



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

A FAGYTÚRÉS FÉNYSPEKTRUMFÜGGŐ MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÁSA ÁRPÁBAN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DOI: 10.54598/001750

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

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítésjegyzék	5
2. Absztrakt.....	7
3. Abstract.....	8
4. Auszug.....	9
5. Bevezetés és célkitűzések.....	10
6. Irodalmi áttekintés	12
6.1. A fény szerepe a növények fejlődésére és a stresszválaszok kialakítására.....	12
6.2. A növények fagyűrészének kialakulása (akklimatizáció)	14
6.3 A <i>C-repeat binding transzkripciós faktorok</i> (CBF-ek).....	18
6.3.1. A CBF-regulon.....	20
6.4. A növényi hormonok	22
6.4.1. A növényi hormonok szerepe és bioszintézise a stresszválaszokban	23
7. Anyagok és módszerek.....	29
7.1. A növényi anyag és a növénynevelés körülményei	29
7.2. A fény- és hőmérséklet-kezelések	30
7.2.1. Fény- és hőmérsékleti viszonyok az első kísérleti során	30
7.2.2. Fény- és hőmérsékleti viszonyok a második kísérlet során	31
7.3. A relatív konduktanciaszintek meghatározása levélmintákból (Fagyteszt).....	32
7.4. A génexpressziós vizsgálatok (qPCR) kivitelezése	34
7.5. Hormonanalízis.....	36
7.6. Az RNA-seq analízis	37
7.6.1. A leolvasások és a bioinformatikai adatok feldolgozása.....	37
7.6.2. A kapott eredmények annotálása	37
7.7. Az eredmények statisztikai kiértékelése	38
8. Eredmények.....	39
8.1. A hőmérséklet, a fényintenzitás és a fényspektrum együttes vizsgálatának eredményei (1. kísérlet)	39
8.1.1. A <i>HvCBF14</i> gén és a <i>HvCOR14b</i> célgénjének transzkripciós változásai.....	39
8.1.2. A <i>HvDHN5</i> gén expressziós szintjei.....	41
8.1.3. A fagyasztási teszt eredményei.....	42
8.1.4. A növények magassága a kísérlet végeztével	44
8.2. Az árpalevelek hormonösszetétel-változásainak vizsgálata normál és alacsony hőmérsékleten, távoli vörös fényben történő kezelés előtti és utáni hidegstressz esetében. (2. kísérlet).....	45

8.2.1. A különböző módon expresszált gének elemzése az RNS-szekvenálást követően	45
8.2.2 Az alacsony R/FR arányú fény hatása a növények fagytűrésre	47
8.2.3. Növényi hormonszint-változások a különböző kezelések során	50
8.2.4. A legfontosabb hormon-anyagcserével kapcsolatos gének expressziós mintázata	54
9. Következtetések.....	56
9.1. A <i>HvCBF14</i> transzkripciós faktor és célgénjeinek a <i>HvCOR14b</i> és <i>HvDHN5</i> expressziós mintázatai	56
9.2. A fagyasztási tesztek különböző fényintenzitások mellett, módosított R/FR arányon.....	58
9.3. A FR hatás mérsékelt hőmérsékleten (FR-M)	60
9.4. Az FR előkezelés hatása a hideg okozta stresszreakcióra (FR-M/FR-C(28))	62
9.5. A kombinált FR és hidegkezelés (FR-C(18))	63
9.6. Konklúzió.....	65
10. Új tudományos eredmények (Tézisek)	67
11. New Results (Theses)	69
12. Összefoglalás	71
13. Summary.....	74
14. Publikációs tevékenység.....	77
14. Mellékletek	80
M1. Irodalomjegyzék.....	81
M2. További mellékletek.....	102
Köszönetnyilvánítás	106

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ABA	abszcizinsav
A02	<i>aldehyd oxidáz 2</i>
CaMs	kalmodulinok
CML	CaM-szerű fehérjék
CPKs / CDPKs	Ca ²⁺ -függő protein-kinázok
CBL	kalcineurin B-szerű fehérjék
CKX9	<i>citokinin oxidáz/dehidrogenáz 9</i>
COAA	<i>acetyl-CoA acetyl transzferáz</i>
cZ	cisz-zeatin
FR	távoli vörös fény
FR-M	távoli vörös fény kezelés mérsékelt hőmérsékleten
FR-M/FR-C (28)	távoli vörös fénykezelést követő hideg kezelés a 28 nap kezdetével
FR-C (18)	kombinált távoli vörös és hideg kezelés a 18 nap kezdetével
HvCBF14	<i>árpa C-repeat binding factor 14</i>
HvCOR14b	<i>árpa cold regulated gene cor14b</i>
HvDHN5	<i>árpa dehidrin 5</i>
IAA	indol-3-ecetsav
JA	jázmonsav
LOX	<i>lipoxigenáz</i>
MAPK	mitogén-aktivált protein-kinázok
NCED1	<i>9-cis-epoxikarotenoid dioxigenáz</i>
NO	<i>nitrogén-oxid</i>
PAL	<i>L-fenilalanin ammónia-liáz</i>

PhyA	fitokróm A
PhyB	fitokróm B
QTL	Quantitative Trait Locus
R	vörös fény
R/FR	vörös és a távoli vörös fény aránya
ROS	reaktív oxigén gyökök
SA	szalicilsav
<i>SDR2</i>	<i>rövid láncú dehidrogenáz 2</i>
tZ	transz-zeatin
W	fehér fény
<i>YUCCA5</i>	<i>indol-3-piruvát monooxygenáz 5</i>
<i>ZEPI</i>	<i>zeaxantin epoxidáz 1</i>

2. ABSZTRAKT

A hidegakklimatizálódást, amely a fagykárak elleni védekezés előfeltétele, befolyásolja az alacsony hőmérséklet, a fotoperiódus, a fény intenzitása, és a fény minősége is. A fény és az alacsony hőmérséklet mint két külső abiotikus tényező hidegedződésben játszott szerepének és annak molekuláris hátterének vizsgálatára két különböző kísérletet állítottunk be.

Az első kísérletben őszi árpa növényeket kezeltünk kis, normál és nagy fényintenzitás mellett, alacsony vörös távoli vörös arányú (R/FR) fénnel 5°C-on és 15°C-on. A *HvCBF14* gén expresszióját és a CBF-regulon két jól jellemzett tagját, a *HvCOR14b* és a *HvDHN5* géneket vizsgáltuk. A vizsgált gének expressziós szintje többszörösen emelkedett 5°C-on a 15°C-os kezeléshez viszonyítva, függetlenül az alkalmazott fényintenzitástól vagy a spektrumtól. A kiegészítő távoli vörös (FR) megvilágítás mindkét hőmérsékleten előidézte a *HvCBF14* és célgénje, a *HvCOR14b* expressziójának indukálását. Ez a fénykiegészítés a *HvDHN5* gén expressziójára csak kis mértékben volt hatással. A környezeti feltételek megváltozását követően, a fiziológiai hatások tesztelésére fagyasztási tesztek is végeztünk. Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy az alacsony R/FR arány növeli az árpa fagyűrését minden fényintenzitásnál.

A második kísérletben a 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. Az FR által fokozott fagy elleni tolerancia 15 °C-on az abszcizinsav (ABA) szintjének növelésével 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 koncentrációjának növekedése mérsékelt volt a fehér kontroll fénykezeléséhez képest, valószínűleg az FR előkezelés okozta magasabb tranziens ABA koncentráció miatt. A jázmonsav (JA) és a szalicilsav (SA) koncentrációja átmenetileg csökkent. Amikor a növényeket közvetlenül hideg (5 °C) és FR kezelés kombinációjának tettük ki, az ABA határozottabb emelkedést mutatott, amire a JA szint hasonlóan módosult. A kombinált kezelés 7. napjára ezen emelkedések az IAA és a cZ emelkedésével járók együtt, mely jelenség erősebb stresszreakciót és ezáltal jobb akklimatizálódást jelezett előre. A fagytesztek alapján a hidegedződés akkor volt a leghatékonyabb, ha az FR fényt az árpa növények korai fejlődési szakaszában alkalmaztuk, nem pedig a későbbi szakaszokban.

Ez a kísérleti sorozat bizonyítékul szolgál a növényi hormonok, a fényminőség, a fényintenzitás és az alacsony hőmérséklet közötti szoros kapcsolatra a hidegakklimatizáció kezdeti szakaszában.

3. ABSTRACT

It is established that besides the cold the incident light also has a crucial role in the cold acclimation process. Cold acclimation, the necessary prerequisite for promotion of freezing tolerance, is affected by both low temperature and enhanced far-red/red light (FR/R) ratio. To elucidate the interaction between these two external hardening factors two different experiments were carried out.

In the first experiment winter barley plantlets were grown under different light conditions with low, normal, and high light intensities at 5°C and 15°C. The expression of *HvCBF14* gene and two well characterized members of the CBF-regulon *HvCOR14b* and *HvDHN5* were studied. In general, the expression level of the studied genes was several fold higher at 5°C than at 15°C independently of the applied light intensity or the spectra. The complementary far red (FR) illumination has induced the expression of *HvCBF14* and also its target gene *HvCOR14b* at both temperatures. However, this supplementation did not affect significantly the expression of *HvDHN5*. To test the physiological effects of these changes in environmental conditions freezing tests were also performed. In all the cases we found that the reduced R/FR ratio increased the frost tolerance of barley at every incident light intensity.

In the second experiment the impact of reduced R/FR ratio in the incident white light was studied on the hormone levels, and on the key hormone metabolism-related genes in winter barley leaves at moderate (15°C) and low (5°C) temperature. FR-enhanced freezing tolerance at 15°C was associated with promotion of abscisic acid (ABA) levels, accompanied by moderate increase of indole-3-acetic acid (IAA) and cis-zeatin (cZ) levels. The most prominent impact on plants' freezing tolerance was found after FR pre-treatment at 15°C followed by cold treatment together with FR supplementation. Response of ABA was diminished in comparison with white light treatment, probably due to the previous transient elevation of ABA content during FR pre-treatment. Jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) were transiently reduced. When the plants were exposed directly to a combination of cold (5°C) and FR supplementation, ABA increase was higher than in white light, and was associated with enhanced elevation of JA. After seven days of the combined treatment IAA and cis-zeatin also increased, which indicate stronger stress response and better acclimation. Cold hardening was more efficient when FR light was applied in the early developmental stage of barley plants rather than in later stages.

This series of treatments serves as evidence for the close relationship between plant hormones, light quality, light intensity and low temperature at the beginning of cold acclimation.

4. AUSZUG

Es wird festgestellt, dass neben der Kälte auch das einfallende Licht eine entscheidende Rolle bei der Kälteakklimatisierung spielt. Die Kälteakklimatisierung, die notwendige Voraussetzung für die Förderung der Gefriertoleranz, wird sowohl von der niedrigen Temperatur als auch von einem verbesserten Verhältnis von Fernrot zu Rotlicht (R/FR) beeinflusst. Um die Wechselwirkung zwischen diesen beiden externen Härtungsfaktoren aufzuklären, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden Wintergerstenpflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen mit niedrigen, normalen und hohen Lichtintensitäten bei 5 °C und 15 °C gezüchtet. Die Expression des *HvCBF14*-Gens und zweier gut charakterisierter Mitglieder des CBF-Regulons *HvCOR14b* und *HvDHN5* wurde untersucht. Im Allgemeinen war das Expressionsniveau der untersuchten Gene bei 5 °C um ein Vielfaches höher als bei 15 °C, unabhängig von der angelegten Lichtintensität oder den Spektren. Die komplementäre Fernrot-Beleuchtung (FR) hat die Expression von *HvCBF14* und auch seines Zielgens *HvCOR14b* bei beiden Temperaturen induziert. Diese Ergänzung beeinflusste jedoch die Expression von *HvDHN5* nicht signifikant. Um die physiologischen Auswirkungen dieser Änderungen der Umgebungsbedingungen zu testen, wurden auch Gefriertests durchgeführt. In allen Fällen stellten wir fest, dass das verringerte R/FR-Verhältnis die Frosttoleranz von Gerste bei jeder einfallenden Lichtintensität erhöhte.

Im zweiten Experiment wurde der Einfluss der FR-Supplementierung auf weißes Licht, das durch künstliche LED-Lichtquellen erzeugt wird, auf die Hormonspiegel, ihren Metabolismus und die wichtigsten Gene im Zusammenhang mit dem Hormonstoffwechsel in Wintergerste bei moderaten (15 °C) und niedrigen (5 °C) bestimmter Temperatur. Eine FR-erhöhte Gefriertoleranz bei 15 °C war mit einer Förderung der Abscisinsäure (ABA) -Niveaus verbunden, begleitet von einem moderaten Anstieg der indol-3-essigsäure (IAA) - und cis-Zeatin (cZ) -Niveaus. Der stärkste Einfluss auf die Gefriertoleranz der Pflanzen wurde nach der FR-Vorbehandlung bei 15 °C und anschließender Kältebehandlung bei der FR-Supplementierung festgestellt. Das Ansprechen von ABA war im Vergleich zur Weißlichtbehandlung verringert, wahrscheinlich aufgrund der Erhöhung der Stresstoleranz während der FR-Vorbehandlung. Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA) wurden vorübergehend reduziert. Wenn die Pflanzen direkt einer Kombination aus Kälte (5 °C) und FR-Supplementierung ausgesetzt wurden, war der ABA-Anstieg höher als bei weißem Licht und war mit einer erhöhten Erhöhung von JA und längerfristig mit einem Anstieg von IAA und cis-Zeatin verbunden. Die auf eine stärkere Stressreaktion und eine bessere Akklimatisation hinweisen. Das Kalthärten war effizienter, wenn FR-Licht eher im frühen Entwicklungsstadium von Gerstenpflanzen als in späteren Stadien angewendet wurde.

Diese Reihe von Behandlungen dient als Beweis für die enge Beziehung zwischen Pflanzenhormonen, Lichtqualität, Lichtintensität und niedriger Temperatur zu Beginn der Kälteakklimatisierung.

5. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

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 fagytűrés kialakulásának vizsgálata.

Alapvető kérdés tehát, hogy Magyarországon a hőmérsékletváltozás vagy akár a napi átlaghőmérséklet fluktuáció mennyire gyakori probléma az őszi gabonafélék áttelelésének tekintetében. Áttekintve az 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 fagyűrő kialakulásának molekuláris háttérét. A kísérletek céljait az alábbiakban határoztuk meg.

Az értekezés fő célkitűzései:

- Három különböző abiotikus tényező, a hőmérséklet, a fényintenzitás és a fényspektrum hatásának egyenkénti, illetve kombinált jellemzése árpa növények fagyástűrésére.
- 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.
- A mesterséges LED-es fényforrások által létrehozott alacsony vörös/távoli vörös (R/FR) fény arány hatásának tisztázása az árpa hormonösszetételére normál és alacsony hőmérsékleten.
- A jelenség mögött található, a növényi hormon-bioszintézisben szerepet játszó gének génexpressziós mintázatainak kiderítése.

6. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

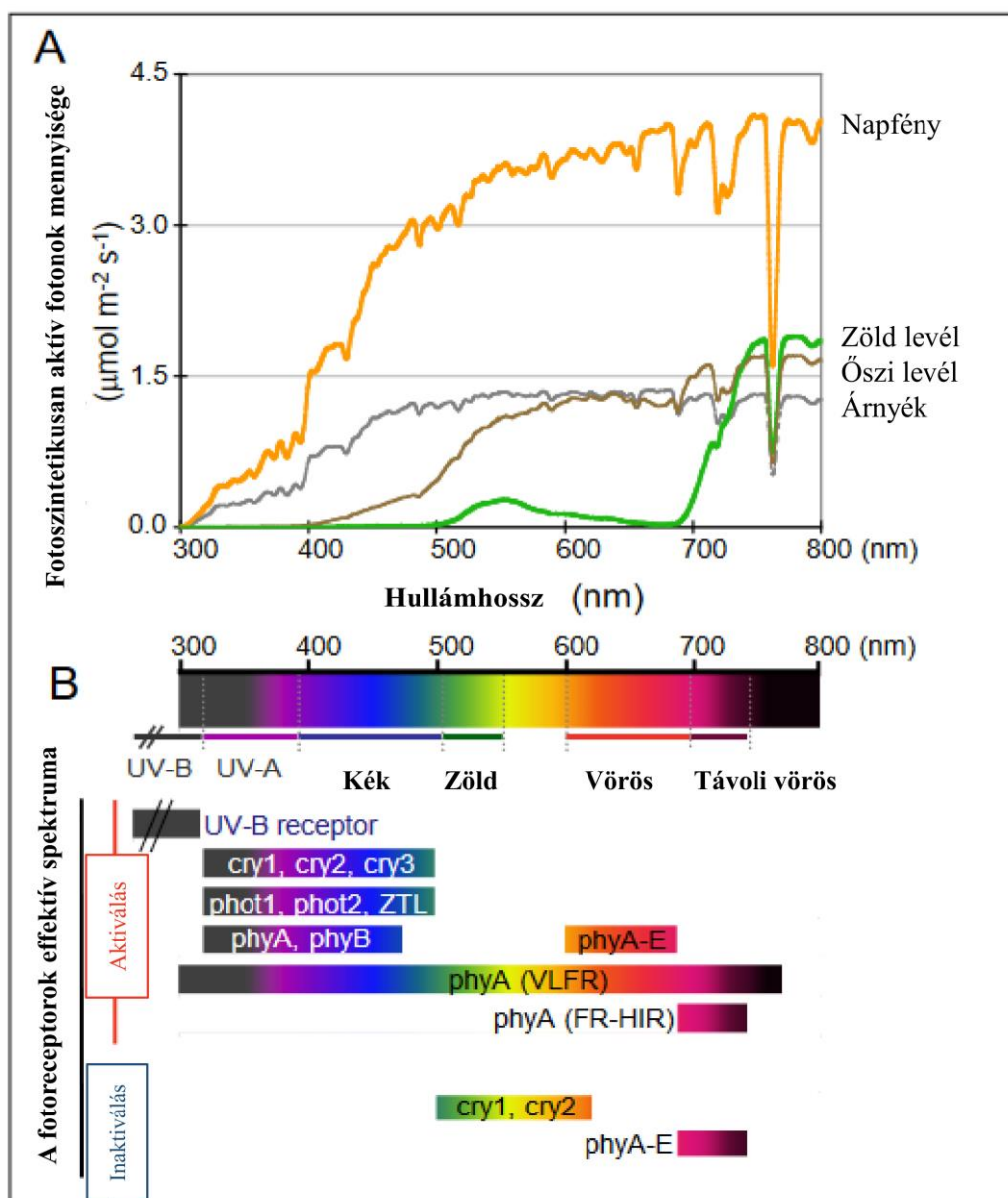
6.1. A fény szerepe a növények fejlődésére és a stresszválaszok kialakítására

A fénynek, mint az élet egyik legmehatározóbb környezeti tényezőjének számos különböző jellemzője van. Ilyenek például a fény spektrális összetétele (a hullámhosszak összessége), intenzitása és időtartama, sőt a fény iránya is nagyban befolyásolhatja a növényi növekedést és fejlődést.

A fény és növények kapcsolatában legtöbbször a fotoszintézis jelenségét vizsgálták. Ez annak is köszönhető, hogy a biológia történelmében az egyik legfontosabb esemény a fotoszintézis kialakulása volt. Ez a folyamat teszi lehetővé a biológiai energiatermelést a növények számára (Singh és mtsai. 2015). A másik fontos tényező a fény által indukált növénybiológiai mechanizmusok esetében a fotomorfogenezis. A növények fejlődésbiológiájában a fotomorfogenezis tulajdonképpen nem más, mint a fény direkt hatása a növények növekedésére és fejlődésére, amely sok esetben a fény spektrumától is függ. Ebből következik, hogy ez a fotoszintézistől egy teljesen független, a fényreceptorok által irányított folyamat (Parks 2003). Fontos megjegyezni, hogy a napfény színe nem állandó, hanem évszaktól, napszaktól és az időjárástól is függően, amely a fentiekben említett tényezőkön kívül akár a növények egymáshoz viszonyított helyzetétől is nagyban változik. (Kotilainen és mtsai. 2020). Így például a vörös/távoli vörös fény arány csökkenésének mértéke mennyiségileg összefügg a szomszédos növényzet sűrűségével és annak közelségével (Smith és Whitlam 1997). Tehát a természetes fény spektrális összetételének változását egy adott időpontban több különböző tényező is meghatározza, amelyet az alábbi ábrán mutatunk be (1. ábra A). A színek ismerete azért fontos, mert a spektrumot alkotó monokromatikus fények más és más reakciókat váltanak ki a növényekben. A fotoszintézis szempontjából főleg a vörös és a kék fény hullámhossztartományában érkező sugárzás gerjeszti az elektronokat. A fotomorfogenezis kapcsán említést érdemel, hogy a kék és az UV tartományú hullámhosszak a karotinoidok és az antocianinok felhalmozódását okozzák a levelekben (Li és Kubota 2009, Carvalho és mtsai. 2016, Bayat és mtsai. 2018). A vörös fény a szénhidrátok felhalmozódását idézheti elő szintén a levelekben (Sæbø és mtsai. 1995, Bayat és mtsai. 2018).

A növények a beeső fény spektrumát az úgynevezett fotoreceptorok segítségével érzékelik, amik aztán különböző jelátviteli folyamatokat képesek indukálni. A fotoreceptorok magukban foglalják a nemrégiben felfedezett UV-B-érzékelő UVR8 proteint (Kliebenstein és mtsai. 2002, Rizzini és mtsai. 2011), a kék és UV-A fényt érzékelő kriptokrómokat, fototropinokat és fény-oxigén-feszültséget érzékelő doménfehérjéket, valamint a vörös (R) és távol-vörös (FR) fényt

abszorbeáló fitokrómokat (Chen és mtsai. 2004, Kim és mtsai. 2007). A felsorolt fotoreceptorok hatékony spektrumát azok aktiválásához és az inaktíváláshoz az 1.B ábra mutatja be.



1. ábra A természetes fény spektrális fotonsugárzása és a fotoreceptorok effektív spektruma. cry1, cry2, cry3. kriptokróm1,2 és 3; phot1 és phot2, fototropin 1 és 2; phyA és phyB, fitokróm A és fitokróm B. ZTL: ZEITLUPE. A: Az összes spektrum spektrométerrel (LI-1800; Li-Cor, Lincoln, NE) lett mérve Japánban, Nara városában (2003. május, 15:00 óra, napfényes időben). **Narancs:** Szűrletlen napfény **Szürke:** Árnyékban **Zöld:** Pueraria lobata levelein keresztül **Világosbarna:** Pueraria lobata sárguló levelein keresztül (ősz levele). B: Az fotoreceptorok aktiválásának és inaktíválásának hatékony spektruma (Kami és mtsai. 2010).

A fotoreceptorok közül az egyik legfontosabb csoportot a fitokrómok alkotják. Ezek szabályozzák egy növény teljes életciklusa alatt bekövetkező fotomorfogén fejlődés minden aspektusát, beleértve a csírázást, a palánták fejlődését, a fotoszintetikusan aktív szomszédos növények általi árnyékolás elkerülését, a cirkadián óra beállítását, de még a virágzás idejét is (Franklin és Quail 2010).

A mérsékelt égövön az áttelelő őszi gabonaféléket októberben vetik el és azok kikelésük után alkalmazkodnak a külső körülményekhez. Ennek lényege, hogy fokozatosan csökken a nappalhossz és egyúttal a hőmérséklet is. Ezt a több hetes edződési folyamatot hidegakklimatizációnak nevezzük, melynek eredményeként a kezdetben még fagyérzékeny növények elviselik a téli fagyokat (Catalá és mtsai. 2011). Az alacsony hőmérséklet, valamint a fény által kiváltott egyedi vagy közös jelek helyes integrálása elengedhetetlen a hidegakklimatizáció megfelelő kialakulásának biztosításához. Leegyszerűsítve, a hideg elleni védekezés megfelelő kialakulásához, vagy akár annak növelése érdekében, a fény elengedhetetlen (Wanner és Junttila 1999). A fény hatását a hidegakklimatizáció kialakulásához szintén a fitokrómokon közvetítik, ami az egyéb hideghatások mellett fokozott génexpressziós változásokat indukál, amelyek pozitívan szabályozzák a fagyűrész kialakulását (Crosatti és mtsai. 1999, Kim és mtsai. 2002, Catalá és mtsai. 2011).

Az eddigiek, valamint fitokrómok aktiválásai spektrumának figyelembe vételével fontos tudni, hogy napfelkelte és alkonyat idején a napsugárzásból származó vörös/távoli vörös fény arány 1,15-ről nagyjából 0,7-0,8-ra csökken. Ehhez kapcsolódva szintén kiemelendő, hogy a nagyobb szélességi fokokon, ahol az alkonyat időtartama meghosszabbodik, a fényminőség változását szezonális információként használják a növények (Linkosalo és Lechowicz 2006).

Mindezek szerint azokban az esetekben, mikor a növényeknek nagyobb hideg elleni kitettséggel kell szembenéznük, a vörös/távoli vörös fény aránya csökken. Lehetséges, hogy a vörös/távoli vörös fény arányt a növények mint jelet érzékelik, és azt használhatják fel a hőmérséklet-csökkenésre való felkészüléshez.

6.2. A növények fagyűrészének kialakulása (akklimatizáció)

A növények fagyállóságának mértéke genetikailag meghatározott, azonban kialakulása egy hosszú adaptációs folyamat eredménye. A szárazság mellett az alacsony hőmérsékletet tartják számon mint a legkomolyabb környezeti tényezőt, amellyel szemben a magasabb rendű növényeknek ellenállónak kell lenniük (Theocharis és mtsai. 2012, Zhou és mtsai. 2017). Az őszi

gabonafélék esetében a fagyálósági sorrend a következő: rozs > búza > árpa > zab. Egy adott növényfaj, például a búza esetében a fagyállóság függ a fejlődési állapottól is. Hidegedződésre csak a fiatal még vegetatív állapotban lévő fiatal növények képesek. Az alacsony hőmérséklet függvényében két különböző hatásról beszélhetünk, amelyekből az egyik a hideg ($<20^{\circ}\text{C}$), míg a másik a fagystressz ($<0^{\circ}\text{C}$). Ennek is köszönhető, hogy a növényeknek nemcsak növekedését és fejlődését befolyásolja a hideg elleni védekezésük hatékonysága, hanem a növények földrajzi eloszlásában is kulcsszerepe van a hőmérsékletnek (Mickelbart és mtsai. 2015, Guo és mtsai. 2017, Nurhasanah Ritonga és Chen 2020).

Az alacsony hőmérséklet korai érzékelése az első lépés a növények számára a toleranciareakciók kifejlesztésére, amely reakciók igen komplex biokémiai és fiziológiai folyamatokká alakulnak át (Ruelland és Zachowski 2010). Vizsgálatok széles skálája azt jelzi, hogy a sejtek lipidmembránja a hideg okozta sérülés elsődleges helye a növényekben (Steponkus 1984). Ezenkívül jól megalapozott, hogy a fagy okozta membránkárosodás elsősorban a fagyással járó dehidratáció következménye (Steponkus 1984, Thomashow 1999). A hidegaklimatizációban olyan jelátviteli utak és biológiailag aktív anyagok vesznek részt, mint az oxidatív útvonal, a mitogén-aktivált protein-kinázok (MAPK-k), a fitohormonok, az abszcizinsav (ABA), valamint a CBF-ek által irányított (CBF függő) útvonalak (Jeon és mtsai. 2010, Danquah és mtsai. 2014, X. Wang és mtsai. 2016, Zhu 2016, Yuan és mtsai. 2018).

