



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**A FAGYTŰRÉS FÉNYSPEKTRUMFÜGGŐ
MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÁSA ÁRPÁBAN**

Doktori értekezés tézisei

Ahres Mohamed

Martonvásár

2021

A doktori iskola

Megnevezése: Festetics Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudományok

Vezetője: Dr. Anda Angéla, DSc.
Az FDI vezetője, Egyetemi tanár
MATE, Georgikon Campus, Környezettudományi
Intézet

Témavezető: Dr. Galiba Gábor DSc.
Tudományos tanácsadó
Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Agrártudományi
Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Növényi
Molekuláris Biológia Csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

A gabonafélék termesztése fontos az emberiség számára, hiszen nem csak az élelmiszereink nagy részét képezik, de az állati takarmányozáson túl, számos ipari tevékenység számára is fő alapanyagforrásként szolgálnak. Ebből kiindulva, kiemelten fontos, hogy a termesztésbe vont növényeinknek nagy termésbiztonsága legyen. A legfőbb problémát az egyre inkább kiszámíthatatlanná váló időjárási körülmények jelentik, melyek következtében a realizált terméshozamok jóval alacsonyabbak lehetnek az elérhető termésmennyiségekhez képest. Az említett időjárási körülmények megváltozásának következtében létrejöhetnek fokozott hőmérsékleti ingadozások, melyek gátolhatják a télállóságot alapvetően befolyásoló genetikailag meghatározott fagyállósági szint kialakulását az áttelelő őszi gabonafélék esetében. Hasonló gonddal nézünk szembe tavasszal, amikor tél végén előforduló meleg hullámok miatt az áttelelő növények elvesztik fagyállóságukat, és károsodnak a rákövetkező fagyok következtében. A munkánk alapja elsősorban az alacsony hőmérséklettel szembeni védekezés és a fagyűrés kialakulásának vizsgálata.

Alapvető kérdés tehát, hogy Magyarországon a hőmérsékletváltozás vagy akár a napi átlaghőmérséklet fluktuáció mennyire gyakori probléma az őszi gabonafélék áttelelésének tekintetében. Áttekintve a Magyar Országos Meteorológiai Intézet adattárát (https://www.met.hu/eghajlat/magyarorszag_eghajlata/eghajlati_adatsorok/Szombathely/adatok/havi_adatok/) megtalálhatjuk, hogy Szombathely térségében az 1901-1930-as évek között a novemberi átlaghőmérséklet 9,37 °C volt, míg az 1981 és 2010 közötti időszakban az majd 1 °C-kal (10,01 °C) emelkedett. Azonban ha megvizsgáljuk a napi hőmérsékleti fluktuációt is, akkor azzal szembesülünk, hogy -4 °C alatti napok száma a XX. század első

30 évének novemberében 10, míg az 1981-2010 közötti időszakban 16 volt. Vagyis a szélsőségesebb időjárási viszonyok ténylegesen előfordulnak hazánkban is.

Mindezen említett tények alapján belátható, hogy egyre inkább szükségesebbé válik az olyan gabonafélék létrehozása, amelyek sokkal ellenállóbbak a környezeti tényezőkre nézve, esetünkben a hőmérséklet jelentős változásaival szemben. A haszonnövények akklimációs képességeinek javítását csak akkor valósíthatjuk meg, ha megismerjük azokat a fő molekuláris mechanizmusokat, melyek szerepet játszanak a növények abiotikus stressz-válaszainak kialakításában.

A hidegedződés indukciójának legfontosabb része a hőmérséklet-csökkenés korai érzékelése. Ez a jelátviteli rendszer azonban igen összetett. Ősszel a környezeti tényezők változására (pl. hőmérséklet, fényintenzitás, spektrumok) van szükség ahhoz, hogy a gabonafélék fiziológiailag felkészüljenek a téli fagyokra. Számos publikációban olvasható a rendszer fény által történő szabályozása. Tudjuk, hogy a napfény spektruma és intenzitása nem állandó, hiszen az hajnalban és alkonyatkor ciklikusan változik, valamint az egyes évszakokban is jelentős eltérést mutat. Naplemente idején a napfény spektrumában szignifikánsan emelkedik a távoli vörös fény aránya a vöröshöz képest, amelyet követően a hőmérséklet is eléri a napi minimumát. Ez a jelenség áll vizsgálódásunk háttérében, és alap hipotézisünket is ebből következtettük vagyis, hogy a növények a csökkent vörös/távoli vörös fény arányt egyfajta jelként használhatják a hőmérséklet-csökkenésre való felkészüléshez. Ezen teóriánk alátámasztására két különböző kísérletet állítottunk be, ahol egy jó fagyűrővel rendelkező őszi árpa genotípusban vizsgáltuk a hőmérséklet, a fényintenzitás és a fényspektrum változástól függő fagyűrés kialakulásának molekuláris háttérét.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Három különböző abiotikus tényező, a hőmérséklet, a fényintenzitás és a fény spektrum hatásának egyenkénti, illetve kombinált jellemzése árpa növények fagyástűrésére.
2. A *HvCBF14* transzkripciós faktor és a CBF-regulon két jól jellemzett tagjának, a *HvCOR14b* és a *HvDHN5* gének expressziójának jellemzése modulált fény- és különböző hőmérsékleti körülmények között.
3. A mesterséges LED-es fényforrások által létrehozott alacsony vörös/távoli vörös (R/FR) fény arány hatásának tisztázása az árpa hormonösszetételére normál és alacsony hőmérsékleten.
4. A jelenség mögött található, a növényhormon-bioszintézisben szerepet játszó gének génexpressziós mintázatainak kiderítése.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A növényi anyag és a növénynevelés körülményei

