fontos a növények túlélése szempontjából. A késleltetést befolyásoló tényezők a következők: a sejtnedv fagyáspontcsökkenését növelő moláris koncentráció növekedés, /amely egy kritikus koncentráción túl szintén káros/, az esetleges túlhűlés /amelyben az ún. vizoldékony krioprotektív anyagoknak fontos szerepe lehet/, az alacsony hűtési sebesség és legfőképpen olyan, még működőképes sejtmembránstruktúrák, amelyeknek vízáteresztő képessége alacsony hőmérsékleten megnövekszik. /Ez utóbbi megjegyzéssel feltételezzük a növények fokozott szárazságtűrését./

Általánosan elfogadott ma már az a nézet, hogy a sejt és a sejtpartikulumok membránjainak, ill. a membránok alkotórészei közül is elsősorban a lipideknek központi szerepe van a növények fagyállóságában. A membránlipidek szerepét a fagyállóságban leegyszerűsítve a lipidek fázisváltozási hőmérsékletével magyarázhatjuk. E kritikus hőmérsékletnél /lipidkeverék esetén hőmérséklettartománynál/ alacsonyabb hőmérsékleteken a membránlipidek a fiziológiás folyékony-kristályos állapotból szilárd-gél állapotba mennek át. Ebben a szilárd-gél állapotban a membránok összes funkciója /pl. a membránokhoz kötött enzimek aktív állapotban tartása, a membránok szemipermeabilitása,



transzportfolyamatok biztosítása / irreverzibilisen megsérül. Feltevésünk szerint a növények membránlipidjeinek fázisváltóási hőmérsékletét és működésüknek a fagyállóság fokozása szempontjából szóba jöhető összes elvét három tényező határozza meg:

1. A különböző membránlipidekben a glicerint észterező zsírsavak lánchossza és telítetlensége /rövidebb lánchossz és nagyobb telítetlenség kedvezőbb, alacsonyabb fázisváltóási hőmérsékletű/.
2. Az egyes lipidféleségek minősége /a foszforsavat észterező vizoldékony un. fejcsoport aminoalkoholok, cukrok milyensége/ a különböző "fejcsoportu" lipidek aránya a különböző membránstrukturákban és kölcsönhatásai más lipidekkel, fehérjékkel, vízzel stb.
3. Olyan lipofil krioprotektív anyagok alacsony hőmérsékleteken történő megjelenése, melyek akár kis mennyiségben és csak lokálisan is, de hatással lehetnek a membránok fluiditására, vízáteresztő képességére, ill. fázisváltóási hőmérsékletére.

### III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 1. A lipidtartalom növekedése és a zsírsavak telítetlenségének szerepe a télállósodás során

Számtalan megfigyelés igazolja, hogy a növényekben alacsony hőmérsékleteken bizonyos anyagok mennyisége megváltozik. Az aminosavak, fehérjék, cukrok, lipidek, nukleinsavak stb. hideg hatására történő felszaporodása egyben arra is utal, hogy a növények anyagcseréjében általános változás megy végbe /1/.

A lipidek mennyiségének növekedése és a fagyállóság közötti pozitív korrelációt már rég megfigyelték. A modern mérés technikák fejlődésével pontos méréseket is végeztek bizonyos fajok és fajták esetében. Több kutatócsoport a fagyállóság és a lipidtartalom kapcsolatát vizsgálva azt találta, hogy a fagyállóság kifejlődésének kezdeti periódusában főként a foszfolipidek mennyisége nőtt meg /2,3,4/. A buzafélék közül az általunk is vizsgált *T.aestivum* két eltérő fagyállóságu fajtáját tanulmányozva egy szerző arra a megállapításra jutott, hogy a hidegadaptáció eredményeképpen a hidegtűrő változat több  $^{32}\text{P}$ -t épített be a foszfolipidjeibe, mint a hidegérzékeny buza /5/. Ugyancsak a *T.aestivum* fajon belül figyelték meg, hogy hidegen csiráztatott növények foszfolipidjeinek mennyisége magasabb volt az azonos morfológiai állapotban lévő 25 °C-on csiráztatottak-

hoz képest /6,7/. A fűfélék leveleinek /2,5,6,8/, valamint néhány lombhullató fa kérgének /9,3,2/ télállósodása során a membrán felszínének növekedését figyelték meg. Elektronmikroszkópos felvételek alapján /amelyeket fás növényeken végeztek/ /10/ az endoplazmás repikulum és a plazmamembrán felszíné megnőtt. A membránfelszín növekedés biológiai jelentőségéről csak elképzeléseink vannak. Feltételezhetjük, hogy az endoplazmás retikulum felszínének növekedése részben kompenzálja a rajta lejátszódó reakciók alacsony hőmérséklet okozta sebességcsökkenését. Másrészt, a megnövekedett felszínű plazmamembrán változatlan vagy csökkent permeabilitási együttható esetén is nagyobb sebességű vízáramlást biztosít a sejtekből. Már a bevezetőben említettük, hogy a túlélés egyik alapvető tényezője a víz-gőz-jég fázisegyensúly létrejöttének módja, az extra- és intracelluláris jégkristályok aránya /11,12/.

A megfelelő fizikai-kémiai állapot és a funkció biztosítására a membránok lipidösszetételében is változások történnek. A növényekben legnagyobb mennyiségben jelenlevő foszfolipidek a PC és PE. A fagyállóság szempontjából a PC sokkal kedvezőbb tulajdonságú foszfolipid, mint a PE /13,14/. /Erre a későbbiekben részletesen kitérünk./ A PC fokozott szerepét támasztja alá, hogy tanulmányozva a szervesen <sup>32</sup>P beépülését hidegérzékeny és hidegtűrő lucernák gyökereinek foszfolipidjeibe azt találták, hogy a hidegtűrő változatban elsősorban a PC akkumulált jelzést /15/. Ugyanezek a szerzők

<sup>14</sup>C-acetát beépülést is vizsgáltak. A hidegtűrő fajta gyökerében nagyobb volt a PC fajlagos aktivitása, mint a hidegérzékenyében.

Az irodalomban több olyan adat is található, hogy az egyes szervezetek a környezet hőmérsékletéhez való alkalmazkodás eredményeként megnövelik zsírsavjaik telítetlenségi fokát /16,17/. Ugyanakkor Wilson és mtsai a legkülönbözőbb hidegtűrő és hidegérzékeny növények linolénsav tartalmát vizsgálva azt találták, hogy hideg hatására a hidegérzékeny növényekben csökkent annak szintje, míg a hidegtűrőkben változatlan maradt /feltehetően a telítetlen zsírsavakat bontó lipoxigenáz aktivitásának különbözőségéről van szó/ /18/. Willemot és mtsai, valamint Farkas és mtsai eltérő fagyűrűsű buzafajtákat vizsgálva arra az eredményre jutottak, hogy a növények - függetlenül fagyűrűsüktől - hasonló mértékben növelték meg zsírsavjaik telítetlenségét hideg hatására /19,20/. Az irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a membránlipidek linolénsavszintjének meghatározott értéken tartása csak egyik követelménye a növények fagyűrűképességének, de nem ez a meghatározó, a növények fagyűrűzésében különbséget tevő tényező.

## 2. A foszfolipidek "degradációja" a fagyhatás után

Mivel vizsgálataink során a növények fagyűrűzését tanulmányoztuk, különösen érdekesek számunkra az irodalomban

közölt  $0^{\circ}\text{C}$  alatti fagyasztásos kísérletek, A már idézett japán szerzők /3/ a nyárfa kéregszöveteinek foszfolipidjeit vizsgálták  $-15$  és  $-195^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztás után és azt találták, hogy a PC és PE eltűnésével egyidőben nagymennyiségű PA keletkezik. Más szerzők is beszámolnak abnormálisan magas PA szintről hideg és fagykezelések során /21,22,23,24/.

### 3. A foszfatidil kolin, mint krioprotektív foszfolipid

Mind a bevezetésben, mind a membránfelszín növekedéssel foglalkozó fejezetben hangsúlyoztuk már, hogy a legfőbb membránalkotó lipidek a foszfolipidek, kulcsfontosságúak a növények számára az alacsony hőmérsékletek túlélésében. Másrészt, az előbbiekből már kitűnik, hogy a növények foszfolipidkészletéből is elsősorban a PC szintje emelkedett a növényekben alacsony hőmérsékleten. Gombák /25/ és mélyhűtött emlős sejtek /26/ hidegadaptálódása során is megfigyelték a PC szint emelkedését. Elképzeléseink szerint a PC több szempontból is a legalkalmasabb lipidféleség a membránszintű krioprotektivitás szempontjából.

a./ Roughan és mtsai bizonyították, hogy a mikroszomális PC egy láncszeme az olajsav telítetlenődésének linol-, ill. linolénsavvá és ezek a többszörösen telítetlen zsírsavak elsősorban a kloroplasztisz galaktolipidjeibe észtereződik /27/. A galaktolipidek mennyisége és zsírsavjai telítetlensége feltehetően a klorofillmolekulák fitol csoport-

jával való asszociáció mértékére és ezen keresztül a fotoszintézis hatásosságára is kihat /28/.

b./ Ha az azonos tulajdonságu /lánc hosszúságu és telítetlenségü/ zsírsavakkal észterezett foszfolipidek fázisváltozási hőmérsékletét összevetjük, megállapíthatjuk, hogy a fontosabb membránalkotó foszfolipidek közül a PC-nek a legalacsonyabb a fázisváltozási hőmérséklete /13,14/. Más szóval, a PC dus membránokban alacsony hőmérsékleten kedvezőbb lesz a folyadék-kristályos-szilárd-gél szeparált fázisok mennyiségi aránya, és ezáltal minden - a membránok integritásával kapcsolatos - folyamat kisebb károsodást szenved, még akkor is, ha a zsírsavak telítetlensége nem növekszik meg. A PC kedvező tulajdonsága a molekula fej-csoportjának térigényével és ebből eredően az észterezett zsírsavak kevésbé gátolt szabad mozgásával van kapcsolatban /29/.

c./ Csak kevés adatunk van a télállósodás okozta plazmamembrán permeabilitási változásokról. Speciális NMR spektroszkópiás mérések permeabilitási állandó számítását teszik lehetővé. E számítások alapján a plazmamembrán vízáteresztőképessége lényegesen megnő a télállósított egyedben /30/ és e jelenség a lipidrétég nagyobb permeabilitásával magyarázható. Graziani és Livne a különböző szintetikus és növényi eredetű foszfolipidek kettős rétegének ozmotikus permeabilitási koefficienseit hasonlította össze /vizre/, amiből ki-

tűnt, hogy a növényi eredetű PC kettősréteg volt a legnagyobb permeabilitású /31/. Ez nyilvánvalóan alátámasztja azt a felfogást, hogy a PC akkumuláció a membránokban azok nagyobb vízáteresztő képességéhez vezet.

#### 4. Membránmódosítás és önszabályozás

A mágneses rezonancia spektroszkópia, továbbá egyéb fizikai mérőműszerek /DSC, fluoreszkáló festékek alkalmazása/ rohamos elterjedése a membránszerkezeti kutatásokban, a szervezetek membránszinten zajló adaptációs mechanizmusainak tanulmányozását szinte forradalmasították. E kutatások eredményeiből ma már egyre nyilvánvalóbb, hogy a legkülönbözőbb élőlények /a baktériumoktól a halakig/ képesek lényegében azonos eredménnyel, a membránalkotó lipidek megnövekedett fluiditásával válaszolni a környezet hőmérsékletcsökkenésére. /32,33/ Feltűnő ugyanakkor, hogy a cél megvalósítása, az ún. homeoviszkozus adaptálódás /azaz minden hőmérsékleten a fiziológiásnak legmegfelelőbb membránlipid mikroviszkozitás szint beállítása/ a szervezetekben csak hasonló, de nem azonos módon történik. Míg pl. az E. coli membránlipidjeinek viszkozitás szabályozása foszfolipidarány változás nélkül, kizárólag a zsírsavak telítetlenődésével magyarázható, /32/ addig ez a megállapítás úgy tűnik, a növényekre nem igaz. Részint a mechanizmus vonzó



egyszerűsége, részint a direkt fluiditásmérési technikák körülményessége és drágasága indokolhatja, hogy a "telítetlen zsírsav" középpontú szemlélet oly sokáig volt kizárólagos a növényi kriobiológiával foglalkozók körében. A szabályozási folyamatokat eddig legrészletesebben a *Tetrahymena pyriformis*-on tanulmányozták. Azok a beavatkozások, amelyekkel a membrán lipidösszetétel megváltozását lehetett elérni, az egyes lipidfélésegek, sőt molekularészletek, fluiditás szabályozásban betöltött szerepét is tisztázták. A teljesség igénye nélkül emlitenénk a zsírsavak, zsírsavszármazékok, zsírsavprekurzorok, szteroidok stb. beépítését /33/. A módosító beavatkozások egy külön csoportját képezik az aminoalkoholos beépítési kísérletek /34,35, 36/. Állandó hőmérsékleten vizsgálták pl. patkány fibroblaszt sejteken az etanolamin, mono- és dimetiletanolamin és a kolin felvétel okozta foszfolipid- és zsírsavösszetétel változásokat /a plazmamembrán, mitokondrium és mikroszóma frakciókban/ és e változások következtében a különböző membránstruktúrákban fellépő mikroviszkozitás eltolódásokat. Az exogén kolin és etanolamin a PC és PE szintjét jelentősen megnövelte. A "szokatlan aminoalkoholok" is beépültek a foszfolipidek fejcsoportjaként. A fejcsoport nagyobb metilációs fokával párhuzamosan ugyanezen foszfolipidek zsírsavkészlete úgy módosult, hogy a poláros régió megnövekedett fluiditását az észterező savak lánchosszuk



növelésével és telítődéssel részben kompenzálták /37/.  
/A kompenzáció mono-, di- és trimetil etanolamin /kolin/  
fejcsoporthoz foszfolipidek esetében tökéletesen megvalósult./ A kolin felvétel következtében megnövekedett PC tartalmu mitokondrium és mikroszóma frakciókban azonban a PC dus membrán jóval mozgékonyabb, mint a PE-ben dusított membrán.

Alig található irodalmi adat a növények membránlipidjeinek tudatos módosítására. /38/ A növények plazmamembránjának sem izoterm, sem hőmérsékletfüggő regulációs mechanizmusa nem tisztázott még.

#### 5. Mágneses rezonancia spektroszkópia alkalmazása a lipidek mozgékonyágának vizsgálatában

Az NMR spektroszkópiát már hosszú ideje alkalmazzák a lipidek fizikai-kémiai állapotának vizsgálatára. A módszer legnagyobb előnye, hogy idegen anyag bevitele nélkül, - így kiküszöbölve azok zavaró hatását - teszi lehetővé a minták szerkezetvizsgálatát. A módszer ma már - elsősorban a műszerek teljesítménynövekedése folytán - nagyszámu variációs lehetőséget kínál, melyek közül az alábbiak tűnnek a legfontosabbaknak:

a./  $^{13}\text{C}$  NMR esetében a H-NMR "átlagolt protonjele" helyett az egyes alkiláncmetilének  $^{13}\text{C}$  jelei felhasználhatók,

a mozgékonyági viszonyok vertikálisan térképezhetők /39, 40/.

b./ Részlegesen deuterált rendszerek esetében olyan molekulaszegmentumok mozgékonyágviszonyai is vizsgálhatók / $^2\text{H}$ -NMR/, amelyekre tisztán protonált rendszerekben nincs lehetőség /41/.

c./ Szerkezeti-, méret- és permeabilitási viszonyok szonikált diszperziókban és in vivo rendszerekben is tanulmányozhatók az un. paramágneses ionok jelenlétében; abból pl, hogy ha PC liposzoma szuszpenzióhoz  $\text{Mn}^{++}$  ionokat adva a trimetilamino csoport metilrezonancia intenzitásának 72 %-a tűnik el, megállapítható volt, hogy mekkora a képzett vezikulák sugara és a foszfolipid kettősréteg vastagsága /42/.

d./ Az un.  $^{31}\text{P}$ -NMR vizsgálatok a foszfolipidek fejcsoportjának mozgékonyágára és átlagos orientációjára adnak felvilágosítást /29/.

e./ A foszfolipidek hidratációjának megállapítására /43/, ill. az intra- és extracelluláris vizpopulációk relaxációs idők alapján történő elkülönítésére tett kísérletek /30/ igen nagy jelentőségűek lehetnek a további fagyállóságkutatásban.