A hideg hatására a növényi sejtek membránjának változik a viszkozitása, és ennek következtében úgynevezett hírvivő (messenger) molekulák szabadulnak fel. Ezek közül is az egyik legfontosabb a kalcium-ion (Ca^{2+}), amely kulcsszerepet játszik a jelátviteli folyamatokban (Ranty és mtsai. 2016). A hideg hatására történő jelátvitel magában foglalja a Ca^{2+} csatornák és/vagy a Ca^{2+} pumpa aktiválását a növényi sejtekben. Ennek következtében a vakuulumból Ca^{2+} áramlik a citoplazmába (Wilkins és mtsai. 2016, Mori és mtsai. 2018). A hideginger által kiváltott Ca^{2+} jeleket Ca^{2+} szenzorok, például kalmodulinok (CaMs), CaM-szerű fehérjék (CML), Ca^{2+} -függő protein-kinázok (CPKs / CDPKs) és kalcineurin B-szerű fehérjék (CBL) közvetítik tovább (Wilkins és mtsai. 2016, Zhu 2016, Shi és mtsai. 2018, Yuan és mtsai. 2018). Aztán ezek a Ca^{2+} szenzorok a Ca^{2+} szignalizáció egyéb komponenseivel együtt dekódolják a Ca^{2+} felhalmozódást downstream szignalizációs eseményekké, mint például foszforilációvá, transzkripciós újraprogramozássá, a MAP kináz kaszkád aktiválódásává, vagy akár a reaktív oxigén gyökök (ROS) és/vagy nitrogén-oxid (NO) felhalmozódásává. (Reddy és mtsai. 2011, Liu és mtsai. 2017, Yuan és mtsai. 2018). A Ca^{2+} jel foszfolipidekkel, elsősorban foszfatidinsavakkal (PtdOH) is

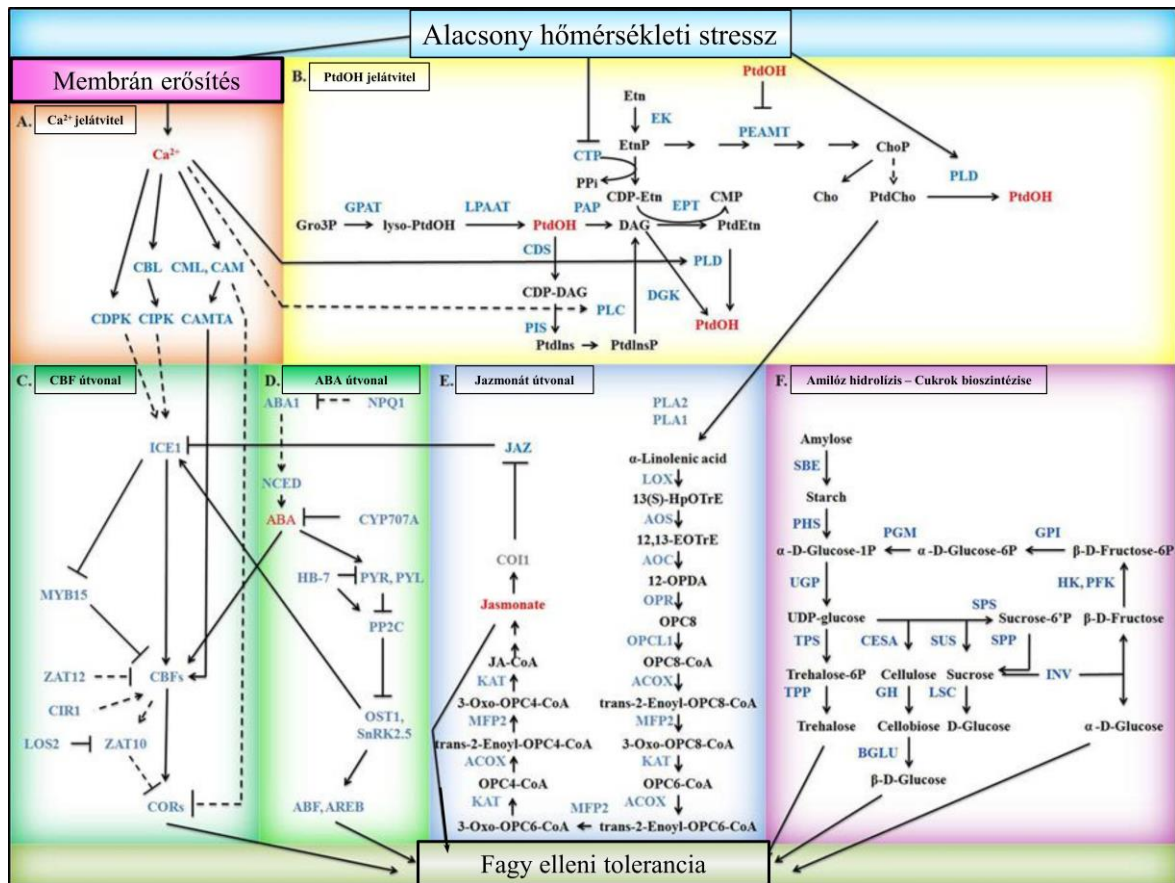
felerosítható, amelyek mint lipid szekunder hírvivők közvetítik a növényekben az alacsony hőmérséklet jelzését (Vergnolle és mtsai. 2005, Chinnusamy és mtsai. 2010).

Az abszcizinsavat (ABA) mint a hidegakklimatizációs folyamat lehetséges aktivátoraként tartják számon, mivel az ABA endogén szintje átmenetileg vagy akár konstitutív módon is megemelkedik a hidegedződés során. Ezt a feltételezést az is megerősíti, hogy növényi *in vitro* kultúrákban az ABA exogén alkalmazásával elérhető, hogy akár normál hőmérsékleti körülmények mellett történő kezeléssel is megvalósítható az egyed fokozott toleranciája a hideghatások ellen (Shinkawa és mtsai. 2013). Az ABA a stressz hatásának érzékelése után már néhány percen belül megkezdí felhalmozódását a növényi sejtekben, ami akár több órán keresztül is folytatódik a hőmérséklet függvényében. Éppen ezért mára elfogadott az a megállapítás, hogy az alacsony hőmérséklethez való alkalmazkodás során az ABA jelátvitel a fagyástűrés kiváltásának és szabályozásának egyik fontos részét képezi (Gusta és mtsai. 2005, Heidarvand és Maali Amiri 2010, Bruňáková és mtsai. 2015).

Az abszcizinsav mellett a jázmonátok mint a növényi hormonok egy másik csoportja is részt vesznek a számos stressz elleni védekezésben, köztük a hőmérsékleti ingadozásokból származó válaszokban is (Balbi és Devoto 2008). Hidegkezelés hatására felhalmozódnak a növényi sejtekben, de például exogén metil-jázmonáttal (MeJA) történő kezelés szintén fokozhatja a fagyűrést (Hu és mtsai. 2017). Ezenkívűl a jázmonsav (JA) mennyisége pozitív korrelációban áll az *Arabidopsis thalina* szacharóztartalmával (Balbi és Devoto 2008), ami szintén összevág azzal a megfigyeléssel, hogy a JA felhalmozódása az *Arabidopsis* növényekben szénhidrátfüggő mechanizmus (Hamann és mtsai. 2009, Wingler és mtsai. 2020). Ez a jelenség összefűggésben áll azzal, hogy a szénhidrátok anyagcsere útja alacsony hőmérsékletre reagálva szintén változó tendenciákat mutat (Jiang és mtsai. 2014).

A keményítő lebomlása során oldható cukrok, mint például szacharóz, glükóz és trehalóz keletkeznek, amelyek modulálhatják a sejtek ozmotikus potenciálját, amik a plazmamembrán megvédésében játszanak szerepet az alacsony hőmérsékleten bekövetkező károsodásokkal szemben (Bogdanović és mtsai. 2008, X. Wang és mtsai. 2016).

Az eddigiek alapján jól látszik, hogy a növények hidegedződése, valamint az akut fagykár elleni védelem mechanizmusa igen összetett folyamat. Ezt a bonyolult folyamatot próbáltuk a 2. ábrán összefoglalni Wang és munkatársai (2016) által készített ábra alapján (X. Wang és mtsai. 2016).



2. ábra Az árpában előforduló alacsony hőmérséklet okozta stressz jelátviteli útjainak sematikus ábrája. A jelző molekulákat, a DEG-eket, a nem-DEG-eket és a metabolitokat piros, kék, szürke és fekete színnel ábrázoltuk. A nyilak pozitív szabályozást jeleznek, míg a zárt vonalak a negatív szabályozást jelentik. A szabályozás közvetlen (folytonos) vagy közvetett (szaggatott vonal) módon is ábrázolva van. **A: Ca^{2+} jelátvitel.** CAM, kalmodulin; CAMTA, kalmodulin-kötő transzkripciós faktor; CBL, kalcineurin B-szerű fehérje; CDPK, kalciumfüggő protein kináz. CIPK, CBL-kölcsönhatásban lévő protein-kináz; CML, kalmodulinszerű fehérje. **B: PtdOH jelátvitel.** CDS, citidin-difoszfat-diacil-glicerin-szintáz; CTP, foszforilkolin-citidilil-transzferáz; DGK, diacilglicerin-kináz; EK, etanol-amin-kináz; EPT, citidin-difoszfat-etanol-amin-foszforotranszferáz; GPAT, glicerín-3-foszfat-acil-transzferáz; LPAAT, lizofoszfatidsav-acil-transzferáz; PAP, foszfatidinsav-foszfatáz; PEAMT, foszfoetanol-amino-metil-transzferáz; PIS, foszfatidilinozitol-szintáz; PLC, foszfolipáz C; PLD, foszfolipáz D; PtdOH, foszfatidsav. **C: CBF útvonal.** CBF, C-repeat binding faktorok; CIR1, cirkadián 1; COR, cold regulated gének; ICE1, CBF expresszió induktora; LOS2, az ozmotikusan reagáló gén 2; MYB15, MYB domén fehérje 15. **D: ABA útvonal.** ABA1, ABA hiányos 1; ABF, ABA-reszponzív elemek megkötő faktor; AREB, ABA-reszponzív elem kötő fehérje; CYP707A, citokróm P450-család 707-A-alcsalád; HB-7, homeobox-7; NCED, 9-cisz-epoxikarotinoid-dioxigenáz; NPQ1, nem fotokémiai csillapító 1; OST1, sztóma nyitó 1; PP2C, fehérje-foszfatáz 2C; PYL, pirabaktin rezisztencia 1-szerű gén; PYR, pirabaktin rezisztencia; SnRK2.5, szacharóz nem fermentáló 1-rokon protein-kináz 2,5. **E: Jasmonát útvonal.** ACOX, acil-CoA-oxidáz; AOC, allén-oxid cikláz; AOS, allén-oxid szintáz; COI1, koronatin-érzékeny 1; JAZ, jászmonát-zim-domén fehérje 11; KAT, ketoacil-CoA-

aciltranszferáz; LOX, linoleát 13S-lipoxigenáz; MFP2, enoil-CoA hidratáz; OPCL1, OPC-8: CoA ligáz 1; OPR, 12-oxofitodienoát-reduktáz; PLA1, foszfolipáz A1; PLA2, foszfolipáz A2. F: Amilóz hidrolízis – Cukrok bioszintéze. BGLU, béta-glükozidáz; CESA, cellulóz-szintáz; GH, 4-béta-D-glükán-4-glükánhidroláz; GPI, glükóz-6-foszfát-izomeráz; HK, hexokináz; INV, invertáz; LSC, levansukráz; PFK, foszfofruktokináz; PGM, foszfoglukomutáz. PHS, alfa-glükán-foszforilil; SBE, keményítőelágazó enzim; SPP, szacharóz-foszfát-foszfátáz; SPS, szacharóz-foszfát-szintáz; SUS, szacharóz-szintáz; TPP, trehalóz-6-foszfát-foszfátáz; TPS, trehalóz-6-foszfát-szintáz; UGP, UDP-glükóz-pirofoszforiláz.

6.3 A *C-repeat binding* transzkripció faktorok (CBF-ek)

A közelmúltban felhalmozott bizonyítékok arra derítettek fényt, hogy az élő és az egynyári növényfajokban egyaránt, a jól összehangolt akklimatizációs folyamatokat egy adott géncsoport, a *C-repeat binding faktorok* vagyis a CBF gének irányítják. Ezért e transzkripció faktorokat az akklimatizáció „mestergénjeinek” is szokták nevezni (Liu és mtsai. 2019).

A CBF transzkripció faktorok az *APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR* (AP2/ERF) DNS kötő domainnal rendelkező AP2/ERF szupercsaládba, azon belül pedig dehidratációra reagáló elem-kötő faktorok (dehydration-responsive element binding factors *DREB1*) alcsaládjába tartoznak. Képesek kötődni a CRT / DRE (*C-repeat / dehydration responsive element*) szekvencia motívumhoz a szabályozott gén promóter régiójában, amely konzervált CCGAC szekvenciát tartalmaz, mint a CBF fehérjék DNS-kötő doménjének kötőhelyét (Stockinger és mtsai. 1997, Liu és mtsai. 1998) Habár elsőként *Arabidopsis thaliana* modellnövényben azonosították és írták le a CBF géneket, azok fontosságának köszönhetően a további vizsgálatok eredményeként mára 54 növényfajban sikerült az azonosításuk. Az 54 fajból 31 kétszikű és 23 egyszikű növényben sikerült megtalálni a CBF ortológ géneket (Navarro és mtsai. 2009).

Alacsony hőmérséklet hatására a CBF gének nagyrésze tranziens expressziót mutat a hidegakklimatizáció korai szakaszában, amelynek intenzitása a hőmérséklet csökkenésével egyenes arányban emelkedik (Gilmour és mtsai. 1998, Zarka és mtsai. 2003). Érdekesség, hogy lúdfűben leírtak egy olyan transzkripció faktort, amely a hideghatás első lépéseként maguknak a CBF gének transzkripcióját szabályozza. Ez a transzkripció faktor az *ICE1* (*Inducer of CBF expression 1*) nevet kapta, amely gén normál hőmérsékleti körülmények között inaktív állapotban van, ám alacsony hőmérséklet hatására aktiválódik, majd konstitutívan expresszáldva indukálja a CBF-ek transzkripcióját (Gilmour és mtsai. 1998).

A CBF-ek döntő szerepét a gabonák hidegedződés folyamatában a QTL (*Quantitative Trait Locus*) térképezés tárta fel (Vágújfalvi és mtsai. 2003, Francia és mtsai. 2004, Miller és mtsai. 2006). Az árpában, a diploid alakor búzában (*Triticum monococcum* L.) és a hexaploid kenyér búzában (*Triticum aestivum* L.) végzett kvantitatív genetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a fagyűrés és a télállóság nagyszámú fenotípusos különbségeit két QTL magyarázza: a *Fr-1* és *Fr-2* (fagyállóság) lokuszok. Világossá vált, hogy az 5A kromoszómán található *Fr-1* lokusz a *VRN1* vernalizációs gént hordozza magában, amely szabályozza a vegetatív hajtás apikális merisztéma fázis váltását a szaporodási szakaszba, következésképpen csak pleiotrop hatással van a fagyűrésre (Galiba és mtsai. 2009, Greenup és mtsai. 2009, Tondelli és mtsai. 2014). Másrésztől legalább 11 CBF gént térképeztek fel az *Fr-2* lokuszban kis 0,7–0,8 centimorgan (cM) távolságon belül alakor búzában és árpában, ami egyértelműen megmutatta, hogy ezek a QTL-ek minden bizonnyal a CBF génekkel azonosak (Francia és mtsai. 2004, 2007, Vágújfalvi és mtsai. 2005, Miller és mtsai. 2006, Tondelli és mtsai. 2006, Stockinger és mtsai. 2007). A CBF-ek döntő szerepe az évelő fajok nyugalmi állapotának kiváltásában akkor vált nyilvánvalóvá, amikor Wisniewski és munkatársai sikeresen izolálták egy őszibarack CBF gén (*PpCBF1*) teljes hosszúságú cDNS-ét (Wisniewski és mtsai. 2011) és annak kifejeződése almában nem csak fokozott hidegállóságot eredményezett, de annak nyugalmi állapotát is indukálta.

A CBF-ek közül a központi szerepet a *CBF14* gén játsza a gabonafélék fagyűrésének meghatározásában. Ezt elsősorban az bizonyítja, hogy amikor transzgenikus tavaszi árpa növényekbe (*Hordeum vulgare* L. 'Golden Promise') épített búza *TaCBF14* gént nem akklimatizációs hőmérsékleten konstitutívan expresszáltattak, az megnövekedett fagyűrést eredményezett (Soltész és mtsai. 2013). Továbbá az árpa genotípusai között a hidegtűrési különbségek összefüggenek a bennünk található *CBF14* allélkülönbségekkel (Fricano és mtsai. 2009).

Mára az is igen megalapozottá vált, hogy az alacsony hőmérséklet mellett a fény is mint külső abiotikus jelként működik, amely befolyásolja a CBF gének expressziós szintjeit (Maibam és mtsai. 2013). Leírták, hogy a CBF-ek működésének modulálásán keresztül a fotoperiódusnak és a fényminőségnek is fontos szabályozó szerepe van a hideg-akklimatizálódás folyamatában (Franklin és Whitlam 2007, Lee és Thomashow 2012, Novák és mtsai. 2016, Gierczik és mtsai. 2017). Mesterséges fényviszonyok alkalmazásával megfigyelték, hogy az alacsony hőmérsékleti és az egyes fénykezelési hatások a CBF gén expressziójára egyaránt hatással vannak, amely több esetben additívnak mondható (Novák és mtsai. 2016). A képet tovább bonyolítja az a felismerés,

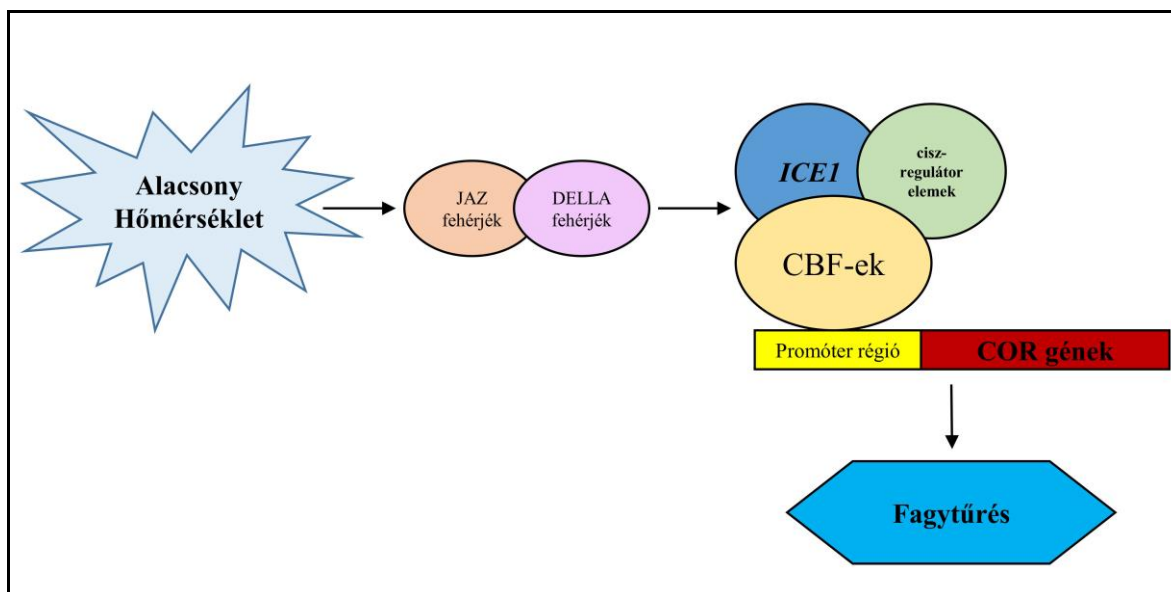
hogy maga a fényintenzitás is befolyásolja a fagyűrés mértékét, mivel az alacsony fényintenzitás képes csökkenteni a növények fagyástűrési szintjét (Apostol és mtsai. 2006).

6.3.1. A CBF-regulon

A CBF transzkripciós faktorok által regulált géneket együttesen CBF regulonnak nevezzük (Gilmour és mtsai. 2004). E gének közül a legfontosabbak a hideg által szabályozott gének (*COR* - *cold regulated gene*) család tagjai (egyéb elnevezései alapján: alacsony hőmérséklettől indukált (*LTI* - *low-temperature induced*), hideg által indukálható (*KIN* - *cold-inducible*) vagy a kiszáradásra reagáló (*RD* - *responsive to desiccation*) (Thomashow 1994), valamint a dehidrin (*DHN*) géncsalád. Míg a *COR* gének elsősorban a fagyűrés kialakításához járulnak hozzá, addig a *DHN* gének elsősorban a fagyás okozta vízvesztés káros hatásaitól védik a növényeket (Danyluk és mtsai. 1994, Jaglo-Ottosen és mtsai. 1998, Choi és mtsai. 1999, Dal Bosco és mtsai. 2003).

Ennek a jelenségnek az első közvetlen bizonyítéka a dehidrációra reagáló elem (*DRE* - *dehydration-responsive element*) felfedezése volt, amely hozzájárul mind a hideg, mind a dehidráció által kiváltott gének expresszióhoz, de nincs hatással az abszcizinsav (ABA) bioszintézisében szerepet játszó gének expressziójára (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki 1994). Később azt is bizonyították, hogy a már az előző fejezetben említett *CBF*-ek fény által történő szabályozása közvetlen módon szintén hatással van a *COR* gének transzkripciós szabályozására (Kim és mtsai. 2002).

A növényekben lezajló ICE-CBF-COR útvonal működését a hideg elleni stresszválaszban a 3. ábra mutatja be (Nurhasanah Ritonga és Chen 2020).



3. ábra A növények ICE-CBF-COR útvonala a hideg elleni stresszválaszban. A CBF-ek expresszióját főleg a DELLA jelátvitel közvetíti tovább, amit aztán az ICE1 indukál. A DELLA fehérjék hozzájárulnak a CBF gének hideg indukciójához a JaZ fehérjék által érzékelt jelek továbbításán keresztül. A CBF-ek aktiválják a COR-gének expresszióját a COR-gének promóterében lévő cisz-elemekhez kötődve, és a növények fagyűrésének fokozódását eredményezik.

A COR géncsaládból leginkább leírt és a legjellemzettebb gén a molekuláris genetikai tényezők között a gabonafélék fagyűrésének területén a *COR14b* (Crosatti és mtsai. 2003). Ennek a génnek az expressziós szintje összefüggésben áll az adott növény hideg-érzékenységével. Fagyűró búza genotípusban a *TaCOR14b* emelkedett transzkripciója mérhető már 18/15 °C nappali/éjszakai hőmérsékleten, vagyis még nem akklimatizációs hőmérsékleten, míg a fagyérzékeny genotípusokban ez a gén egyáltalán nem fejeződik ki ezeken a viszonylag magas hőmérsékleteken (Jaglo-Ottosen és mtsai. 1998, Thomashow 1999, Vágújfalvi és mtsai. 2000).

A DHN géncsaládból árpában a legismertebb hidegindukálható dehidrin a *dehidrin 5* (*DHN5*) gén, amelyet a gyakorlatban a búza *WCS120* gén ortológjaként tartanak számon (Sarhan és mtsai. 1997, Kosová és mtsai. 2008). Ez azért lényeges, mivel a búzában a *WCS120* gént markergénként használják a búza növények fagyűrésének meghatározásához (Vítámvás és mtsai. 2007). Ebből adódik, hogy jelenleg a *HvDHN5* gén az árpában szintén az elérhető maximális fagyűrés markergénjének is tekinthető (Kosová és mtsai. 2013).

A változó fényviszonyok és a csökkenő hőmérséklet kapcsolatának felderítése a növények hidegakklimatizációs folyamatára legalább két fontos célt szolgálna. Ezek egyike az, hogy tudjuk, hogy az éghajlatváltozás hatással van-e a növények hideg-akklimatizálódására, és ha megértjük,

hogyan reagálnak molekuláris szinten a hőmérséklet ingadozására, akkor a hideg elleni tolerancia javítására az előre jelzett jövőbeni éghajlathoz gyorsabban alkalmazkodó növényfajtákat tudnánk előállítani. (Liu és mtsai. 2019). A második ok ennél sokkal praktikusabb. A télállóság javítása érdekében a kutatók gyakran növénynevelő kamrákat használnak a jobb fagyűrűsű egyedek szelektálására. Gabonafélék esetében egy teljes növény fagyasztási vizsgálata nagyjából 8 hétig tart, és ha két szelekciós hőmérsékletet használunk (például -12 és -15 °C), akkor csak 60 genotípust tesztelhetünk egy arra kialakított kamrában (Sutka 1981, Galiba és mtsai. 1995, Francia és mtsai. 2004, Soltész és mtsai. 2013, Jeknić és mtsai. 2014). Ez nemcsak meglehetősen időigényes folyamat, de igen drága is. Ha feltételezzük, hogy ez nem jelent problémát, még akkor is előfordulhat egy komolyabb nehézség a vizsgálat során. Ha a tesztelt csíraplazma egyes vonalainak fagyűrűsége csak kissé különbözik (1 vagy 2 C°), az eredmények alig, vagy egyáltalán nem ismételhetők. Ezenkívül a gyakran használt hideg fénycsövek öregedése megváltoztatja a fényintenzitást és a kibocsátott fény spektrumát is, ami tovább erősíti egy kísérlet hibahatásait.

6.4. A növényi hormonok

Mint helyhezköthött organizmusoknak, a növényeknek nem csak érzékelniük kell a környezet változásait, de azokra gyorsan reagálniuk is kell. A növényi hormonok (fitohormonok), olyan endogén kis molekulák, amik sokoldalú szerepet játszanak a növény növekedésében és fejlődésének szabályozásában, a környezet fizikai viszonyokra reagálva (Jiang és Asami 2018). Annyira fontos molekulák, hogy tulajdonképpen egy növény életciklusának minden szakaszát a növényi hormonok szabályozzák. Általában a növényi biológiai aktivitást egynél több hormon szabályozza, így a biológiai jelenség gyakran több különböző hormon együttes kölcsönhatását tükrözi (Wang és Irving 2011). A növényi hormonok, mint azt említettük, számos ponton befolyásolják a növények fejlődését, növekedését és szaporodásuk idejét és hatékonyságát, de mára egyéb szabályozó szerepük is bizonyítottá vált, például a stresszválaszok kialakításában is (Davies és Davies 2016, Shigenaga és Argueso 2016, Ku és mtsai. 2018, Méndez-Hernández és mtsai. 2019).

Néhány konkrét tényezőt, amelyekre hatással vannak a növényi hormonok, az alábbiakban foglaltunk össze, de természetesen ennél jóval több folyamatban is részt vesznek.

- Embriogenezis
- Sejtosztódás és sejtmegnyúlás szabályozása
- Szervek kialakulása és növekedése
- Szaporodásbiológiai folyamatok szabályozása
- Gyümölcskötés és növekedés
- A növények nyugalmi állapotának (dormancia) szabályozása
- Szeneszencia előidézése vagy késleltetése
- **Biotikus és abiotikus stresszhatások elleni védekezés kialakítása**

6.4.1. A növényi hormonok szerepe és bioszintézise a stresszválaszokban

Növényekben a változó környezeti tényezőkkel szemben kialakuló akklimatizációs folyamat koordinációjának irányításában kulcsszerepe van a fitohormonoknak is (Foyer és Noctor 2005, Fujita és mtsai. 2006, Kurepin és mtsai. 2012, Galiba és mtsai. 2013). A fitohormonok a stresszre adott válaszaik alapján két csoportra oszthatók. Az első csoport az úgynevezett „pozitív növekedésszabályozókból” áll, és az auxinokat, a citokinineket (CK), a gibberellineket (GA) és a brasszinoszteroidokat tartalmazza. A második csoport pedig az úgynevezett „stresszhormonokat” foglalja magában; abszizinsav (ABA), jázmonsav (JA), szalicilsav (SA), etilén és strigolaktonok (Kosová és mtsai. 2012).