A kísérletek egy jó hidegtűrővel rendelkező őszi árpa (*Hordeum vulgare spp vulgare var. Nure*) genotípussal végeztük el. Az első kísérletben a magvakból három napos csíráztatást követően, 480 db csíranövényt ültettünk el Jiffy-7 36 mm átmérőjű tápkorongokba (Jiffy Group, Oslo, Norway). A második kísérletben viszont a csíranövények már nem tápkorongokba, hanem földdel feltöltött faládákba (30 cm × 25 cm × 10 cm) lettek szétültetve. Ezt követően a növényeket előnevelés céljából (majd a különböző hőmérsékletű- és fény kezelések elvégzéséhez is) PGV-36-os (Conviron PGV36; Controlled Environments Ltd.; Winnipeg, MB, Canada) modulálható LED fénymennyezettel felszerelt növénynevelő kamrába helyeztük, mind két kísérlet esetében. A növényeket folyamatos 12 órás (12h/12h) megvilágítás mellett 15°C-on tizennégy napon át neveltük 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, ahol a fényt kizárólag egy széles spektrumú „fehér” LED (Philips Lumileds, LXZ25790-y) szolgáltatta. A növényeket heti három alkalommal $\frac{1}{2}$ koncentrációjú Hoagland-táppalattal öntöztük.

3.2. Fény- és hőmérsékleti viszonyok az első kísérlet során

Az előnevelés után, mikor a növények már elérték a megfelelő három leveles fejlettségi állapotot, kezdtük meg a kezeléseket. Ebben a kísérletben a modulálható LED fénymennyezetet hat zónára osztottuk fel, melyekben a kezdeti 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fényintenzitású fehér fény mellett, 125 és 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fényintenzitású zónákat is létrehoztunk. Ezek a területek szolgáltak a kísérletben kontrollként. Itt a megvilágítás egyáltalán nem tartalmazott FR fényt. A maradék három területen a fehér fény mellé távoli vörös fénykiegészítést adtunk szűk 750 nm-es LED-del (Edison Edixeon, 2ER101FX00000001) úgy, hogy a vörös távoli vörös fény aránya (R/FR)

ezekben ~0,5 legyen. A fény, a hőmérséklet és a megvilágított órák száma az első kezelés ideje alatt változatlan maradt, amely összesen tíz napig tartott. Tíz nap eltelte után a második kezelésben az eddig kezelt, majd feldolgozott növények mellett nevelkedett növényeket használtuk tovább. A kialakított zónák mind fényintenzitásban, mind pedig fényspektrumukban megegyeztek a korábban leírtakkal, viszont a kísérlet második szakaszában a hőmérsékletet 5 °C-ra csökkentettük. Ez a kezelés további 7 napig tartott. Mindkét esetben a kezelések első és utolsó napján vettünk mintákat a génexpressziós vizsgálatokhoz, de a fagytesztek elvégzése céljából csak az utolsó napokon gyűjtöttük be a növényi anyagokat.

3.3. Fény- és hőmérsékleti viszonyok a második kísérleti során

Itt az előnevelés után csak két területre választottuk szét a növénynevelő kamránkat. Az egyik területen kizárólag a fehér fény szolgáltatott $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitást a növények felett. A másik zónában a fehér fényt távoli vörös fénnel egészítettük ki, amelyet első kísérlethez hasonlóan a 750 nm-es LED-del (Edison Edixeon, 2ER101FX00000001) valósítottunk meg. A kontroll fehér fény FR nélküli megvilágításához képest a R/FR aránya itt is 0,5-re módosult. A fentiekben részletezett két kísérlet három különböző kezelési változatra osztható. Ezek a variánsok a fénykezelések idején alkalmazott hőmérsékletben, a felhasznált növények korában és a FR fénynek való kitettségükben különböztek egymástól. Mintákat gyűjtöttünk az egyes kezelések első és utolsó napján, nagyjából két órás időtartam alatt, a fények bekapcsolásától számított 6 és 8 óra (ZT6 - ZT8) között. A hidegkezelések alkalmazását az első napon a hőmérséklet fokozatos csökkentésével kezdtük meg, ami 15 °C -ról 5 °C-ra való csökkenést jelentett az éjszaka folyamán, mielőtt a kiegészítő FR fény reggel bekapcsolt volna.

A második kísérletben elvégzett kezelések változatai:

- **FR-M:** A 18 napos növényeket tíz napig 15 °C-on alacsony R/FR aránnyal kezeltük. Az emelkedett FR-expozíció végére a növények többsége elérte a négylevelű fejlettségi stádiumot.
- **FR-M/FR-C(28):** Az első kezeléssel továbbvitt 28 napos FR-edzett növényeket további hét napig 5 °C-on tartottuk további FR kezelés mellett. A kezelés végére a növények életkora 35 napra emelkedett.
- **FR-C(18):** A tizennyolc napos növényeket hét napra közvetlenül 5 °C-os alacsony hőmérsékletnek tettük ki, azonnali FR jelenlét mellett.

3.4. A relatív konduktancia szintek meghatározása levélmintákból (Fagyteszt)

A levelekből apró 2 mm széles levélszegmenseket vágunk le, amiket aztán 14 ml-es Falcon csövekbe (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, MA, USA) raktunk. Ezt követően a mintákat folyadékos Grant GP-200-R4 fagyasztó készülékbe (Grant Instruments, Shepreth, UK) helyeztük, melyben folyamatosan áramoltatott 50%-os etilén-glikol oldat biztosította a gyors hőátadást és az egyenletes hőmérsékletet. A hőmérsékletet folyamatosan csökkentettük a kezelési hőmérsékletekről -2°C-ig, ahol tizennyolc órán keresztül voltak a minták, ami a hidegedzést kívánta modellezni. Ezt követően az első kezeléseket (15°C) mintái mindkét kísérletből -5, -7 és -9 °C-on voltak egy órán át fagyasztva, míg az alacsony hőmérsékleten (5°C) kezelt minták -8, -10, és -12°C-on voltak fagyasztva, szintén 1 órán át. A fagyasztásokat követően a mintákat kivettük a fagyasztókészülékből, és minden egyes mintához 8ml MQ vizet adtunk. A mintákat következő lépésben két órán át rázattuk, majd konduktométerrel (Mikro KKT, Magyarország) mértük az így kapott oldatok vezetőképességét. Az adatok elemzéséhez a Multi-Sample Conductometer 1.0 verzióját (Intron Software, Biological Research Centre, Szeged, Hungary (Copyright© L. Menczel, 2002)) használtuk. A relatív vezetőképességet öt biológiai ismétlésben vizsgáltuk.