Az ESR spektroszkópia a membránlipidek rendezettségének, a tranzíciós hőmérséklet meghatározásának egyik leggyakrabban alkalmazott módszere napjainkban. A különböző helyeken

páratlan spinű N-t tartalmazó gyűrűvel szubsztituált zsírsavak ill. foszfolipidek megjelenése a 60-as évek végére tehető, szintézisük főképpen Griffith, Kornberg és McConnell nevéhez fűződik /44,45/.

A modell vagy in vivo rendszerekbe rendszerint ultrahangozással, vagy egyszerű rázással /46/, más esetekben BSA-hoz kötött formában viszik be az alkalmazott jelölőt /47/.

A különböző spektrális paraméterekből számolva leggyakrabban az un. rendparaméter értékét  $|S|$  és a rotációs korrelációs időt  $|\tau|$  szokták megadni az irodalomban /48/. A rotációs korrelációs idő segítségével közvetlen /poise-ban kifejezett/ mikroviszkozitásérték számításra is lehetőség van. A membránlipidek fázisváltóási hőmérsékletének ESR spektroszkópiával történő mérését növények hidegtűrésével foglalkozó szerzők is leirták /49, 50/. A növények fagyállósága és membránlipidjeik rendezettsége kapcsolatára vonatkozó méréseket /51/, továbbá protoplaszton keresztül plazmamembrán rendezettségére vonatkozó méréseket ESR technikával csoportunkban végeztünk /52/.

#### IV. CÉLKITÜZÉS

A növények fagytűrésének és membránjai összetételének, fizikai-kémiai állapotának kapcsolatáról nagyon sok, egymásnak ellentmondó munka látott napvilágot. A növényi membránok "alapanyagai" a lipidek. A kloroplasztisz kivételével a fő membránalkotó lipidek a foszfolipidek.

Szerettük volna megtudni, hogy az általunk vizsgált buzafajták fagytűrése és foszfolipidjeinek mennyisége, valamint a foszfolipidek összetétele között van-e egyértelmű kapcsolat. A növények lipidanalitikájának eredményei alapján a főbb foszfolipidekből mesterséges membránokat, liposzómákat készítve tanulmányozni kívántuk, hogy az egyes foszfolipidféleségek milyen fizikai-kémiai tulajdonságokat hordoznak.

Terveink között szerepelt, hogy megváltoztatva a jól adaptálódó buzafajta lipidösszetételét úgy, hogy az a jó fagytűrőképességű, télállósított buzafajtákéhoz legyen hasonló, télállósodás nélkül is, - bebizonyítsuk a lipidek egyértelmű szerepét a fagytűrésben.

Ezzel a foszfolipid összetétel változtatással több, a lipidek és fagyállóság kapcsolatának még nyitott kérdésére kerestünk választ. Ezek közül is külön említést érdemel a plazmamembrán adaptáció-fluiditás kapcsolatának vizsgálata, amelyet - tekintettel arra a tényre, hogy a plazma-

membrán tökéletes izolálása növényekben mindezekig megoldatlan - alapvetően új, az irodalomban még nem közölt módszerrel kellett elvégeznünk.

Törekvéseink végső soron a közvetlen gyakorlati hasznosítás lehetőségeihez is elvezetnek. A foszfolipid mérésen alapuló tesztelési módszer segítségével ismeretlen tűrőképességű búzák fagytűrése lenne megítélhető. A növények hideg- és fagytűrőképességének mesterséges fokozása a termésátlagok növelését eredményezné és a vegyszeres növényvédelem új távlatait nyithatná meg.

## V. A FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

### 1. Anyagok

A DPPC és a DPPE a Fluka készítménye.

Az I/1,14/ és I/12,3/ spinjelölt sztearinsavak a Syva készítményei.

A Gas Chrom P gázkromatográfiás hordozófázis az Applied Science Laboratories gyártmánya.

A Silic-A-200 és a BSA Sigma termékek.

A sejtfalemésző enzimek közül az "Onozuka" R-10 a Kinki mfg Co. Japan, a Pectinase Sigma, a Rhozyme pedig a Rohm and Haas Ltd. Phyladelphia termékei.

A CC az Ega-Chemie készítménye.

Az összes többi, nem említett vegyszer a Reanal terméke.

A vizsgált növények:

A kísérleteinkben vizsgált növények 4 csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen "kezelést" kaptak, azaz, milyenek voltak a hő- és fényviszonyok a fejlődésük során.

#### 1.1. A természetben télállóított növények

Az első csoport növényei a természetben nőttek. Ezekben a kísérletekben egy rozs, a Secale cereale Kisvárdai fajtáját és a T. aestivum 2 fagyűrő - Miranovskaja 808 és Bezostaja 1 - és 2 fagyérzékeny - a Penjamo 62 és a

Short Mexican - fajtáját vizsgáltuk. A magokat a Genetikai Intézet kísérleti földjén vetettük el 1977. október végén. November közepén a levegő hőmérséklete  $0^{\circ}\text{C}$  alá süllyedt és kb.  $-5 - -10^{\circ}\text{C}$  volt alkalmankénti hófödéssel. Ezekkel a növényekkel január közepén végeztük a kísérleteket, így minden növény télállósítottnak tekinthető.

#### 1.2. A fitotronban télállósodott növények

A növények zöme a *T. aestivum* fajhoz tartozott. Ezen kívül a *T. turgidum* faj néhány fajtája és a *Secale cereale* Kisvárdai rozsfajta voltak a kísérletek tárgyai. Ezek a növények meghatározott program szerint télállósodtak az MTA Martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézet fitotronjaiban. A növények  $20^{\circ}\text{C}$  nappali és  $10^{\circ}\text{C}$  éjszakai hőmérsékleten csiráztak, a megvilágítás-erősség  $14000\text{ Lux}$  volt. Az idő előrehaladtával hetenként csökkent a hőmérséklet, csökkent a megvilágítás időtartama és erőssége is. Az 5. hét végére  $3,5^{\circ}\text{C}$  volt a nappali és  $0,5^{\circ}\text{C}$  az éjszakai hőmérséklet, a megvilágítás időtartama  $9$  óra. Eközben a megvilágítás-erősség  $8000\text{ Lux}$ -ra csökkent. Az 5. hét után egy hét "edzés" következett.  $3^{\circ}\text{C}$  nappali és  $-3^{\circ}\text{C}$  éjszakai hőmérséklet mellett  $21$  órán keresztül  $15000\text{ Lux}$  érte őket. A következő  $4$  nap átlaghőmérséklete  $-4^{\circ}\text{C}$  volt és a növények teljes sötétben voltak. A  $4.$  nap után a fitotron hőmér-

séklete  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{óra}$  sebességgel  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hült. Ezen a hőmérsékleten a növények 24 órát töltöttek.

A fitotronban nevelt növények fagytűrését a martonvásári intézet munkatársai határozták meg.

### 1.3. A nem télállósított növények nevelése

Laboratóriumban csiráztak csapvizzel nedvesített szűrőpapíron,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten, 100 W-os égővel folyamatosan megvilágítottuk őket. A vizsgálatokhoz 8 napos növényeket használtunk.

### 1.4. Kolin kloridos tápoldaton nevelt Miranovskaja 808

A jól adaptálódó MIR ezekben a kísérletekben vizkultúrán nőtt 8, illetve 16 napig  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, valamint 8 nap  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  előélet után további 8 napig  $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Minden hőmérsékleten 5 kultúra volt különböző tápoldatokon: egy kontroll, amely csapvizzen nőtt, a másik 4 kultúra kolin klorid oldaton nevelkedett. Az oldatok koncentrációi: 5, 15, 30, 60 mM voltak. Néhány kísérletben a növények 15 mM kolin klorid oldaton nőttek  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 8 napig, utána leöntöttük a kolin klorid oldatot és a növények csapvizzen nőttek további 8 napig  $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.



## 2. Az alkalmazott módszerek

### 2.1. A lipidek kivonása, elválasztása és analízise

2.1.1. A lipidek kivonását Folch szerint végeztük, némi módosítással /53/. Az analízisekhez kb. 1 gramm növényt felszeletelés és súlymérés után izopropilalkoholt tartalmazó ampullákba forrasztottunk és 1 órára 100 °C-os kémcsőtermosztátba helyeztük. Kihülés után az ampullákat feltörtük, tartalmukat Potter-féle homogenizátorba vittük és kétszeres mennyiségű kloroformot hozzáöntve homogéneztük. A homogenátumot 2 órán keresztül állni hagytuk, majd leszűrtük. A szürlethez az össztérfogat 20 %-át kitevő mennyiségű 0,1 M-os KCl oldatot adtunk, alaposan összeráztuk. A KCl oldat hozzáöntésekor a kloroformos fázis különvált a vizes-alkoholos fázistól. A különválást centrifugálással tettük teljessé. A kloroformos fázist szárazra pároltuk és 5 ml kloroformban felvettük.

### 2.1.2. Az összfoszfolipidek meghatározása

A foszfolipidek mennyiségi meghatározásakor Kahovcova és Odavic módszerét követtük /54/. A lipidextraktból 250 µl-t 1,5 % Mg/Ac/2-ot tartalmazó szilikagél H lapokra cseppentettünk. A megszáradt foltra 50 %-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-et cseppentettünk és 2 órán keresztül 180 °C-os szárítószekrényben tartottuk. Kihülés után a foltokat

kémcsőbe kapartuk, 1 ml "foszfor reagenst" /6,85 g Na-molibdát +0,4 g hidrazinszulfát + 100 ml cc.  $H_2SO_4$ , 1000 ml-re felöntve desztillált vízzel/ és 4 ml deszt. vizet adtunk hozzá, 1 óra időtartamra  $100^\circ C$ -os vízfürdőbe helyeztük. Kihülés után centrifugáltuk és 700 nm-en mértük az extinkciót. /Összehasonlító: 4 ml viz + 1 ml "foszfor reagens", standard: 0,1 ml  $10^{-3}M$ -os  $KH_2PO_4$  + 3,9 ml deszt. viz + 1 ml "foszfor reagens"/

### 2.1.3. A foszfolipidek vékonyréteg kromatográfiás elválasztása és mennyiségi meghatározása

A foszfolipidek elválasztása 2 dimenziós vékonyréteg kromatográfiával történt Rouser és mtsai szerint /55/. 1 ml-nyit a lipidextraktból 1,5 % Mg/Ac/ $_2$ -ot tartalmazó szilikagél H lapokra cseppentettünk. A lapokat előtte  $110^\circ C$ -on 1 órán keresztül aktiváltuk. Az elválasztás 2 dimenzióban történt. Az első dimenzió futtatóelegye: kloroform : metanol : ammónia = 65 : 25 : 5. Az első irányban a lapok 1 órán keresztül tulfutottak és utána 2-3 órán keresztül levegőn száradtak, míg az oldószerek szaga érződött.  $90^\circ$ -kal elfordítva tettük a 2. szolvensbe: kloroform : aceton : metanol : ecetsav : viz = = 30 : 40 : 10 : 15 : 5. Száradás után a lapokat jódgőzbe tettük, a jód a lipidek zsírsavjainak kettős kötéseikhez addicionálódott és az egyes lipidek barnás színt kaptak. A foltokat bejelöltük, azonosítottuk.

A jód szublimálása után a foltokra 50 %-os  $H_2SO_4$ -et cseppentettünk,  $180^\circ C$ -on roncsoltuk és a fent leírtak alapján spektrofotometriásan mértük a foszfort /54/.

#### 2.1.4. A foszfolipidek elválasztása oszlopkromatográfiával

Az elválasztás Rouser és mtsai szerint történt /57/. Penjamo 62 /PEN/ és Miranovskaja 808 /MIR/ levelek 10-10 g-jából az összlipideket a már ismertetett módon extraháltuk, majd az extraktot 1 ml kloroformban felvettük. Az elválasztásnál az alkalmazott oszlop átmérője 2,5 cm, hossza 10 cm volt. Töltetként 1 órán keresztül  $110^\circ C$ -on aktivált kovasavat /Silic-A-200, 60-200 mesh/ használtunk. A lipidextrakt felvitele előtt az oszlopot 300 ml kloroformmal mostuk. A folyamatos eluáláshoz a következő oldószereket használtuk: 300 ml kloroform, 50 ml kloroform : aceton = 1:1, 50 ml 10% vizet tartalmazó aceton és 150 ml metanol. Az egyes eluátumok aliquotjainak tisztaságát vékonyrétegen ellenőriztük. A metanolos frakció tiszta foszfolipideket tartalmazott. A frakciót bepároltuk és kloroform : metanol = 2:1 arányu elegyében feloldottuk.

#### 2.1.5. A zsírsavak gázkromatográfiás vizsgálata

Az összlipidek zsírsavainak elemzéséhez a kivont lipidekből 0,5 ml-t kihuzott kémcsövekbe vittünk és bepároltuk. 3 ml 5% sósavat tartalmazó metanolt öntöttünk rá, széndioxiddal lefuvattuk /inert atmoszféra/ és le-

forrasztottuk. 3 órás időtartamra 80 °C-ra tettük. Lehülés után az ampullákat feltörtük, tartalmukat kémcsövekbe vittük. Kétszeres mennyiségű vizet és 3 ml petrolétert adtunk hozzá, jól összeráztuk. A fázisok szétválása után a petroléteres fázist leszivtuk, kónikus csövekbe vittük és szárazra pároltuk. 100 µl benzolban feloldottuk és ebből 2 µl-t kromatografáltunk. A gáz-folyadék kromatográfiás vizsgálatot lángionizációs detektorral működő JEOL JGC 1100 készüléken végeztük. A zsírsavmetilészterek elválasztására használt 1,8 m hosszú spirális üvegkolonna megosztófázison. Az egyes csucsk azonosítását ismert anyagokkal, továbbá a retenciós idők alapján számításokkal végeztük. A mennyiségi meghatározás területszámítással történt. Minden esetben 3-3 párhuzamos vizsgálatot végeztünk. A hiba kisebb volt 2,5%-nál a fő zsírsavak /16:0, 18:2, 18:3/ esetében és kb. 20% volt a 18:0 és 18:1 zsírsavaknál.