Az abiotikus stresszekre adott válaszok egyik legfontosabb hormonja az ABA, amelyet általában a legfőbb abiotikus stresszhormonnak is neveznek. Döntő szerepe van a szárazság-, a só- és a hidegstressz hatásainak alakulásában (Gusta és mtsai. 2005). A hideg okozta sérülések elkerülése érdekében az ABA-tartalom emelkedése stabilizálhatja a növények víz homeosztázisát a hideg stresszreakció korai szakaszában, és serkentheti a védő molekulák (vegyületek) termelését (Galiba és mtsai. 1993). Például az alakor (*T. monococcum*) esetében ABA emelkedést írtak le mind a hajtáscsúcsok, mind pedig a levelek esetében is már az első napon 4 °C-os kezelést követően. Ez az emelkedés elősegítette a növény vízállapotának javulását a sztóma bezárása révén, és elősegítette a védekezést a késői embriogenezisben az által, hogy a védőfunkciót ellátó fehérjék (LEA - late embryogenesis abundant proteins) expresszióját stimulálta (Vanková és mtsai. 2014). Magasabbrendű növényekben az ABA bioszintézis útjának kiindulópontja a zeaxantin és az antheraxanthin violaxantinná történő epoxidálása, amelyet egy zeaxantin epoxidáz (ZEP) enzim

katalizál (Marin és mtsai. 1996). Az epoxidáció után minden transz-violaxantin átalakul 9-cisz-violaxantinná vagy 9-cisz-neoxantinná (Seiler és mtsai. 2011). Azt követő lépésben a 9-cisz-violaxantin és a 9-cisz-neoxantin oxidatív hasítása következik xantoxinná, amelyet a 9-cisz-epoxi-karotinoid-dioxigenáz (NCED) katalizál (Schwartz 1997, Nambara és Marion-Poll 2005, Lefebvre és mtsai. 2006). A teljes folyamatot tekintve úgy tűnik, hogy az *NCED* gének lehetnek talán a legfontosabb tényezők ebben a bioszintézisben, legalábbis ami a hidegedződési folyamatot érinti. Erre abból lehet következtetni, hogy a hidegkezelt búzafajtáknál az *NCED1* transzkripció szintje a növények leveleiben jóval alacsonyabb, a fagyérzékeny fajtákban, mint a fagyűrő genotípusokban, ahol nagyon magas volt ugyanazon gén expresziós szintje (Kalapos és mtsai. 2016). Az oxidatív hasítás után a xanthoxin a plasztidokból a citoszolba szállítódik, majd ott rövid szénláncú dehidrogenáz (SDR – short-chain dehydrogenase) segítségével abszcizikus aldehiddé konvertálódik (Choi és mtsai. 1999, González-Lamothe és mtsai. 2012). Az utolsó lépésben pedig az abszcizikus aldehideket aldehid-oxidáz (AO) oxidálja ABA-vá (Seo és mtsai. 2004).

Számos publikáció szerint az SA fontos szerepet játszik mind a biotikus, mind az abiotikus stresszválaszok kialakításában növényfajok széles körében. A gabonafélékben kimutatták, hogy az SA kezelés pozitív hatással volt az alacsony hőmérséklettel szemben kialakított toleranciára (Miura és Tada 2014). Árpában az exogén SA alkalmazása javította a fagyűrést azáltal, hogy csökkentette a lipidperoxidációt, valamint a jégkristályok kialakulását a sejtekben. Ezt a jelenséget leírták mind a fagyűrő, mind pedig az arra érzékeny genotípusokban egyaránt. Ez azzal is összefüggésben lehet, hogy a SA az apoplastikus antioxidáns enzimek aktivitását is befolyásolta a fent leírtak esetében (Mutlu és mtsai. 2013a, Mutlu és mtsai. 2013b). Kukoricában a szalicilsavval történő előkezelés már normál növekedési hőmérsékleten is képes fokozott antioxidáns aktivitást indukálni, ezáltal növelve az alacsony hőmérséklet elleni védekezési mechanizmusokat (Janda és mtsai. 1999). Ez természetesen azt is jelenti, hogy az SA nemcsak a hideg, de oxidatív stressztől is képes óvni a növényeket, befolyásolva azok redox állapotát (Horváth és mtsai. 2002, Yang és mtsai. 2004). Az SA szintézisének kulcsfontosságú szabályozási pontja a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) által vezérelt fenilalanin kialakulása, bár ezzel párhuzamos útvonalon az izochorizmát-szintáz (ICS) katalizálásának közbenjárásával, szintén lehetséges a SA szintézise (Dempsey és mtsai. 2011, Kim és Hwang 2014). Megállapították, hogy a PAL egy stressz által indukálható enzim, amelyet UV-besugárzás, erős fényintenzitás vagy alacsony hőmérséklet is képes szabályozni (Dixon és Paiva 1995). Uborkában a PAL expressziós mintázata korrelál a hidegstressz hatás indukálta biokémiai védekezési mechanizmusok miatt kialakult csökkent foto- és oxidatív károsodásokkal (Dong és mtsai. 2015). Itt fontos megjegyezni

azonban, hogy gabonafélékben az eredmények kétértelműek. Őszi búza esetében található olyan szakirodalom, amely a PAL aktivitás emelkedéséről számol be a hidegedződés szakaszában (2°C, 28 napig) (Gaudet és mtsai. 2000), míg egy másik tanulmány ennek pont ellenkezőjét állítja (Olenichenko és Zagoskina 2005).

A JA számos fiziológiai folyamat szabályozásában vesz részt, és döntő szerepet játszik számos biotikus és abiotikus stresszválaszban is (Avanci és mtsai. 2010, Taniguchi és mtsai. 2014). Több, a JA bioszintézisében szerepet játszó gén transzkripciójának fokozódásáról, valamint a JA tartalom emelkedéséről számoltak be rizsben, közvetlenül alacsony hőmérsékletnek való kitettség következtében (Du és mtsai. 2013). Őszi és tavaszi búza esetében nemcsak a gyorsan bekövetkező hőmérséklet-változás, de az alacsony hőmérséklet huzamossabb ideig tartó megléte is magasan tartotta a növények JA szintjét (Kosová és mtsai. 2012). A JA-tartalom emelkedése aszályos időszakokban is hasonló tendenciákat mutat (Djilianov és mtsai. 2013). A JA bioszintézis útja foszfolipid felszabadulásával kezdődik a plaztoid membránok lipideiből, majd lipoxigenáz (LOX) és α -dioxigenáz (α -DOX) katalízis következik (Göbel és Feussner 2009, Sharma és Laxmi 2016). A LOX enzimek potenciális szerepét a hidegakklimatizációban különböző növényfajokban is említik, de extrém körülmények között az eredmények már ellentmondásosak. Csicsereborsóban például jóval fagy alatti hőmérsékleten (-10 °C) a LOX-aktivitásának jelentős csökkenése jelentkezik (Kazemi-Shahandashti és mtsai. 2014). Ezzel szemben a hosszan tartó hősokk vagy hideg kezelés jelentős emelkedést eredményezett a paradicsom LOX-al kapcsolatos folyamataiban (Copolovici és mtsai. 2012).

Az auxinok a növények növekedésének és fejlődésének területén a leginkább vizsgált hormonok, míg a hideg akklimatizációban betöltött szerepükről nagyon korlátozott információ áll rendelkezésre. Az a viszonylag kevés információ, ami jelenleg rendelkezésünkre áll, is elsősorban *Arabidopsis thaliana* (L.) és rizs tanulmányokból ismeretes (Hannah és mtsai. 2005, Jain és Khurana 2009, Eremina és mtsai. 2016). A biológiailag legaktívabb auxin az indol-3-ecetsav (IAA) (González-Lamothe és mtsai. 2012, Weijers és mtsai. 2018). Általánosságban elmondható, hogy a tartós hidegstressz pozitívan befolyásolja az IAA felhalmozódását, valamint az auxin-anyagcserében résztvevő gének expresszióját is pozitívan regulálja (Kosová és mtsai. 2012, Du és mtsai. 2013). Az IAA többféle módon szintetizálódhat a növényekben. Ezek közül a legfontosabb útvonalon az indol-3-piruvát (IPA) képződése a leginkább leírt folyamat, amely a flavin-monooxigenáz (YUCCA) enzimesaládnak köszönhetően valósul meg, amelynek tagjai az IPA IAA-vá történő dekarboxilezését végzik (Zhao 2014).

A citokininek (CK) elsődleges élettani funkciói a növények fejlődési folyamataihoz kapcsolódnak (nevezetesen a sejtosztódás és a sejtnövekedés stimulálásához), de köztudottan szerepet játszanak az abiotikus és a biotikus stresszválaszokban is (Ryu és Cho 2015). Megállapították, hogy a CK-k kiemelkedő szerepet játszanak a hideg elleni védelemben, de ezen a területen még nem sikerült teljesen tisztázni funkcióikat (Pavlů és mtsai. 2018). Általában az aktív CK-k mennyisége a hidegsokk hatására azonnal csökken, ami összefügg a növény erőfeszítéseivel, hogy az energiát a növekedésből a védekezésbe helyezze át (Argueso és mtsai. 2009, Vanková és mtsai. 2014). A növényekben négy aktív CK forma létezik, nevezetesen a transz-zeatin (tZ), a cisz-zeatin (cZ), az izopenteniladenin (iP) és a dihidrozeatin (DHZ) (Gajdošová és mtsai. 2011). A sejtosztódás indukálásában fiziológiailag a legaktívabb citokinin a tZ (Sakakibara 2006), míg a kevésbé aktív cZ a többi CK-től eltérő funkciókat lát el, és sokkal inkább a stresszválaszokkal kapcsolható össze (Gajdošová és mtsai. 2011, Schäfer és mtsai. 2015). A CK bioszintézis legfontosabb szabályozói az izopentenil-transzferázok (IPT-k), míg a fő lebontási enzimek a citokinin-oxidáz / dehidrogenázok (CKX).

Annak ellenére, hogy számos tanulmány foglalkozott a fény által kiváltott növényi egyedfejlődéssel és az egyes hormonok közötti kölcsönhatásokkal (Alabadí és Blázquez 2009, Lau és Deng 2010), mégis keveset tudni azokról a hormonális változásokról, amelyek a fényminőség módosulása miatt következnek be. A fényspektrum-összetétel hatásával kapcsolatban a legtöbbet vizsgált kérdés az úgynevezett „shade avoidance syndrome”, magyarul árnyékelkerülési szindróma. Ennek a lényege, hogy a növények a fény spektrumát használják fel a szomszédos növényzetre vonatkozó információként (Franklin és Whitelam 2005). A növények a kék és a vörös fényt használják fel a fotoszintézisük működésében, míg a távoli vörös fény (FR) emelkedését (ami annak köszönhető, hogy a szomszédos növények által megtörténik a vörös fény (R) abszorpciója, ezáltal csökken a R/FR arány a sűrű növényzet alsóbb részein) fontos morfológiai jelként értelmezik. Az FR megnövekedett aránya számos molekuláris mechanizmuson keresztül indítja el az árnyékelkerülő választ, ideértve az auxinok abszolút emelkedését (Alabadí és Blázquez 2009, Zhou és mtsai. 2018). A csökkent R/FR aránnyal együtt járó IAA emelkedés pedig a citokinin-oxidáz/dehidrogenáz 6 (CKX6) gén indukcióját eredményezi a fiatal növények leveleiben, ami a citokininek lebomlásához vezet. (Zhang és mtsai. 1995, Carabelli és mtsai. 2007). A csökkent R/FR arány negatívan befolyásolta a JA és a SA felhalmozódását is, amely a növények fokozott kitérttségét eredményezi a növényi kártevők elleni. (Moreno és mtsai. 2009, Yang és Li 2017).

Az árnyékhataison kívül a különböző fényminőség változásból fakadó jelek a növények számára fontos szezonális információt is nyújtanak. A fotoperiódus hatása a növények fagy elleni toleranciájára és fejlődésére jól megalapozott, míg a fénykörnyezet napi minőségi változásainak lehetséges hatása kevésbé ismert. A vörös és a távoli vörös fény (R/FR) arány nappali fényben állandó és független a felhőzet borításától, de szürkületben sokkal kisebb, ha a Nap magassági szöge kevesebb, mint 10° (Holmes és Smith 1977). Az Egyenlítőtől eltávolodva ez a jelenség egyre hangsúlyosabbá és jellemzőbbé válik az északi féltekén a mérsékelt és boreális éghajlati öveken. Kimutatták, hogy alkonyatkor a csökkent R/FR arány gátolja az internodiumok megnyúlását hibrid nyárfában (*Populus tremula x tremuloides*) az aktív tenyészidőszak végén. E mellett tavasszal alkonyatkor a csökkent R/FR arány elősegíti az ezüst nyírfa rügyfakadását is (Olsen és Junttila 2002, Linkosalo és Lechowicz 2006).

A magasabb FR jelenlét fontos tényezőnek bizonyult az *A. thaliana* hideg akklimatizációs folyamataiban, elsősorban a CBF regulon szabályozásán keresztül (Franklin és Whitelam 2007, Lee és Thomashow 2012). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolták, hogy a csökkent R/FR arány pozitívan befolyásolta a búza és az árpa fagytűrését is (Novák és mtsai. 2016). A növények a fényt fotoreceptorai segítségével érzékelik, ami a R és az FR esetében a fitokrómokat jelenti (Franklin és Whitelam 2007, Franklin és Quail 2010, Novák és mtsai. 2016, Gierczik és mtsai. 2017). Az a tény, hogy a legelterjedtebb fitokróm, a PhyB termoszenzorként működik (Jiang és mtsai. 2020), azt jelzi, hogy a magas FR és az alacsony hőmérséklet kombinációja a növények számára egyedi környezeti jelet képvisel, amely legalább részben eltér az árnyékkerülő szindrómától. Ezt a következtetést támasztják alá a specifikus transzkripciós profilok, például az FR-stimulált PhyA és az alacsony hőmérséklet szinergetikus hatása a legfontosabb hideg által kiváltott transzkripciós faktorok, a CBF-ek expressziójára (F. Wang és mtsai. 2016).

Ezt összevetve a növényi hormonokkal kapcsolatos ismerteinkkel úgy gondoljuk, hogy az alacsony hőmérséklet és a fényminőség egyaránt jelentősen befolyásolja számos fitohormon anyagcseréjét is, ami a CBF-ekkel együtt nagy hatással lehet a növények hidegakklimatizációs folyamataira.

A BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK fejezetben megfogalmazott célok elérése, valamint fentebb leírt teóriánk alátámasztásának érdekében két egymástól különálló kísérletet állítottunk be. Az egyikben csökkentett R/FR aránnyal rendelkező fény hatásait vizsgáltuk három különböző fényintenzitás mellett normál és alacsony hőmérsékleten. Itt a fenotípusos jellegek mellett, elsősorban a *CBF14* gén, valamint a hozzá kapcsolódó CBF-regulon működésére voltunk

kíváncsiak. Míg a másodikban már csak egy fény intenzitáson dolgoztunk tovább, itt elsősorban az árpa hormonösszetételének változásait vizsgáltuk, normál és alacsony hőmérsékleten, távoli vörös fényben történő kezelés előtti és utáni hideg stressz esetében, különböző fenológiai fázisokban. Az disszertáció könnyebb megértése és olvashatósága érdekében, a két kísérletet az esetek nagyrésztében külön fogjuk tárgyalni.

7. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

7.1. A növényi anyag és a növénynevelés körülményei

A kísérletek, ahogy a fentiekben már leírtuk, egy jó hidegtűréssel rendelkező árpa (*Hordeum vulgare spp vulgare var. Nure*; $2n=2x=14$; genom: HH) genotípussal végeztük el. Ezt a magas hozamú, hidegtűrő, kétsoros őszi árpa fajtát 1999-ben az Olasz Kísérleti Gabonatermesztési Intézet (Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura (Fiorenzuola)) hozta forgalomba. Az első kísérletben (Martonvásár 2017) a magvakból három napos csíráztatást követően, 480 db csíranövényt ültettünk el Jiffy-7 36 mm átmérőjű tápkorongokba (Jiffy Group, Oslo, Norway). A második kísérletben (Martonvásár 2019) 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 különböző hőmérsékletű- és fény kezelések elvégzéséhez is) PGV-36-os (Conviroon PGV36; Controlled Environments Ltd.; Winnipeg, MB, Canada) modulálható LED fénymennyezettel felszerelt növénynevelő kamrába helyeztük, mind a két kísérlet esetében (4. ábra). A növényeket e növekedési szakaszában folyamatos 12 órás (12h/12h) megvilágítás mellett 15°C-on tizennégy napon át neveltük 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ fényintenzitás mellett, ahol a fényt kizárólag egy széles spektrumú „fehér” LED (Philips Lumileds, LXZ25790-y) szolgáltatta. A növényeket heti három alkalommal $\frac{1}{2}$ Hoagland-tápoldattal öntöztük (Hoagland és Arnon 1938). Az előnevelés és a kísérlet körülményeit a 4. ábra mutatja be (4. ábra).



4. ábra A moduláris LED fénymennyezettel elátott PGV-36-os fitotron kamra belső elrendezése, valamint a LED modulok közeli képe, kizárólag fehér fény kibocsátása esetén (saját fotó).

Habár árpában a fotoperiódus szintén befolyásolja a hidegedződést (Fowler és mtsai. 2001), mégis a munkánk során kísérletbe vont (*Hordeum vulgare* spp. *vulgare* var. Nure) genotípusról az alábbiakat fontos tudni. Ez a genotípus két fotoperiódus-érzékeny (PPDH - photoperiod-sensitive) allélt hordoz. Az egyik a *PPD-H1* (a 2H kromoszómán), amely érzéketlen (*ppd-H1*) a nappalhosszra. A másik a *PPD-H2* (az 1H kromoszómán), amely a nappalhosszra érzékeny allél (*Ppd-H2*) (Rizza és mtsai. 2016). Közepes fotoperiódus alatt (12/12 óra) ezek a gének egyáltalán nem aktiválódnak, ezért ebben a tanulmányban nem volt szükség a PPD gének tanulmányozására, de egyéb beállítási rendszerekben (hosszú vagy rövid napos kezelések során) fontos lehet a vizsgálatuk.

7.2. A fény- és hőmérséklet-kezelések

7.2.1. Fény- és hőmérsékleti viszonyok az első kísérleti során

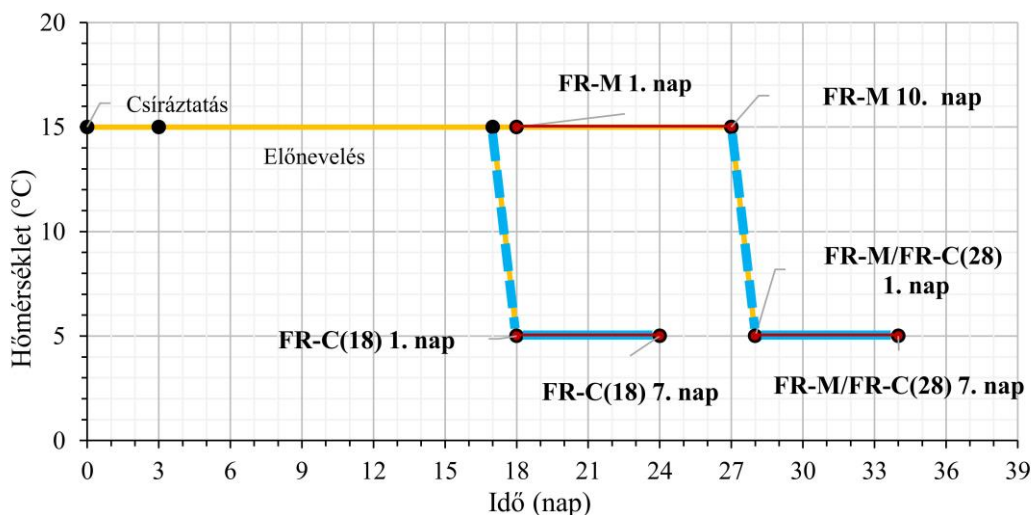
Az előnevelés után, mikor a növények már elérték a megfelelő három leveles (Zadoks és Board 1999) fejlettségi állapotot, akkor kezdtük meg a kezeléseket. Ebben a kísérletben a modulálható LED fénymennyezetet hat zónára osztottuk fel, melyekben a kezdeti 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ fényintenzitású „white” fény mellett, 125 és 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 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 $\sim 0,5$ 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. Az egyes kezelésekből a fény spektrális összetételét a további mellékletek fejezet első ábrája mutatja be (M2. 1. ábra). 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 kezeléseks első és utolsó napján vettünk mintákat a génexpressziós vizsgálatokhoz, de a fagytesztek elvégzése céljából csak az utolsó napokon gyűjtöttük be a növényi anyagokat. A vizsgált növényi részek mindig a 2. legfiatalabb levélből származtak. A kísérlet végén a növények magasságát is mértük.

7.2.2. Fény- és hőmérsékleti viszonyok a második kísérlet során

Az első kísérlethez hasonlóan itt is tizennyolc napos növényeken kezdtük meg a kezeléseinket. Itt az előnevelés után csak két területre választottuk szét a növénynevelő kamrát. Az egyik területen kizárólag a fehér fény szolgáltatott $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ fényintenzitást a növények felett (kontroll). 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 (M2. 2. ábra, (Kovács és mtsai. 2020)), 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. A kezelési változatok könnyebb értelmezése céljából azokat az 5. ábrán sematikus formában mutatjuk be. 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. Az RNAseq elvégzéséhez csak az első két kezelési változat első napjain vettünk mintát a fentiekben kifejtett időpontokban. Tehát ez az első kísérlethez képest változatlan maradt. 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 kísérletben elvégzett kezelések változatai (lásd 5. ábra):

- 1. 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 négyleveles fejlettségi stádiumot (Zadoks és Board 1999).
- 2. FR-M/FR-C(28):** Az első kezelésből 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.
- 3. FR-C(18):** A tizennyolc napos növényeket hét napra közvetlenül 5 °C-os alacsony hőmérsékletnek tettük ki, azonnali FR jelenlét mellett.



5. ábra A fény- és hőmérséklet kezelések összefoglaló ábrája. **1. kezelés FR-M:** A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 °C-on. **2. kezelés FR-M / FR-C (28):** 28 napos FR edzett növények további hét napig 5 °C-on történő kezelése. **3. kezelés FR-C (18):** 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. A piros vonal az FR kezeléseket jelölik, míg a kék vonalak az alacsony (5 °C) hőmérsékletet jelzik.

7.3. A relatív konduktancia szintek meghatározása levélmintákból (Fagyteszt)

A fagyteszt elvégzéséhez mindkét kísérlet esetében a kezelések utolsó napján vettünk levélmintákat. A fagytesztet a Webb és munkatársai által leírt módszer alapján végeztük el (Webb és mtsai. 1994). A levelekből apró 2 mm széles levélszegmenseket vágunk le, amiket aztán 14 ml-es Falcon csövekbe (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, MA, USA) raktunk, csövenként 12 levéldarabot, négy különböző növényről. 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 hűtadást és az egyenletes hőmérsékletet (6. ábra).



6. ábra A Grant GP-200-R4 fagyasztó készülék (saját fotó).

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 kezelések (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 -on voltak fagyasztva, szintén 1 órán át. A további mellékletek fejezetben megtalálható a készülék részletes program táblázata (M2. 1. táblázat). A fagyasztásokat követően a mintákat kivettük a fagyasztókészülékből, és minden egyes mintához 8ml MQ vizet adtunk. A mintákat következő lépésben két órán át ráztattuk, majd erre külön készített konduktométerrel (Mikro KKT, Magyarország) mértük az így kapott oldatok vezetőképességét. A szövetekből kiáramló ionok mennyiségének függvényében más és más eredményt kapunk, ami esetünkben képes megmutatni, hogy a szövetek mennyire sérültek. Ehhez természetesen és a relatív konduktancia megállapításához, szükségünk volt egyáltalán nem fagyasztott, csak két órán át MQ vízben rázatott kontroll mintákra, valamint rögtön folyékony N_2 -ben szétroncsolt, majd szintén rázatott „totál károsított” mintákra is. 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 ismételtsben vizsgáltuk.

7.4. A génexpressziós vizsgálatok (qPCR) kivitelezése

A kezelések első és utolsó időpontjában a fény bekapcsolását követő 6-8 órában (ZT6-ZT8) 50 mg tömegű levélmintákat gyűjtöttünk. Ezekből a 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. Erre a cDNS könyvtárak elkészítése érdekében volt szükség. 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 primerek információit az első táblázat foglalja magába (1. táblázat).

A primer szekvenciák és referenciáik				
Rövidítések	Gének	Forward szekvenciák 5'-3'	Reverse szekvenciák 5'-3'	Reference
<i>HvCYCLO</i>	<i>Ciklophilin</i>	CCTGTCGTGTCGTCGGTCTAAA	ACGCAGATCCAGCAGCCTAAAG	Burton et al., 2004
<i>HvCBF14</i>	<i>C-repeat binding factor 14</i>	GTTGAATGAGCACTGGTTTGG	ACAATGAACGAGCAGGTATGG	Morran et al., 2011
<i>HvCor14b</i>	<i>cold-regulated gene cor14b</i>	TTGAGGATGTGAGCAAATGAG	TACATCGTCAATGACGAGACC	
<i>HvDHN5</i>	<i>dehidrin 5</i>	TGGCGAAGTTCCACCGTATGC	ACGAAAACGTGTGCCACACTG	
<i>NCED1</i>	<i>9-cis-epoxikarotenoid dioxigenáz</i>	CTCTCCTACATCTCGCCTGC	CCTTCTGTAGCTGGGGTTCG	saját tervezés
<i>CKX9</i>	<i>citokinin oxidáz/dehidrogenáz 9</i>	TGATCTCTTCCGTGCTGCTC	CGATCCTGGCCCGAGTAATG	saját tervezés
<i>AO2</i>	<i>aldehid oxidáz 2</i>	CGCTCTCTCGTTTCGACATCA	GGAGCCCGCATTACTGACTT	saját tervezés
<i>SDR2</i>	<i>rövid láncú dehidrogenáz 2</i>	GCCATCTCGCCCACTACATCC	CGGCGCCCTCCATCTCGT	Seiler et al., 2011
<i>PAL</i>	<i>L-fenilalanin ammónia-liáz</i>	TGCTCGTCCGTGTCAATACC	CGTTGGCGTTGAGAAGTGTG	saját tervezés
<i>LOX</i>	<i>lipoxigenáz</i>	GAAGGTGGAGGTCAAGGAGC	CCCCGACTTGTGCTCTTCT	saját tervezés
<i>CoAA</i>	<i>acetyl-CoA acetyl transzferáz</i>	ATTGTTGTGGCAGGTGGGAT	CAACGAGGCTGTCATGTCC	saját tervezés
<i>ZEP1</i>	<i>zeaxantin epoxidáz</i>	GCGAGAGGCGGGGGAGAAGT	TGGTGACAAGGGGTGGCTGAAG	Seiler et al., 2011
<i>YUCCA5</i>	<i>indol-3-piruvát monooxygenáz 5</i>	GCAGCAGACAACAACAGCAA	CTTTTGCTTTGGTGGCTGCT	saját tervezés

1. Táblázat A kísérletekben felhasznált primerek információi

Minden primerpár esetben megvizsgáltuk a termékek olvadási görbáját, amely megerősíti egy géntermék amplifikációját. A relatív expressziós szinteket $\Delta\Delta Ct$ módszerrel (Livak és Schmittgen 2001) számítottuk ki, ahol referenciagénként (Housekeeping gene) pedig a ciklophilint használtuk fel. A $\Delta\Delta Ct$ módszerrel történő számolás során szükség van abszolút referencia (CT) értékekre, melyekhez az összes többi értéket viszonyítjuk. Ennek a módszernek köszönhetően a kifejeződési értékek összehasonlíthatóak az egyes gének és a kezelések között is. A számolás menete a következőképpen történik.