3.5. A génexpressziós vizsgálatok (qPCR) kivitelezése

Az 50 mg tömegű levél mintákból először teljes RNS-t izoláltunk a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) segítségével a gyártó utasításai alapján. A kinyert RNS mennyiségének meghatározását NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, MA, USA) végeztük. Ezt követően cDNS könyvtárakat készítettünk, amely előállítását a Moloney Murine Leukemia Vírus (M-MLV) Reverse Transcriptase és oligo (dT) 18 primer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) felhasználásával végeztük a gyártó protokollja szerint. A génexpressziós szinteket a CFX96 Touch™ valós idejű PCR detektáló rendszerrel (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Hungary) határoztuk meg, ahol a qPCR mintáit KAPASYBR® FAST, Master Mix (2X), Universal qPCR kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA) felhasználásával állítottuk össze. A qPCR-hez felhasznált primereket egyes esetekben már publikált irodalmakból vettük át a mi kísérleteinkhez (Burton és mtsai. 2004, Morran és mtsai. 2011, Seiler és mtsai. 2011), de több esetben ezeket mi magunk terveztük meg, az NCBI-Primer Design Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) és az Oligo Analyzer 1.0.3 szoftver (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) segítségével. A relatív expressziós szinteket $\Delta\Delta C_t$ módszerrel (Livak és Schmittgen 2001) számítottuk ki, ahol referenciagénként pedig ciklophilint használtuk.

3.6. Hormonanalízis

A hormonanalízishez szedett 100 mg-nyi levélmintákat vizsgáltuk és elemeztük (Dobrev P.I. & Kamínek, M. 2002) és (Dobrev, P.I. & Vankova, R. 2012) leírása alapján. Első lépésben a mintákat golyósmalommal (MM301, Retsch) homogenizáltuk, majd azokat 15/4/1 v / v / v arányú hideg (-20 °C) metanol / víz / hangyasav elegyében extraháltuk. Ezt követően az alábbi belső

sztenderdeket (10 pmol / minta) adtuk hozzá az így kapott növényi mintákhoz: $^{13}\text{C}_6$ -IAA, $^2\text{H}_2$ -OxIAA (Cambridge Isotope Laboratories); $^2\text{H}_4$ -SA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA,); $^2\text{H}_3$ -PA, $^2\text{H}_3$ -DPA, $^2\text{H}_4$ -7OH-ABA, $^2\text{H}_5$ -ABA-GE (NRC-PBI), $^2\text{H}_6$ -ABA, $^2\text{H}_5$ -JA, $^2\text{H}_5$ -transZ, $^2\text{H}_5$ -transZR, $^2\text{H}_5$ -transZ7G, $^2\text{H}_5$ -transZ9G, $^2\text{H}_5$ -transZOG, $^2\text{H}_5$ -transZROG, $^2\text{H}_5$ -transZRMP, $^2\text{H}_3$ -DHZ, $^2\text{H}_3$ -DHZR, $^2\text{H}_3$ -DZRMP, $^2\text{H}_7$ -DZOG, $^2\text{H}_3$ -DHZ9G, $^2\text{H}_7$ -DZOG, $^2\text{H}_6$ -iP, $^2\text{H}_6$ -iPR, $^2\text{H}_6$ -iP7G, $^2\text{H}_6$ -iP9G, $^2\text{H}_6$ -iPRMP (Olchemin). Az extraktumokat kevert módú reverz fázisú cserélő SPE oszlopon (Oasis-MCX, Waters) tisztítottuk. Ezt követően két különböző hormonfrakciót eluáltunk egymás után. Az A frakció esetében az eluálást metanollal végeztük, amely ABA-t, IAA-t, SA-t és JA-t tartalmazott. A B-frakciót 0,35 M NH_4OH -t tartalmazó 60%-os metanolban eluáltuk, amely így csak a CK-eket tartalmazta. A hormonmetabolitokat HPLC (Ultimate 3000, Dionex) alkalmazásával analizáltuk, hibrid hármass kvadrupol/lineáris ioncsapda tömegspektrométerrel összekapcsolva (3200 Q TRAP, Applied Biosystems). A hormonok mennyiségi meghatározását izotóphigítási módszerrel, többszintű kalibrációs görbékkel végeztük ($R^2 > 0,99$). Az adatfeldolgozást az Analyst 1.5 szoftverrel (Applied Biosystems) végeztük. Az analízis a kísérlet három biológiai ismétlését tartalmazta.