## 2.2. A foszfolipidek degradációjának mérése

A természetben télállóított növényeket a fagystressz hatására történő foszfolipid degradáció bizonyítására egy hűtőszekrénybe tettük -15 °C-ra. A lehülés sebessége kb. 10 °C/perc volt. Miután a növények különböző hosszúságu időt eltöltöttek a hűtőszekrényben, 24 órára

hidegszobába /+4 °C/ kerültek. 24 óra elteltével a növények leveleinek lipidtartalmát a már leirt módon extraháltuk, kétdimenziós lapon a foszfolipideket elválasztottuk és mértük spektrofotometriásan a mennyiségüket. E kísérlet eredményeként a PA/PC arányt adtuk meg, mely a foszfolipid degradáció mértékét jellemzi és egyben ezzel küszöböltük ki legjobban a mérés hibáit. /56/ /Ugyanazon lapon detektált PA és PC arány a három párhuzamosban 10% max hibával megegyezett./

### 2.3. Fagytürési vizsgálatok a vezetőképesség mérésén alapuló módszerrel

E vizsgálatokban a Dexter és mtsai által bevezetett módszert alkalmaztuk /58/. Minden hőmérsékleten, ill. kólinklorid /CC/ oldaton vagy csapvizen nőtt növényből 120-140 egyedet gyökerestől kiemeltünk az edényből, a növényeket +2 °C-ra tettük egy hőmérsékletszabályozóval ellátott hűtőszekrénybe. A hűtőszekrényt 2 °C/óra sebességgel hűtöttük és 0 °C-tól óránként /-20 °C-ig/ 10-10 szálat kivettünk a hűtőszekrényből. Miután a növények +4 °C-on /hidegszoba/ 1 órát eltöltöttek, minden levélnek megmértük a vezetőképességét egy erre a célra átalakított OK 102/1 típusu konduktométerrel /Radelkisz/. A megfagyott levelek vezetőképessége ugrásszerűen megnőtt. Minden esetben azonos szegmentek vezetőképességét mértük úgy, hogy rögzített tüelektródokra szurtuk fel a leveleket.

Az ép levelek alapállapotban mért vezetőképesség értékeivel korrigáltuk a különböző 0 °C alatti hőmérsékleten "kezelt" levelek vezetőképesség értékeit. Eredményeinket 10 levélen mért vezetőképesség átlagából számoltuk. A teljesen megfagyott növény /100%-osan sérült/ vezetőképességének mérésére 10 szál növényt cseppfolyós N<sub>2</sub>-be mártottunk és miután 1 órát +4 °C-on eltöltöttek, mértük a levelek vezetőképesség értékeit. A többi azonos morfológiai állapotú levél vezetőképességét ehhez hasonlítottuk. Az egyes hőmérsékleteken a szórás /a 10 levél vezetőképességében/ kisebb volt 10%-nál. A vezetőképesség értékekből %-os sérülést számoltunk, ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében és erről az ábráról olvastuk le a félhalálzási hőmérsékletet /LH<sub>50</sub>/, amelyeket táblázatban közlünk.

#### 2.4. Deuteráltvizes liposzóma-szuszpenzió készítése NMR spektroszkópiás vizsgálatokhoz

A szintetikus L-β,γ-dipalmitoil-α-lecitin, az L-β,γ-dipalmitoil-α-foszfátidiletanolamin és tojáslecitin, valamint a MIR és PEN oszlopon elválasztott foszfolipidjeinek liposzómasuszpenzióit az alábbi módon készítettük:

15 mg-ot a fenti foszfolipidekből kloroform : metanol = 2:1 elegyében felvettünk és vastagfalu centrifuga-

csőben vékony rétegben  $N_2$ -el a cső aljára pároltuk. A bepárolt filmre 1 ml deuteráltvizet öntöttünk. Egy 150 W-os MSE szonikálóval 10 percig ultrahangozva optikailag tiszta oldatot nyertünk. Ultrahangozás közben a mintákat jéggel hűtöttük. Az így kapott vezikulák NMR spektrumát Dombi György tanszéki mérnök vette fel egy JEOL C-60 MHz magasfelbontóképességű spektrométeren.

## 2.5. Protoplaszt izolálása a kolin klorid oldaton nőtt

Miranovskaja 808-ból

A protoplaszt izolálása Dudits és mtsai módszerét követve történt, /59/ azzal a módosítással, hogy a tápoldatot 0,5 M szorbitolra cseréltük. A protoplaszt izolálását félsteril körülmények között végeztük a 8 napig  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és további 8 napig  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nőtt növények leveleiből. /A növények 0,5, 15, 30, 60 mM kolin kloridon nőttek./ 2 g levelet zsillettpengével kb. 0,5 mm-es szeletekre vágunk. A petri csészében levő szeletekre 20 ml 0,5M glükózt és 1,4 mM  $\text{CaCl}_2$ -t tartalmazó oldatot öntöttünk /pH=6,0/. A növényt szeletek mosását kétszer ismételtük a fenti oldattal, majd a szeletekre 20 ml sejtfal-emésztő enzimoldatot öntöttünk. Az oldat összetétele: 2% Cellulase "Onozuka" R-10, 0,5% Rhozyme, 1% Pectinase, 3 mM MES, 0,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 M szorbitol /pH=6,4/. A petri csészét légmentesen lezártuk és 6 órán keresztül  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lassan ráztuk. /Közben fénymikroszkópon többször ellenőriztük a protoplasztok épségét./ Utána kémcsövekbe szűrtük 40-45 mikronos acélszűrőn

és 1000 rpm-mel 3 percig centrifugáltuk. Az üledéket 3 mM MES, 0,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 M szorbitol /pH=6,4/ összetételű oldatban szuszpendáltuk és újra centrifugáltuk. Ezután az üledéket a fenti oldat 5 ml-ében szuszpendáltuk és megmértük a ml-enkénti protoplasztok számát. Az átlagos kitermelés  $5 \times 10^6$  protoplaszt/g levél volt.

#### 2.6. BSA-hoz kötött spinjelölt zsírsavak készítése

Az I /12,3/ és I /1,14/ spinjelölt sztearinsavat kloroformban felvettük és egy 25 ml-es Erlenmeyer lombik aljára pároltuk  $\text{N}_2$ -vel vékony rétegben. Az I /12:3/ jelölő használatakor a membrán felszínéhez közeli, az I /1,14/ jelölő alkalmazásával pedig a membrán hidrofób övének rendezettségéről kaptunk információt. A bepárolt filmre annyi 5% BSA-t tartalmazó puffert öntöttünk, hogy a zsírsav koncentráció 0,1% legyen. /Ugyanaz a puffer, mint amelyben a protoplasztokat szuszpendáltuk./

A spinjelölt sztearinsavat a BSA-puffer eleggyel 16 órán keresztül inkubáltuk  $25^\circ\text{C}$ -on /enyhén ráztuk közben/. A 16 óra elteltével minden spinjelölt zsírsav BSA-hoz volt kötve. /Az ESR spektrumon nem volt un. szabad zsírsav jel/ /52/.

#### 2.7. A protoplaszt jelölése a spinjelölt sztearinsavval

Az 5 ml protoplaszt szuszpenzióból  $7,0 \times 10^6$  mennyiségű protoplasztot kipipettáztunk, centrifugáltuk és az üledéket felvettük 200  $\mu\text{l}$  pufferben, amely tartalmazta



a BSA-hoz kötött spinjelölt sztearinsavat. A protoplasztokat 1 órán át lassu mozgatás közben inkubáltuk a spinjelölt sztearinsav-BSA komplex oldattal. 1 óra elteltével 10 ml puffert pipettáztunk hozzá, centrifugáltuk 3 percig, 1000 rpm-mal. /Igy az esetleg még beépületlen albumin-spinjelölt sztearinsavat eltávolítottuk./ Centrifugálás után az üledéket 100  $\mu$ l pufferben felvettük, ellenőriztük a protoplasztok épségét /52/. Az ily módon jelölt protoplasztok ESR spektrumát Horváth László, az MTA SzBK Biofizikai Intézet munkatársa vette fel, ő számolta a rendparamétereket, ill. a korrelációs időket.



## VI. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

### 1. A zsírsavak és foszfolipidek vizsgálata a fagy- tűrő rozsbán és a különböző érzékenységu buza- fajtákban

Vizsgálatainkban a rozs /*Secale cereale*/ Kisávr dai faj-  
tája, mely nagyon fagy-tűrő, a *Triticum aestivum* buza faj két  
nagy télállóságu buza fajtája - a Miranovskaja 808 és Bezos-  
taja 1 -, valamint 2 nagyon fagy-érzékeny fajtája - a Short  
Mexican és Penjamo 62 foszfolipid készletét elemeztük. /Ezen  
fajták fagy-érzékenysége a III. táblázatban megtalálható./

a./ Ismeretes, hogy a növények fagy-állósága egy fajta  
esetében sem állandó érték. Függ a növény morfológiai álla-  
potától és mindenekelőtt attól, hogy a fagyhatás előtt meny-  
nyi ideig és milyen hőmérsékleti viszonyok között fejlődött.  
Az irodalom a növények télállósodásának legalapvetőbb moz-  
zanatául /a lipidanyagcserén belül/ a membránalkotó lipidek  
zsírsavainak telítetlenedését tartotta /8,9/. Vizsgálá-  
tinkat a télállósított növények leveleiből kivont lipidek  
zsírsavösszetételének összehasonlításával kezdtük. /I. Táb-  
lázat/ A növényekben a legnagyobb mennyiségben jelenlevő  
zsírsavak a következők: linolénsav, palmitinsav, linolsav,  
olajsav, sztearinsav. /Ez utóbbi kettő jóval kevesebb./

I. Táblázat

Az október végétől január közepéig szántóföldön termesztett /télállósított/ rozs és buzafajták százalékos zsírsavösszetétele

	Zsírsavak /%/				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
S. cer.					
KISV	16,9	1,9	3,5	12,4	69,2
T. aest.					
MIR	11,8	0,5	9,2	12,4	66,2
BEZ	10,7	1,9	6,9	12,3	68,1
Sh. MEX	13,6	1,9	4,8	13,6	66,2
PEN	15,9	1,5	4,2	11,9	66,5

Egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a vizsgált növények épp a télállósított állapotukban nem mutatnak semmilyen lényeges különbséget zsírsavösszetételükben. Részletesen elemeztük az összes lényeges membránalkotó lipid, így a foszfolipidek és a galaktolipidek, ill. a foszfolipideken belül a PC, PA, PE, PG és PI zsírsavösszetételét. Az eredmények közlésétől eltekintünk, mert hasonlóan a télállósított növények összlipidjei zsírsavösszetételéhez, nincs korreláció a zsírsavak telítetlensége és a növények fagytűrése között.

b./ Megvizsgáltuk ugyanezen növények leveleinek foszfolipidösszetételét is. A legfontosabb foszfolipidek mennyisége a II. Táblázatban látható.

II. Táblázat

A foszfolipidek mennyisége október végétől január közepéig /1977-78/ szántóföldön termesztett rozs és búzafajtákban

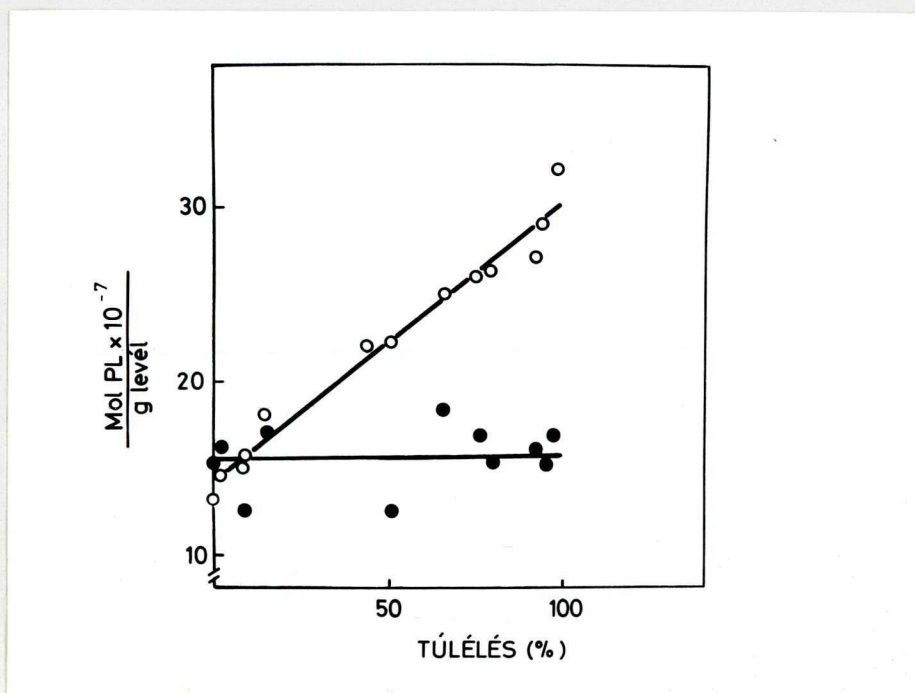
Növény	Foszfolipidek /mol x 10 <sup>-7</sup> /g levél/				
	PC	PA	PE	PG	PI
S. cer.					
KISV	14,0	3,1	5,6	4,1	2,4
T. aest.					
MIR	14,5	6,2	5,5	3,1	2,4
BEZ	15,0	5,7	4,5	3,2	3,1
Sh. MEX.	10,3	6,8	4,8	1,6	2,1
PEN	10,1	8,3	4,0	0,8	2,4

A maximálisan télállóítottoknak tekinthető szántóföldi növényekben a legnagyobb mennyiségben jelenlevő foszfolipid a PC. A PC mennyisége kb. másfélszeres a fagyűrő növényekben a fagyérzékenyekhez viszonyítva. Magasabb a PG mennyisége is a fagyűrőkben. Feltűnő, hogy a PA mennyisége az érzékenység növekedésével nő.

c./ További vizsgálatainkat meghatározott program szerint /hőmérséklet, fény, páratartalom/ fitotronban nevelt növények-

kel végeztük.

A fitotronban nevelt,  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyhatásnak kitett néhány buzafajta és a rozs foszfolipidtartalmának meghatározásával egyértelműen megállapíthattuk, hogy alacsony hőmérséklet hatására a fagytűrő fajtákban ún. "membrán augmentációs" folyamat játszódik le. A foszfolipidek halmozódása e folyamat eredménye a fagytűrő fajtákban. Az 1. Ábrából láthatjuk, hogy a foszfolipidek mennyisége kb. 2,5-szer több a fagytűrő egyedekben a fagyérzékenyekhez képest. Másrészt, a  $25^{\circ}\text{C}$ -on növesztett növények foszfolipidtartalma közel azonos és a legkevésbé fagytűrő fajták  $-12^{\circ}\text{C}$ -on mutatott foszfolipid szintjével azonos. A nagyszámu mérésből úgy tűnik, hogy a túlélés és a télállóított fagyhatásnak kitett levelek foszfolipidtartalma között lineáris kapcsolat van. A későbbiekben még utalunk rá, hogy a megnövekedett foszfolipidtartalom és következményeképpen a nagyobb plazmamembrán felszín alapvetően fontos lehet stresszhelyzetben, a víz sejtből extracelluláris térbe történő távozásának megkönnyítésében.



1. Ábra

Összefüggés a rozs és különböző buzafajták /az anyag és módszer részben leírt, fitotronban termesztett/  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyhatást követő %-os túlélése és a  $25^{\circ}\text{C}$ -on 7 napig<sup>●●</sup> nevelt ill. fitotronban télállósított és  $-12^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztott<sup>○○</sup> levelek foszfolipidtartalma között.