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{cyclo}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{kezelt(W+FR)} - \Delta Ct_{kontrol(W)}) \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

A kísérletek során minden egyes primert úgy terveztünk meg, hogy azok olvadási hőmérséklete megegyező legyen. Ennek köszönhetően a teljes génexpressziós vizsgálatokhoz elég volt egyetlen egy program minden gén transzkripció szintjének megállapításához. Ez a qPCR program pedig a következőképpen került kialakításra.

<i>A qPCR program</i>			
Lépések	Idő	Hőmérséklet	
Kezdeti denaturáció	3:00	95°C	
Denaturáció	0:05	95°C	40 ciklus
Elongáció	0:30	60°C	
Fluoreszcencia-jeldetektálás			
Az olvadási görbék felvétele	0:05/ciklus	65°C - 95°C	0.5°C/ ciklus

7.5. 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 sztenderdek (10 pmol / minta) adtuk hozzá az így kapott növényi mintákhoz: ¹³C₆-IAA, ²H₂-OxIAA (Cambridge Isotope Laboratories); ²H₄-SA (Sigma-Aldrich); ²H₃-PA, ²H₃-DPA, ²H₄-⁷OH-ABA, ²H₅-ABA-GE (ABA-glucosyl ester) (NRC-PBI), ²H₆-ABA, ²H₅-JA, ²H₅-transZ, ²H₅-transZR, ²H₅-transZ7G, ²H₅-transZ9G, ²H₅-transZOG, ²H₅-transZROG, ²H₅-transZRMP, ²H₃-DHz, ²H₃-DHzR, ²H₃-DZRMP, ²H₇-DZOG, ²H₃-DHz9G, ²H₇-DZOG, ²H₆-iP, ²H₆-iPR, ²H₆-iP7G, ²H₆-iP9G, ²H₆-iPRMP (Olchemim). 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 NH₄OH-t tartalmazó 60%-os metanolban eluáltuk, amely így csak a CK-ket tartalmazta. A hormonmetabolitokat HPLC (Ultimate 3000, Dionex) alkalmazásával analizáltuk, hibrid hármas kvadrupol/lineáris ioncsapda tömegspektrométerrel összekapcsolva (3200 Q TRAP, Applied Biosystems). A hormonok mennyiségi meghatározását izotóphígítási módszerrel, többszintű kalibrációs görbékkel végeztük (R² > 0,99). Az adatfeldolgozást az Analyst 1.5 szoftverrel (Applied Biosystems) végeztük. Az analízis a kísérlet három biológiai ismétlését tartalmazta. A hormonok analízisét Prágában Prof. Radomira Vankova laboratóriumában (Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Laboratory of Hormonal Regulations in Plants) végezték el.

7.6. Az RNA-seq analízis

Az RNA szekvenálás Olaszországban Prof. Luigi Cattivelli laboratóriumában készült el a CREA Agrárkutatói és Gazdasági Tanács intézetében (CREA Council for Agricultural Research and Economics, Fiorenzuola d'Arda, Olaszország). A tőlük kapott nyers adatokat később mi magunk dolgoztuk fel.

7.6.1. A leolvasások és a bioinformatikai adatok feldolgozása

A szekvenálásból kapott nyers adatokban a rossz minőségű leolvasásokat és szennyeződések a fastQC 11.1 alkalmazáson keresztül kerestük (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Először az eredeti 125 nucleotid (nt) hosszúságú leolvasásokat 80 nt-re vágtuk (trimmeltük), hogy kizárjuk a gyenge minőségű részeket, amik az olvasatok 3'-én jelentkeztek. Ezzel párhuzosan a primer és adapter szekvenciákat Cutadapt program segítségével tisztítottuk (Martin 2011). A szennyeződésektől mentes, szűrt read-eket Bowtie2 (Langmead és Salzberg 2012) és Tophat2 (Kim és mtsai. 2013) segítségével térképeztük fel az árpa genomjára (*Hordeum vulgare* Hv_IBSC_PGSC_v1). Az intronok minimális és maximális hosszát 40, illetve 50000 bp-t hosszúságúra állítottuk be. A HTSeq program 0.6.1p1 verzióját (Anders és mtsai. 2015) egyvégű és „unió” módban használtuk, így gyűjtve össze az összes olvasási számot a BAM illesztési fájljából. Az adatfeldolgozás végére a biológiai replikátumok magas korrelációs együtthatót mutattak (A biológiai replikátumok között a Pearson-féle korrelációs együtthatók mindig nagyobbak voltak, mint 0,95). A differenciáltan expresszált géneket (DEG-ek) a Bioconductor DESeq2 1.8-as verziójú csomag segítségével (Love és mtsai. 2014) kerestük meg, ahol paraméteres illesztéssel, a betaPrior paramétert hamisra állítva, és az FDR küszöbértékét (Benjamini-Hochberg hamis felderítési arány) 0,05-re állítva dolgoztunk.

7.6.2. A kapott eredmények annotálása

Az árpa referenciagenomját, cDNS- és peptidszekvenciáinak adatbázisát az IPK-Gatersleben szerveréről töltöttük le az annotálás megkezdéséhez (https://webblast.ipk-gatersleben.de/barley_ibsc/downloads/). A differenciáltan expresszált gének (DEG-ek) funkcionális annotációját több adatbázis felhasználásával végeztük. A génontológiai információkat az Universal Protein Resource (<ftp://ftp.uniprot.org>; UniProt release 2019_11) adatbázisból nyertük ki, majd a kapott fehérjegyűjteményeket ezt követően a Hidden Markov Model (HMM) alapú HMMER 3.0 szoftvercsomaggal (<http://eddylab.org/software/hmmer/>) (Eddy 2009) vizsgáltuk a Pfam 32.0 program segítségével (<ftp://ftp.ebi.ac.uk>) (El-Gebali és mtsai.

2019). Az árpa genomjának teljes szekvencia-adatbázisa ellenére a jelátviteli útvonalai és az egyes génszekvenciák információi még mindig hiányosak. Ezért az árpa gének vizsgálatához az árpához viszonylag hozzá közel álló *Brachypodium distachyon* növényfaj ortológ génjeit használtuk fel a KEGG útvonalak elemzéséhez (https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?org=T01717).

7.7. Az eredmények statisztikai kiértékelése

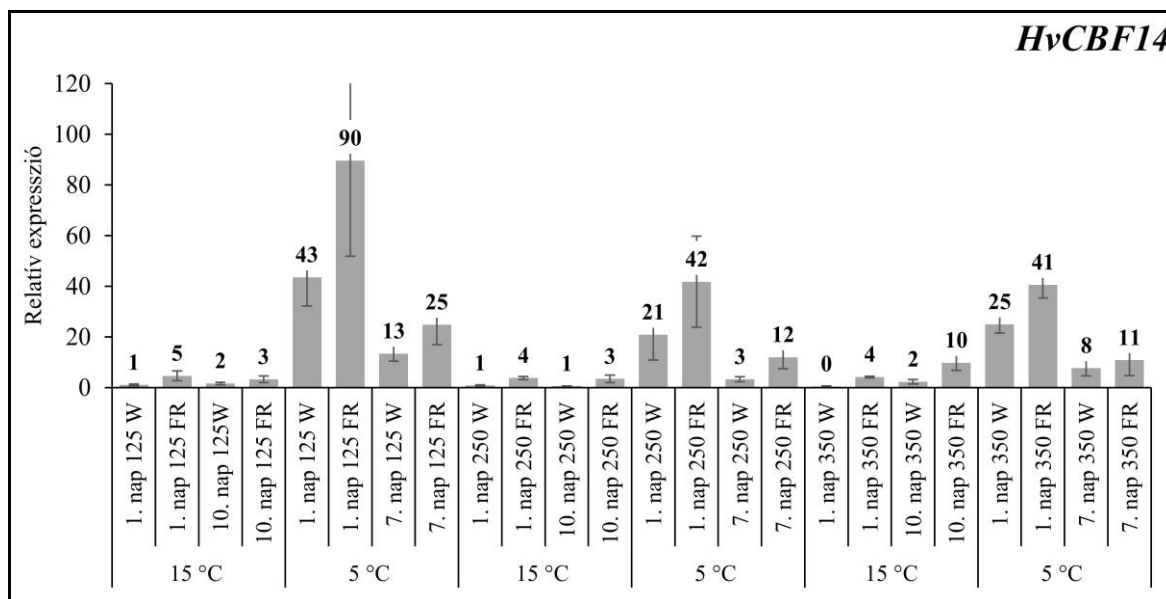
Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 16.0 verziójú statisztikai programcsomag (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.) segítségével végeztük el. A szórások egyezését Levene's tesztel ellenőriztük, majd az adatok normalitás vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov próbával 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.

8. EREDMÉNYEK

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

8.1.1. A *HvCBF14* gén és a *HvCOR14b* célgénjének transzkripció változásai

A $\Delta\Delta C_t$ módszerrel történő expressziós vizsgálatokban belső kontrollként minden esetben a 15 °C-on, kizárólag fehér fényen (W) és a legalacsonyabb fényintenzitáson nevelt növényeket használtuk (7. ábra). A FR fénykiegészítés alacsony fényintenzitás mellett ($125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ötszörös transzkripció 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 W 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 transzkripció 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.

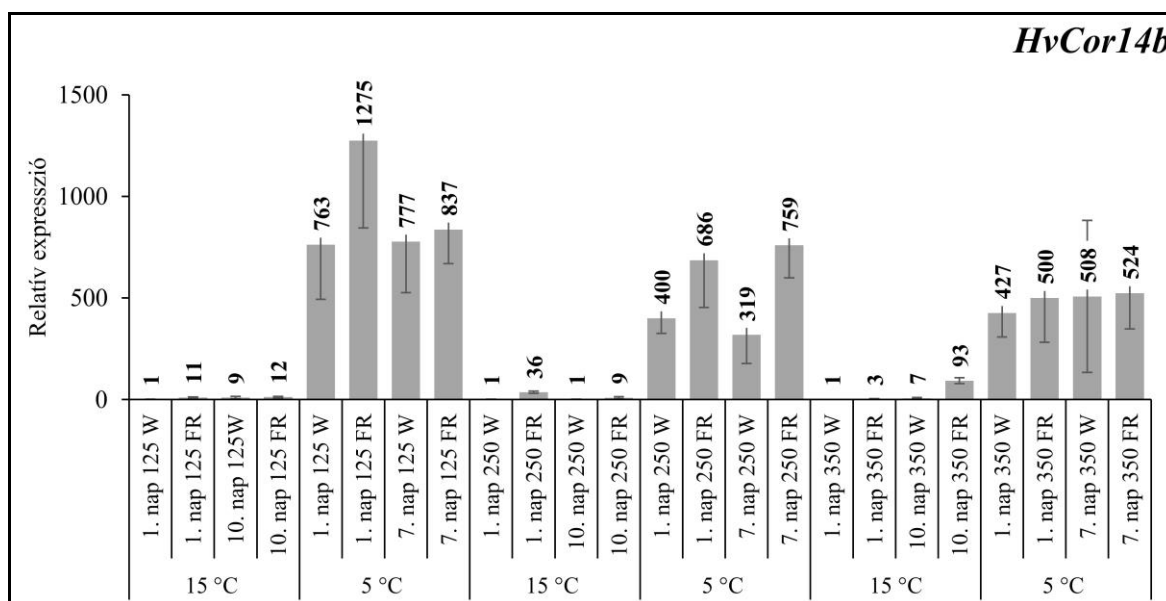


7. ábra A *HvCBF14* gén relatív expressziós mintázata változó intenzitású fehér fény és FR megvilágítással kiegészített spektrum esetében normál és alacsony hőmérséklet mellett. A vizsgált növényeket 12 órás fotoperióduson neveltük, ahol a mintákat a megvilágítás megkezdése után 6-8 órával vettük. Az X tengely mutatja a kezelések fázisait. A transzkripciós szinteket $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számoltuk ki. Az adatok és a hibasávok, amelyek a szórást képviselik, három biológiai ismétlésből származnak, három technikai mintával.

A *HvCOR14b* gén esetében az előzővel megegyező procedúrát végeztük el, melynek összesített eredményét a 8. ábra mutatja be. 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 kitartott egészen a 10. napig, ám itt a W mintákban is már emelkedett a *HvCOR14b* gén transzkripciós 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 hidegedződés korai indukálásában. Az 5 °C-os kezelés utolsó, hetedik napjára viszont már a kontrol 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

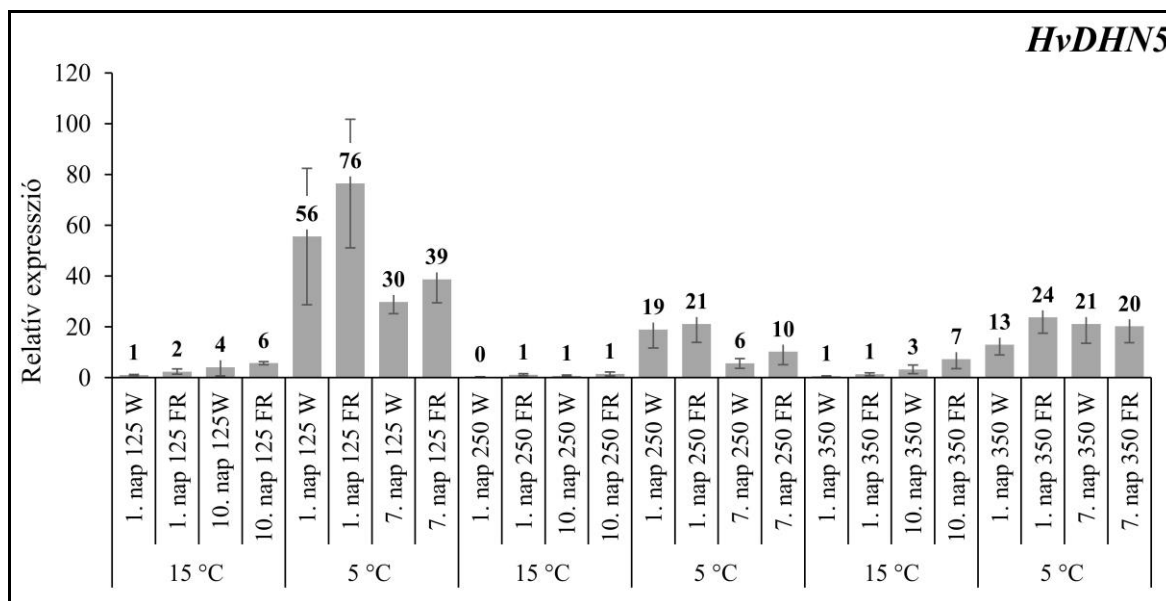
kontroll mintákhoz képest. Az 5 °C -os hőmérsékleten mind a kezelés első és utolsó napján kétszeres különbséget mértünk a fénykezelések között, a gén kifejeződésének jelentős növekedése mellett. Magas fényintenzitás mellett mRNS szintváltozás nem volt kimutatható a W és az változott R/FR arány függvényében 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.



8. ábra A *HvCor14b* gén relatív expressziós mintázata változó intenzitású fehér fény és FR megvilágítással kiegészített spektrum esetében normál és alacsony hőmérséklet mellett. A vizsgálati körülmények megegyeznek a 7. ábrán bemutatottakkal.

8.1.2. A *HvDHN5* gén expressziós szintjei

A *HvDHN5* gén expressziós változásait továbbra is az eddig leírtak alapján mutatjuk be (9. ábra). 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 kontroll 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. Természetesen az alacsonyabb hőmérsékletről (5 °C) származó mintákban a génexpresszió szintje tartósan magasabb volt.



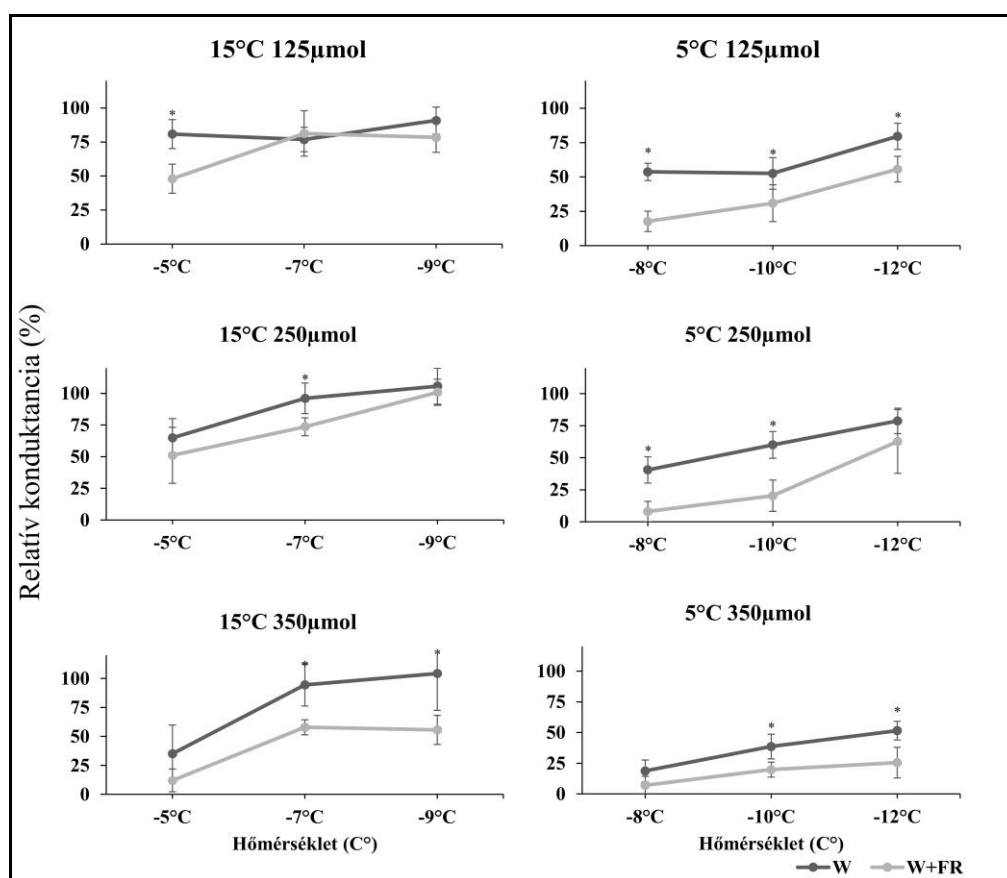
9. ábra A HvDHN5 gén relatív expressziós mintázata változó intenzitású fehér fény és FR megvilágítással kiegészített spektrum esetében, normál és alacsony hőmérséklet mellett. A vizsgálati körülmények megegyeznek a 7. ábrán bemutatottakkal.

8.1.3. A fagyasztási teszt eredményei

A modulált megvilágítás esetleges hatását a fagyűrésre fagyasztási tesztekkel ellenőriztük. A fagyűrést a különböző hőmérsékleteken fagyasztott levélszelvényekből kiáramló elektrolitok vezetőképességének mérésével határoztuk meg. Minél sérültebb a levél, annál több elektrolit áramlik ki belőle, következésképpen a vezetőképesség negatívan korrelál a fagyállósággal. A fagyteszteket tíznapos kezelés után hajtottuk végre a 15°C-on, és hétnapos kezeléseket után az 5°C-on nevelt növényekből származó mintákkal (10. ábra). Az összehasonlításokat közvetlen módon hajtottuk végre, vagyis a két fénykezelést egymással páronként hasonlítottuk össze minden fagyasztási hőmérsékleten.

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.

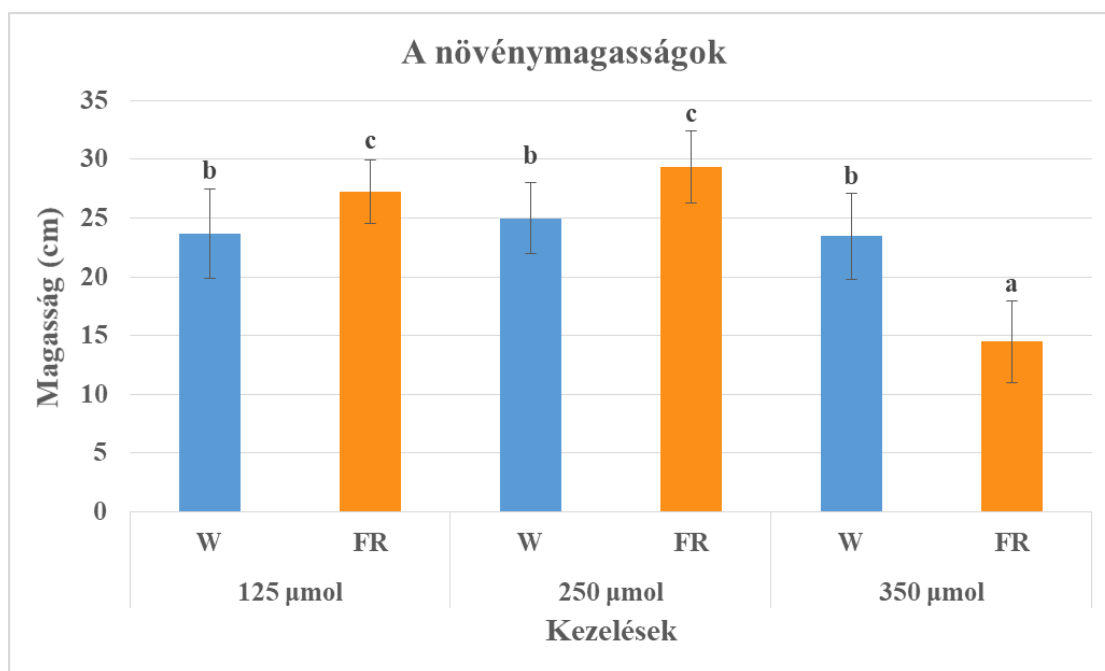
Ettől függetlenül itt már az összes fagyasztási hőmérsékletben szignifikáns különbséget mértünk a minták között. A megnövelt fényintenzitásnak ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) köszönhetően a távoli vörös fénnel kiegészített fehér fénnel történő megvilágítás még nagyobb mértékben csökkentette 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 termesztett társaiké.



10. ábra A kiegészítő FR fénykezelések hatása az árpa fagytoleranciájára különböző fényintenzitások mellett. Az X tengely a fagyasztási hőmérsékletét mutatja, míg az Y tengely a relatív vezetőképességi értékeket (a letalitás százalékban) mutatja. Mindegyik esetben a mintákat a kezelések utolsó napján gyűjtöttük össze. A 15°C -os eredmények esetében ez a 10. napot jelenti, míg az 5°C -nál a 7. napot. Az adatok és a hibaszávok, amelyek a szórást képviselik, öt biológiai ismétlésből származnak.

8.1.4. A növények magassága a kísérlet végeztével

A kísérlet végeztével minden egyes zónában lemértük a növények magasságát, mert azok között szemmel látható volt a magasságbeli különbség (11. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy az árpa növények magassága intenzitástól teljesen függetlenül alakult fehér fény esetében. Az FR kezelés viszont alacsony és normál fényintenzitásokon szignifikánsan emelte a növények magasságát a kontrol fehér fényen nevelt növényekhez képest. Ezt a fenotipikus változást FR hatásra már több növényfajban is bizonyították. A mi esetünkben az FR indukálta megnyúlás ~4cm-t jelentett. Ami viszont igazán érdekes a kapott eredmények alapján, az a magas ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fényintenzitás alatt növekedő növények eredményéből adódik. Itt az FR kezelés a többi eredményünkhöz, valamint az eddig publikált adatokhoz képest ellentétes hatást váltott ki. A növények magassága itt oly mértékben lecsökkent, hogy még a fehér fényben nevelt kontroll növényekhez képest is szignifikáns csökkenés következett be. Az FR kezelt többi fényintenzitáshoz képest ~14 cm-rel, de még a W kontrol növényekhez képest is ~10cm-rel voltak alacsonyabbak a növényeink.



11. ábra A növénymagasságok alakulása a kísérlet végeztével (35. nap). A kísérletben felhasznált növények magasságának adatait 25-25 növény méretének átlagával határoztuk meg. **W:** fehér fény **FR:** távoli vörös kiegészítés. Az oszlopok közötti szignifikáns különbségeket Tukey's-b teszttel határoztuk meg, ahol a különböző betűk $P < 0,05$ valószínűségi szinten mért szignifikáns különbségeket jelölnek.

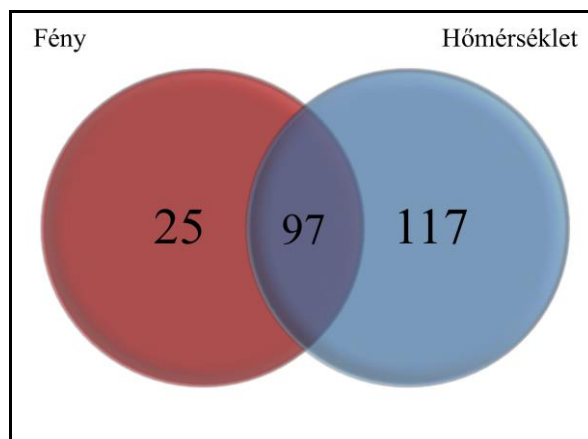
8.2. Az árpalevelek hormonösszetétel-változásainak vizsgálata normál és alacsony hőmérsékleten, távoli vörös fényben történő kezelés előtti és utáni hidegstressz esetében. (2. kísérlet)

Ennek a kísérleti rendszernek emlékeztetése érdekében röviden összefoglalva az alábbiakat érdemes megjegyezni. Itt a fehér fény szolgáltatott 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ fényintenzitást a növények felett (kontroll), amelyeket egyéb intenzitásokon már nem vizsgáltunk. A másik zónában a fehér fényt távoli vörös fénnel egészítettük ki, amelyet első kísérlethez hasonlóan itt is 750 nm-es LED-del (Edison Edixeon, 2ER101FX00000001) valósítottunk meg. A különbséget fentiekben már részletezett kísérletben az szolgáltatatta, hogy három különböző kezelési változatra bontottuk. A kísérletben elvégzett kezelések változatai (lásd 5. ábra):

- **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 négyleveles fejlettségi stádiumot (Zadoks és Board 1999).
- **FR-M/FR-C(28):** Az első kezelésből 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.