3.7. Az eredmények statisztikai kiértékelése

Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 16.0 verziójú statisztikai programcsomag (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.) segítségével végeztük el. A szórások egyezését Levene's tesztel ellenőriztük, majd az adatok normalitás vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov próbával ellenőriztük. Az adatok közti különbségeket egy tényezős ANOVA tesztnek vetettük alá (Analyze / Compare means / OneWay ANOVA / Post Hoc Multiple Comparisons). A szórásnégyzetek egyezősége esetén a

Tukey-teszt post hoc módszert használtuk, illetve a szórásnégyzetek egyenlőtlensége esetében ezt Dunnett's T3-ra módosítottuk. A fagytesztek statisztikai kiértékeléséhez a páronkénti összehasonlítást kétmintás t-próbával vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A hőmérséklet, a fényintenzitás és a fényspektrum együttes vizsgálatának eredményei (1. kísérlet)

4.1.1. A HvCBF14 gén és a HvCOR14b célgénjének transzkripciós változásai

A FR fénykiegészítés alacsony fényintenzitás mellett ($125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ötszörös transzkripciós emelkedést mutatott a *HvCBF14* gén szintjében 15°C -on a kezelés első napján, de annak utolsó, vagyis 7. napjára a különbség háromszorosra csökkent a kiindulási fehér fényvel (W) megvilágított kontrol mintákhoz képest. Az alacsony 5°C -os hőmérséklet megkezdését követően erőteljes növekedés következett be már a W minták transzkripciójában is. Ez az emelkedés negyvenháromszoros ezekben a mintákban, de ezen kezelési ponton a FR kiegészítés tovább indukálta a *HvCBF14* gén működését, ami a hidegkezelés mellett bekövetkező transzkripciós változást annak kétszeresére (az eredeti érték kilencvenszeresére) emelte. A hidegkezelés hetedik napjára ez a változás lecsökkent, de a W és FR mintákban az addig tapasztalt tendenciakülönbség megmaradt. Normál ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) és magas ($350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fényintenzitáson kezelt növények mintáiban az alacsony intenzitáson tapasztalt génexpressziós mintázatok hasonlóan alakultak. A szembetűnő különbség közöttük csupán annyi volt, hogy a hidegkezelés nem volt akkora hatással a *HvCBF14* gén működésére, de a fénykezelések közötti különbségek így is nagyon hasonlóan alakultak.

A *HvCOR14b* gén esetében az eredmények hasonló tendenciákat mutattak, mint a *HvCBF14* gén esetében, így elmondható, hogy ennek eredményei megerősítést nyertek. Az FR kiegészítésnek köszönhetően az alacsony fényintenzitáson tartott növények tizenegyszeres mRNS koncentráció növekedést mutattak a kontrol növények eredményeihez képest normál hőmérsékleti körülmények között. Ez az emelkedett szint kitarzott

egészen a 10. napig, ám itt a W mintákban is már emelkedett a *HvCOR14b* gén transzkripció szintje. Alacsony hőmérsékleten, ahogy azt már a *HvCBF14* gén esetében is tapasztaltuk, rögtön megnőtt a növények génexpressziója (több, mint hétszázszorosára) már az első mintavételi időpontban, de ebben az esetben is az FR kiegészítés közel kétszeresére fokozta a génexpressziót. A hideg körülmények következtében történő emelkedés természetesen nem számít váratlan eredménynek, hiszen e gének alapvető fontossággal bírnak a hidegdedződés korai szakaszában. Az 5 °C-os kezelés utolsó, hetedik napjára viszont már a kontroll és a kezelt minták közti különbség teljesen megszűnt. Normál (250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intenzitáson hasonló, egyértelmű tendenciák rajzolódtak ki; 15 °C-on a távoli vörös fénykiegészítés hatására harminchatszoros növekedés állt be a *HvCOR14b* gén expressziójában, ami bár csökkent, mégis közel kilencszerese maradt a kontroll mintákhoz képest. Az 5 °C-os hőmérsékleten mind a kezelés első és utolsó napján kétszeres különbséget mértünk a fénykezelések között, a gén kifejeződésének jelentős növekedése mellett. Magas fényintenzitás mellett mRNS szintváltozás nem volt kimutatható sem a W mintákban sem pedig az R/FR arány függvényében 5 °C-on. Nem volt különbség a kontroll és az FR-el kezelt minták között, azonban a hideg továbbra is hatással volt e gén expressziójára. 15 °C-on azonban az FR-kiegészítés a transzkriptum szintjének masszív, kilencvenháromszoros növekedését okozta a tíznapos kezelés végeztével.

4.1.2. A *HvDHN5* gén expressziós szintjei

Alacsony 125 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett a *HvDHN5* gén transzkriptum szintje megduplázódott az FR kiegészítés eredményeként az első napon 15 °C-on, de ez a különbség a tizedik napra teljesen lecsökkent a kontrol mintáihoz képest. Ezt a tendenciát 5 °C-on is visszakaptuk. A nagyobb fényintenzitással kezelt minták eredményei alapján általában megállapítható,

hogy sem a hőmérséklet, sem a fénykezelések nem voltak jelentős hatással a génexpressziós mintázatra.

4.1.3. A fagyasztási teszt eredményei

Az alacsony fényintenzitás mellett 15 °C-on nevelt növényekről származó mintákban szignifikáns különbséget mértünk, de kizárólag az első, vagyis a -5 °C-on fagyasztott minták esetében. Ezen a hőmérsékleten az FR kezelt minták pont az LT50 (lethal temperature - letális hőmérséklet) érték közelében helyezkedtek el, míg a kontroll minták már 75% letalitást mutattak. Az alacsonyabb fagyasztási hőmérsékleteken ez a különbség teljesen megszűnt. Ezzel szemben 5 °C-on, amely elég alacsony a hidegakklimatizáció kiváltásához, a modulált fehér fénynek kitett növények fagyállóbbak voltak. Ezek a növények csak -12 °C-on történő fagyasztás után érték el az LT50-et a FR kezelés következtében, míg a kontroll esetében a fehér fényen megvilágított minták esetében is -8 °C-ig tolódott az LT50 érték. Ettől függetlenül itt már az összes fagyasztási hőmérsékletben szignifikáns különbséget mértünk a minták között. A megnövelt fényintenzitásnak (250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) köszönhetően a távoli vörös fényvel kiegészített fehér fényvel történő megvilágítás még nagyobb mértékben csökkentette a fagy okozta sejtmembrán-károsodásokat a levelekben. A különböző fényhatások ebben az esetben is jóval nagyobb különbségeket eredményeztek alacsonyabb hőmérsékleten. A legnagyobb fényintenzitás (350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alkalmazásakor a kontroll minták relatív vezetőképessége jelentősen csökkent már 15 °C-on is, de még ebben az esetben is az FR kiegészítés lényegesen képes volt csökkenteni a fagyasztás okozta károkat. Az alacsonyabb fényintenzitással megvilágított mintákhoz hasonlóan az alacsony hőmérsékleten (5 °C) kezelt növények fagyástűrése jóval magasabb volt, mint a 15 °C-on növekvő társaiké.