2. Az alapvető foszfolipidek hidrolizisének mértéke  
- mint módszer - a fagyűrés tesztelésére

A következő vizsgálatokkal célunk kettős volt. Választ adni arra a kérdésre, hogy a  $-12^{\circ}\text{C}$ -ra történő lassu lehűtés során mely foszfolipidek szintje, ill. aránya nőtt a fagyűrő fajtákban. Másrészt, a membránkárosodás termékei

fellelhető-e ilyen hőmérséklet hatása után.

A III. Táblázatban látható, hogy a növények a túlélés növekedésével párhuzamosan voltak képesek megtartani - a nyilván már stresszhelyzet előtt is eltérő - PC szintet. A fagytűrő egyedek közel négyszer annyi PC-t tartalmaztak, mint a fagyérzékeny fajták. Nemcsak a PC abszolút szintje, hanem az összfoszfolipidek %-ában kifejezett PC értékek is magasabbak a fagytűrő fajtákban. A PA abszolút mennyisége minden növényben kb. azonos érték. Mivel az érzékeny növények sokkal kevesebb foszfolipidet tartalmaztak leveleikben, mint a fagytűrő társaik, ez a PA állandóság relativ PA növekedést jelent az érzékeny növényekben. A PA/PC hányadossal jellemezhetjük a membránok "jóságát". A túlélés növekedésével ez a hányados rohamosan csökken, tehát a fagytűrő fajták membránjainak tulajdonsága sokkal kedvezőbb, mint az érzékeny fajtáké. A PE %-os mennyisége szintén közel ugyanaz minden növényben.

Ha a télállósított levelekben levő különbség membránjaik eltérő minőségével magyarázható, úgy fagystressz során membránjaik eltérő mértékben károsodnak és különböző ideig képesek megőrizni membránjaik "integritását".

A kísérletsorozat elején említett, szántóföldön télállósított rozs- és buzafajták PA/PC arányának változását követtük  $-15^{\circ}\text{C}$ -on kb  $10^{\circ}\text{C}$ /perc sebességű fagyasztás után.

/2. Ábra/

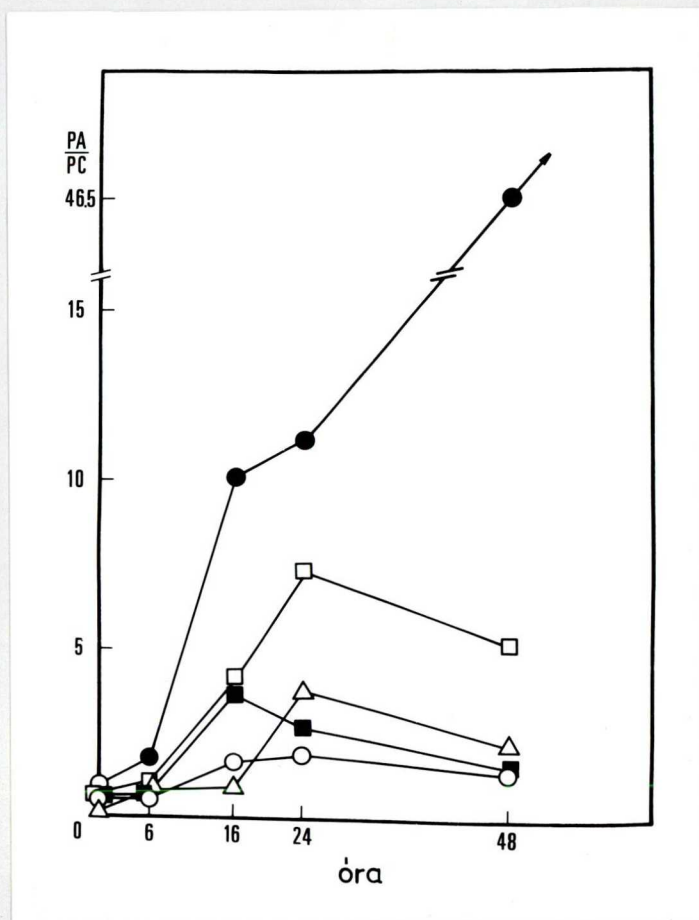


III. Táblázat

Egy rozs, valamint különböző buzafajok és fajták túlélése /%/, továbbá a PC és PA mennyisége, ezek aránya PA/PC és a PC és PE összfoszfolipidek %-ában kifejezett értékei -12 °C-os fagyhatás után

Növény	Tulélés %	PC mol x 10 <sup>-7</sup> /g	PA levél	PA/PC	PC %	PE
T. aest.						
Tobari 66	0,0	2,9	4,3	1,49	22,3	23,8
Penjamo 62	2,5	3,0	3,3	1,25	20,5	26,7
Short Mex.	9,0	3,2	3,4	1,11	21,0	22,8
T. turgidum						
Genetile	9,1	3,7	3,9	1,05	23,9	21,9
T. aest.						
Sieta Cerros	15,2	4,0	4,1	1,00	22,3	21,7
San Pastore	43,8	7,0	5,4	0,77	31,8	22,3
T. turgidum						
Buccale	51,2	7,3	4,9	0,68	33,0	24,9
T. aest.						
Karstein	66,7	7,5	4,4	0,59	31,1	25,3
Odessza 51	77,0	7,6	4,5	0,59	29,5	23,6
Kastiszka	80,2	7,8	4,6	0,58	29,7	22,8
Bezostaja 1	92,7	8,0	4,6	0,57	30,1	21,4
Kavkaz	95,0	9,2	4,3	0,47	32,1	24,4
Miranov. 808	97,5	9,3	4,2	0,45	32,0	21,3
Secale cereale						
Kisvárdai	98,5	10,8	4,6	0,43	33,9	23,6





2. Ábra

A foszfatidsav felhalmozódás a télállósított rozsban és bu-  
zafajtákban  $-15^{\circ}\text{C}$ -on az idő függvényében ●●PEN, □□Sh. MEX.,  
■■BEZ, ○○MIR, △△Sec. cer.

A vizsgált növények PA/PC aránya fokozatosan nőtt a  
hidegkezelés időtartamával. A PA felhalmozódás a PC kárára  
fordítottan arányos a növények fagyűrő képességével. Ez a  
16 órás hidegkezelésnél volt a legnyilvánvalóbb; hosszabb  
ideig tartó hideghatásra a PA/PC arány ismét kisebb lett.  
A felszaporodás lelassulása részben a prekursorok kimerülésé-

nek, részben a PA más komponensekké /LPA, stb./ való továbbalakulásának tulajdonítható. Az utóbbi feltételezés alátámasztására nincs direkt bizonyítékunk.

### 3. A lipidek NMR spektroszkópiás vizsgálata

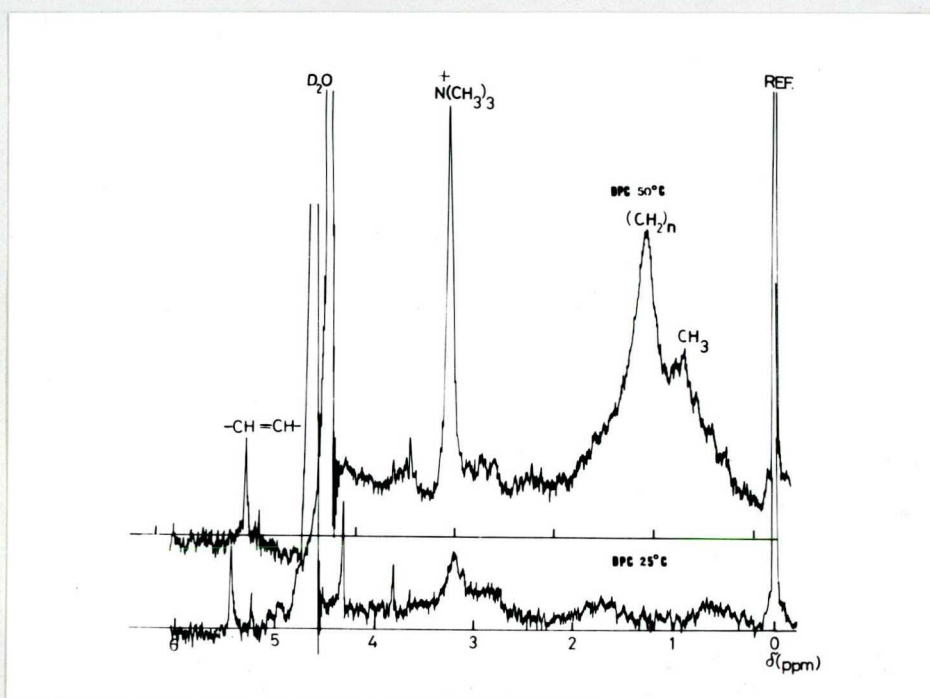
A lipidekkel folytatott nagyfelbontóképességű NMR spektroszkópiás vizsgálatok véljünk kettős volt:

a./ Olyan modellrendszerek tanulmányozása, melyek segítségével közvetlenül demonstrálható, hogy a lipidek zsírsavjainak telítetlensége, továbbá az azonos telítettségű és lánchosszuságú zsírsavak esetében a lipidek fejcsoportjának minősége egy adott hőmérsékleten miképpen hat a molekulák mozgékonyására.

b./ Különböző hőmérsékleteken növesztett MIR és PEN foszfolipidjeiből készített vezikulák spektrumának összehasonlítása az alkillánc mozgékonyág szempontjából.

A 3. Ábrán észterkötésben két palmitinsavat tartalmazó foszfatidilkolin /DPPC/ - melynek fázistranzíciós hőmérséklete  $41,5^{\circ}\text{C}$  - vezikuláinak spektruma látható. Az ábrán jól látszik, hogy a molekula fejcsoportjának  $/\text{N}/\text{CH}_3/3$   $\delta=3,2$  ppm/ és alkilláncának  $/\text{CH}_2/_{\text{n}}$ ,  $\delta=1,3$  ppm ill.  $\text{CH}_3$ ,  $\delta=0,8$  ppm/ mozgékonyága nagyságrendekkel nagyobb, ha a lipideket tranzíciós hőmérsékletüknél magasabb hőmérsékleteken vizsgáljuk. /A jel intenzitása egyenesen és szélessége fordítottan arányos a mikroviszkozitással, amint az előző feje-

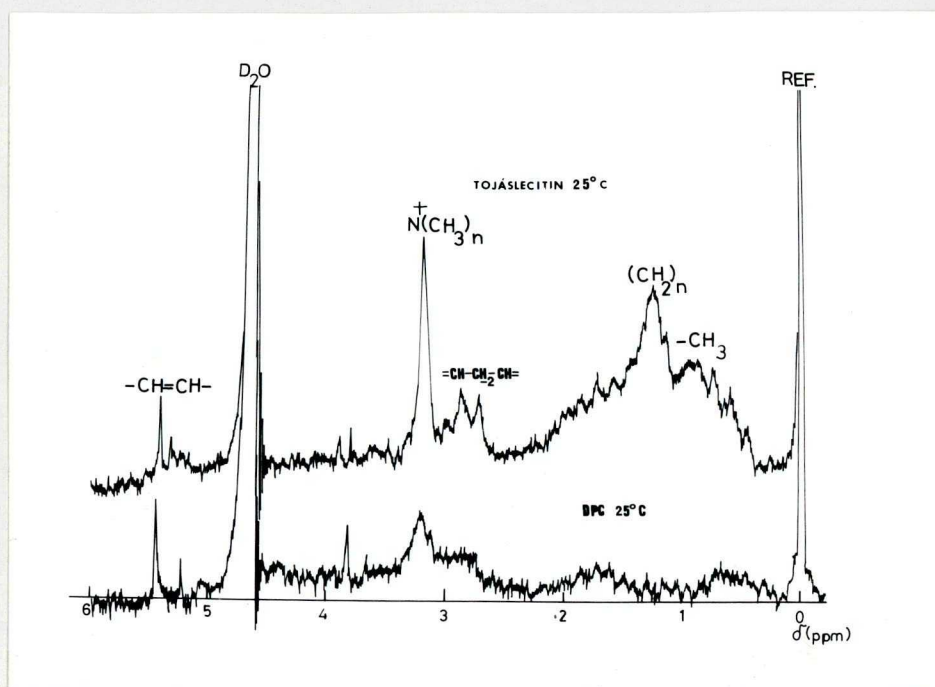
zetben leirtuk./



3. Ábra

DPPC deuterált vízben készített vezikuláinak NMR spektruma  
25 és 50 °C-on

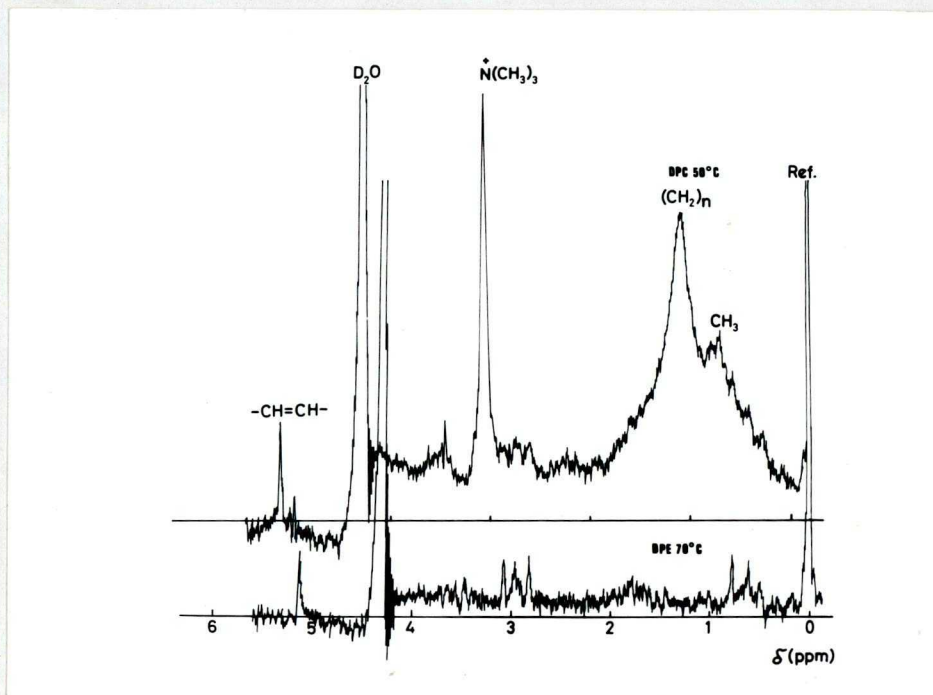
A következő ábrán /4. Ábra/ a részben telítetlen zsírsavakkal észterezett tojáslecitin és DPPC spektrumát vetettük össze 25 °C-on. A telítetlen zsírsavak molekuláris rendezetlenséget növelő hatása mind a fejcsoport, mind az alkillánc jelének összehasonlításából kitűnik.