8.2.1. A különböző módon expresszált gének elemzése az RNS-szekvenálást követően

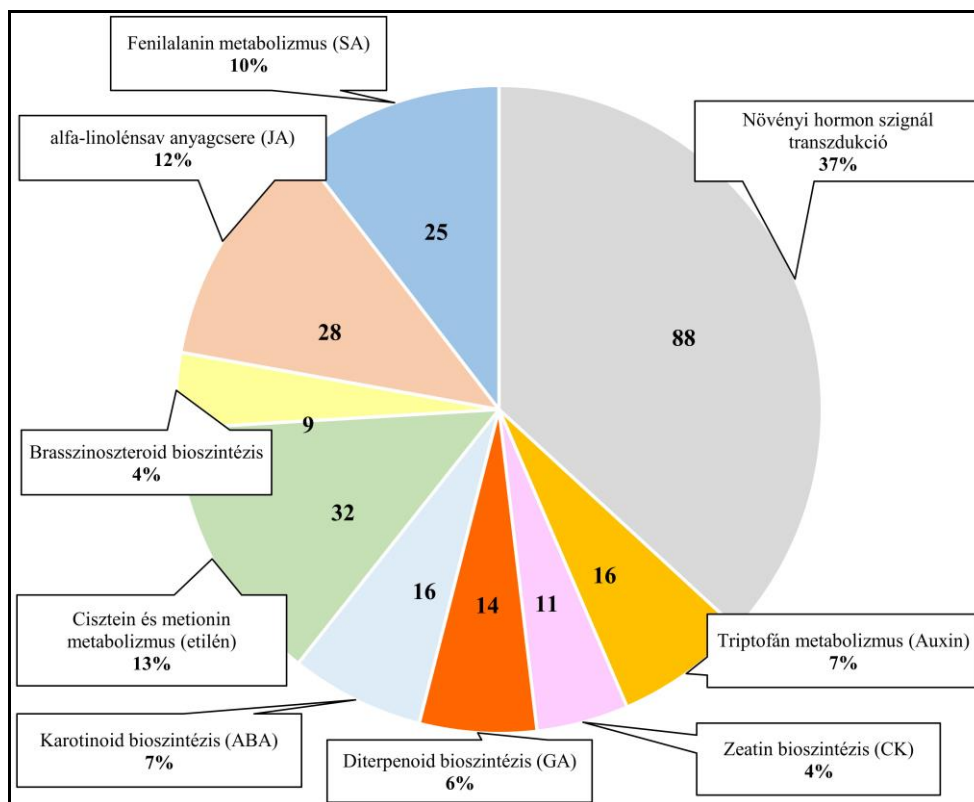
Az RNAseq elemzés összesen 562 db, a növényi hormonok szignáltranszdukciós útvonalához tartozó differenciálisan expresszált gént (DEG) tárt fel. Ezek közül 239 gén volt, amelyeknél legalább kétszeres növekedést vagy legalább felére csökkenő változás volt mérhető a kontroll és a kezelt minták összehasonlításakor. Ezt a 239 gént vettük végül számításba az eredmények bemutatásához. E 239 génből összesen csak 25 gén reagált kizárólag az FR fénnel történt kiegészítés hatására, míg a 117 gén expresszióját a hőmérséklet 15 °C-ról 5 °C-ra történő csökkenésének eredményeként értelmezhetjük. A fennmaradó 97 gént mind a két abiotikus faktor befolyásolta (12. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen jelzik, hogy a hőmérséklet nagyobb hatással volt a transzkriptóm változásaira, mint a fény modulálása a növényi hormon szignáltranszdukció esetén, de együttes hatásuk majdnem ugyanolyan nagy hatással volt a növényekre, mint szimplán csak az alacsony hőmérséklet.



12. ábra A fény alacsony R/FR arányára és az alacsony (5 °C) hőmérsékletre adott válaszként eltérő módon expresszált gének összefoglalása az RNAseq eredménye alapján.

Az RNAseq-ből nyert adatok ellenőrzése és hitelessége érdekében az eredményeket qPCR segítségével validáltuk. Az RNAseq és a qPCR összehasonlítása után egy viszonylag erős ($R^2=0,708$) korrelációt találtunk az expressziós értékek között (M2. 3. ábra), ami azt jelentette, hogy az adatok használhatók és érvényesnek tekinthetők. A validáláshoz összesen tizenegy qPCR-ből származó expressziós értéket használtunk. A kiválasztott gének a következők voltak: *ERF038-like* (etilénre reagáló transzkripció faktorhoz hasonló gén), *CBF9* és a *CBF14* (C-repeat/DRE-Binding Factor 9, 14), *PLD α 3* (phospholipase D alpha 3), *CES1* (alkaline phytoceramidase), az *ALDH* (aldehyde dehydrogenase), a *CKX9* (cytokinin dehydrogenase 9), a *COAA* (acetyl-CoA acetyltransferase), a *YUCCA5* (indole-3-pyruvate monooxygenase), az *NCED1* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1) és *AO2* (aldehyde oxidase 2).

A gének annotálását követően 9 fitohormonnokkal kapcsolatos funkcionális csoportot azonosítottunk a KEGG útvonal adatbázisában. Ezek a csoportok a növényi hormon szignáltranszdukció (bdi04075), a triptofán metabolizmus (bdi00380), a zeatin bioszintézis (bdi00908), a diterpenoid bioszintézis (bdi00904), a karotinoid bioszintézis (bdi00906), a cisztein és metionin metabolizmus (bdi00270), a brassinoszteroid metabolizmus (bdi00905), az alfa-linolénsav metabolizmus (bdi00592) és a fenilalanin metabolizmus (bdi00360). A felsorolt jelátviteli utakból a növényi hormon szignál transzdukciós csoport 88 gént tartalmazott, amelyek az összes annotált génnek mintegy 37%-át tették ki. A többi útvonal génei hasonló eloszlást mutatottak az egyes csoportok között (13. ábra).



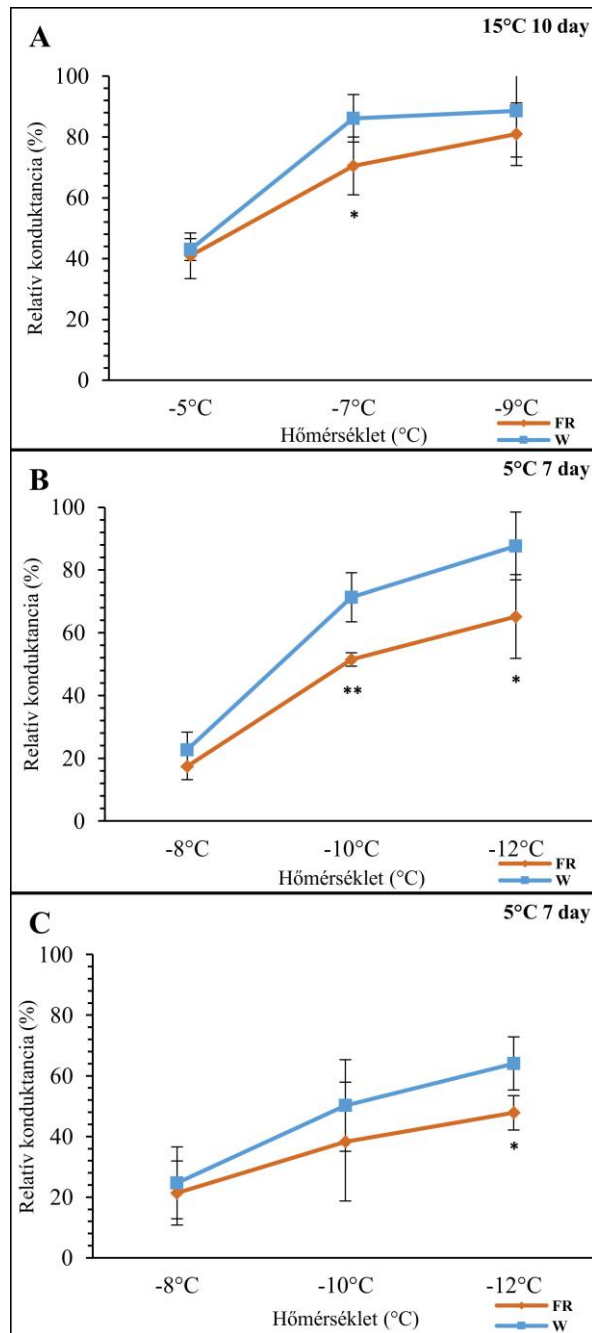
13. ábra A kontroll fehér és a távoli vörös fény kiegészítés hatására különbözőképpen expresszált gének csoportosítása 9 funkcionális csoportban a KEGG adatbázis útvonalak alapján. A 9 csoport a növényi hormon szignál transzdukció, triptofán metabolizmus (auxin), zeatin bioszintézis (CK), diterpenoid bioszintézis (GA), karotinoid bioszintézis (ABA), cisztein és metionin metabolizmus (etilén), brassinoszteroid bioszintézis, alfa-linolénsav anyagcsere (JA), és a fenilalanin metabolizmus (SA) csoport.

8.2.2 Az alacsony R/FR arányú fény hatása a növények fagyűrésre

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 hatása, milyen módon befolyásolja az árpa fagyűrését. A kiegészítő FR fénnel 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. Az elektrolitok kiszivárgásából számított relatív vezetőképességek alapján elmondhatjuk, hogy az FR fénykiegészítés pozitív hatást gyakorolt az egyedek stressz elleni toleranciájára (14. ábra). A három különböző kezelést a 14. ábra három részre tagolva mutatja be.

Az első kezelési vátozatban 15 °C-os hőmérséklet mellett az FR hatás csak -7 °C-os fagyási hőmérsékleten eredményezett szignifikáns különbséget a kontroll W mintákhoz képest. A kontroll és az FR kezelt minták közötti figyelemre méltó fagyűrési javulást a második kezelés során figyeltük meg. A hosszantartó alacsony R/FR expozíció (FR-M/FR-C(18)) feltételezett FR edződést jelent a növényeknek, amelyek az alacsony hőmérsékletet ezáltal jobban elviselték. Itt a jelentős különbségeket -10 °C-on, valamint -12 °C-on mértük. A harmadik kezelésben egyetlen ponton mértünk szignifikáns különbséget, azonban ez a különbség a legalacsonyabb -12 °C-os fagyasztáson történt.

Az eredmények összehasonlításából jól kitűnik, hogy növényi sejtek membrán károsodása sokkal kisebb volt a növények alacsony hőmérsékletéhez (5 °C) történő alkalmazkodása után, mint a 15 °C-on termesztett növényeknél (14. ábra A), ami teljesen független volt a fény minőségétől (14. ábra B és C). A fiatalabb növények kezelése esetén (FR-C(18)) további javulás volt megfigyelhető mind a kontroll mintákban, mind pedig az FR fénykiegészítés mellett, de a fény modulálása tovább fokozta azok fagyűrését (14. ábra C). 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.



14. ábra A kiegészítő FR kezelések hatása az árpa fagytűrésére a három kezelési elrendezésben. Az X tengely a fagyasztási hőmérsékletét mutatja, míg az Y tengely a relatív vezetőképességi értékek (a letalitás százalékban) mutatja. Mindegyik esetben a mintákat a kezelések utolsó napján gyűjtöttük össze. A 15 ° C-os eredmények esetében ez a 10. napot, míg az 5 ° C-nál a 7. napot jelenti. A (FR-M): A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 ° C-on. B (FR-M/FR-C(28)): 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. C (FR-C(18)): 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. W - fehér fény; FR – távoli vörös fénnel kiegészített fehér fény. Az adatok és a hibásávok, amelyek a szórást képviselik, öt biológiai ismételtségből származnak. A kontroll és a kezelt minták közötti különbség szignifikanciáját * $P < 0,05$ és ** $P < 0,01$ jelöli kétmintás t-próbával teszteltük.

8.2.3. Növényi hormonszint-változások a különböző kezelések során

Mivel a növényi hormonok intenzíven szabályozzák a növények hideg-akklimatizálódását, a kísérletek kiemelt fontosságú része volt a hormonok mennyiségi meghatározása a három különböző kezelésben. Az FR hatását különböző hőmérsékleteken, időszakokban, valamint a növények különböző életkoránál használt kezelésekben is összehasonlítottuk. A vizsgált hormonszintekben jelentős különbségeket figyeltünk meg minden kezelési variánsban, sőt azok egymástól is sok esetben elértek (15-16. Ábra; M2. 2. táblázat). Az eredmények részletezésekor elsősorban öt hormont mutatunk be, nevezetesen az ABA, JA, SA, IAA és CK-k hormon eredményeket, mivel itt voltak szignifikáns különbségek.

Az első kísérletben a 15 °C-on végzett FR-kezelés pár óra elteltével már majdnem megduplázta a teljes ABA-tartalmat a vizsgált növényi mintákban (15. ábra A), amely különbség a kísérlet végéig (10. nap) is teljesen stabil maradt. Ahogy az várható volt, a hidegkezeléstől (FR-M/FR-C(18) 5 °C) számított néhány óra elteltével jelentősen ($P < 0,05$) 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 pedig csökkenő tendenciákat mutatott mind a kontroll fehér, mind az FR-vel kezelt mintákban (15. ábra A).

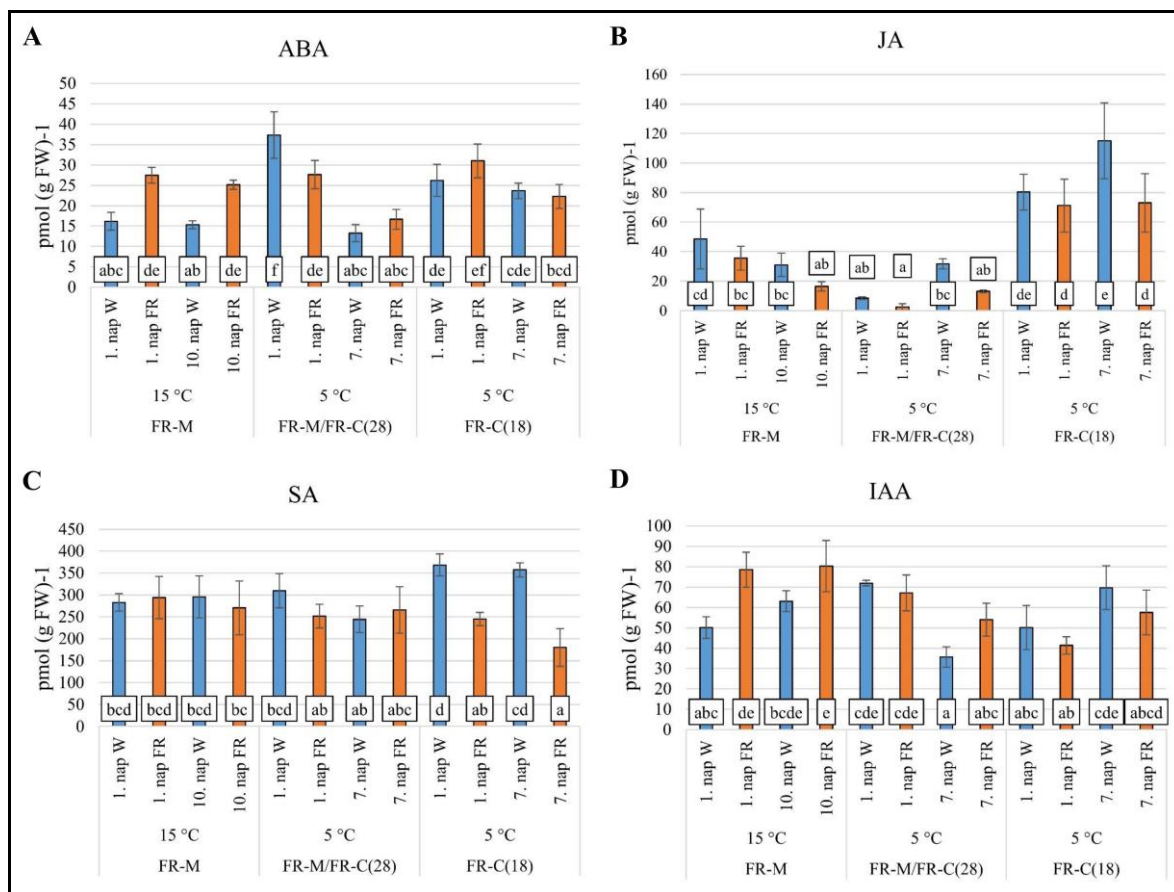
A harmadik kezelés során (FR-C(18)) az előző kísérleteknél fiatalabb, tizennyolc napos növények (másodiknál 28 nap) kaptak hidegkezelést (5 °C). További különbség volt, hogy a harmadik kísérleti változat esetében az FR-kezelés a hőmérséklet-eltolódással azonos időben kezdődött. Mind a kontroll, mind 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. Érdekes módon a megnövekedett ABA-tartalom a hétnapos hideg kezelés után részben megmaradt mind a fehér fény, mind az FR kezelt mintákban, de ez a hormonszint magyarázható az aktivált védelmi szint fenntartásával a fiatalabb növényekben.

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. (15. Ábra B). 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 függetlenül; viszont annak végére fehér fényben még tovább emelkedett. A modulált fényben ez a hatás nem volt tapasztalható, itt a növények csak fenntartották hidegkezelés után elért mennyiségeket.

Az FR-M kezelés során sem az FR, sem a hideg kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az SA tartalmat (15. ábra C). 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 (15. ábra D) majdnem kétszeresére növelte az FR kezelés 15 °C-on, és ez a növekedés a tizedik nap végére is megmaradt. Ez a jelenség nagy valószínűséggel az árnyékkerülés-szindrómához kapcsolódik, amelyet az alacsony R/FR arányú beeső fehér fény okozott. 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 alul-reguláltság következett be az FR-kezelt növényekben. Azonban hét nap elteltével mérsékelt IAA emelkedés volt tapasztalható, a fény spektrumától függetlenül.

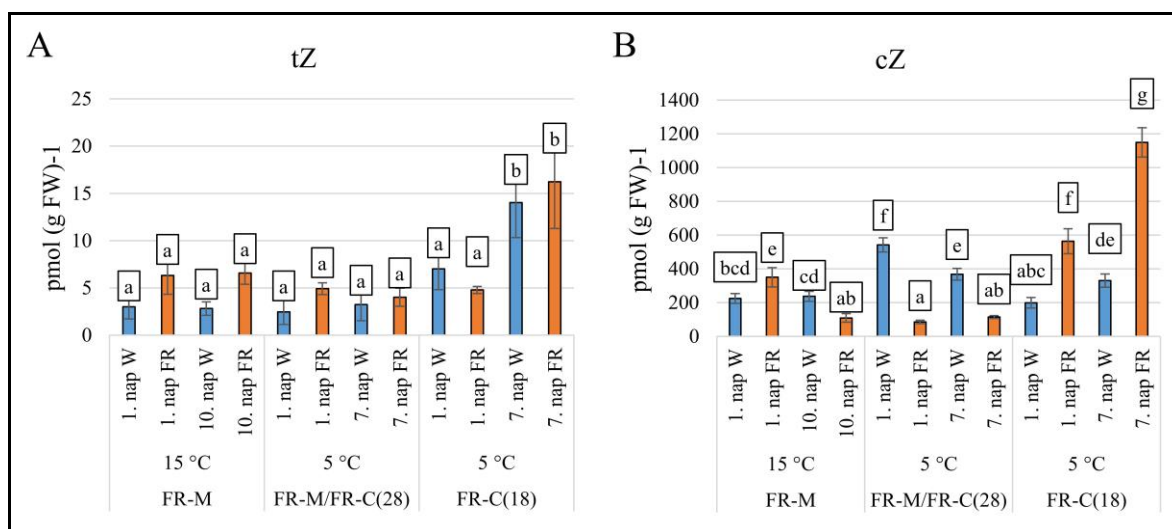


15. ábra Az FR kezelés és a mérsékelt vagy alacsony hőmérséklet hatása a hormonkoncentráció mennyiségére az egyes kezelések első és utolsó napjain. **A:** ABA, abszizinsav; **B:** JA, jázmonsav; **C:** SA, szalicilsav; **D:** IAA, indol-3-ecetsav A vizsgálathoz felhasznált levélmintákat a megvilágítás megkezdése után 6-8 órával gyűjtöttük, míg a növények 12 órás fotoperiódus alatt nőttek. **FR-M:** A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 °C-on. (A kezelés első napja: 1. nap; A kezelés utolsó napja: 10. nap) **FR-M/FR-C(28):** 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. (A kezelés első napja: 1. nap; A kezelés utolsó napja: 7. nap) **FR-C(18):** 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. (A kezelés első napja: 1. nap; A kezelés utolsó napja: 7. nap) W - fehér fény; FR – távoli vörös fénnel kiegészített fehér fény. Az átlag és a szórás értékeit három biológiai ismétlésből számoltuk. Az oszlopok közötti szignifikáns különbségeket Tukey's-b teszttel határoztuk meg ($P < 0,05$).

Az aktív citokininek közül a transz-zeatin (tZ), a dihidrozeatin (DHZ) és az izopentenilád-kilenc (iP) szintje alacsony jóval alacsonyabb volt a cisz-zeatin (cZ) szintjével összehasonlítva. Eredményeink bemutatása során csak a fiziológiailag legaktívabb CK-t, a transz-zeatint és az stresszválaszokkal szorosan összekapcsolható cisz-zeatin mutatjuk be (16. ábra). Az első kezelésben (FR-M) az FR mérsékeltén fokozta a tZ mennyiségi előfordulását 15 °C-on a kezelés korai szakaszában, de ez változás a 10. nap elteltével is megmaradt. (16. ábra A). A hidegstressz

(FR-M/FR-C(18)) átmeneti tZ csökkenést eredményezett a kontroll W mintákban, de a FR kiegészítésnek köszönhetően a növények alacsony hőmérsékleten magasabb tZ szintet tudtak fenntartani. A kezelés végén enyhe tZ emelkedés volt megfigyelhető a fehér fénynek kitett növényekkel összehasonlítva. Az FR és a hideg kombinációjának együttes alkalmazása (FR-C(18)) sem volt jelentős hatással a harmadik kezelés első napján; azonban a 7. nap elteltével szignifikáns emelkedést találtunk, de a fénykezelésektől 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 (16. ábra B) 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. Ez a különbség a 7. nap végére még tovább emelkedett.



16. ábra Az FR kezelés és a mérsékelt vagy alacsony hőmérséklet hatása az aktív citokinin koncentrációkra. **A:** tZ, transz-zeatin; **B:** cZ, cisz-zeatin. A feltételek megegyeznek a 15. ábrán bemutatottakkal. **FR-M:** A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 °C-on. **FR-M/FR-C(28):** 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. **FR-C(18):** 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. W - fehér fény; FR – távoli vörös fényvel kiegészített fehér fény. Az átlag és a szórás értékeit három biológiai ismétlésből számoltuk. Az oszlopok közötti jelentős különbségeket Tukey's-b teszttel határoztuk meg ($P < 0,05$).

8.2.4. A legfontosabb hormon-anyagcserével kapcsolatos gének expressziós mintázata

A kiválasztott hormon-metabolizmussal kapcsolatos gének expresszióját qPCR segítségével határoztuk meg. Az összes relatív expressziós értéket az első kezelés első napjával 15 °C-on (FR-M) hasonlítottuk össze. Az eredményeket egy hőtérkép foglalja össze amit a 17. ábra mutat be. A kezelések a transzkripciós szintek alapján külön csoportokat alkottak hierarchikus csoportosítás következtében, ami egyértelműen megmutatja az FR kezelések időzítésének fontosságát.

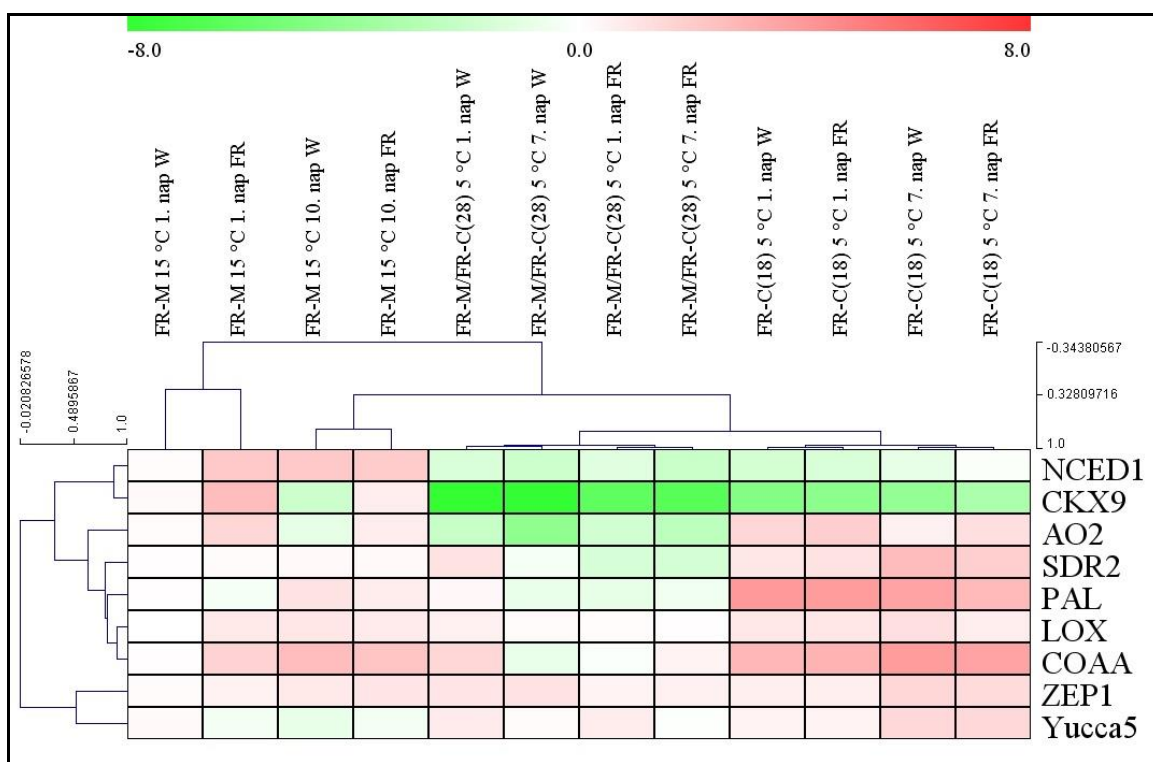
Az ABA esetében a *ZEPI*, *NCED1*, *SDR2* és *AO2* bioszintézis gének transzkripciós profilját vizsgáltuk meg. A *ZEPI* expressziója csak kismértékben változott az FR-M és az FR-M / FR-C(28)) kezelések során. Az FR-C(18) esetében, amikor a fiatalabb növényeket kombinált hatásnak tettük ki, a *ZEPI* transzkriptum szintje hét nap eltelte után emelkedett a fényminőségtől függetlenül. Az FR fény nagy pozitív hatását az *NCED1* expressziójára 15 °C-on detektáltuk. Alacsony hőmérsékleten az *NCED1* expresszió erősen le volt szabályozva, függetlenül a növény korától vagy a fény spektrumától. A másik két gén (*SDR2* és *AO2*) hasonlóan viselkedett, és nagyon közeli csoportot alkotott egymással. 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 tizennyolc napos növények hidegkezelése a fénykezelésétől abszolút függetlenül indukálta expressziójukat a harmadik kezelés során FR-C(18).

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 kezelésekben.

Általánosságban elmondható, hogy a nagyobb változások leginkább a fiatal növények a kombinált kezelésében (FR-C(18)) következtek be, amely jelenség alól egyedül a *CKX9* gén expressziós mintázata volt a kivételével. Ebben a kísérleti elrendezésben a kezelt növények nem szoktak hozzá az emelt FR fényhez, és még a háromlevelű fejlődési szakasz elején voltak. A fitohormon tartalomhoz hasonlóan itt mutattuk ki a legkifejezettebb kölcsönhatást az FR és a hideg kezelések között.



17. ábra A kiegészítő FR fény és az alacsony hőmérséklet hatása a növényi hormon-bioszintézisben szerepet játszó gének relatív expressziójára hőtésképen ábrázolva. A levélmintákat a megvilágítás megkezdése után 6-8 órával gyűjtöttük. A növényeket 12 órás fotoperiódus alatt növesztettük. A transzkripciós szinteket $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számoltuk ki. Az eredmények Log2 értékben vannak megadva. **FR-M:** A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 °C-on. **FR-M/FR-C (28):** 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. **FR-C(18):** 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. **W** - fehér fény; **FR** – távoli vörös fényvel kiegészített fehér fény. Az adatok három biológiai ismétlésből származnak. A hőtésképen kívüli X és Y tengelyek jelölései a hierarchikus klaszterezés utáni távolsági vagy közelségi adatokra vonatkoznak.