4.2. Az árpalevelek hormonösszetétel-változásainak vizsgálata normál és alacsony hőmérsékleten, távoli vörös fényben történő kezelés előtti és utáni hidegstressz esetében. (2. kísérlet)

4.2.1. Az alacsony R/FR arányú fény hatása a növények fagytűrésre

Az FR kiegészítés hatását az árpa növények fagyűrésére a levélmintákból származó relatív elektromos vezetőképességek kiszámításával ebben a kísérleti rendszerben is megvizsgáltuk. Ez nem csak, azért volt szükséges hogy tovább erősítse az első kísérlet eredményeit, de arra is rávilágíthatott, hogy a kombinált FR fény és hideg kezelés, milyen módon befolyásolja az árpa fagyűrését. A kiegészítő FR fényvel történő kezelés hatása mind 15 °C-on (FR-M), mind az FR előkezelés után bekövetkező hőmérséklet csökkenés (5 °C) esetében (FR-M/FR-C(18)), mind pedig a hőmérséklet csökkenéssel egyidejűleg alkalmazott FR kezelés a fiatal árpa növényekre (FR-C(18)) jelentős különbségeket indukált a három kezelési változat között. A relatív vezetőképességek alapján elmondhatjuk, hogy az FR fénykiegészítés pozitív hatást gyakorolt az egyedek stressz elleni toleranciájára. A harmadik kezelési variánsban fiatalabb növények kezelése esetén (FR-C(18)) további javulás volt megfigyelhető mind a kontroll mintákban, mind pedig az FR fénykiegészítés mellett. Az eredmények azt mutatják, hogy az alacsony R/FR arány pozitívan befolyásolja a növények fagyásállóságát normál és alacsony hőmérsékleten is. Mind emellett az is megállapítható, hogy az alacsony hőmérséklet, az alacsony R/FR arány, valamint a növény fejlődési szakasza mind-mind befolyásolja a fagyűrést.

4.2.2. Növényi hormonszint-változások a különböző kezeléseknél

A vizsgált hormonszintekben jelentős különbségeket figyeltünk meg minden kezelési variánsban, sőt azok egymástól is sok esetben elértek. Az eredmények részletezésekor elsősorban öt hormont mutatunk be az

értekezésben, nevezetesen az ABA, JA, SA, IAA és CK-k hormon eredményeket, mivel esetükben mértünk szignifikáns különbségeket.

Az első kezelésben a 15 °C-on végzett FR-kezelés pár óra elteltével már majdnem megduplázta a teljes ABA-tartalmat a vizsgált növényi mintákban, amely különbség a kísérlet végéig (10. nap) is teljesen stabil maradt. Ahogy az várható volt, a hidegkezeléstől (FR-M/FR-C(18)) számított néhány óra elteltével szignifikánsan ($P < 0,05$) növelte az ABA-tartalmat a kontroll fehér fényvel megvilágított mintákban úgy, hogy annak értékei meghaladták az FR-rel kezelt minták szintjét. A hőmérséklet-csökkenés csak kis mértékben befolyásolta az ABA-koncentrációt az FR- kezelt mintákban a normál 15 °C-os mintákhoz képest. Ez azt jelenti, hogy a távoli vörös fényben az ABA koncentrációja konstans volt az alkalmazott hőmérsékleti értékektől függetlenül. Hétnapos hidegkezelés után az ABA-tartalom csökkenő tendenciákat mutatott mind a kontroll fehér, mind az FR-vel kezelt mintákban. A harmadik kezelés során (FR-C(18)) a FR-kezelés a hőmérséklet csökkentéssel azonos időben kezdődött. Mind a kontroll, mind az FR kezelt növények hasonlóan reagáltak az alacsony hőmérsékletre, bár az FR-kezelt minták ABA-tartalma a kezelés kezdete után közvetlenül meghaladta a kontroll mintákét. Valószínűleg a két külső abiotikus tényező kombinációja szinergikusan befolyásolta az ABA metabolizmust.

Az FR kiegészítésnek mérsékelt negatív hatása volt a JA-szintre 15 °C-on (FR-M). Ez a csökkenés kizárólag a kezelés 10. napján volt megfigyelhető, de addig az időpontig fénytől független mennyiségben volt jelen a növényekben. Az alacsony hőmérséklet (FR-M/FR-C(18)) a JA-tartalom átmeneti csökkenését okozta szintén fényminőségtől függetlenül. Viszont az FR előkezelés erősítette a hideg által kiváltott hatást és egy közel negyed részre történő csökkenést idézett elő, ami különösen a hideghatás korai szakaszában

mutatkozott meg. A harmadik kísérlet (FR-C(18)) során a JA-tartalom megduplázódott a hidegstressz első napján, a fénykezeléstől szintén függetlenül; viszont annak végére fehér fényben még tovább emelkedett. A modulált fényben ez a hatás nem volt tapasztalható.