4. Ábra

Tojáslecitin és DPPC deuterált vízzel készített vezikuláinak NMR spektruma 25 °C-on

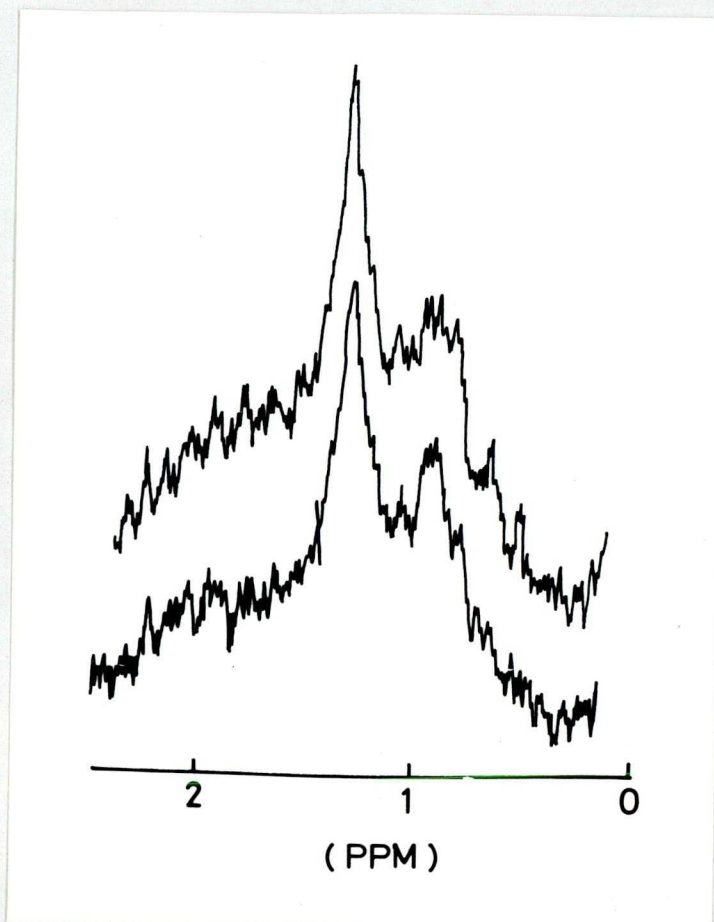
Abban az esetben, ha a foszfolipidek azonos zsírsavakkal észterezettek, de a fejcsoportjuk eltérő, markáns különbségek láthatók az alkillánc fluiditásában. /5. Ábra/ A DPPE zsírsavjainak mozgása még 70 °C-on is szinte teljesen gátolt, mobilitása meg sem közelíti a DPPC 50 °C-on, vagy a tojáslecitin 25 °C-on mérhető értékeit. A DPPE molekuláinak primer aminja merőben más tulajdonságot ad a molekulának, mint a DPPC kvaterner nitrogénjének jelenléte. /A DPPE fejcsoportjának kisebb térkitöltése miatt a membrán pakoltsága nagyobb, a zsírsavak mozgástere kisebb./



5. Ábra

DPPC és DPPE deuterált vízben képzett vezikuláinak NMR spektruma 50, ill. 70 °C-on

A növények membránfoszfolipidjei között található PC és PE /a plazmamembrán fő lipidkomponensei/ aránya és telítetlensége, amint azt a fenti modellrendszerrel is bizonyítottuk, alapvetően fontos tényezője a membránok fluiditásának és ezen keresztül a fagyállóságának. A fenti rendszer alkalmasnak bizonyult arra is, hogy segítségével a növények foszfolipidjeinek alkillánc mozgékonyágát megítéljük és a kapott kép alapján összehasonlításokat tegyünk. A 25 °C-on 7 napig nevelt MIR és PEN izolált foszfolipidjei alkillánc mozgékonyágát szemlélteti a 6. ábra.



6. Ábra

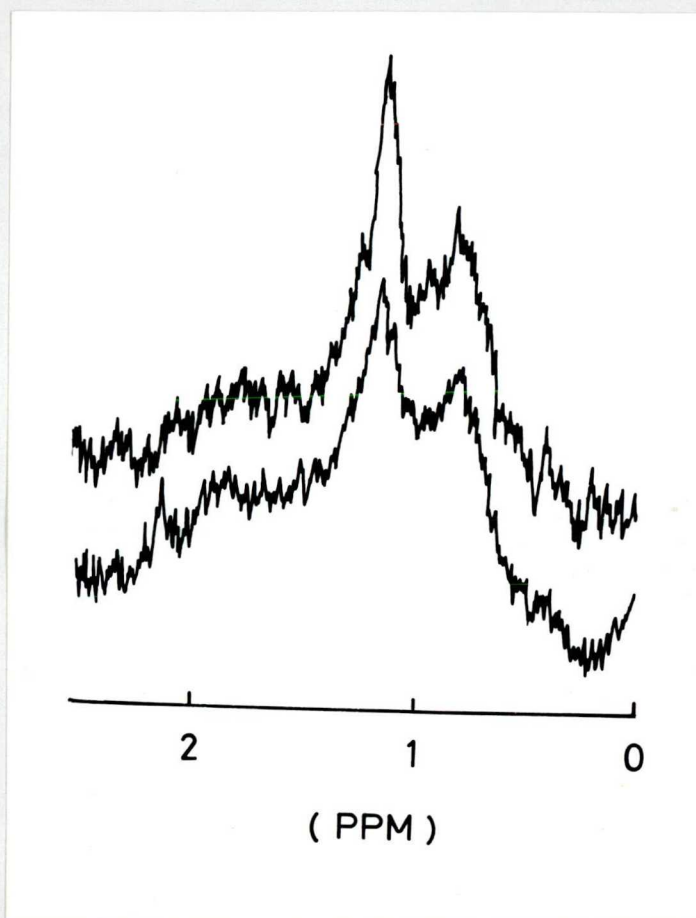
7 napig 25 °C-on nevelt MIR és PEN foszfolipidjeinek deuterált vízben készített vezikuláinak NMR spektrumrészlete  
50 °C-on

/Fent: MIR; alatta: PEN/

A különböző fejcsoportok és a foszfolipidekbe észte-  
rezett zsírsavak telítetlenségi állapotának közös hatása jól  
lemérhető a spektrumok alkillánc régióinak összevetéséből.  
/A növények foszfolipidjei spektruma 2 ppm-nél nagyobb tar-  
tományának elemzésétől - a sokkomponensű rendszer bonyo-  
lultsága miatt - eltekintettünk. A 25 °C-on nevelt 7 napos

növények foszfolipidjei alkillánc mozgékonyága nem különbözik. /Azonos zsírsav- és foszfolipid összetétel./

A következő ábrán /7. Ábra/ a télállósítás után 6 órán keresztül  $-12^{\circ}\text{C}$ -on tartott MIR és PEN foszfolipidjei vezikuláinak NMR spektrumrészlete látható.



7. Ábra

A télállósítás után 6 órán keresztül  $-12^{\circ}\text{C}$ -on tartott MIR és PEN leveleinek foszfolipidjeiből deuterált vízben készített vezikulák NMR spektrumrészlete

/Fent: MIR; alul: PEN/

Az ábrából kitűnik, hogy az említett fagyhatás után a MIR foszfolipidek zsírsavjai a stresszhelyzetet követően nagyobb mozgékonyaságúak, mint a PEN-é. A jelenség hátterében - mivel izolált foszfolipidekről van szó -, és kizártak a foszfolipid-egyéb lipid, foszfolipid-fehérje, ill. a foszfolipid-ion kölcsönhatások - a közel azonos zsírsavösszetételekből ítélve csakis a komponensek eltérő aránya, azaz a már ismertetett fejcsoport hatás áll. Ez a fejcsoport hatás a fagyálló fajták PC többletével jól magyarázható és hangsúlyozza a PC kulcsszerepét.

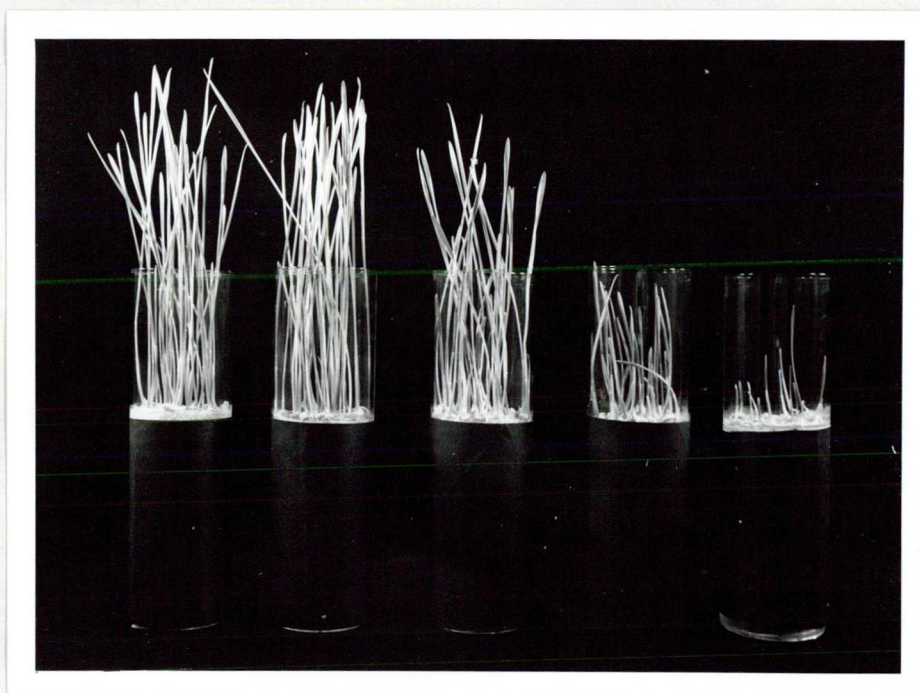
#### 4. Kísérletek a foszfatidilkolin szintjének növelésére a Miranovskaja 808-ban

Az eddigi kísérleteink egyik legnyilvánvalóbb eredményeként azt állapíthattuk meg, hogy a fagyűrő buzafajták a télállósodás során megnövelik foszfolipidjeik mennyiségét, és a plazmamembrán egyik legfontosabb poláros lipidjének, a PC-nek szintje megemelkedik. Kézenfekvő tehát, hogy a fagyállóság mesterséges indukálásának legcélszerűbb módjaul e foszfolipid mennyiségének kedvező megváltoztatását tüztük ki célul.

Több kísérlettel igazoltuk, hogy a búzák mind a leveleiken, mind gyökereükön keresztül felveszik a kolint /esetünkben kolinklorid formában/. A  $^{14}\text{C}$  jelzett CC aktivitásának elhanyagolhatóan kis %-a /1-2%/ a LPC-ben, a fő többsége a



PC-ben volt mérhető inkubálás után a lipidek extraktjából. Nagy mennyiségű CC felvételéhez /az anyag és módszer részben leírtak szerint/ a csapvizben feloldott CC 0, 5, 15, 30, 60 mM-os oldatait használtuk. A 25 °C-on 7 napig különböző koncentrációjú CC oldaton növesztett MIR levelein észlelhető legszembetűnőbb változás a növekedés gátlódás, amely a nagyobb koncentrációknál egyre kifejezettebb /8. Ábra/.



8. Ábra

0, 5, 15, 30, 60 mM CC oldatok hatása a MIR /7 napig 25 °C-on termesztett/ növekedésére

A gyakorlatban számos növekedésgátló anyag ismeretes. Néhány retardáns kémiai felépítésében is van közös vonás; éspedig az a kvaterner nitrogén, ill. trimetil ammónium



csoport, amely az ismert klórkolinkloridban /CCC/ is megtalálható.

A 0, 5, 15, 30, 60 mM CC oldatok foszfolipid összetételre kifejtett hatását három kísérletben vizsgáltuk /V. Táblázat/. A növények egy csoportja 8 napig 25 °C-on nőtt; egy másik csoport ezután újabb 8 napig 2 °C-on nőtt tovább, ill. egy harmadik csoport 16 napig nőtt 25 °C-on. Egy olyan kísérletet is végeztünk, amelyben a 25 °C-on 15 mM CC-n növesztett növények gyökeréről 8 nap után leöntöttük az oldatot és helyette csapvizet tettünk, majd a növények 2 °C-on így újabb 8 napot töltöttek.

Amint az várható volt, a MIR foszfolipid összetétele mind a négy kezeléstípus hatására megváltozott. A változások lényegében minden esetben azonos jellegűek voltak; megnövekedett a PC szintje és ezzel párhuzamosan csökkent a PA %-os mennyisége. /A növények összfoszfolipid szintje a különböző kezelések után nem változott./ Az is megállapítható az V. Táblázatból, hogy azonos CC koncentrációknál a hidegkezelés okozott legjelentősebb PC szint emelkedést. A 8 napig 25 °C-on és további 8 napig 2 °C-on történő nevelés közel 20%-kal magasabb PC %-hoz vezetett, szemben a végig 25 °C-on történő neveléssel. Lényegében a végig melegen növesztett /15 mM CC/ növény /V. Táblázat: c. pont/ %-os PC értékével azonos számszerűen is a 8 napig 25 °C-on 15 mM CC-n, majd újabb 8 napig 2 °C-on csapvizzen nevelt MIR megfelelő PC %-os értéke. A növény tehát igen erősen reagál a

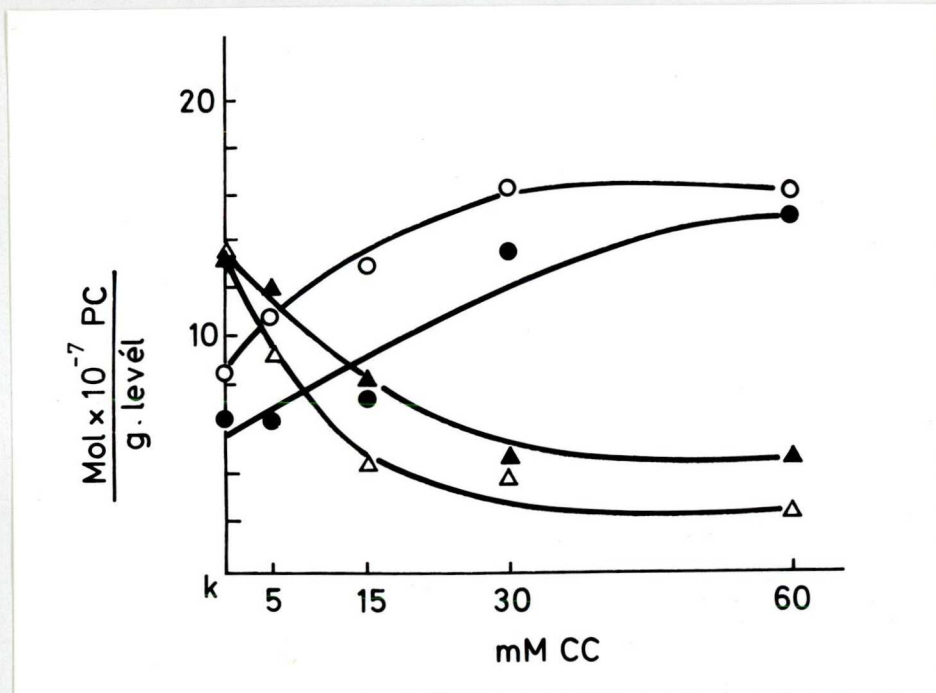
V. Táblázat

A MIR foszfolipid összetétele különböző koncentrációju CC oldatokon nevelve: a, 8 napig 25 °C-on, b, 8 napig 25 °C-on és további 8 napig 2 °C-on, c, 16 napig 25 °C-on, d, 15 mM CC-n 8 napig 25 °C-on és további 8 napig csapvizen 2 °C-on

Kezelés	/mM CC/	Foszfolipidek /%/				
		PA	PC	PI	PE+PG	DPG
a,	0	30,6	24,2	9,2	27,6	8,3
	5	28,4	28,1	9,2	25,6	7,6
	15	27,6	29,9	10,3	24,7	7,5
	30	24,0	31,4	9,9	28,1	6,5
	60	19,6	42,4	9,3	21,3	7,4
b,	0	35,6	24,6	4,4	29,7	5,7
	5	26,5	31,6	6,6	30,6	4,6
	15	17,7	41,6	7,7	29,2	3,8
	30	10,9	42,5	9,9	31,1	5,6
	60	9,3	47,8	10,9	26,9	5,1
c,	0	43,7	20,8	8,5	23,8	3,2
	5	38,2	22,1	6,9	25,9	6,8
	15	25,4	23,6	11,3	35,2	5,1
	30	14,7	42,1	13,4	24,8	-
	60	16,5	43,8	11,6	23,6	4,4
d,	15	38,9	23,3	6,5	27,3	3,0

"hőmérséklet-kényszerre" CC jelenlétében, ám CC távollétében igyekszik "elfelejteni" előéletét - azaz az afiológiás PC szintet membránjaiban.