9. KÖVETKEZTETÉSEK

9.1. A *HvCBF14* transzkripciós faktor és célgénjeinek a *HvCOR14b* és *HvDHN5* expresziós mintázatai

Kutatócsoportunk korábbi munkáiban már beszámoltak arról, hogy a *HvCBF14* gén expressziós szintje nagymértékben megemelkedik 15 °C-on (sőt már nem induktív 22 °C-on is) a beeső fény alacsony R/FR arányának következtében. Azonban ez a jelenség alacsony 5 °C hőmérsékleten az akkori rendszerünkben már teljesen megszűnt (Novák és mtsai. 2016), hiszen a most a mi kísérletünkben a *HvCBF14* gén jóval nagyobb mértékben expresszált. Éppen ezért a jelen tanulmány (7. ábra) fényében felül kell vizsgálnunk az akkori eredményeket. A változás valószínűleg a használt fényforrások eltérése miatt következett be. 2016-ban Sylvania 215WF96T12 hideg lineáris „fehér” fénycsőveket használtunk LED-es fényforrások helyett. Az FR kiegészítést akkor, 3W-os nagyteljesítményű LED-ekkel adtuk hozzá, hogy alacsony R/FR arányt kapjunk a spektrumban. A fluoreszcens fénycsővekben a fény spektruma nem konzisztens, mert számos kiemelkedő kék csúcsot tartalmaz, amelyek zavarhatják a *HvCBF14* expresszióját ((Novák és mtsai. 2016), S1 ábra). A gabonafélékben nincs bizonyíték erre az elméletre, de az *Arabidopsis thaliana*-ban az *COR27* és az *COR28* géneket elnyomta a kék fény, ami negatívan szabályozta a CBF expresszióját (Li és mtsai. 2016).

Figyelembe véve a jelen kísérletet, jól látható, hogy a hideg akklimatizációs körülmények között, egy jól definiált, tiszta spektrummal (M2. 1. ábra) a távoli vörös fény még jobban stimulálja és fokozza az expresszió szinteket ennek a génnek esetében. Érdekes módon a legmagasabb *HvCBF14* transzkripciós szinteket a legkisebb fényintenzitás mellett mértük, ami arra utal, hogy a növények nagyobb stresszhatások érték (a fotoszintézishez nem optimális szint), és ezért jobban reagálnak (7. ábra). Figyelembe kell vennünk azt is, hogy a természetes környezetben a csökkent R/FR arány a naplementekor jelentkezik, és ekkor a szürkület kezdtével a fényintenzitás fokozatosan csökken. Következésképpen nyilvánvalónak tűnik, hogy nemcsak a spektrum, hanem a változó fényintenzitás is fontos abiotikus tényező, ami génszabályozást befolyásoló jel lehet a növények számára (Franklin és Whitelam 2007, Lindlőf 2010, Franklin és mtsai. 2014, Gierczik és mtsai. 2017).

Paradicsomban a monokromatikus vörös és távoli vörös fényt tesztelték a hidegtűrés fokozására. Megállapították, hogy monokromatikus vörös fény hatására a hidegtűrés csökkent, míg a távoli vörös fény pozitívan hatott a hidegtűrésre. A jelenség mögött található transzkripciós tényezőként a *CBF1* gént állapítottak meg. A *CBF1* transzkriptumszintjét a monokromatikus vörös

fény csökkentette, míg növekedést csak távoli vörös megvilágítással mellett sikerült mérni, de azt is csak hidegkezelés után (F. Wang és mtsai. 2016).

A *HvCOR14b* expressziós eredményeink, ahogy az várható volt, nagy hasonlóságot mutattak a *HvCBF14* mRNS szint változásával (7. és 8. ábra). Ezek az eredmények azt is bizonyították, hogy a COR gének szabályozását nemcsak a hideg befolyásolja, hanem a fényviszonyok is vezérlik, vagy legalábbis a *HvCOR14b*-t határozottan befolyásolja a fény. Kobayashi és mtsai. (2004) kimutatták, hogy a sötét környezet gátolja, míg a fény számos COR-gént, köztük a COR14 búzában történő expresszióját stimulálja (Kobayashi és mtsai. 2004). 15 °C-on ennek a génnek az expressziója fehér fény alatt is megnőtt, tíz napos fényintenzitás-módosítás után, ami egyértelműen korrelál Kobayashi és Vágújfalvi búzával kapcsolatos eredményeivel (Vágújfalvi és mtsai. 2000, Kobayashi és mtsai. 2004).

Kísérleteinkben az egyes intenzitásokban is óriási különbségek voltak megfigyelhetőek, de a távoli vörös kiegészítés hatására ez még tovább emelkedett. Korábbi publikációban már leírták, hogy a *HvCOR14b* expresszióját a fényminőség is meghatározta etiolált árpa növényekben. A vörös és a kék fény képes volt megemelni a gén transzkriptum szintjét, míg a távoli vörös és zöld fény egyáltalán nem befolyásolta azt (Crosatti és mtsai. 2003). Ennek ellenére eredményeink azt mutatták, hogy normál körülmények között a távoli vörös fény nagyon is befolyásoló tényező lehet a gén expressziójában. Alacsony ($125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és normál ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) intenzitás mellett az FR kezelés első napján jelentős változás következett be, míg nagy intenzitáson ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) az utolsó napon 15 °C-on hatalmas, kilencvenszoros növekedés volt tapasztalható. Ezzel szemben alacsony, 5 °C-os hőmérsékleten csak kis különbségek voltak kimutathatók a kezelt növények között. Ez azt jelenti, hogy nagy fényintenzitás mellett, alacsony hőmérsékleten volt egy küszöbérték a gén indukciójában, és azt az FR kiegészítés nem indukálta tovább, ellentétben más kezelésekkel. A legnagyobb génexpressziós változások alacsony fényintenzitáson történtek. Ez jól szemlélteti a fény intenzitásának és minőségének a *HvCOR14b* expresszióra gyakorolt speciális hatását.

A *HvDHN5* gén sokkal kevésbé reagált, mint a másik két gén, az FR-modulált spektrumok szempontjából (9. ábra). Csak az alacsony hőmérsékletnek volt a transzkriptum szintjére nyilvánvaló hatással. A hidegre történő érzékenységre számítottunk, mert több esetben bemutatták már, hogy ellenőrzött környezetben a *HvDHN5* felhalmozódását a hideg sok genotípusnál fokozta, továbbá a *HvDHN5* gént az árpában a fagyűrész markergénjének tekinthető (Kosová és mtsai. 2013). Érdekes módon a *HvDHN5* expressziója nem változott szignifikánsan az emelkedett

HvCBF14 szintek mellett. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy a *HvDHN5* gén a dehidrinek Kn osztályába tartozik, amelyek reagálnak a fagyra és a szárazságra, de a fény alapvetően nem szabályozza azok működést (Kosová és mtsai. 2008, 2013, Zolotarov és Strömvik 2015).

Jelen kísérletben azt is megfigyeltük, hogy a *HvDHN5* gén különböző fényintenzitások esetén sem reagál szignifikánsan eltérően. A különbségek hiánya azzal is magyarázható, hogy bár a DHN család tagjai gén-expressziójának napi ritmusa van (Cellier és mtsai. 2000), de a fotoperiódusok mellett a hőmérséklet az, ami szignifikánsan befolyásolja az expressziójukat. Hasonlót tapasztaltak a *BpuDhn1* és *BpuDhn2* gének esetében nyírfákban is (Welling és mtsai. 2004). Ráadásul úgy tűnik, hogy a rövid nappalhossz csak segít megindítani az expressziót mint kulcsfontosságú elemet ebben a folyamatban, de később már nem jelent további regulációs pontot. Mindez azt is sugallhatja, hogy a *HvDHN5* szabályozása független a fitokróm által közvetített jelátviteli úttól, ami rugalmasabbá teszi az árpa hidegakklimatizációs mechanizmusát.

9.2. A fagyasztási tesztek különböző fényintenzitások mellett, módosított R/FR arányon

Az összehasonlítás alapját a fehér fény képezte, és a távoli vörös modulált zónák eredményeit állítottuk szembe vele (10. ábra). Minden fényintenzitásnál és hőmérsékletnél egyértelmű különbség van a két kezelés között. Ismert, hogy maga a fényintenzitás befolyásolja a fagyűrés mértékét, és megfelelően magas fényintenzitást alkalmazva a fagyűrés szobahőmérsékleten is javítható a búzában (Szalai és mtsai. 2009). Ezen túlmenően, a hidegedződés ideje alatt elegendő megvilágítás nélkül, a potenciálisan magas fagyállóságú téli gabonafélék sem képesek megfelelő fagyástűrést elérni (Gray és mtsai. 1997, Apostol és mtsai. 2006). Hasonló eredményeket jelentettek lúdfűben is. Ennél a modellnövényenél a rövid fotoperiódus alacsonyabb fagyűrést eredményezett, míg az alacsony fényintenzitás is hasonló eredményeket hozott. Bár a kísérlet elsősorban nem ennek a témának a célját szolgálja, de a szerzők azt sugallták eredményeikkel, hogy a lúdfű fagyállóságának kialakulása a beérkező fotonok teljes számához kapcsolódik, nem pedig a fotoperiódus időtartamához (Wanner és Junttila 1999). Vizsgálatunk (10. ábra) szintén megerősíti ezeket az állításokat árpára nézve, mivel az alacsony és a magas fényintenzitás között a relatív vezetőképesség mindkét hőmérsékleten csökkent, még a vörös fény kiegészítéstől függetlenül is.

A rozs esetében arról számoltak be, hogy a hidegexpozíció után a rozs növények sokkal nagyobb hidegtűrést mutattak a normál hőmérsékleten termesztett kontrolljukhoz képest. Ezzel szemben az eredményeik azt is megmutatták, hogy nagyobb fényintenzitás mellett a növények fagyűrése megnövekedett, de ez a növekedés nem volt olyan magas, mint az edzett kontrollokban

(Gray és mtsai. 1997). Az őszi búza (*Triticum aestivum* L. var. Mv Emese) esetében hasonló eredményeket igazoltak. Hidegben edzett palánták fagyűrűzése jóval magasabb volt, amikor normál fényerősséggel ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nevelték őket, sőt magasabb fényintenzitás mellett ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a növények magasabb túlélési arányokat is mutattak, mint gyenge fényviszonyok mellett ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Hasonló eredményt értek el még hideg edzés nélkül is (Janda és mtsai. 2007).

Eredményeink is ezt a tendenciát mutatták, de emellett azt is jelzik, hogy az R/FR arány módosulása nemcsak szinergetikus hatást mutat alacsony hőmérsékletekkel (Novák és mtsai. 2016), hanem védelmi mechanizmusokat is indukálhat nem akklimatizációs hőmérsékleten is, különösen nagy fényintenzitás mellett ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Csökkent R/FR arány esetén nagyobb fagyástűrés volt megfigyelhető minden fényintenzitás mellett. Paradicsomban a termesztés során távoli vörös fény hatásait vizsgálták a betakarítás után. A termesztés során a kiegészítő távoli vörös fény javította a szüret utáni hidegtűrést az érett zöld és vörös betakarított paradicsomokban is. Ebben az esetben a kiegészítés nagyobb szilárdságot, fokozott pigmentáltságot okozott, és csökkentette a hűtés által kiváltott károsodási és bomlási folyamatokat (Affandi és mtsai. 2020). Bár a magas fényintenzitású kiegészítő vörös fény sok esetben előnyös, ha korábban a növényeket alacsonyabb beeső fényintenzitáson nevelték, a fényerősség hirtelen növekedése káros mellékhatásokat is okozhat, például fotoinhibíciót vagyis a fotoszintetikus apparátus károsodását a hideg akklimatizáció során (Zhu és mtsai. 2017, Szalai és mtsai. 2018). A mi eredményeink ezt konkrétan nem tudják megerősíteni, hiszen csak a növények magassági mutatóiból kiindulva (11. ábra) tudunk csak távoli következtetést levonni. Ettől függetlenül Kono és munkatársai 2017-es és 2020-as eredményei arra mutattak rá lúdfű modellnövényben, hogy a vörös fény megvilágítás során, fluktuáló fényerősség mellett az erős fény gyenge fény átmenetnél a távoli vörös fény kiegészítés segíti a fotoszintézis fényvédelmi folyamatainak relaxálódását. A gyenge fényről erős fényre történő átmenet során a távoli vörös fénykiegészítés az I-es fotokémiai rendszer körüli ciklikus elektronáramlás fokozásán és a fényvédelmi folyamatok támogatása által, képes megakadályozni, hogy az elektronok a PSI-ből a molekuláris oxigénre kerüljenek (Kono és mtsai. 2017, 2020). Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek rövid távú kísérletek voltak és a fényvédelmi rendszernek megvannak a limitációi. Amíg a PSI körüli ciklikus elektronáramlás aktív, melyet az extra távoli vörös fény a magasabb fényintenzitás mellett tovább erősít, a megnövekedett delta pH függő fényvédelmi folyamatok miatt a PSII működése erősen csökkenhet (Cornic és mtsai. 2000). Ez közvetlen módon vezethet a fotoszintetikus aktivitás leszabályozásához és a szénhidrát raktárak kiürüléséhez, amely nem kedvez a növekedésnek.

Természetesen ezen feltevéseket csak kísérletes módon lehet bizonyítani, de ilyen irányú kísérleteket ebben a rendszerben nem végeztünk.

Kimutatták azt is, hogy az alacsonyabb R/FR arány a fitokróm jelrendszer befolyásolásával növelheti a fagyűrés emelkedett szintjét (Franklin és mtsai. 2014, Novák és mtsai. 2016, Gierczik és mtsai. 2017). Eredményeink azt is bizonyították, hogy a megemelkedett FR fény a spektrumban nagyban javíthatja az árpa fagyűrését, amely tovább növelhető a fényintenzitás növelésével párhuzamosan. A fás szárú növényekben a csökkent R/FR arány ezen hatását már régen bizonyították. Például somban és loncfélékben a vörös fény negatívan befolyásolta a fagyűrést. A som több genotípusát vizsgálva igazolták, hogy a távoli vörös fény pozitívan befolyásolja a hideg akklimatizációs folyamatokat (Williams és mtsai. 1972, McKenzie és mtsai. 1974). Ha összehasonlítjuk a nagy fényintenzitáson megvalósuló legmagasabb fagyállóságot a *COR14b* expressziós mintázataival (8. ábra), akkor az még azt is mutathatja, hogy az árpa fagyűrését befolyásoló számos mechanizmus (X. Wang és mtsai. 2016) vizsgálata is fontos lehet, ha nemcsak fagyűrés markerezése a cél.

9.3. A FR hatás mérsékelt hőmérsékleten (FR-M)

A növények különböző fotoreceptorok által érzékelik a fényt. Az egyetlen olyan fotoreceptor, ami kizárólag a FR által aktiválódik, a fitokróm A (PhyA). Ez azért is kiemelten fontos, mert már publikáltak eredményeket arról, hogy ez a fotoreceptor fokozza a növények fagy elleni toleranciáját (Gururani és mtsai. 2015, F. Wang és mtsai. 2016). A PhyA-aktivációval járó megnövekedett FR mennyisége pozitív hatása összhangban áll a mi eredményeinkkel, ahol mi is FR-indukálta fagytolerancia-emelkedést tapasztaltunk az árpa esetében már 15 °C-on (14. ábra). Ez a megállapítás összhangban áll egy korábbi tanulmánnyal (Novák és mtsai. 2016), ahol az alacsony R/FR arány pozitív hatását a legfontosabb hidegindukálható transzkripciós faktor, a *CBF14* expressziójára mutatták ki 15 °C-on. Azonban a hideg-akklimatizációra gyakorolt FR hatás pontos mechanizmusa egyelőre nem teljesen ismert. Kutatócsoportunk korábbi gabonafélékben történő vizsgálataiban (búzában és árpában) kimutatták, hogy a csökkent R/FR arány hatása tovább fokozható a nagyobb fényintenzitással (Novák és mtsai. 2016, Ahres és mtsai. 2020). Azt is meg kell említeni, hogy a normál növekedési hőmérsékleten termesztett tavaszi árpafajtáknál az FR fény kevésbé hatékony, mint más módosítások, például a kék fény növelése a megvilágító fehér fényben (Klem és mtsai. 2019).

Az FR fagyűrésre gyakorolt hatásán kívül, a természetben előforduló fényspektrum összetételének őszi változásaihoz hasonlatosan (szintén megnövekedett FR mennyiség következik

be a természetes fényben), a növények azt árnyékjelzésként is érzékelhetik, mivel a növények elsősorban a vörös fényt használják fel, míg a FR fény egyrésze visszaverődik. Sűrű vegetációban ez indukálja az árnyékkerülés-szindrómát, amely a kétszikűeknél a hipokotil/szár növekedésének stimulációjával és a levélfejlődés visszaszorításával jár együtt (Ballaré és Pierik 2017). Ez egyszikűek esetében csökkent kalászszaámot és az érett szemek súlyának csökkenésében mutatkozik meg (Panigrahy és mtsai. 2020). Ezeket a fejlődési jelenségeket is, a hidegakklimatizációval egyetemben a növényi hormonok képesek szabályozni. Ezért is fontos hangsúlyozni, hogy az FR-expozíció által kiváltott változások kapcsolatban állnak a hidegedződés folyamatával és az árnyékkerülő-szindrómával egyaránt.

A 15 °C-os FR-kiegészítés (FR-M) legjelentősebb hormonszint-változás az ABA-mennyiségi növekedése volt (15. ábra A). A génexpresziós vizsgálatok is alátámasztják ezt a növekedést, ahol az ABA mennyiségi előfordulását korlátozó *NCED1* bioszintetikus enzim génjének transzkripciója, valamint más ABA-bioszintetikus gének, mint pl. az *AO2*, valamint kisebb mértékben a *ZEP1* és *SDR2* expressziója nőtt (17. ábra). Ez összhangban áll más olyan tanulmányokkal, amelyek arról számoltak be, hogy az ABA bioszintéziséhez kapcsolódó géneket erőteljesen indukálja a fehér fény spektrumának FR-rel való kiegészítése (Seo és mtsai. 2009, Xu és mtsai. 2014). Az alacsony R/FR arány pozitívan szabályozza az ABA-t lúdfűben is, ezáltal gátolva annak növekedését (Reddy és mtsai. 2013). Úgy tűnik, hogy az ABA a hidegedzés során (legalábbis részben) a védőanyagok expressziójának stimulálásával, pl. LEA fehérjék (Kosová és mtsai. 2012), vagy a növekedés teljes leállításával vesz részt (Francis és Sorrell 2001).

A JA degradálódása tartós FR-expozíció esetén 15 °C-on (15. ábra B) összhangban van az árnyékolási reakció alatt fellépő szuppresszálsággal, amely a növények alacsonyabb R/FR-arányon bekövetkező fokozott sebezhetőséggel jár együtt (Voitsekhovskaja 2019). Lúdfűben az alacsony R/FR arány gátolja a JA által kiváltott védekezési reakciókat, valószínűleg annak a ténynek köszönhetően, hogy a növényeknek át kell helyezniük energiaforrásaikat a védelem kialakításáról a gyorsabb növekedés, pontosabban a szármegnyúlás irányába (Leone és mtsai. 2014). Más hasonló esetet tavaszi árpában írtak le, ahol az FR fény szintén negatívan befolyásolta a JA bioszintézisét a tavaszi árpa levelében (Klem és mtsai. 2019). A JA tartalom csökkenése mellett, annak jelátviteli működése is nagyban csökkent. Ez a folyamat az FR által kiváltott fitokróm B inaktiválásának következtében alakul ki, melynek eredményeként a JA represszor JAZ fehérjék (JASMONATE ZIM DOMAIN) stabilizálódnak (Ballaré 2014).

Az alacsony R/FR arány nemcsak a JA-függő, hanem az SA-függő védekezéseket is csökkentette a lúdfüben (De Wit és mtsai. 2013). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az árnyékelkerülő válasz elsőbbséget élvez a növényi immunválaszokkal szemben (De Wit és mtsai. 2013, Leone és mtsai. 2014). A mi kísérletünkben azonban csak enyhe SA csökkenést észleltünk hosszan tartó FR kezelés esetén (15. ábra C).

Az árnyékkerülési-szindróma válaszreakciójaként általában az egyetlen emelkedő hormon az IAA (Kohnen és mtsai. 2016, Ma és Li 2019). Ezt mi is hasonlóan tapasztaltuk, ugyanis ennek az auxinnak a jelentős mértékű növekedését detektáltuk az FR-expozíció teljes időtartama alatt 15 °C-on az FR-M kezelésben (15. ábra D), amit a *COAA* gén expressziójának növekedése előre jelzett (17. ábra). Ismeretes, hogy az IAA hormont túltermelő növények a CKX-eket vagyis a fő CK-bontó enzimeket pozitívan szabályozzák (Eklöf és mtsai. 1997, Ballaré és Pierik 2017). Ezt az eredményt mi is meg tudjuk erősíteni, hiszen az IAA növekedése egybevágott a *CKX9* gén jelentős emelkedésével (17. ábra). Ez jól korrelál az aktív CK-k csökkenésével, ami a tizedik napon következett be alacsony R/FR arány mellett (16. ábra), és összhangban van azzal a ténnyel is, hogy az árnyékelkerülés általában a CK-nek csökkenésével jár, ami összefügg a levél növekedésének gátlásával is (Kurepin és mtsai. 2013).

9.4. Az FR előkezelés hatása a hideg okozta stresszreakcióra (FR-M/FR-C(28))

A fagytesztek eredményei (14. ábra) azt mutatták, hogy az FR-vel történő előkezelés (FR-M/FR-C(28)) erős pozitív hatással volt a fagytürésre a rákövetkező 5 °C-os hidegkezelés után. A hőmérséklet csökkentése 5 °C-ra a fehér fényben termesztett növényekben az ABA koncentráció átmeneti növekedését eredményezte (15. ábra A). Ez az ABA növekedés összhangban van több megjelent publikációval (Kosová és mtsai. 2012, Kalapos és mtsai. 2017). Az ABA esetében az alacsony hőmérséklet hasonló hatást váltott ki a kontroll fehér fény esetében, mint amit az első kísérletben tapasztaltunk az ABA anyagcseréjében a 15 °C-os FR kezelésben. A hideg a többi stresszfaktor mellett (sótartalom, dehidratáció, hő) erősen befolyásolja az ABA szintjét azáltal, hogy a bioszintézisében rész vevő számos gént aktiválja (Tuteja 2007). Növényekben az FR-hez való alkalmazkodást követően (15 °C-os FR kezelés) az alkalmazott 5 °C hidegkezelés az ABA szintet számottevően nem változtatta meg. Ennek oka lehet az FR előkezelés által okozott nagyobb hidegtürés, amely csökkentette a stressz hatását, és így alacsonyabb stresszválasz társult az alacsony hőmérséklethez. A kezelés végére az ABA szintje a kontroll fehér fényben, illetve az FR kezelésben csökkenést mutatott. Az ABA csökkenése a tartós hidegkezelés során összhangban van egy korábbi eredménnyel (Kosová et al. 2012). Az ABA profil egybeesett az *SDR2* és *AO2* gének

expressziójával. Az alacsony *NCED1* transzkriptumszint abból is eredhet, hogy az ABA levelekben történő emelkedése elsősorban a gyökerekből származó transzportnak köszönhetően, nem pedig ott szintetizálódott.

A kezelés korai szakaszában a hidegre adott stresszreakcióban a JA szint meglehetősen alacsony volt (15. ábra B), ami később is csak mérsékelten emelkedett. Ez összhangban van a Hu és munkatársai által leírtakkal (Hu és mtsai. 2017). Érdekes módon az első variánsban (FR-M) a 15 °C-on tapasztalt negatív FR hatás a teljes hideg kezelési időszakban is fennmaradt (15. ábra B). Az SA esetében is csak kisebb változásokat tudtunk megfigyelni (15. ábra C). A *PAL* gén expressziójának mérsékelt csökkenése korrelált az SA-szintjének enyhe csökkenésével a hidegkezelés elején.

Az FR előzőekben leírt pozitív hatása az IAA-ra szinte rögtön a kezelés első napjára megszűnt a hideghatás (5 °C) bekövetkezte után (15. ábra D), ami azt jelzi, hogy az auxinokra a hőmérséklet nagyobb hatással van, mint a fényminőség. Azonban a hosszabb ideig történő hideg és FR kezelés végére az eddig tárgyalt pozitív hatás újra szignifikánsan mérhető volt.

A sejtosztódás stimulálásában legaktívabb citokininre (tZ) a hideg stressz mérsékelten ugyan, de rögtön negatív hatást gyakorolt. Ezzel ellentétben viszont a cZ-tartalom növekedett, ami azért is érdekes, mert alapvetően az aktív citokininek alacsony mennyisége gyakran összefügg a stresszválaszokkal. Később a tZ kissé megemelkedett, míg a cZ mérsékelten csökkent, ami azt jelezheti, hogy a növények már képesek voltak alkalmazkodni az alacsony hőmérséklethez. A 15 °C-on végzett kezeléshez hasonlóan a hosszan tartó FR kezelés 5 °C-on is negatív hatással volt a cZ-re. Az FR-kezelt növények kissé magasabb tZ-tartalma viszont az kezelés első napján arra is utalhat, hogy az FR-előkezelés által magasabb stressztolerancia alakult ki, és emiatt a stresszhatást is csökkenti.