Az FR-M kezelés során sem az FR, sem a hideg kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az SA tartalmat. A harmadik kezelés (FR-C(18)) során azonban, ahol a fiatalabb növényeket érte az együttes kezelés az JA-hoz hasonlóan változott az SA-tartalom mennyisége. Hidegexpozíció esetén az SA-tartalom mérsékelten nőtt a fehér fényben, míg ezt az emelkedést szignifikánsan ($P < 0,05$) gátolta az FR-kiegészítés.

Az első kezelés korai szakasza során az IAA-tartalmat majdnem kétszeresére növelte az FR kezelés 15 °C-on, és ez a növekedés a tizedik nap végére is megmaradt. A hidegre adott (FR-M/FR-C(18)) korai reakció az IAA koncentráció növekedésével járt együtt, mind a fehér fényel, mind az FR kezelt növények esetében. Mindazonáltal a stressz utolsó napján mérsékelt lefelé történő szabályozást figyeltünk meg a fehér fényel megvilágított mintákban. Az FR kezelés az IAA emelkedés részleges fenntartását okozta. A harmadik kísérleti változatban (FR-C(18)) a kombinált stressz okozta átmeneti IAA tartalom csökkent az FR-kezelt növényekben. Azonban, hét nap elteltével mérsékelt IAA emelkedés volt tapasztalható, a fény spektrumától függetlenül.

Az FR kiegészítés hatása a cZ tartalomra átmeneti növekedést okozott az FR-M kezelésben 15 °C-on, majd ezt követően ez a tendencia teljesen átfordult, és a koncentráció csökkent a kezelés végére. A hőmérséklet 5 °C-ra történő csökkentése után a cZ-tartalom jelentősen megnőtt a fehér fényel megvilágított mintákban. Az FR-hez adaptált mintákban viszont a kiegészítő FR fény lecsökkentette ezt a hideg okozta emelkedést. Kontrasztban az eddigiekkel, a hideg és az FR egyidejű alkalmazásával (FR-C(18)) óriási

különbségek mutatkoztak a kontroll és a kezelt minták között. A cZ-tartalmat az FR közel háromszorosára emelte a fehér fényel megvilágított mintákhoz képest.

4.2.3. A legfontosabb hormon-anyagcserével kapcsolatos gének expressziós mintázata

Az ABA esetében a *ZEP1*, *NCED1*, *SDR2* és *AO2* bioszintézis gének transzkripciós profilját vizsgáltuk meg. A *ZEP1* expressziója csak kismértékben változott az FR-M és az FR-M / FR-C(28)) kezelése során. Az FR-C(18) esetében, amikor a fiatalabb növényeket kombinált hatásnak tettük ki, a *ZEP1* transzkriptum szintje hét nap eltelté után emelkedett a fényminőségtől függetlenül. Az FR fény nagy pozitív hatását az *NCED1* expressziójára csak 15 °C-on detektáltuk. A másik két gén (*SDR2* és *AO2*) hasonlóan viselkedett. Kifejeződésüket főként az alacsony hőmérséklet szabályozta, kivéve az FR-M kísérlet első napját, ahol az *AO2* expressziója kissé megnőtt. A kiegészítő FR fény, a hideggel szinergiában tovább csökkentette annak transzkripciós szintjét. Az FR-C(18) kezelésnél ez a jelenség éppen ellentétes volt: a csökkenő mintázat helyett emelkedés volt megfigyelhető.

A JA és az SA anyagcserével kapcsolatos gének (*LOX* és *PAL*) ugyanabba a klaszterbe csoportosultak, sőt néhány a fent említett ABA-val kapcsolatos génnel (*SDR2* és *AO2*) együtt alkotott nagyobb csoportot. Az FR-kezelés e két gén expressziójának enyhe csökkenését okozta tíz nap után 15 °C-on. Az FR-M/FR-C(28) és az FR-C(18) kísérletekben ellentétes mintázatot figyeltünk meg. Míg az előbbi enyhe lefelé, addig az utóbbi felfelé irányuló változást mutatott, főleg a *PAL* esetében.

A *COAA* és *YUCCA5* géneket az auxin bioszintézisében elfoglalt fontosságuk miatt vizsgáltuk. A legnagyobb változásokat a *COAA* esetében

tapasztaltunk. Az expresszió háromszoros stimulálását okozta az FR kiegészítés 15 °C-on már hét óra eltelt után is (FR-M). Az FR-M/FR-C(28) kezelésnek és a megfelelő fehér kontrollokkal történő összehasonlítása azt mutatta, hogy az alacsony hőmérséklet megszüntette a fénykezelések közötti különbségeket. A tizennyolc napos növények hidegkezelése a fényminőségtől függetlenül még nagyobb expresszió-növekedést eredményezett.

A *CKX9* expressziós mintázatát az *NCED1*-el sikerült csoportosítani. A *CKX9* expresszió nagy, közel hatszoros emelkedést mutatott a fehér fényhez történő FR kiegészítéskor 15 °C-on (FR-M). Alacsony hőmérsékleten a *CKX9* expresszió drámaian csökkent a további kezeléseknél.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az első kísérletben őszi árpa növényeket kezeltünk alacsony, normál és nagy fényintenzitás mellett, alacsony vörös távoli vörös arányú (R/FR) fényvel 5°C-on és 15°C-on. A *HvCBF14* gén expresszióját és a CBF-regulon két jól jellemzett tagját, a *HvCOR14b* és a *HvDHN5*-et vizsgáltuk.