A CC felvétel és PC-vé alakítás hőmérsékletfüggésének és mechanizmusának mélyebb megértésében segít a 9. Ábra.



9. Ábra

A PC és PA abszolút mennyiségei a 8 napig 25 °C-on és további 8 napig 2 °C-on<sup>○,△</sup>, ill. a 16 napig 25 °C-on<sup>●,▲</sup> 0, 5, 15, 30, 60 mM CC oldaton növesztett MIR leveleiben

Az ábrából kitűnik, hogy minden egyes CC koncentrációnál a növény kevesebb PC-t készít 25 °C-on, mint alacsony hőmérsékleten. A különbségek már alapállapotban, azaz CC távollétében láthatók. Valószínűnek látszik, hogy kellően nagy kon-

centrációknál "telitődés" van, hőmérséklettől függetlenül. A 15-30 mM CC jelenlétében szintetizált  $14-16 \text{ mol} \times 10^{-7} / \text{g}$  lev. PC szint azonos a szántóföldről származó, télállóított 8-10 hetes MIR és a többi fagyűrő buza PC tartalmával. A 9. Ábrán a kétféle hőmérséklet után mért PA tartalmat is feltüntettük a különböző CC koncentrációknál. Valószínűnek látszik, hogy a PC diglicerid-része /legalábbis többségében/ a már meglévő PA-ból származik; bár állításunkat csak a különböző neutrális lipidekre vonatkozó mérésekkel tehetjük teljesen egyértelművé.

Láthatjuk, hogy a kolin felvétellel a növény a CC koncentrációtól és hőmérséklettől függően eredeti foszfolipid összetételét megváltoztatja. Ha feltételezzük, hogy a különböző szervezetek membránjai a szervezet különböző szintű és mértékű adaptációs képessége révén minden körülmények között a növény számára legkedvezőbb fizikai-kémiai állapot elérésére és megtartására törekszenek, kézenfekvő felvetnünk a következőket:

1. Vajon a megváltozott foszfolipid összetétel - amely mint az NMR spektroszkópiás vizsgálatokból egyértelműen kintűnt, nagymértékben befolyásolja a zsírsavak alkiláncának mozgékonyágát - mennyire felel meg a jól adaptálódó, jó fagyűrő MIR-nek? Más szóval; az abnormálisan magas PC szintet és ebből eredően a membrán túlfluidizáltságát képes-e a növény kompenzálni?

2. A plazmamembrán - amely eleve magas foszfolipid és főleg PC tartalmu, így kolinfelvétellel minősége drasztikusan megváltozott - mikroviszkozitás-változása mérhető-e?
3. A kolinfelvétel megnövelte a PC szintet, ami nagyobb mozgékonyságu membránt eredményezett. Vajon a nagyobb fluiditásszint önmagában elvezethet-e a fagyállóság növekedéshez? Azaz, a természetes körülmények között 4-6 hétig tartó télállósítás /amely méréseink szerint a membránok mikroviszkozitásának csökkenéséhez vezet/ időben rövidíthető-e a fluiditásszint mesterséges növelésével?

Az első kérdésre mindenekelőtt a zsirsavak elemzéséből nyert adatok alapján kerestünk helyes választ. Amint a VI. Táblázatban látható, az előzőekben ismertetett különböző kísérleti körülmények között a növények összlipidjei zsirsavösszetételét vizsgáltuk a különböző koncentrációk függvényében. Megállapíthatjuk, hogy a zsirsavak %-os aránya lényegesen nem változik a kezelések során.

Az irodalomból ismeretes, hogy a plazmamembrán lipidjeinek többsége foszfolipid /PC, PE/, míg a kloroplasztisz zsirszerű anyagainak jelentős részét a legtelítetlenebb zsirsavakkal észterezett galaktolipidek alkotják. Érdeemesnek látszott, hogy a foszfolipidek, a PC, ill. a galaktolipidek /MGDG, DGDG/ zsirsavösszetételét külön is megvizsgáljuk /VII. Táblázat/.

VI. Táblázat

0, 5, 15, 30, 60 mM CC hatása a MIR levelek összlipidjei zsirsavösszetételére a különböző kezelések során /a, b, c, d; lásd az V . Táblázat!/  
/

	Kezelés /mM CC/	Zsirsav /%/				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
a,	0	16,4	1,1	3,7	19,4	59,5
	5	16,2	1,2	3,7	20,2	58,7
	15	15,9	0,8	4,3	20,5	58,5
	30	17,0	0,8	5,0	18,7	58,4
	60	20,2	2,1	5,2	23,4	49,2
b,	0	16,6	0,8	3,8	19,2	59,5
	5	13,8	1,1	6,0	17,1	61,2
	15	16,0	0,8	2,5	15,3	65,3
	30	17,7	1,1	3,1	14,5	63,7
	60	19,1	4,1	6,1	14,5	56,3
c,	0	15,6	0,7	3,3	18,9	61,4
	5	16,3	1,3	2,6	16,1	63,7
	15	14,7	0,6	3,0	19,8	65,0
	30	19,7	1,3	5,0	17,4	56,6
	60	16,6	1,4	4,4	18,7	59,5
d,	15	15,2	1,3	4,1	22,6	56,8

VII. Táblázat

Összfoszfolipidek, PC, MGDG és DGDG %-os zsírsavösszetétele a 25 °C-on 8 napig +2 °C-on további 8 napig csapvizben, ill. 15 mM CC-n nevelt MIR leveleiből

Lipid	Kezelés /mM CC/	Zsírsav				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Össz- foszfo- lipid	0	35,8	0,6	3,0	23,8	36,8
	15	38,4	1,0	3,5	27,8	29,3
PC	0	25,1	3,4	7,3	39,8	24,4
	15	39,9	7,0	11,0	28,8	13,2
MGDG	0	6,1	1,1	3,6	14,5	74,2
	15	24,0	1,4	2,6	14,1	57,9
DGDG	0	27,2	1,8	1,3	8,6	61,2
	15	13,0	1,7	1,2	10,6	73,5

A vizsgálatokat a 15 mM CC-n felnövő MIR leveleken végeztük. A foszfolipidek és elsősorban a PC ugyanis, - amint az irodalmi áttekintés részben már említettük - közvetlen szerepet játszik a kloroplasztisz galaktolipidjeinek telítetlen zsírsavakkal való ellátásában. A folyamat oly módon történik, hogy a PC-ben észterezett olajsav - többféle elképzelés szerint - linolsavvá telítetlenődik, magán a PC molekulán és ez a linolsav linolénsavvá telítetlenedve jelenik meg a galaktolipidek zsírsavkészletében.



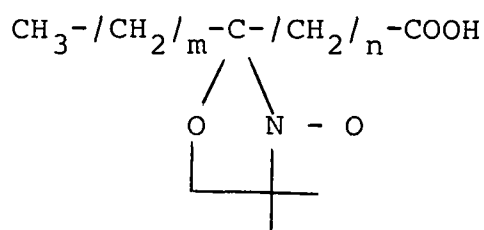
/Jelzett olajsav PC-be történő felvételét, fokozatos telítetlenődését, majd galaktolipidekbe történő beépülését buzákban alacsony hőmérsékleteken mi is kimértük./

A VII. Táblázat nagyon jelentős változásokat mutat és jelzi, hogy az összlipidek zsírsavösszetételének változatlansága téves következtetések levonására készíthető, és az egyes lipidfélésegek zsírsavösszetételének elemzésével kaphatunk helyes képet a PC felszaporodás hatásáról.

Az összlipideknek kb. 50 %-át kitevő galaktolipidek a kloroplasztisz lipidkomponensei, a plazmamembrán /amely az össz membránlipideknek kb 10 %-át tartalmazza/ főként foszfolipidekből áll. A táblázatból kitűnik, hogy a foszfolipidek keveréke kevesebb 18:3-at és több 18:2-t, míg a PC mind 18:2-ből, mind pedig 18:3-ból kb. 10 %-kal kevesebbet tartalmaz CC kezelés után. Eltér a kétféle galaktolipid zsírsavösszetétele is; az MGDG telitettebb, a DGDG telítetlenebb, mint a kontroll. Következtetésként megállapíthatjuk, hogy a kolin felvétel sokkal nagyobb mértékű változásokat eredményezett a lipidanyagcserében, mint azt előzőleg feltételeztük; továbbá, hogy a fentiekből úgy tűnik, a plazmamembrán foszfolipidjei a mozgékonyabbá vált fejcsoport fluidizáló hatását a molekulák alkiláncainak keményítésével részben kompenzálják.

## 5. Fluiditás mérés a megnövekedett PC tartalmu növény plazmamembránjában

A plazmamembrán izolálása növényekből nehézkes és bizonytalan eljárás. Ugyanakkor - mint már hangsúlyoztuk - a növény alacsony hőmérsékleteket túlélő képessége szempontjából éppen ennek a strukturának az épsége az egyik legfontosabb tényező. Az irodalomból több indirekt fizikai mérőmódszer ismeretes a különböző membránok poláros, vagy hidrofób öve mikroviszkozitásának mérésére. Ezek közül az egyik legáltalánosabb az ún. spinjelölt zsírsavak módszere. Ha egy modell vagy in vivo membránrendszer lipidövének mozgékonyági viszonyait kívánjuk feltérképezni /tengely körüli forgás, laterális diffúzió, flip-flop mozgás stb./, e célra a rendszerrel legnagyobb analógiát mutató zsírsavjelölők a legalkalmasabbak. Elhelyezkedésük a membránok hidrofób övében azonos az észterezett zsírsavak orientációjával, másrészt a párosítatlan elektront tartalmazó nitroxid /más néven doxyl/ gyűrű a zsírsavlánc minden egyes C atomjára szubsztituálható. A spinjelölt zsírsavak nemzetközi megállapodás szerinti általános képlete: I/m,n/



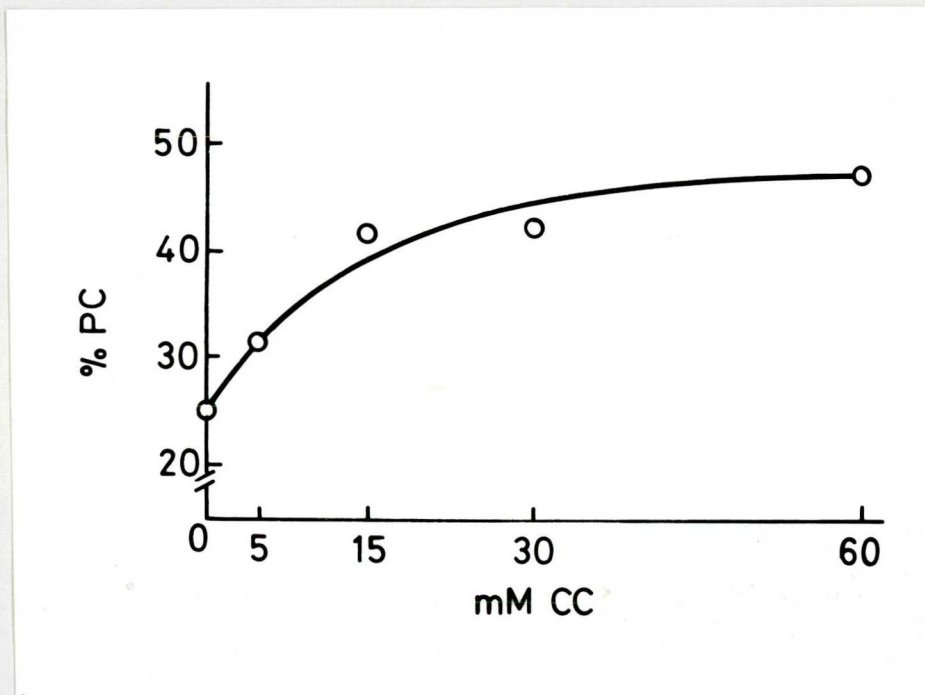
A spektrum - amely a mágneses térerősség függvényében a rezonanciahelyeken mért abszorpcióértékek első differenciálhányadosa - elemzéséből még a membránok különböző mélységeinek mikroviszkozitására is következtetni tudunk. A spinjelölt zsírsavak izolált protoplaszt plazmamembránba történő bevitelét sikerrel megoldottuk. A minták ESR spektrumának elemzéséből az un. rendparaméter /  $S_A$  / ill. rotációs korrelációs idő /  $\tau_c$  / értékei számíthatók, melyek közvetlen kapcsolatba hozhatók a gyök környezete által megszabott mozgékonyági viszonyokkal /minél nagyobb a szám, annál merevebb a membrán/. Természetesen feltételezhetjük, hogy a membránokba juttatott zsírsavjelölők - mint általában a szabad zsírsavak - karboxil-csoportjukkal a foszfolipidek glicerol övéhez kapcsolódva "usznak" az észterezett zsírsavak között, többé-kevésbé azok alkiláncával párhuzamosan elhelyezkedve.

Kísérleteink célja az volt, hogy a membránok összetételének megváltozását eredményező izoterm beavatkozás közvetlen, mikroviszkozitás változásban megnyilvánuló hatását - annak jellegét és mértékét - a zsírsavövben meghatározzuk. A láncmozgékonyosság az eredetileg un. all-transz állapotban levő alkilánc C-C kötés mentén történő és un. transz-gauche átmeneteket eredményező csavarodásaival, ill. ezek előfordulásának valószínűségével arányos. Ezen átmenetek valószínűsége a fejcsoporttól távolodva nő. A telítetlen

zsírsavak kettős kötési cisz térállásuak, e térállás miatt a molekulák nagyobb térigényűek. Emiatt a nagyobb térigény miatt a szomszédos zsírsavmolekulákon a fentebb említett átmenetek nagyobb valószínűséggel jönnek létre, vagyis a telítetlen rendszerek mozgékonyasága nagyobb. E mozgékonyaság azonban függ a foszfolipidek fejcsoportjának minőségétől is - amint azt az irodalmi adatok és a közölt NMR spektrumok is bizonyították. E mozgékonyasági viszonyok egy lipid kettősrétegben belül vertikálisan is valamilyen gradiens mentén változnak, ám a mozgékonyasági viszonyok eredőjeként egy foszfolipid vagy foszfolipid keverék jól definiált tranzíciós hőmérséklettel jellemezhető, amely hőmérséklet alatt a folyadékkristályos állapottal együttjáró mozgékonyaság megszűnik és a rendszer az ún. szilárd-gél strukturába megy át, mozgékonyasága 0.

Vizsgálatainkat a PC képzés szempontjából legeredményesebb /25 °C 8 nap + 2 °C 8 nap/ kolin felvételi kísérletekkel végeztük. A különböző CC koncentrációjú oldatokon nőtt MIR leveleiből nyert protoplasztok plazmamembránjai lipidövének rendezettségét tükrözi a 10/a, b, c ábra. A 10/a ábrán a 25 °C 8 napig + 2 °C 8 napig termesztett MIR leveleinek összfoszfolipidjei 100 %-ában adtuk meg a PC tartalmat a CC koncentráció függvényében. A növények plazmamembránjaiban a PC-t tekintve feltehetően ugyanilyen mértékű arányváltozás megy végbe, és amint arra az előbbi-

ekben következtettünk, a fejcsoport régió megnövekedett fluiditását /az adott hőmérsékleten optimális fluiditás szint beállítása céljából/ a növény esetleg a foszfolipidek zsírsavjai segítségével kompenzálja.