9.5. A kombinált FR és hidegkezelés (FR-C(18))

Az FR-C(18) kezelés során a hideg stresszt az FR kiegészítésével egyidejűleg alkalmaztuk a fiatal, tizennyolc napos növényeknél. Az FR-M/FR-C(28) kezeléshez képest a fiatalabb növények már fehér fényben is szignifikánsan nagyobb stressztűrést mutattak (14. ábra). Úgy tűnik, hogy a növények érzékenyebbek az alacsony hőmérsékletre a három leveles fejlődési szakaszban, összehasonlítva fejlődésük későbbi szakaszaival. Az ABA korai emelkedése valamivel alacsonyabb volt, mint a huszonnyolc napos növényeké. A jelenség legvalószínűbb magyarázata a következő: Az északi félteke mérsékelt éghajlatú régiójában az őszi gabonafélék

vetési ideje október első és második hetében kezdődik, ami általában novemberig tart. Következésképpen, amikor az első fagyok már hatással vannak a fejlődő növényekre (az éjszakai fagyok általában november elején jelennek meg), akkor még fejlődésük nagyon fiatal szakaszban van (2-3 leveles stádium). Tehát több száz évig a gazdák és termesztők is kisselektáltak olyan fajtákat, amelyek képesek voltak alkalmazkodni ehhez a zord éghajlathoz. Nemrégiben megjelent publikációkban is arról számoltak be, hogy a fény minősége és mennyisége befolyásolta mind a búza, mind pedig az árpa növekedését és fejlődését, sőt a cirkadián óra működésére is jelentős hatással van (Gierczik és mtsai. 2017, Monostori és mtsai. 2018, Watson és mtsai. 2018, Monteagudo és mtsai. 2020)

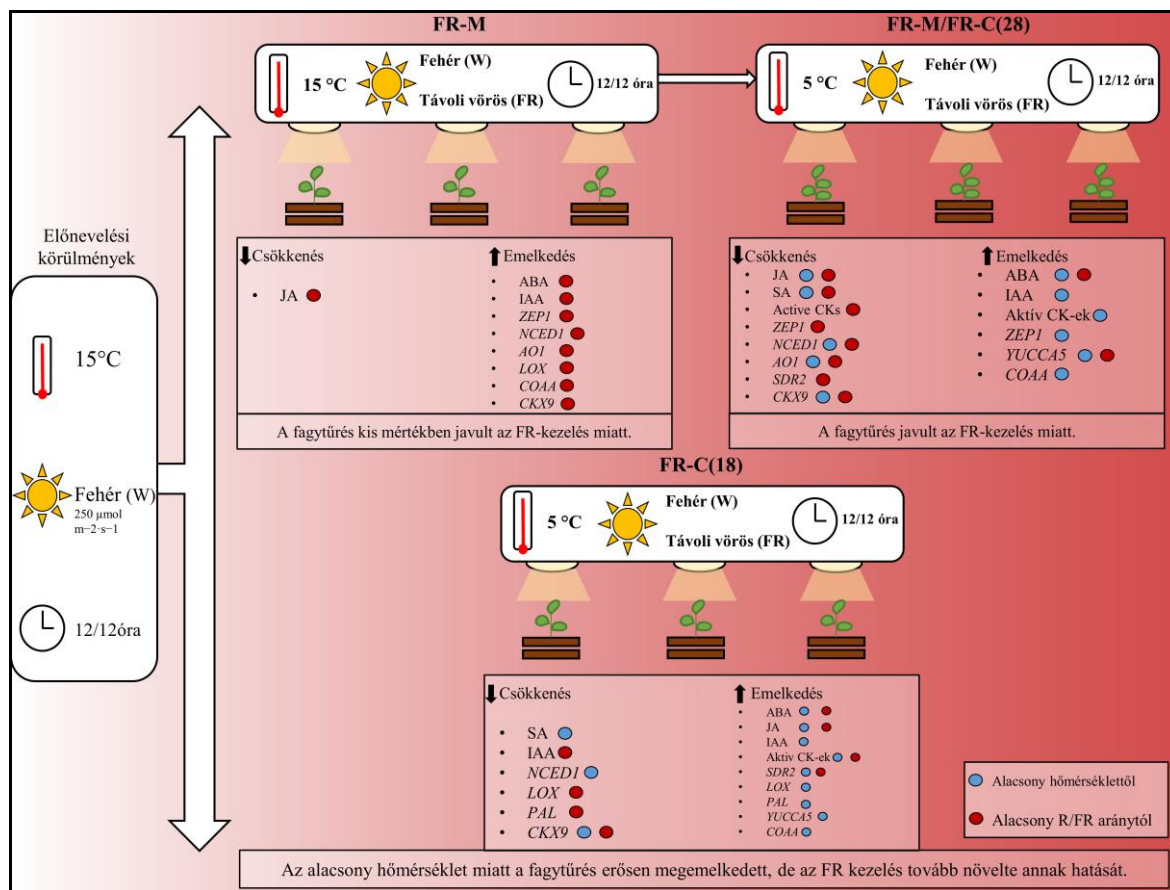
Ezzel egyidejűleg a JA és az SA mennyiségi előfordulása is sokkal nagyobb mértékben változott, mint az FR-M vagy FR-M/FR-C(28) kezeléseknél. A hormonprofilok összhangban vannak bioszintetikus génjeik expressziós mintázatával, erős stimulációt detektálunk az SA bioszintézis kapcsán kiemelten fontos *PAL* génnél, de a JA bioszintézisében szerepet játszó *LOX* gén transzkripció szintje is emelkedett. Ez összhangban van a korábbi beszámolókkal, amelyekben az alacsony hőmérséklet vagy a hidegakklimatizáció általában megemelt *PAL* aktivitást eredményez, pl. *festulolium*- vagy repcenövényekben (Pociecha és mtsai. 2008, Hura és mtsai. 2015). Valószínűleg a növények ebben a fejlődési szakaszban prioritizálják a védelmi mechanizmusaik erősítését a szélsőséges környezeti feltételek ellen. A hétnapos hideg időszak végén az összes stresszhormon, különösen a JA tovább emelkedett. A *LOX* gén működése azonban ellentmond áll Liu és mtsai. eredményeinek (Liu és mtsai. 2016), akik több *LOX* gén hideg okozta szuppressziójáról számoltak be dinnyében. A válasz azonban fajspecifikus lehet, ráadásul a különféle *LOX* gének különböző szabályozási folyamatokban is jelen lehetnek.

Megállapítottuk, hogy a hideg és az FR kombinációja fokozza a hideg elleni toleranciát a csak hideg kezeléshez képest, hiszen az ABA szintje emelkedett, míg azzal ellentétesen az IAA szint csökkent. Az ABA felhalmozódásának különbsége az FR-M/FR-C (28) és az FR-C(18) kezelés között az előbbi esetben az FR előkezelésnek tudható be. Ez összhangban lehet Bravo és munkatársai 1998-as munkájával, ahol a hideghez adaptálódott és a normál hőmérsékleten nevelt árpa növények ABA tartalma hasonlóan alakult, mint a mi növényeinkben a FR-hez való alkalmazkodást követően (Bravo és mtsai. 1998). Az FR kezelés a stresszhez kapcsolódó citokinin a cZ szubsztanciális növekedését okozta függetlenül a kezelés hosszától. Azonban FR kezelés végére (7. nap) a JA és az SA mennyisége jelentősen csökkent, ami általában az árnyékreakció egyik fő ismertetőjele. Mind a hormonszint, mind a hormon anyagcserével kapcsolatos gének

expressziós profilja azt jelzi, hogy az aktivált védekezés mechanizmus a teljes kísérlet egésze alatt fennmaradt. Az IAA növekedése szorosan összefügg a magas CK-tartalommal, amely ráadásul összhangban állt a *YUCCA5* és a *COAA* expressziójának magas szintjével, azt jelzi, hogy a fiatal növények jobban képesek alkalmazkodni ehhez a stresszállapotához.

9.6. Konklúzió

Az eredményeink azt mutatják, hogy FR-kiegészítésű fehér fény koordinátorként működik a hidegedződés korai szakaszában, és ez a jelenség különbözik a FR által befolyásolt más növényfejlődési és élettani folyamat szabályozásától. A kiegészítő FR fény pozitív hatással volt a növények hidegtűrésére minden kezelési variánsban. Ezt a hatást 5 °C-os hidegkezelés tovább erősítette, a nem hideg-akklimatizációs hőmérsékleten (15 °C) nevelt növényekhez viszonyítva. A hormon és a qPCR elemzések eredményei azt mutatják, hogy a hőmérséklet nagyobb hatással volt a növény viselkedésére, mint a fényspektrum módosulása. Az adatok teljes összefoglalását a 18. ábra mutatja be, ami szemlélteti azt is, hogy a hideg illetve FR kezelés szinergikus, de néhány esetben antagonista hatásokat is kiváltottak. Mindenesetre a két környezeti faktor együttes alkalmazása fejti ki a legnagyobb hatást. Úgy tűnik, hogy az FR kezelés időzítése és időtartama döntő tényező a hideg-akklimatizálódási folyamatokban, ami a növények akklimatizálását illeti. Egy másik fontos tényező a növények. Az árpanövények korai fejlődési szakaszában a hidegedződés hatékonyabb volt, ami magasabb fagytoleranciát eredményezett. Ezt a jelenséget egyes növényi hormonok koncentrációjának a változása, például a JA és az SA erőteljesebb emelkedése is jelzi.



18. ábra A különböző hőmérsékletek és/vagy a FR kezelés által kiváltott növényi hormon válaszok és a kulcsfontosságú hormon metabolizmussal kapcsolatos gének expressziós változásai. **FR-M**: A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 °C-on. **FR-M/FR-C(28)**: 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. **FR-C(18)**: 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. W - fehér fény; FR – távoli vörös fénnel kiegészített fehér fény. ABA, abszizinsav; IAA, indol-3-ecetsav; JA, jázmonsav; SA, szalicilsav; aktiv CK-ek, aktiv citokininek; CKX9, citokinin-oxidáz/dehidrogenáz 9; COAA, acetyl-CoA acetyltransferáz; YUCCA5 indol-3-piruvatmonooxygenáz; ZEP1 zeaxantin-epoxidáz; NCED1, 9-cisz-epoxikarotinoid-dioxigenáz 1; SDR2, rövid láncú dehidrogenáz 2; AO2, aldehyd-oxidáz 2; LOX, lipoxigenáz; PAL, fenilalanin-ammónia-liáz.

10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

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 transzkripciós 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 szinergetikusan 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 fagytűrő őszi gabonafélék esetében a környezeti hőmérséklet és a fényintenzitás függvényében. A FR kiegészítés indukálja a hidegedződést 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.

11. NEW RESULTS (THESES)

1. According to our best knowledge these are the first results to show that the combined effects of the cold, light intensity and the modification of the R/FR light ratio can greatly influence the expression pattern of the *HvCBF14* and the *HvCOR14b* gene, and also adjust the level of the *HvDHN5* gene. While low temperature induced all of their expression, far-red light supplementation was able to further enhance their transcriptional level except for the *HvDHN5* gene. This positive effect was sometimes suppressed or further strengthened by the change in light intensity.
2. The two genes which are used primarily as markers to predict the level of the barley frost tolerance behaved differently. While the *HvCOR14b* gene showed an absolute increase in both low temperature and under supplemented far-red light, the *HvDHN5* only responded to the low temperature in a reliable manner. This suggests that the *HvDHN5* gene should be used when light modifications do not occur or to predict the level of total hardiness after adequately long cold acclimation.
3. These three environmental factors seem to be interfering with each other during the cold acclimation process. The modification of temperature, light intensity and R/FR ratio have an additive effect on barley's cold hardiness, but in many cases they cause even synergistic effect in the barley plants. This phenomenon leads some serious alteration in the level of frost hardiness in the early stages of cold hardening.
4. Cold hardening was more efficient in the early developmental stages of barley plants, which was associated with higher stimulation of plant defence as indicated by comparable elevation of ABA and higher modulation of JA and SA.
5. The timing and duration of the FR treatment seem to be crucial factors in cold acclimation processes as far as plant acclimation is concerned.
6. Based on these results it seems that elevated protection against low temperature can occur in plants as an adaptation to autumn-related environmental changes, distinct from the shade avoidance syndrome.
7. The results of the hormone and the qPCR analyses indicate that temperature had a greater impact on plant behaviour than the modification of the light spectrum.

8. FR-supplemented white light acts as a coordinator in the pre-hardening process, apart from the regulation of many plant developmental and physiological processes.

12. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk hátterét több, ma már széles körben elfogadott tudományos eredményre alapoztuk. A búza és az árpa fagyállóságát befolyásoló *FR2* lokuszban számos *CBF* transzkripciós faktor gén található, amelyek kulcsszerepet töltenek be a növények hidegedződésének folyamatában. *Arabidopsis thaliana* modellnövényben bizonyították, hogy a *CBF* gének az alacsony hőmérséklet, a fotoperiodus és a fényintenzitás mellett a fényminőségére is erősen reagálnak. Tudjuk, hogy ősszel számos környezeti tényező változására (pl. hőmérséklet, fényintenzitás, spektrumok) van szükség ahhoz, hogy a gabonafélék fiziológiailag felkészüljenek a téli fagyokra. Hipotézisünket, hogy a növények a csökkent vörös/távoli vörös fény arányt egyfajta jelként használhatják a hőmérséklet-csökkenésre való felkészüléshez is e tényekre alapoztuk. A teóriánk alátámasztására két különböző kísérletet állítottunk be, ahol egy jó fagyűrővel rendelkező őszi árpa genotípusban vizsgáltuk a hőmérséklet, a fényintenzitás és a fény spektrum változástól függő fagyűrő kialakulásának molekuláris hátterét, különösen a *CBF* regulont és a növényi hormonokat.

Az első kísérletben őszi árpa növényeket kezeltünk alacsony, normál és nagy fényintenzitás mellett, alacsony vörös távoli vörös arányú (R/FR) fénnel 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, amely szintén képes modulálni 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* gént akkor kell használni, ha nem következnek be fénymódosítások, vagy 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 tesztek

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 ős 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 egyedekhez 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 stressztolerancia megemelkedése miatt. A jázmonsav (JA) és a szalicilsav (SA) átmenetileg redukálódott.

Amikor a növényeket közvetlenül hideg (5 °C) és FR kezelés kombinációjának tettük ki, az ABA határozottabb emelkedést mutatott, aminek hatására a JA szint hasonlóan módosult. Hosszabb távon ezen emelkedések az IAA és a cisz-zeatin (cZ) emelkedésével járt, amelyek erősebb stresszreakciót és jobb akklimatizálódást jeleznek előre. A hormon- és a qPCR elemzések eredményei azt mutatják, hogy a hőmérséklet nagyobb hatással volt a növény viselkedésére, mint a fényspektrum módosulása. Az adatok elemzésével láthatjuk, hogy mind szinergikus, mind antagonista 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 bizonyítékul 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 fagytűréssel is járt. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy az alacsony hőmérsékleti 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.

13. SUMMARY

Our work was based on several scientific results that are widely accepted in the field of cold acclimation in cereals. There are many CBF transcription factors in the wheat and barley Fr-2 locus that affects their frost resistance. It has been described that the photoperiod and the light quality are important regulators in the cold acclimation processes through the modulation of the CBF regulon. During autumns, environmental changes (e.g. temperature, light intensity, spectra) are required for cereals to prepare physiologically to winter frost. The most important environmental factors are shortening of day length and alteration in the light spectrum, which are assumed to have a pivotal role in the induction of the cold hardening process. To support our theory between the interactions of these two external hardening factors two different experiments were carried out. For these experiments a cold-tolerant, winter habit barley *Hordeum vulgare* spp. *vulgare* var. Nure was used where we investigate the effects of the temperature, the light intensity and the light quality on the the development of frost tolerance.

In the first experiment our aim was to study the expression of the HvCBF14 gene and two well-characterized members of the CBF-regulon the HvCOR14b and the HvDHN5 genes. These genes were observed under modulated light (white and FR supplemented white light) and temperature conditions (15 °C and 5°C). We also elucidated how light intensity, in parallel with the modified spectrum of incident white light, affects the freezing tolerance of the barley seedlings.

According to our best knowledge, these are the first results to show that the combined effects of cold, light intensity, and modification of the R/FR light ratio can greatly influence the expression pattern of HvCBF14 and HvCOR14b genes and can also adjust the level of the HvDHN5 gene. Interestingly, the two genes, which are used primarily as markers to predict the level of barley frost tolerance, behaved differently. While the HvCOR14b gene showed an absolute increase in both low-temperature and under supplemented far-red light conditions, HvDHN5 only responded to low temperatures in a reliable manner. This suggests that the HvDHN5 gene should be used when light modifications do not occur or to predict the level of total hardiness after adequately long cold acclimation. Therefore, we suggest that in those cases, when artificial light sources are used during cold hardening, the expression level of HvCOR14b should be monitored instead. These three environmental factors seem to be interfering with each other during the cold acclimation process, which can result in serious alterations in the level of frost hardiness. Accordingly, during selection for frost tolerance in plant growth chambers, it is very important to keep both the light intensity and spectrum constant, and this is the prerequisite for repeatability.

Moreover, in field conditions applying external light sources, it also might prevent cold injuries in different plant species during autumn.

In the second experiment the effects of the FR supplementation on barley plants was further investigated but only at 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ light intensity. In this experiment the impact of reduced R/FR ratio in the incident white light was studied on the hormone levels, and on the key hormone metabolism-related genes in winter barley leaves at moderate (15°C) and low (5°C) temperature.

We proved that the FR-supplemented white light acts as a coordinator in the pre-hardening process, aside from its regulation of many plant developmental and physiological processes. Supplementary FR light had a positive impact on the plants' cold tolerance, even at moderate temperature which also confirmed the results of the first experiment. This effect was strengthened by cold treatment at 5 °C, in comparison with a non-cold hardening temperature. FR-enhanced freezing tolerance at 15°C was associated with promotion of abscisic acid (ABA) levels, accompanied by moderate increase of indole-3-acetic acid (IAA) and cis-zeatin (cZ) levels. The most prominent impact on plants' freezing tolerance was found after FR pre-treatment at 15°C followed by cold treatment together with FR supplementation. Response of ABA was diminished in comparison with white light treatment, probably due to the previous transient elevation of ABA content during FR pre-treatment. Jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) were transiently reduced. When the plants were exposed directly to a combination of cold (5°C) and FR supplementation, ABA increase was higher than in white light, and was associated with enhanced elevation of JA. After seven days of the combined treatment IAA and cis-zeatin also increased, which indicate stronger stress response and better acclimation. Cold hardening was more efficient when FR light was applied in the early developmental stage of barley plants rather than in later stages. The results of the hormone and the qPCR analyses indicate that the temperature had a greater impact on the plant behaviour than the light spectra modification. Both synergetic and antagonistic effects were found among these two environmental cues when applied together. The timing and duration of the FR treatment seem to be a crucial factor in the cold acclimation processes as far as plant acclimation is concerned. Another important factor is plant age. Cold hardening was more efficient in the early developmental stages of barley plants, which was associated with higher stimulation of plant defence as indicated by comparable elevation of ABA and higher increase of JA and SA

This series of experiments may serve as an evidence for the close relationship between plant hormones, light quality and low temperature in the beginning of cold acclimation. After

serious alterations in phytohormone contents and in their related transcriptome by the decreased R/FR ratio and/or the low temperature, an elevated frost tolerance was measured in all instances. Based on these results it seems that an elevated protection against the low temperature can occur in plants as a positive side effect of the shade avoidance syndrome. However, it is important to emphasize the timing of the FR treatments are also a key factor for this positive influence. The better timing for the application of modulated light spectrum results in higher hardening state during the pre-hardening process.

14. PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

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>

Más témákhoz kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent cikkek

Gyugos, M., **Ahres, M.,** Gulyas, Z., Szalai, G., Darko, E., Vegh, B., ... Kocsy, G. (2019). Role of light-intensity-dependent changes in thiol and amino acid metabolism in the adaptation of wheat to drought. *JOURNAL OF AGRONOMY AND CROP SCIENCE*, 205(6), 562–570. <http://doi.org/10.1111/jac.12358>

Gierczik, K., Székely, A., **Ahres, M.,** Marozsán-Tóth, Z., Vashegyi, I., Harwood, W., ... Vágújfalvi, A. (2019). Overexpression of Two Upstream Phospholipid Signaling Genes Improves Cold Stress Response and Hypoxia Tolerance, but Leads to Developmental Abnormalities in Barley. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER*, 37(4), 314–326. <http://doi.org/10.1007/s11105-019-01154-5>

Monostori, I., Heilmann, M., Kocsy, G., Rakszegi, M., **Ahres, M.,** Altenbach, S., ... Darko, É. (2018). LED Lighting – Modification of Growth, Metabolism, Yield and Flour

Composition in Wheat by Spectral Quality and Intensity. FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, 9. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00605>

Gierczik, K., Novak, A., **Ahres, M.**, Szekely, A., Soltesz, A., Boldizsar, A., ... Vagujfalvi, A. (2017). Circadian and Light Regulated Expression of CBFs and their Upstream Signalling Genes in Barley. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 18(8). <http://doi.org/10.3390/ijms18081828>

Konferenciakiadványokban teljes terjedelemmel megjelent

Gierczik, K., Novák, A., **Ahres, M.**, Székely, A., Galiba, G., & Vágújfalvi, A. (2016). A fény hatása az árpa stressz-indukált szignáltranszdukciós génjeinek ritmikus expressziós mintázatára. In PEME XIII. PhD. - Konferencia (pp. 53–64).

Előadások

Ahres, M., Kiss, E., Vashegyi, I., & Galiba, G. (2016). A foszfatidil-inozitol jelátviteli rendszer vizsgálata in vivo komplementációs kísérletekben. In PEME XIII. PhD. - Konferencia (pp. 5–16).

Poszterek

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).

Konferenciakiadványokban megjelent összefoglalók

Előadások

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).

Poszterek

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).
- Gábor, K., Mónika, G., Zsolt, G., Gabriella, S., Éva, D., Zsuzsa, M., ... Gábor, G. (2018). Light intensity-dependent differences in metabolism during drought in wheat. In Plant Biology Europe 2018 Conference (pp. 76–76).
- Gierczik, K., Novák, A., **Ahres, M.**, Székely, A., Boldizsár, Á., Galiba, G., & Vágújfalvi, A. (2017). Az árpa kalcium függő jelátviteli útvonal elemeinek és CBF génjeinek ritmikus expressziós mintázata. In XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap: összefoglalók (pp. 102–102).
- 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).
- Kalapos, B., **Ahres, M.**, Gierczik, K., Székely, A., Gulyás, Z., Kovács, K., ... Soltész, A. (2017). What we even want to know about CBF transcription factors in cereals. CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 45(S1), 95–96. <http://doi.org/10.1556/0806.45.2017.100>
- 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>

Összesítés

Σ **Impact Factor: 27,62**

Tudományos cikkek: 8

Konferenciakiadványok: 12

Proceedings-kiadványok: 3

Absztrakt: 9

Előadás: 2

14. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

- Affandi, F.Y., Verdonk, J.C., Ouzounis, T., Ji, Y., Woltering, E.J. & Schouten, R.E. 2020. Far-red light during cultivation induces postharvest cold tolerance in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 159:0–9.
- Ahres, M., Gierczik, K., Boldizsár, Á., Vítámvás, P. & Galiba, G. 2020. Temperature and light-quality-dependent regulation of freezing tolerance in barley. *Plants*. 9:1–13.
- Alabadí, D. & Blázquez, M.A. 2009. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Molecular Biology*. 69:409–17.
- Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W. 2015. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31:166–9.
- Apostol, S., Szalai, G., Sujbert, L., Popova, L.P. & Janda, T. 2006. Non-invasive monitoring of the light-induced cyclic photosynthetic electron flow during cold hardening in wheat leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 61:734–40.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J. & Kieber, J.J. 2009. Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*. 32:1147–60.
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H. & Goldman, M.H. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and molecular research : GMR*. 9:484–505.
- Balbi, V. & Devoto, A. 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: Crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*. 177:301–18.
- Ballaré, C.L. 2014. Light Regulation of Plant Defense. *Annual Review of Plant Biology*. 65:335–63.
- Ballaré, C.L. & Pierik, R. 2017. The shade-avoidance syndrome: Multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell and Environment*. 40:2530–43.
- Bayat, L., Arab, M., Aliniaiefard, S., Seif, M., Lastochkina, O. & Li, T. 2018. Effects of growth under different light spectra on the subsequent high light tolerance in rose plants. *AoB PLANTS*. 10:1–17.
- Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vučinić, Ž. & Spasojević, I. 2008.

- Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal*. 37:1241–6.
- Bravo, L.A., Zuniga, G.E., Alberdi, M. & Corcuera, L.J. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum*. 103:17–23.
- Bruňáková, K., Petijová, L., Zámečník, J., Turečková, V. & Čellárová, E. 2015. The role of ABA in the freezing injury avoidance in two *Hypericum* species differing in frost tolerance and potential to synthesize hypericins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 122:45–56.
- Burton, R.A., Shirley, N.J., King, B.J., Harvey, A.J. & Fincher, G.B. 2004. The CesA Gene Family of Barley. Quantitative Analysis of Transcripts Reveals Two Groups of Co-Expressed Genes. *Plant Physiology*. 134:224–36.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. & Ruberti, I. 2007. Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes and Development*. 21:1863–8.
- Carvalho, S.D., Schwieterman, M.L., Abraham, C.E., Colquhoun, T.A. & Folta, K.M. 2016. Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Frontiers in Plant Science*. 7:1–14.
- Catalá, R., Medina, J. & Salinas, J. 2011. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:16475–80.
- Cellier, F., Conéjéro, G. & Casse, F. 2000. Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower. *Journal of Experimental Botany*. 51:299–304.
- Chen, M., Chory, J. & Fankhauser, C. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*. 38:87–117.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K. & Sunkar, R. 2010. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 639:39–55.
- Choi, D.W., Zhu, B. & Close, T.J. 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: Sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1234–47.
- Copolovici, L., Kännaste, A., Pazouki, L. & Niinemets, Ü. 2012. Emissions of green leaf

- volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *Journal of Plant Physiology*. 169:664–72.
- Cornic, G., Bukhov, N.G., Wiese, C., Bligny, R. & Heber, U. 2000. Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*. 210:468–77.
- Crosatti, C., De Laureto, P.P., Bassi, R. & Cattivelli, L. 1999. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiology*. 119:671–80.
- Crosatti, C., Marè, C., Mazzucotelli, E., Belloni, S., Barilli, S., Bassi, R., Dubcovsky, J., Galiba, G., Stanca, A.M. & Cattivelli, L. 2003. Genetic analysis of the expression of the cold-regulated gene *cor14b*: A way toward the identification of components of the cold response signal transduction in Triticeae. *Canadian Journal of Botany*. 81:1162–7.
- Dal Bosco, C., Busconi, M., Govoni, C., Baldi, P., Michele Stanca, A., Crosatti, C., Bassi, R. & Cattivelli, L. 2003. *Cor* Gene Expression in Barley Mutants Affected in Chloroplast Development and Photosynthetic Electron Transport. *Plant Physiology*. 131:793–802.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. & Hirt, H. 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*. 32:40–52.
- Danyluk, J., Houde, M., Rassart, É. & Sarhan, F. 1994. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Letters*. 344:20–4.
- Davies, P.J. & Davies, P.J. 2016. The Plant Hormones : Their Nature , Occurrence , and A1 . The Plant Hormones : Their Nature ,. 1–11.
- De Wit, M., Spoel, S.H., Sanchez-Perez, G.F., Gommers, C.M.M., Pieterse, C.M.J., Voesenek, L.A.C.J. & Pierik, R. 2013. Perception of low red: Far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 75:90–103.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C. & Klessig, D.F. 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book*. 9:e0156.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7:1085–97.

- Djilianov, D.L., Dobrev, P.I., Moyankova, D.P., Vankova, R., Georgieva, D.T., Gajdošová, S. & Motyka, V. 2013. Dynamics of Endogenous Phytohormones during Desiccation and Recovery of the Resurrection Plant Species *Haberlea rhodopensis*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 32:564–74.
- Dobrev, P.I. & Vankova, R. 2012. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Methods in Molecular Biology*. 913:251–61.
- Dong, C., Li, L., Cao, N., Shang, Q. & Zhang, Z. 2015. Roles of phenylalanine ammonia-lyase in low temperature tolerance in cucumber seedlings. *Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology*. 26:2041–9.
- Du, H., Liu, H. & Xiong, L. 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in Plant Science*. 4:1–10.
- Eddy, S.R. 2009. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*. 23:205–11.
- Eklöf, S., Åstot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O. & Sandberg, G. 1997. Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology*. 38:225–35.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E. & Finn, R.D. 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*. 47:D427–32.
- Eremina, M., Rozhon, W. & Poppenberger, B. 2016. Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73:797–810.
- Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S. & Sarhan, F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology*. 127:1676–81.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17:1866–75.
- Francia, E., Barabaschi, D., Tondelli, A., Laidò, G., Rizza, F., Stanca, A.M., Busconi, M., Fogher, C., Stockinger, E.J. & Pecchioni, N. 2007. Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 115:1083–91.

- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A.M., Galiba, G., Tóth, B., Hayes, P.M., Skinner, J.S. & Pecchioni, N. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a „Nure” (winter) x Tremois’ (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics*. 108:670–80.
- Francis, D. & Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: A mini review. *Plant Growth Regulation*. 33:1–12.
- Franklin, K.A. & Quail, P.H. 2010. Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*. 61:11–24.
- Franklin, K.A., Toledo-Ortiz, G., Pyott, D.E. & Halliday, K.J. 2014. Interaction of light and temperature signalling. *Journal of Experimental Botany*. 65:2859–71.
- Franklin, K.A. & Whitelam, G.C. 2005. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany*. 96:169–75.
- Franklin, K.A. & Whitelam, G.C. 2007. Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 39:1410–3.
- Fricano, A., Rizza, F., Faccioli, P., Donata, P., Pavan, P., Stella, A., Rossini, L., Piffanelli, P. & Cattivelli, L. 2009. Genetic variants of *hvcbf14* are statistically associated with frost tolerance in a european germplasm collection of *hordeum vulgare*. *Theoretical and Applied Genetics*. 119:1335–48.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:436–42.
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P.I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M. & Motyka, V. 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62:2827–40.
- Galiba, G., Quarrie, S.A., Sutka, J., Morgounov, A. & Snape, J.W. 1995. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:1174–9.