Ismereteink szerint ezek az első eredmények, amelyek azt mutatják, hogy a hideg, a fényintenzitás és az R/FR fényarány módosítása együttesen befolyásolhatja a *HvCBF14* és a *HvCOR14b* gén expressziós mintázatát, továbbá a *HvDHN5* gén transzkripciós szintjét. Érdekes módon az a két gén, amelyet elsősorban markerként használnak az árpa fagyállóságának előrejelzésére, eltérő módon viselkedett. Míg a *HvCOR14b* gén abszolút növekedést mutatott mind alacsony hőmérsékleten, mind kiegészített távoli vörös fény alatt, addig a *HvDHN5* gén csak az alacsony hőmérsékletre reagált megbízható módon. Ez azt sugallja, hogy a *HvDHN5* gén nem alkalmazható a modulált fény által indukált fagytűrés markereként, ellenben akkor használható, ha meg kell jósolni a teljes fagytolerancia szintet, ami csak hosszú hidegakklimatizáció után állapítható meg. Ezért azt javasoljuk, hogy azokban az esetekben, amikor mesterséges fényforrásokat használnak a hidegedzés során, a *HvCOR14b* expressziós szintjét kell ellenőrizni a hideghatás elleni védekezés előrejelzésére. Úgy tűnik, hogy ez a három környezeti tényező együttesen hat a hidegakklimatizálódási folyamat során, ami komoly változásokat eredményezhet a fagyállóság mértékében. Ennek megfelelően a növénynevelő kamrákban a fagyállóságra irányuló tesztelesek során nagyon fontos, hogy a fényintenzitást és a spektrumot is állandóan tartsuk, ami az ismételhetőségnek is előfeltétele. Emellett szabadföldön is a külső fényforrások alkalmazása terepi körülmények között az őszi folyamán

megakadályozhatja a különböző növényfajok hideg okozta sérüléseit. Természetesen ezt a hipotézist csak további kísérletekkel lehet majd igazolni.

A második kísérletben az FR-kiegészítés hatását tovább vizsgáltuk. Itt a növények hormonszintjére, azok metabolizmusára és a legfontosabb hormon-anyagcseréhez kapcsolódó génekre voltunk kíváncsiak, szintén mérsékelt (15 °C) és alacsony (5 °C) hőmérsékleten, de már csak egy fényintenzitáson (250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$).

Bizonyítottuk, hogy a FR-kiegészítésű fehér fény koordinátorként működik az hidegedződés folyamatban. A második kísérleti rendszerben is a kiegészítő FR fény pozitív hatással volt a növények hidegtűrésére, ami visszaigazolta az első kísérlet eredményeit. Ezt a hatást 5 °C-os hideg kezelés erősítette, összehasonlítva a nem akklimatizációs hőmérsékleten nevelt kontroll egyekhez képest. Az FR által fokozott fagyűrés 15 °C-on az abszcizinsav (ABA) szintjének emelkedésével járt együtt, az indol-3-ecetsav (IAA) és a cisz-zeatin (cZ) szintjének mérsékelt emelkedésével szoros összefüggésben. A 15 °C-os FR kezelés után bekövetkező hőmérséklet csökkenés számos változást idézett elő. Az ABA válasza csökkent a fehér kontroll fényhez kezeléséhez képest, valószínűleg az FR előkezelés alatti stressz tolerancia megemelkedése miatt. A jázmonsav (JA) és a szalicilsav koncentrációja (SA) átmenetileg csökkent.

Amikor a növényeket közvetlenül hideg (5 °C) és FR kezelés kombinációjának tettük ki, az ABA határozottabb emelkedést mutatott, amivel egyidőben a JA szint hasonlóan módosult. Hosszabb távon ezen emelkedések az IAA és a cisz-zeatin (cZ) emelkedésével jártak együtt, mely változások erősebb stressz reakciót és jobb akklimatizálódást jeleznek előre. Az IAA növekedése szorosan összefügg a magas CK-tartalommal, amely ráadásul

összhangban állt a *YUCCA5* és a *COAA* expressziójának magas szintjével, ami tovább erősíti azt a következtetésünket, hogy a fiatal növények jobban képesek alkalmazkodni ehhez a stressz állapotához. A hormon- és a qPCR elemzések eredményei azt mutatják, hogy a hőmérséklet nagyobb hatással volt a növény viselkedésére, mint a fény spektrum módosulása. Az adatok elemzésével láthatjuk, hogy mind szinergikus, mind antagonistikus hatásokat is kiváltott ez a két környezeti jel, de együttesen alkalmazva őket számos pozitív hatás érhető el. Úgy tűnik, hogy az FR kezelés időzítése és időtartama, és a növények fejlődési szakasza döntő tényező a hideg-akklimatizálódási folyamatokban. Az árpanövények korai fejlődési szakaszában a hidegedződés hatékonyabb volt, amit az ABA, JA és SA hormonok változása is alátámasztott.

Ez a kísérletsorozat bizonyítékkal szolgálhat a CBF-ek, a CBF regulon, a növényi hormonok, a fényminőség és az alacsony hőmérséklet közötti szoros kapcsolatra a hideg-akklimatizációs folyamat során. A fitohormonok és a hozzájuk kapcsolódó transzkriptomok jelentős modulációja az FR fény növelésével a mérsékelt vagy az alacsony hőmérsékleti tényezőktől függetlenül minden esetben megnövekedett fagyűréssel is járt együtt. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a fagy ellen fokozott védelem léphet fel a növényekben az őszi környezeti változásokhoz való alkalmazkodásként, az árnyékelkerülési-szindrómától függetlenül. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy az FR kezelések időzítése és a növények kora egyaránt kulcsfontosságú tényező a hideg akklimatizációban, amelyek azt jelentősen módosíthatják.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A hideg, a fényintenzitás és a vörös távoli vörös fény arány módosítása együttesen befolyásolja az árpa *HvCBF14* és a *HvCOR14b* gének expressziós mintázatát, a *HvDHN5* gén módosításával egyetemben. Amíg az alacsony hőmérséklet mindhárom gén esetében indukálta azok transzkripcióját, addig a távoli vörös fénykiegészítés tovább növelte transzkripció szintjüket kivéve a *HvDHN5* gén esetében. Ezt a pozitív hatást hol elnyomta, hol pedig még tovább erősítette a fény intenzitásának megváltozása is.
2. A *HvCOR14b* és a *HvDHN5* gén, amelyeket elsősorban markerként használnak az árpa fagyállóságának előrejelzésére, másképp viselkedett. Míg a *HvCOR14b* gén expressziója növekedést mutatott mind alacsony hőmérsékleten, mind pedig kiegészített távoli vörös fény hatásának következtében, addig a *HvDHN5* csak alacsony hőmérsékletre reagált. Ez azt sugallja, hogy a *HvDHN5* gén expressziójának szintjét csak akkor lehet a fagyűrési markerként használni, ha a teljes tolerancia szint kialakulását egy megfelelően hosszú hideg edződési folyamat előzi meg.
3. Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy hideg, a fényintenzitás és a vörös/távoli vörös fény arány módosítása additív hatás mellett több esetben szinergikusan is képes hatni az árpa növényben a hideg edződés korai szakaszában, ami komoly pozitív változásokat eredményez a fagyállóság szintjén is.