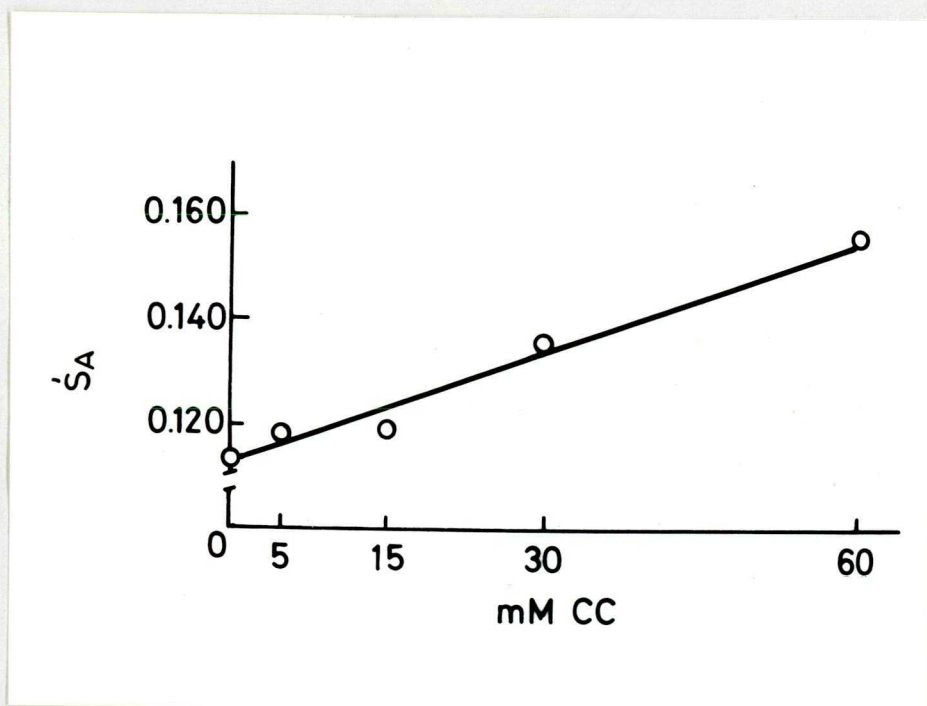


10/a Ábra

A PC % változás 0, 5, 15, 30, 60 mM CC oldaton növesztett /8 nap 25 °C + 8 nap 2 °C/ MIR leveleiben

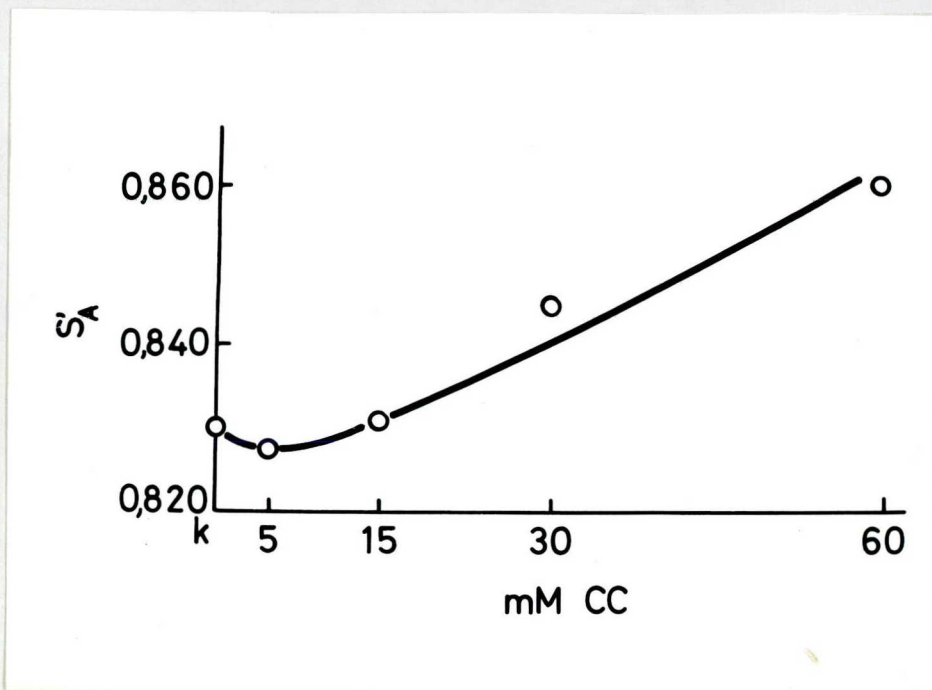
Elképzeléseink bizonyítéka a 10/b, c ábra. A fejcsoporttól legtávolabb - I /1,14/ spinjelölő- arányosan a PC % növekedésével nő a plazmamembrán rendezettsége /10/b Ábra/. Közelebb az egyre nagyobb mozgékonyabb fejcsoporthoz, a

kompenzáció majdnem a fele, sőt kisebb CC koncentrációnál mikroviszkozitás csökkenést mértünk. /10/c Ábra/ Az I /12,3/ jelölő a fejcsoporthoz közeli régió mikroviszkozitásáról ad információt. /Ezekből a rendparaméterekből jól látszik, hogy a fejcsoporttól távolabb a rendparaméter jóval kisebb, mint ahhoz közel, vagyis a fejcsoporttól távolodva a fluiditás egyre nagyobb./



10/b Ábra

A rendparaméterek a fentiek szerint nevelt MIR protoplaszt plazmamembránjában I /1,14/ jelölő alkalmazásakor



10/c Ábra

A rendparaméterek /  $S_A$  / értékeinek változása a CC kezelt MIR protoplaszt plazmamembránjában I /12,3/ jelölő alkalmazásakor

Az eddigiekből egyértelműen megállapíthatjuk, hogy az abnormálisan magas PC szint fluidizáló hatását a növény a zsírsavak telítésével igyekszik kompenzálni. A beállított technika segítségével a jövőben azokra a további és érdekes kérdésekre is válaszolhatunk, hogy a kompenzáció nagysága hogyan függ a hőmérséklettől, az egyes fajták eredeti fagyállóságától stb.



## 6. Mesterséges fagyállóság indukció

A növények hideg- és fagytűrő képességének megállapítására irányuló kísérletek egyik célja az volt, hogy a nyert ismeretek birtokában úgy módosítsuk azokat a növény számára kárt nem okozó beavatkozással, hogy az alacsony hőmérsékleteket tűrő képességük fokozódjék.

Adataink bizonyították, hogy a legeredményesebb beavatkozások a membránlipidek, elsősorban a plazmamembrán alkotó foszfolipidek mennyisége és főleg aránya megváltoztatásának irányában várhatók.

A fagyállóság megváltoztatásának - vagyis elképzeléseink szerint mindenekelőtt a plazmamembrán lipidösszetétele megváltoztatásának - egyik formája, amint azt bizonyítottuk kísérleteinkkel, az aminoalkoholos kezelés volt. A vizoldékony aminoalkohol felszivódása nem ütközött nehézségekbe: beépülése a PC-be ugyanakkor lényegesen megváltoztatta a foszfolipidek arányát a kontroll növényekhez képest. A PC megnövekedett szintjével párhuzamosan - laboratóriumi körülmények között - a MIR leveleinek fagyállósága egy adott hűtési sebességnél megnőtt. Az eredményeket a VIII. Táblázatban foglaltuk össze.

A VIII. Táblázatból a következőket állapíthatjuk meg: a 25 °C-on nevelt /egyébként kiváló télállóságu/ MIR -2 °C körül megfagy. /Nem változik a fagytűrőképessége akkor sem,



ha további néhány napig szobahőn tovább nő a növény./

### VIII. Táblázat

Fagyállóság értékek /LH<sub>50</sub>/ 2 °C/óra hűtési sebességnél a különböző ideig 25 °C-on vagy ezt követően 2 °C-on tartott MIR leveleiben. A növények csapvizen, vagy 15 mM CC oldaton, ill. földben nőttek.

Kezelés	LH <sub>50</sub> / °C /
25 °C, 8 nap, csapviz	- 2,2
25 °C, 8 nap, 15 mM CC	- 12,3
25 °C, 8 nap +2 °C, 8 nap csapviz	- 7,3
25 °C, 8 nap +2 °C 8 nap, 15 mM CC	- 13,7
25 °C, 8 nap +42 nap edzés föld	- 12,5
25 °C, 8 nap 15 mM CC + 2 °C, 8 nap viz	- 9,7

Ha a 25 °C-on való növesztést alacsony hőmérsékleten /2 °C/ folytattuk /végig csapvizen/, 8 nap alatt -7,3 °C-ra, 42 nap alatt pedig /földben/ -12,5 °C-ra nőtt a levelek fagy-tűrése. Ezek a mérések jó összhangban vannak a MIR természetes körülmények között tapasztalható tűrőképességével; meg kell azonban jegyeznünk, hogy a természetben igen ritka az ilyen gyors hőmérsékletcsökkenés. Másrészt a vízkultúra viszonyok pl. éppen a növények vízháztartásának megváltoztatásával nem tekinthetők minden szempontból összevethetőnek a földre ültetett növényekkel.

Alapvetően megváltozott a helyzet, ha a növények CC

jelenlétében nőttek. A 25 °C-on 8 napig 15 mM CC-n termesztett MIR fagyállósága lényegében eléri a 6 hétig CC nélkül nevelt, maximálisan edzett egyedek tűrőképességét. A MIR akkor mutat legnagyobb túlélést, ha néhány napig 2 °C-on tartjuk 15 mM CC oldaton. Ez az érték csökken, ha a CC előkezelést 25 °C 8 nap után csapvizes növesztés váltja fel, bár még mindig nagyobb, mintha a növények ugyanilyen hőmérsékleteken, de végig csapvizen nőnek / -9,7 °C /. Ezzel a kísérlettel sikerült bebizonyítanunk, hogy az exogén CC nyomán megnövekedett PC szint a kezelés után /annak megszüntetésével/ rövidesen fiziológiás értékre áll be. Másrészt, hogy a megnövekedett fagyállóság részleges felejtése mögött olyan hatások is húzódnak, amelyeket szintén a CC bevitel hozott létre, de nem a megváltozott PC tartalommal függnek össze, hanem valamilyen CC prekuzort igénylő más anyag magasabb intracelluláris szintjével. Több elképzelésünk közül a feltehetően gibberellin csökkenést okozó hatást kell kiemelnünk, miután több olyan gibberellin gátló retardáns ismeretes az irodalomból, amelyek trimetil csoportot /pl. CCC/ mint közös molekularészletet tartalmaznak.



## VII. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A télállósított buzafajták membránlipidjeinek és fagy-  
tűrésének kapcsolatáról eredményeink alapján a következőket  
állapíthatjuk meg:

1. Az eltérő télállóságu buzafajták leveleinek zsírsav-  
összetétele nem különbözött. Ha egy 25 °C-on 7 napig  
nevelt buzafajta a levelének zsírsavösszetételét /nem  
közölt kísérletek/ hasonlítjuk össze a télállósított  
azonos levelek zsírsavösszetételével, kb. 15 %-kal na-  
gyobb a linolénsav %-os aránya a télállósított levelek-  
ben /ezt más szerzők is megfigyelték/ /62/. Itt azonban  
felmerül az a kérdés, hogy mennyire helytálló összehasonlí-  
tani egy 7 napos növényt néhány hetes növényel, és ez  
az időfaktor kikerülhetetlensége értékelhetetlenné teszi  
ezt az összehasonlítást. Ujabban De la Roche /63/ és mtsai gá-  
tolták buzában a linolénsav szintézist, és ez nem okozott  
rosszabb fagyűrést a növényben. Valószínű, hogy a zsír-  
savak telítetlenségének is van szerepe a fagyűrésben,  
ez azonban nem meghatározó szerep.

2. A foszfolipidek szerepe

A lipidanalitikával nyert adataink és irodalmi hivatko-  
zások alapján /1,2,3,5/ megállapíthatjuk, hogy a tél-  
állósodás folyamán a jó fagyűrő egyedekben a foszfolipi-  
dek mennyisége nőtt, ebből pedig az irodalomra támaszkod-

va /10/ azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a membránok felszine nagyobb lett /az endoplazmás retikulum és a plazmamembrán felszine/. Mivel alacsony hőmérsékleten az összes kémiai folyamat sebessége kicsi, a növény az aktiv felszin növelésével próbálja a membránkötött folyamatok működését biztosítani.

Nagyon fontos a növény túlélése szempontjából, hogy a plazmamembrán permeabilitása mindig megfelelő legyen: lehülés során a víz egy részének a sejtből ki kell áramlania /10, 11/ és a zavartalan, vagy még inkább nagyobb plazmamembrán permeabilitás nagymértékben hozzájárul a túléléshez. Így feltehető, hogy a membránok felszinének területnövekedése épp ugy benne foglaltatik az adaptációban, mint ezen membránok fluiditásának szabályozása. /A fagyérzékeny növények képtelenek a felszin növelésére. /

A membránfelszin növekedésével egyidőben a foszfolipidek összetétele is megváltozott. A PC mennyisége kb. 3-szoros volt a fagyűrő egyedekben a fagyérzékenyekhez képest. Ezzel párhuzamosan a fagyérzékeny növény foszfolipidjeinek mozgékonyasága a fagyhatás után sokkal kisebb, mint a fagyűrőé, bár zsirsavkészletük azonos. Az, hogy a PC képez a legkevésbé zsufolt membránt, /ennél fogva legmozgékonyabb membránt/ jól beleillik a fenti eredményekbe /13, 14/. A PC felhalmozódást hidegkezelést köve-

tően megfigyelték gombákban /25, 26/ és mélyhűtött emlős sejtekben /64/.

A PC fejcsoportja okozta jó tulajdonságait az NMR felvételeken egyértelműen bizonyítottuk a modellkísérletekben. A télállósított, majd fagyasztott levelek /MIR és PEN/ izolált foszfolipidjeinek NMR spektrumából megállapíthatjuk, hogy a MIR-ből izolált foszfolipid vezikulák mozgékonyasága nagyobb és mivel a zsírsavak összetétele azonos, a PC mennyisége pedig nő a MIR-ben, ez a mozgékonyaság növekedés a fejcsoport hatása.

A PC hidrolizise az egyik korai jele a hidegkárosodásnak a hidegérzékeny növényekben. Pl. uborka /23/ és a szójabab /21/ sziklevelében fagypontra alatta a PC szintén hidrolizált.

Hogy mikor és milyen hőmérsékleten következik be ez a hidrolizis, ez a membrán "jóságának" fokmérője, és ez a hőmérséklet egybeesik a növény fagytürelésének határával. Ha a membrán még alacsony hőmérsékleten is folyékony-kristályos állapotban marad, a membránok nem töredeznek szét, a foszfolipáz-D nem "szabadul ki" a membránból /fiziológiai körülmények között az enzim ugyanis inaktív/. Bizonyos szerves oldószerek jelenlétében homogénezve a szöveteket, a foszfolipáz-D szintén aktiválódhat és az extraktban a PA szint emelkedése mérhető /65/. Forró izopropanol jelenlétében végzett homogénezéssel ez a műtermék PA képző-

dés kiküszöbölhető /56/. A roncsolódott membránu növényt magasabb hőmérsékletre helyezve a foszfolipáz-D elkezd működni és a PC hidrolizál /65/. Ezért a PA/PC arány mérésével a növények a fagytűrésük alapján sorba állíthatók és ez olcsó, egyszerű módszert ad a növénynemesítőknek a fagytűrés megbecslésére.