4. Az árpanövények korai fejlődési szakaszában a hidegedződés hatékonyabb volt az FR kezelés és az alacsony hőmérséklet kombinációjában, mint a dolgozatban taglalt későbbi fejlődési szakaszokban, amit a fagytesztek eredménye is alátámasztott. Ez a magasabb stimuláció az ABA szintjének gyors emelkedésével, valamint a JA és az SA tartalomban bekövetkező emelkedéssel magyarázható.
5. Úgy tűnik, hogy a FR kezelés időzítése és időtartama döntő tényező a hideg-akklimatizálódási folyamatokban, ami az árpa akklimatizálását illeti.
6. Az alacsony vörös/távoli-vörös fény arányú fehér fény az árnyékelkerülési-szindróma kiváltásától eltérő hatással is rendelkezik a fagyűrő őszi gabonafélék esetében a környezeti hőmérséklet és a fényintenzitás függvényében. A FR kiegészítés indukálja a hidegedzést és a fagy ellen fokozott védelmet biztosít a mérsékelt illetve boreális égvő őszi körülményeihez hasonlatos megvilágítás alkalmazása esetén.
7. A hormon és a qPCR elemzések eredményei azt mutatják, hogy a hőmérséklet nagyobb hatással volt az árpanövény viselkedésére, mint a fényspektrum módosulása.
8. Eredményeink alapján a távoli vörös (FR) fény nem központi jelként, hanem koordinátorként működhet az árpa hidegedzés kezdeti szakaszában, számos növényfejlődési és élettani folyamat szabályozásának összehangolásában.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációban bemutatott témákhoz kötődő, nemzetközi folyóiratban megjelent cikkek

Ahres, M.; Pálmai, T.; Gierczik, K.; Dobrev, P.; Vanková, R.; Galiba, G. The Impact of Far-Red Light Supplementation on Hormonal Responses to Cold Acclimation in Barley. *Biomolecules* 2021, 11, 450. <https://doi.org/10.3390/biom11030450>

Ahres, M., Gierczik, K., Boldizsár, Á., Vítámvás, P., & Galiba, G. (2020). Temperature and Light-Quality-Dependent Regulation of Freezing Tolerance in Barley. *PLANTS-BASEL*, 9(1), 83. <http://doi.org/10.3390/plants9010083>

Gyugos, M., **Ahres, M.,** Gulyás, Z. et al. Light spectrum modifies the drought-induced changes of glutathione and free amino acid levels in wheat. *Acta Physiol Plant* 43, 90 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03253-x>

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. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 21(20). <http://doi.org/10.3390/ijms21207557>

Konferencia közlemények és összefoglalók

Ahres, M., Boldizsár, Á., Gierczik, K., Székely, A., Vágújfalvi, A., & Galiba, G. (2019). Az árpa fagyállóságának változása különböző fényspektrumok és hideghatás következtében. In *Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok* (pp. 204–208).

Ahres, M., H. Kamiran, Á., Gierczik, K., Boldizsár, Á., Vanková, R., & Galiba, G. (2019). Temperature dependent hormonal and metabolomics changes during supplementary far-red light induced pre-hardening process in barley. In 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding Book of abstracts (pp. 40–40).

Ahres, M., Kovács, T., Boldizsár, Á., Gierczik, K., Székely, A., Gombos, Z., ... Galiba, G. (2019). The combined effect of various light spectra and light intensities on barley frost-tolerance (Vol. 1). Olomouc: European Federation of Biotechnology.

Kovacs, T., **Ahres, M.**, Gombos, Z., & Galiba, G. (2019). Increased proportion of far-red in the incident white light modify membrane lipid composition by temperature dependent manner in winter barley. In 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding Book of abstracts (pp. 80–80).

Gábor, G., Ákos, B., Krisztián, G., Aliz, N., **Mohamed, A.**, Éva, Á., ... Attila, V. (2018). Molecular background of circadian clock-, light quality- and temperature dependent regulation of freezing tolerance in cereals. In Plant Biology Europe 2018 Conference (pp. 67–67).

Novák, A., Boldizsár, Á., Gierczik, K., **Mohamed, A.**, Ádám, É., Kozma-Bognár, L., ... Galiba, G. (2017). Light-quality and temperature dependent regulation of the freezing tolerance in cereals. In Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium (p. 310).

Novák, A., Boldizsár, Á., Gierczik, K., **Mohamed, A.**, Ádám, É., Kozma Bognár, L., ... Galiba, G. (2017). Circadian and light quality regulated expression of CBF genes influences the cold acclimation process in cereals. CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 45(S1), 61–62.
<http://doi.org/10.1556/0806.45.2017.100>