### 3. A foszfolipid összetételének megváltoztatása

A PC kedvező tulajdonságai a fagyállóság tekintetében ismertek. A PC bioszintézisének 3 alapvető útja ismeretes. A PE metilálódásának, továbbá az ugynevezett fejcsoport cserének növényekben inkább csak elvi jelentősége van. In vivo legjelentősebb CDP-kolin ut, ez esetben a PC PA-ból vagy más poolból származó digliceridekből és CDP-kolinból keletkezik. Nemrégiben sikeres kísérletek történtek a fejcsoport összetételének módosítására állati /67/ és növényi /68/ sejtekben is. A paradicsom hidegtűrése megváltozott, ha a membránt PE-ben dúsították /69/. Ha a növények CC jelenlétében nőttek, a legszembetűnőbb változás a koncentrációfüggő növekedés gátlódás volt. A CC az  $N/CH_3/3$  csoport jelenléte miatt hasonlít több, a mezőgazdaságban alkalmazott növekedésgátlóhoz. Valószínű, hogy a fagytűrés növekedésének okozója csak részben a CC által előidézett membránmódosítás. Ugyanis azokban a kísérletekben, ahol a CC-n nőtt növények 8 nap után vizen nőttek tovább, a PC-szint a kontroll értékre csökkent,

és evvel egyidőben fagytűrésének kb csak 50 %-a "veszett el" /70/. A növekedésgátlók a hormonok bioszintézisét megváltoztatják. A növekedésgátlókkal kezelt növények fagytűrése megnőtt /71/ és gibberelinnel ezt a fagytűrés növekedést el lehetett tüntetni /72/. Ezekből levonható az a következtetés, hogy a növények hormonháztartása a fagytűrés kialakításában szintén fontos szerepet játszhat.

A növényekben a PC szintje arányos volt az alkalmazott CC koncentrációval, és függött a termesztés hőmérsékletétől. A hidegen tartott növények minden CC koncentrációnál több PC-t készítettek, mint az ugyanannyi ideig 25 °C-on növelt növények. A PC szintjének emelkedése mellett az összfoszfolipidek szintje változatlan maradt. A PC jelentős része a PA-ból keletkezett. A növény ugyanakkor a kolin-"kényszer" elmultával helyreállítja az eredeti PC arányt.

A 15 mM CC-n nőtt növények tűntek a legalkalmasabbnak a fagytűrés vizsgálatára, figyelembe véve a növekedésgátlódást és a membránmozgékonyági viszonyokat.

Bármilyen körülmények között 15 mM CC-n nőtt növények fagytűrése jobb volt, mint az ugyanolyan körülmények között, csapvizen nőtt növényeké.

A CC oldaton nőtt növények plazmamembrán foszfolipidjeinek zsírsav része a CC koncentráció növekedésével merevedik. Ez a merevedés a 30 és 60 mM CC jelenlétében nagyon

nagy. Ugyanakkor 5 mM CC jelenlétében enyhe fluiditás növekedés volt tapasztalható - a kontroll állapothoz képest - abban az esetben, ha a fejcsoportokhoz közeli helyen spinjelölt zsírsavval /I/12,3/ jelölünk. A fejcsoporttól távolodva /I/1,14/ jelölő/ ez a fluiditás növekedés nem észlelhető. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a növények membránjainak az adott hőmérsékleten van egy optimális - a zsírsavak és a fejcsoportok által megszabott - fluiditásszintje és a növény olyan lipideket szintetizál, hogy az optimális fluiditást tartani tudja.



## VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Nagyszámu méréssel igazoltuk, hogy az eltérő fagy-tűrőképességű búzák a télállósítási folyamat során - arányosan az alacsony hőmérsékleteket tűrő képességükkel - foszfolipideket akkumulálnak. A foszfolipidek mennyiségi változását arányváltozás is kíséri: a fagy-tűrő egyedek membránjai PC-ben gazdagabbak. A PC alacsonyabb szintje a fagyérzékeny búzában a foszfolipáz-D enzim aktiválódásával, a PC PA-vá történő átalakulásával részben magyarázható.

A degradációs folyamat követése - a foszfolipid mérés egyszerűsége révén - ismeretlen tűrőképességű búzák fagyállóságának gyors tesztelési lehetősége lehetne a gyakorlatban.

A levelekből extrahált foszfolipidek liposzóma szuszpenzióján végzett NMR spektroszkópiás kísérletek is alátámasztották azt a feltevésünket, hogy a lényegében azonos zsírsavösszetételű membránlipidek eltérő molekuláris mozgékonyága elsősorban fejcsoport különbségekkel magyarázható.

A MIR búzafajta CC tápoldaton növesztve leveleinek PC szintjét jelentősen megnövelte. A növekedés mértéke alacsony hőmérsékleten nagyobb volt, mint 25 °C-on. A képződött PC mennyiségével arányosan csökkent a levelek PA tartalma, alátámasztva a PC un. CDP-kolin uton való képződésének való-

szinüségét.

A megváltozott foszfolipid összetételű növény leveleiben a különböző poláros lipidek zsírsavösszetétele sem állandó. Ez azonban a totál lipidek elemzéséből nem tűnik ki. A PC deszaturációs folyamatokat gyorsító szerepével magyarázható a DGDG telítetlenedése. Azokban a strukturákban viszont, ahol a PC maga is jelen van, csökken a telítetlen zsírsavak mennyisége. A fejcsoport fluidizáló és az ezt kompenzálni próbáló zsírsav telítődés rigidizáló hatásainak együtteseként a növény membránjai lipidövének mikroviszkozitását feltehetően egy fiziológiás érték körül tudja tartani. Az izoterm önregulációs mechanizmus működését plazmamembránban - az irodalomban először - az ESR technikával bizonyítottuk.

A kedvező membránmódosítás, a homeoviszkozus állapot természetes körülmények között 5-6 hétig történő elérésének lerövidítését, az 1-2 hetes növények fagyállóság növekedését eredményezte. A növények membránmódosítás útján történő fagyállóságnövelése beláthatatlanul nagy lehetőségeket kínál e módszer gyakorlati hasznosításának terén.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Levitt, J.  
Responses of Plants to environmental stress. New York:  
Academic Press /1972/
2. Singh, J., de la Roche, I.A. and Siminovitch, D.  
Nature, 257: 669-671 /1975/
3. Yoshida, S. and Sakai, A.  
Plant and Cell Phys., 55: 353-359 /1973/
4. De Silva, K.L.N.S., Weinberger, Kates, M. and de la Roche, I.A.  
Can.J.Bot., 53: 1899-1905 /1975/
5. Willemot, C.  
Plant Physiol., 55: 356-359 /1975/
6. de la Roche, I.A., Andrews, C.J. and Kates, M.  
Plant Physiol., 51: 468-473 /1973/
7. de la Roche, I.A., Andrews, C.J., Pomeroy, M.K. and Kates, M.  
Can.J.Bot. 50: 2401-2409 /1972/
8. Kuiper, P.J.C.  
Plant Physiol., 45: 684-686 /1970/
9. Siminovitch, D., Simon, J. and De la Roche, I.A.  
Cryobiology, 12: 144-153 /1975/
10. Pomeroy, M.K. and Siminovitch, D.  
Can.J.Bot., 49: 787-795 /1971/
11. Olien, C.R.  
Ann. Rev. Plant Physiol., 18: 387-408 /1967/
12. Mazur, P.  
Ann.Rev.Plant Physiol., 20: 419-448 /1970/
13. Phillips, M.C., Finer, E.G. and Hauser, H.  
Biochim. Biophys. Acta, 290: 397-402 /1974/
14. Michaelson, D.M., Holowitz, A.F. and Klein, M.P.  
Biochemistry, 13: 2605-2612 /1974/

15. Greier, G. Hope, H.J. and Willemot, C  
Can. J. Bot., 53: 1473-1477 /1974/
16. Lyons, J.M. and Andrews, C.M.  
J.Am.Oil.Chem.Soc., 42: 1056-1058 /1965/
17. Sato, N., Murata, N., Miura, Y. and Ueda, N.  
Biochim. Biophys Acta 572: 19-28 /1979/
18. Wilson, J.M. and Crawford, R.M.M.  
J.Exp.Bot., 25., 121-131 /1974/
19. Willemot, C., Hope, H.J., Williams, R.J. and Michaud R.,  
Cryobiology, 14: 87-93 /1977/
20. Farkas, T., Vigh, L., Horváth, I. and Belea, A.  
Cryobiology 15: 565-577 /1978/
21. Wilson, R.F. and Rinne, R.W.  
Plant Physiol., 57: 270-273 /1976/
22. Andrews C.J., Pomeroy M.K. and De la Koche, I. A.  
Can. J. Plant Sci., 54: 9-15 /1974/
23. Wright, M. and Simon, E.W.  
J. Exp. Bot., 249: 400-411 /1973/
24. Yoshida, S. and Sakai, A.  
Plant Physiol., 53: 509-511 /1974/
25. Hunter, K. and Rose, A.H.  
Biochim. Biophys. Acta, 260: 639-653 /1972/
26. Savicki E.H. and Pisano, M.A.  
Lipids, 12: 125-127 /1976/
27. Slack, C.R. and Roughan, P.G.  
Biochem. J., 152: 217-228 /1975/
28. Hitchcock, C. and Nichols, B.W.  
Plant Lipid Biochemistry, Acad. Press., London /1971/
29. Seeling, I.  
Biochim. Biophys. Acta, 515: 105-140 /1978/

30. Fabry, M;E. and Eisenstadt, M.  
J.Membrane Biol., 42: 375-398 /1978/
31. Graziani, Y. and Livne, A.  
J. Membrane Biol., 7: 275-284 /1972/
32. Simensky, M.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA /1974/
33. Thompson, G.A. and Nozawa, Y.  
Biochim. Biophys. Acta, 472: 55-92 /1977/
34. Blank, M.L., Piantadosi, C., Ishaq, K.S. and Snyder, F.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 62: 983-988 /1975/
35. Esko, I.D., Gilmore, I.R. and Glaser, M.  
Biochemistry, 16: 1881-1890 /1977/
36. Akesson, B.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 76: 93-99 /1977/
37. Schroeder, F.  
Biochim. Biophys. Acta, 511: 356-376 /1978/
38. Breidenbach, R.W. and Lyons, J.M.  
Biochim. Biophys. Acta, 443: 157-168 /1976/
39. Williams, E., Sears, B., Allerhand, A. and Cordes, E.H.  
J.Am.Chem.Soc., 95: 4871-4873 /1974/
40. Levy, G.C., Komoroski, R.A. and Halstead, J.A.  
J.Am.Chem.Soc., 96: 5456-5461 /1974/
41. Iavis, J.H., Maraviglia, B., Weeks, G. and Godin, D.V.  
Biochim. Biophys. Acta, 550: 362-367 /1979/
42. Finer, E.G., Flook, A.G. and Hauser, H.  
FEBS Letters, 18: 331-334 /1971/
43. Taylor, R.P.  
Arch. Biochem. Biophys., 173: 596-602 /1976/
44. Griffith, O.H. and McConnel. H.M.M.  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 55: 8-11 /1966/

45. Hubbel, L.W. and McConnel, H.M.  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 64: 20-27 /1969/
46. Miller, R.W. and de la Roche, I.A.  
Biochim. Biophys. Acta, 443: 64-80 /1976/
47. Landsberger, F.R., Lenard, J., Paxton, J. and Compans, W.  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 68: 2579-2583 /1971/
48. Curtain, C.C., Looney, F.D., Marchalonis, J.J. and Raison, J.K.  
J.Membrane Biol., 44: 211-232 /1978/
49. Wade, N.L., Breidenbach, R.W. and Lyons, J.M.  
Plant Physiol., 54: 320-323
50. Patterson, B.D., Kenrick, J.R. and Raison, J.K.  
Phytochemistry, 17: 1089-1092 /1978/
51. Vigh, L., Horváth, I., Farkas, T., Horváth, L.I. and Belea, A.  
Phytochemistry, 18: 787-789 /1979/
52. Vigh, L., Horváth, I., Farkas, T., Horváth, L.I. and Dudits, D.  
In: Proceedings of the 5th International protoplast Symposium, 1979. Pergamon Press, Oxford and Academic Press, Budapest /nyomtatás alatt/
53. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H.  
J.Biol.Chem., 226: 497-509 /1957/
54. Kahovcova, J. and Odavic, P.  
J.Chromatography, 40: 90-96 /1969/
55. Rouser, G., Fleischer, S. and Yamamoto, A.  
Lipids, 5: 494-496 /1970/
56. Horváth, I., Vigh, L., Belea, A. and Farkas, T.  
Physiol. Plant., 45: 57-62 /1979/
57. Rouser, G., Kritchevsky, G., Simon, G. and Nelson, G.J.,  
Lipids, 2: 37-40 /1966/

58. Dexter, S.T., Tottingham, W.E. and Graber, L.F.  
Plant Physiol., 7: 63-78 /1932/
59. Dudits, D., Kao, K.N., Constabel, F. and Gamborg, O.L.  
Can.J.Genet,Cytol., 18: 263-269 /1976/
60. Grenier, G. and Willemot, C.  
Cryobiology, 11: 324-331 /1974/
61. Thompson, L.W. and Zalik, S.  
Plant Physiol., 52: 268-273 /1973/
62. de la Roche, I.A., Andrews, C.J. and Pomeroy, M.K.  
Can. J. Bot., 50: 2401-2409 /1972/
63. de la Roche, I.A.  
Acta Horticulture, 81: 85-87 /1978/
64. Aloia, R.C.  
Comp. Biochem. Physiol., 60B, 19-26 /1978/
65. Yang, S.F., Freer, S. and Benson, A.A.  
J. Biol. Chem., 242: 477-484 /1967/
66. Quarles, R.H. and Dawson, R.C.H.  
Biochem. J., 112: 787-794 /1969/
67. Roughan, P.G. and Slack, C.R.  
Biochim. Biophys. Acta, 431: 86-95 /1976/
68. Engelhard, V.H., Esko, J.D., Storm, D.R. and Glaser, M.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73: 4482-4486 /1976/
69. Ilher, R., Warring, A.J., Lyons, J.M. and Breidenbach, R.W.  
Protoplasma 90: 229-252 /1976/
70. Warring, A.J., Breidenbach, R.W. and Lyons, J.M.  
Biochim.Biophys.Acta, 443: 157-168 /1976/
71. Kretschmer, G. and Leyer, B.  
Albrecht, Theor. Arch. 14: 93-104 /1972/
72. Roberts, D.W.A.  
Can.J.Bot., 49: 705-711 /1971/

Hálás köszönet illeti dr. Farkas Tibor tudományos főmunkatársat, témavezetőmet. Munkámban jó tanácsaival, emberségével nagyon sokat segített.

Megköszönöm az NMR spektrumok elkészítését dr. Dombi György tanszéki mérnöknek /JATE, Szerves-kémiai Intézet/ és Horváth László tudományos munkatársnak az ESR felvételek elkészítését és értékelését /SzBK, Biofizikai Intézet/.