- Galiba, G., Tuberosa, R., Kocsy, G. & Sutka, J. 1993. Involvement of Chromosomes 5A and 5D in Cold- Induced Absciscic Acid Accumulation in and Frost Tolerance of Wheat Calli. *Plant Breeding*. 110:237–42.
- Galiba, G., Vágújfalvi, A., Li, C., Soltész, A. & Dubcovsky, J. 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science*. 176:12–9.
- Galiba, G., Vanková, R., Tari, I., Bánfalvi, Z. & Poór, P. 2013. *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World*. Springer New York, New York, NY. 73–87 o.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Davoren, J., Puchalski, B. & Ergon, Å. 2000. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57:15–24.
- Gierczik, K., Novák, A., Ahres, M., Székely, A., Soltész, A., Boldizsár, Á., Gulyás, Z., Kalapos, B., Monostori, I., Kozma-Bognár, L., Galiba, G. & Vágújfalvi, A. 2017. Circadian and light regulated expression of CBFs and their upstream signalling genes in barley. *International Journal of Molecular Sciences*. 18.
- Gilmour, S.J., Fowler, S.G. & Thomashow, M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant molecular biology*. 54:767–81.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M. & Thomashow, M.F. 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*. 16:433–42.
- Göbel, C. & Feussner, I. 2009. Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry*. 70:1485–503.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N. & Bouarab, K. 2012. The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell*. 24:672–777.
- Gray, G.R., Chauvin, L.P., Sarhan, F. & Huner, N.P.A. 1997. Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiology*. 114:467–74.
- Greenup, A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. & Trevaskis, B. 2009. The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. *Annals of Botany*. 103:1165–72.

- Guo, X., Zhang, L., Zhu, J., Liu, H. & Wang, A. 2017. Cloning and characterization of SiDHN, a novel dehydrin gene from *Saussurea involucreata* Kar. et Kir. that enhances cold and drought tolerance in tobacco. *Plant Science*. 256:160–9.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Ganesan, M., Strasser, R.J., Han, Y., Kim, J. Il, Lee, H.Y. & Song, P.S. 2015. In Vivo assessment of cold tolerance through chlorophyll-a fluorescence in transgenic zoysiagrass expressing mutant phytochrome A. *PLoS ONE*. 10:1–17.
- Gusta, L. V., Trischuk, R. & Weiser, C.J. 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*. 24:308–18.
- Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J. & Somerville, C. 2009. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *Plant Journal*. 57:1015–26.
- Hannah, M.A., Heyer, A.G. & Hinch, D.K. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*. 1:0179–96.
- Heidarvand, L. & Maali Amiri, R. 2010. What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*. 32:419–31.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil / THE WATER-CULTURE METHOD FOR GROWING PLANTS WITHOUT SOIL
Professor of Plant Nutrition and Chemist in the Experiment Station. 2 Instructor in Truck Crops and Junior Plant Physiologist in the Experi. *Smithsonian Institution Annual Report*. 1884–949.
- Holmes, M.G. & Smith, H. 1977. the Function of Phytochrome in the Natural Environment—I. Characterization of Daylight for Studies in Photomorphogenesis and Photoperiodism. *Photochemistry and Photobiology*. 25:533–8.
- Horváth, E., Janda, T., Szalai, G. & Páldi, E. 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: Differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Science*. 163:1129–35.
- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J. & Yu, D. 2017. Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: Crosstalk with other phytohormones. *Journal of Experimental Botany*. 68:1361–9.
- Hura, K., Hura, T., Rapacz, M. & Plazek, A. 2015. Effects of low-temperature hardening on the

- biochemical response of winter oilseed rape seedlings inoculated with the spores of *Leptosphaeria maculans*. *Biologia (Poland)*. 70:1011–8.
- Ivanov Dobrev, P. & Kamínek, M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 950:21–9.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O. & Thomashow, M.F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280:104–6.
- Jain, M. & Khurana, J.P. 2009. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS Journal*. 276:3148–62.
- Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S. & Popova, L.P. 2007. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry*. 68:1674–82.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. & Páldi, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208:175–80.
- Jeknić, Z., Pillman, K.A., Dhillon, T., Skinner, J.S., Veisz, O., Cuesta-Marcos, A., Hayes, P.M., Jacobs, A.K., Chen, T.H.H. & Stockinger, E.J. 2014. Hv-CBF2A overexpression in barley accelerates COR gene transcript accumulation and acquisition of freezing tolerance during cold acclimation. *Plant Molecular Biology*. 84:67–82.
- Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novák, O., Ku, S.J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.J., Strnad, M. & Kim, J. 2010. A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 285:23371–86.
- Jiang, B., Shi, Y., Peng, Y., Jia, Y., Yan, Y., Dong, X., Li, H., Dong, J., Li, J., Gong, Z., Thomashow, M.F. & Yang, S. 2020. Cold-Induced CBF–PIF3 Interaction Enhances Freezing Tolerance by Stabilizing the phyB Thermosensor in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 13:894–906.
- Jiang, H.Y., Li, W., He, B.J., Gao, Y.H. & Lu, J.X. 2014. Sucrose metabolism in grape (*Vitis vinifera* L.) branches under low temperature during overwintering covered with soil. *Plant*

Growth Regulation. 72:229–38.

- Jiang, K. & Asami, T. 2018. Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 82:1265–300.
- Kalapos, B., Dobrev, P., Nagy, T., Vítámvás, P., Györgyey, J., Kocsy, G., Marincs, F. & Galiba, G. 2016. Transcript and hormone analyses reveal the involvement of ABA-signalling, hormone crosstalk and genotype-specific biological processes in cold- shock response in wheat. *Plant Science*. 253:86–97.
- Kalapos, B., Novák, A., Dobrev, P., Vítámvás, P., Marincs, F., Galiba, G. & Vanková, R. 2017. Effect of the winter wheat cheyenne 5A substituted chromosome on dynamics of abscisic acid and cytokinins in freezing-sensitive Chinese spring genetic background. *Frontiers in Plant Science*. 8:1–12.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. & Fankhauser, C. 2010. Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*. 91:29–66.
- Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A. & Ramezanzpour, S.S. 2014. Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 171:1106–16.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. & Salzberg, S.L. 2013. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*. 14:1–13.
- Kim, D.S. & Hwang, B.K. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*. 65:2295–306.
- Kim, H.J., Kim, Y.K., Park, J.Y. & Kim, J. 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 29:693–704.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G. & Somers, D.E. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 449:356–60.
- Klem, K., Gargallo-Garriga, A., Rattanapichai, W., Oravec, M., Holub, P., Veselá, B., Sardans,

- J., Peñuelas, J. & Urban, O. 2019. Distinct Morphological, Physiological, and Biochemical Responses to Light Quality in Barley Leaves and Roots. *Frontiers in Plant Science*. 10:1–19.
- Kliebenstein, D.J., Lim, J.E., Landry, L.G. & Last, R.L. 2002. Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human Regulator of Chromatin Condensation 1. *Plant Physiology*. 130:234–43.
- Kobayashi, F., Takumi, S., Nakata, M., Ohno, R., Nakamura, T. & Nakamura, C. 2004. Comparative study of the expression profiles of the Cor/Lea gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*. 120:585–94.
- Kohnen, M. V., Schmid-Siegert, E., Trevisan, M., Petrolati, L.A., S  n  chal, F., M  ller-Moul  , P., Maloof, J., Xenarios, I. & Fankhauser, C. 2016. Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. *Plant Cell*. 28:2889–904.
- Kono, M., Kawaguchi, H., Mizusawa, N., Yamori, W., Suzuki, Y. & Terashima, I. 2020. Far-red light accelerates photosynthesis in the low-light phases of fluctuating light. *Plant and Cell Physiology*. 61:192–202.
- Kono, M., Yamori, W., Suzuki, Y. & Terashima, I. 2017. Photoprotection of PSI by far-red light against the fluctuating light-induced photoinhibition in *Arabidopsis thaliana* and field-grown plants. *Plant and Cell Physiology*. 58:35–45.
- Kosov  , K., Holkov  , L., Pr     il, I.T., Pr     ilov  , P., Brad    ov  , M., V  t    m  v  s, P. &   apkov  , V. 2008. Expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Physiology*. 165:1142–51.
- Kosov  , K., Pr     il, I.T., V  t    m  v  s, P., Dobrev, P., Motyka, V., Flokov  , K., Nov  k, O., Ture  kov  , V., Rol     ik, J., Pe     ek, B., Tr     vnickov  , A., Gaudinov  , A., Galiba, G., Janda, T., Vlas  kov  , E., Pr     ilov  , P. & Vankov  , R. 2012. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *Journal of Plant Physiology*. 169:567–76.
- Kosov  , K., V  t    m  v  s, P., Pr     ilov  , P. & Pr     il, I.T. 2013. Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum*. 57:105–12.

- Kotilainen, T., Aphalo, P.J., Brelsford, C.C., Böök, H., Devraj, S., Heikkilä, A., Hernández, R., Kylling, A., Lindfors, A. V. & Robson, T.M. 2020. Patterns in the spectral composition of sunlight and biologically meaningful spectral photon ratios as affected by atmospheric factors. *Agricultural and Forest Meteorology*. 291:108041.
- 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*. 21:1–24.
- Ku, Y.S., Sintaha, M., Cheung, M.Y. & Lam, H.M. 2018. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses.
- Kurepin, L. V., Dahal, K.P., Savitch, L. V., Singh, J., Bode, R., Ivanov, A.G., Hurry, V. & Hüner, N.P.A. 2013. Role of CBFs as integrators of chloroplast redox, phytochrome and plant hormone signaling during cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:12729–63.
- Kurepin, L. V., Walton, L.J., Hayward, A., Emery, R.J.N., Pharis, R.P. & Reid, D.M. 2012. Interactions between plant hormones and light quality signaling in regulating the shoot growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Botany*. 90:237–46.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9:357–9.
- Lau, O.S. & Deng, X.W. 2010. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*. 13:571–7.
- Lee, C.M. & Thomashow, M.F. 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:15054–9.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E. & Marion-Poll, A. 2006. Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant Journal*. 45:309–19.
- Leone, M., Keller, M.M., Cerrudo, I. & Ballaré, C.L. 2014. To grow or defend? Low red: Far-red

- ratios reduce jasmonate sensitivity in *Arabidopsis* seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*. 204:355–67.
- Li, Q. & Kubota, C. 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany*. 67:59–64.
- Li, X., Ma, D., Lu, S.X., Hu, X., Huang, R., Liang, T., Xu, T., Tobin, E.M. & Liu, H. 2016. Blue light- and low temperature-regulated COR27 and COR28 play roles in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*. 28:2755–69.
- Lindl f, A. 2010. Interplay between low-temperature pathways and light reduction. *Plant Signaling and Behavior*. 5:820–5.
- Linkosalo, T. & Lechowicz, M.J. 2006. Twilight far-red treatment advances leaf bud burst of silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiology*. 26:1249–56.
- Liu, J.Y., Zhang, C., Shao, Q., Tang, Y.F., Cao, S.X., Guo, X.O., Jin, Y.Z. & Qi, H.Y. 2016. Effects of abiotic stress and hormones on the expressions of five 13-CmLOXs and enzyme activity in oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Journal of Integrative Agriculture*. 15:326–38.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H. & Miura, S. 1998. Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought-and Low-Temperature. *The Plant Cell Online*. 10:1391–406.
- Liu, Y., Dang, P., Liu, L. & He, C. 2019. Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. 38:511–9.
- Liu, Z., Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Li, Z., Guo, Y., Gong, Z. & Yang, S. 2017. Plasma Membrane CRPK1-Mediated Phosphorylation of 14-3-3 Proteins Induces Their Nuclear Import to Fine-Tune CBF Signaling during Cold Response. *Molecular Cell*. 66:117-128.e5.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25:402–8.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 15:1–21.
- Ma, L. & Li, G. 2019. Auxin-dependent cell elongation during the shade avoidance response. *Frontiers in Plant Science*. 10:1–8.

- Maibam, P., Nawkar, G.M., Park, J.H., Sahi, V.P., Lee, S.Y. & Kang, C.H. 2013. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:11527–43.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. & Marion-Poll, A. 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*. 15:2331–42.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 17:10.
- McKenzie, J.S., Weiser, C.J. & Burke, M.J. 1974. Effects of Red and Far Red Light on the Initiation of Cold Acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. . *Plant Physiology*. 53:783–9.
- Méndez-Hernández, H.A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R.N., Juárez-Gómez, Y.L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C. & Loyola-Vargas, V.M. 2019. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 10:1–15.
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P.M. & Bailey-Serres, J. 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. 16:237–51.
- Miller, A.K., Galiba, G. & Dubcovsky, J. 2006. A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 275:193–203.
- Miura, K. & Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*. 5:1–12.
- Monostori, I., Heilmann, M., Kocsy, G., Rakszegi, M., Ahres, M., Altenbach, S.B., Szalai, G., Pál, M., Toldi, D., Simon-Sarkadi, L., Harnos, N., Galiba, G. & Darko, É. 2018. LED lighting – modification of growth, metabolism, yield and flour composition in wheat by spectral quality and intensity. *Frontiers in Plant Science*. 9:1–16.
- Monteagudo, A., Kiss, T., Mayer, M., Casas, A.M., Igartua, E. & Karsai, I. 2020. Genetic diversity in developmental responses to light spectral quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology*. 20:1–14.
- Moreno, J.E., Tao, Y., Chory, J. & Ballaré, C.L. 2009. Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America. 106:4935–40.
- Mori, K., Renhu, N., Naito, M., Nakamura, A., Shiba, H., Yamamoto, T., Suzaki, T., Iida, H. & Miura, K. 2018. Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺ increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*. 8:1–10.
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Shirley, N., Langridge, P. & Lopato, S. 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*. 9:230–49.
- Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., Atici, Ö. & Nalbantoğlu, B. 2013. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biologia Plantarum*. 57:507–13.
- Mutlu, Salih, Karadağoglu, Ö., Atici, Ö., Taşgin, E. & Nalbantoğlu, B. 2013. Time-dependent effect of salicylic acid on alleviating cold damage in two barley cultivars differing in cold tolerance. *Turkish Journal of Botany*. 37:343–9.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. 2005. Absciscic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. 56:165–85.
- Navarro, M., Marque, G., Ayax, C., Keller, G., Borges, J.P., Marque, C. & Teulieres, C. 2009. Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal of Experimental Botany*. 60:2713–24.
- Novák, A., Boldizsár, Á., Ádám, É., Kozma-Bognár, L., Majláth, I., Bága, M., Tóth, B., Chibbar, R. & Galiba, G. 2016. Light-quality and temperature-dependent CBF14 gene expression modulates freezing tolerance in cereals. *Journal of Experimental Botany*. 67:1285–95.
- Nurhasanah Ritonga, F. & Chen, S. 2020. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants*. 9.
- Olenichenko, N.A. & Zagorskina, N. V. 2005. Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 41:681–5.
- Olsen, J.E. & Junttila, O. 2002. Far red end-of-day treatment restores wild type-like plant length in hybrid aspen overexpressing phytochrome A. *Physiologia Plantarum*. 115:448–57.

- Panigrahy, M., Majeed, N. & Panigrahi, K.C.S. 2020. Low-light and its effects on crop yield: Genetic and genomic implications. *Journal of Biosciences*. 45:1–15.
- Parks, B.M. 2003. The Red Side of Photomorphogenesis. *Plant Physiology*. 133:1437–44.
- Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B. & Černý, M. 2018. Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 19:1–36.
- Pociecha, E., Płazek, A., Janowiak, F. & Zwierzykowski, Z. 2008. ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 73:126–32.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotellet, V., Galaud, J.P., Thuleau, P. & Mazars, C. 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–7.
- Reddy, A.S.N., Ali, G.S., Celesnik, H. & Day, I.S. 2011. Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*. 23:2010–32.
- Reddy, S.K., Holalu, S. V., Casal, J.J. & Finlayson, S.A. 2013. Absciscic acid regulates axillary bud outgrowth responses to the ratio of red to far-red light. *Plant Physiology*. 163:1047–58.
- Rizza, F., Karsai, I., Morcia, C., Badeck, F.W., Terzi, V., Pagani, D., Kiss, T. & Stanca, A.M. 2016. Association between the allele compositions of major plant developmental genes and frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of different origin. *Molecular Breeding*. 36.
- Rizzini, L., Favory, J., Cloix, C., Faggionato, D., Hara, A.O., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I. & Ulm, R. 2011. 103.Full. 332:103–6.
- Ruelland, E. & Zachowski, A. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*. 69:225–32.
- Ryu, H. & Cho, Y.G. 2015. Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*. 58:147–55.
- Sæbø, A., Krekling, T. & Appelgren, M. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 41:177–85.

- Sakakibara, H. 2006. CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57:431–49.
- Sarhan, F., Ouellet, F. & Vazquez-Tello, A. 1997. The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiologia Plantarum*. 101:439–45.
- Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I.D., Großkinsky, D.K., Vankova, R., Baldwin, I.T. & Meldau, S. 2015. The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *Journal of Experimental Botany*. 66:4873–84.
- Schwartz, S.H. 1997. Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science*. 276:1872–4.
- Seiler, C., Harshavardhan, V.T., Rajesh, K., Reddy, P.S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. & Sreenivasulu, N. 2011. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 62:2615–32.
- Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E. & Koshiba, T. 2004. Comparative studies on the Arabidopsis aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and Cell Physiology*. 45:1694–703.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G. & Yamaguchi, S. 2009. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*. 69:463–72.
- Sharma, M. & Laxmi, A. 2016. Jasmonates: Emerging Players in Controlling Temperature Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 6.
- Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q. & Liu, H. 2018. The arabidopsis calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 19.
- Shigenaga, A.M. & Argueso, C.T. 2016. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 56:174–89.
- Shinkawa, R., Morishita, A., Amikura, K., Machida, R., Murakawa, H., Kuchitsu, K. & Ishikawa, M. 2013. Absciscic acid induced freezing tolerance in chilling-sensitive

- suspension cultures and seedlings of rice. *BMC Research Notes*. 6:1.
- Singh, S., Agrawal, S.B. & Agrawal, M. 2015. Role of Light in Plant Development. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT AND ENVIRONMENT*. 1:43–56.
- Smith, H. & Whitelam, G.C. 1997. The shade avoidance syndrome: Multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment*. 20:840–4.
- Soltész, A., Smedley, M., Vashegyi, I., Galiba, G., Harwood, W. & Vágújfalvi, A. 2013. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 64:1849–62.
- Steponkus, P.L. 1984. Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*. 35:543–84.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. & Thomaschow, M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:1035–40.
- Stockinger, E.J., Skinner, J.S., Gardner, K.G., Francia, E. & Pecchioni, N. 2007. Expression levels of barley Cbf genes at the Frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at Fr-H1 and Fr-H2. *Plant Journal*. 51:308–21.
- Sutka, J. 1981. Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 59:145–52.
- Szalai, G., Majláth, I., Pál, M., Gondor, O.K., Rudnóy, S., Oláh, C., Vanková, R., Kalapos, B. & Janda, T. 2018. Janus-faced nature of light in the cold acclimation processes of maize. *Frontiers in Plant Science*. 9:1–17.
- Szalai, G., Pap, M. & Janda, T. 2009. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants. *Journal of Plant Physiology*. 166:1826–31.
- Taniguchi, S., Hosokawa-Shinonaga, Y., Tamaoki, D., Yamada, S., Akimitsu, K. & Gomi, K. 2014. Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant, Cell and Environment*. 37:451–61.

- Theocharis, A., Clément, C. & Barka, E.A. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235:1091–105.
- Thomashow, M.F. 1994. 30 *Arabidopsis thaliana* as a Model for Studying Mechanisms of Plant Cold Tolerance. Cold Spring Harbor Monograph Archive. Archive 27:807–34.
- Thomashow, M.F. 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:571–99.
- Tondelli, A., Francia, E., Barabaschi, D., Aprile, A., Skinner, J.S., Stockinger, E.J., Stanca, A.M. & Pecchioni, N. 2006. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:445–54.
- Tondelli, A., Pagani, D., Ghafoori, I.N., Rahimi, M., Ataei, R., Rizza, F., Flavell, A.J. & Cattivelli, L. 2014. Allelic variation at Fr-H1/Vrn-H1 and Fr-H2 loci is the main determinant of frost tolerance in spring barley. *Environmental and Experimental Botany*. 106:148–55.
- Tuteja, N. 2007. Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling and Behavior*. 2:135–8.
- Vágújfalvi, A., Aprile, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G. & Cattivelli, L. 2005. The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*. 274:506–14.
- Vágújfalvi, A., Galiba, G., Cattivelli, L. & Dubcovsky, J. 2003. The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. *Molecular Genetics and Genomics*. 269:60–7.
- Vágújfalvi, A., Galiba, G., Dubcovsky, J. & Cattivelli, L. 2000. Two loci on wheat chromosome 5A regulate the differential cold-dependent expression of the cor14b gene in frost-tolerant and frost-sensitive genotypes. *Molecular and General Genetics*. 263:194–200.
- Vanková, R., Kosová, K., Dobrev, P., Vítámvás, P., Trávníčková, A., Cvikrová, M., Pešek, B., Gaudinová, A., Prerostová, S., Musilová, J., Galiba, G. & Prášil, I.T. 2014. Dynamics of cold acclimation and complex phytohormone responses in *Triticum monococcum* lines G3116 and DV92 differing in vernalization and frost tolerance level. *Environmental and Experimental Botany*. 101:12–25.

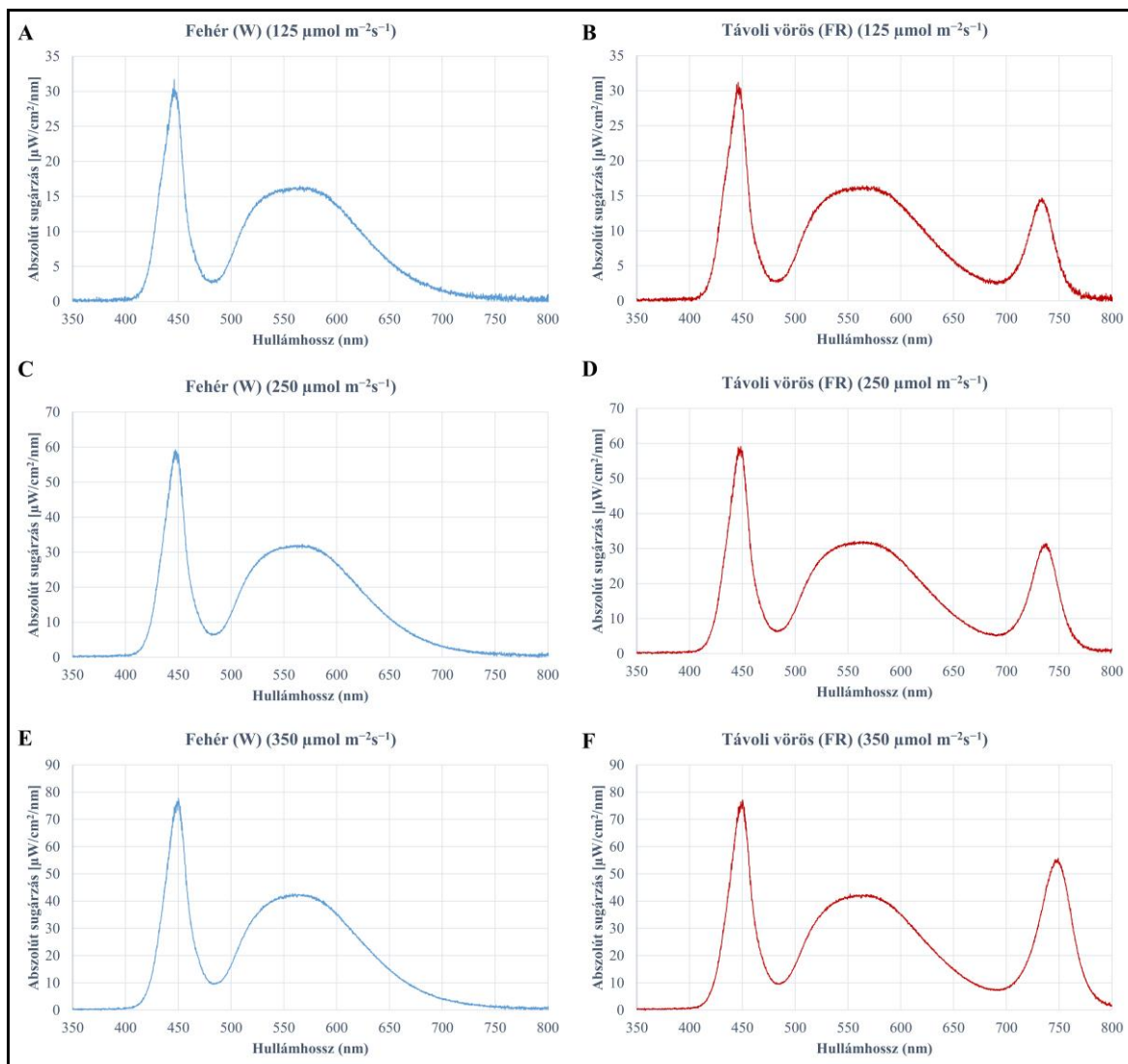
- Vergnolle, C., Vaultier, M.-N., Taconnat, L., Renou, J., Kader, J., Zachowski, A. & Ruelland, E. 2005. The Cold-Induced Early Activation of Phospholipase C and D Pathways Determines the Response of Two Distinct Clusters of Genes in Arabidopsis Cell Suspensions. *Plant Physiology*. 139:1217–33.
- Vítámvás, P., Saalbach, G., Prášil, I.T., Čapková, V., Opatrná, J. & Ahmed, J. 2007. WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology*. 164:1197–207.
- Voitsekhovskaja, O. V. 2019. Phytochromes and Other (Photo)Receptors of Information in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 66:351–64.
- Wang, F., Guo, Z., Li, H., Wang, M., Onac, E., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J. & Zhou, Y. 2016. Phytochrome a and b function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling 1. *Plant Physiology*. 170:459–71.
- Wang, X., Wu, D., Yang, Q., Zeng, J., Jin, G., Chen, Z.H., Zhang, G. & Dai, F. 2016. Identification of mild freezing shock response pathways in barley based on transcriptome profiling. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–13.
- Wang, Y.H. & Irving, H.R. 2011. Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling and Behavior*. 6:494–500.
- Wanner, L.A. & Junttila, O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in arabidopsis. *Plant Physiology*. 120:391–9.
- Watson, A., Ghosh, S., Williams, M.J., Cuddy, W.S., Simmonds, J., Rey, M.D., Asyraf Md Hatta, M., Hinchliffe, A., Steed, A., Reynolds, D., Adamski, N.M., Breakspear, A., Korolev, A., Rayner, T., Dixon, L.E., Riaz, A., Martin, W., Ryan, M., Edwards, D., Batley, J., Raman, H., Carter, J., Rogers, C., Domoney, C., Moore, G., Harwood, W., Nicholson, P., Dieters, M.J., Delacy, I.H., Zhou, J., Uauy, C., Boden, S.A., Park, R.F., Wulff, B.B.H. & Hickey, L.T. 2018. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature Plants*. 4:23–9.
- Webb, M.S., Uemura, M. & Steponkus, P.L. 1994. A comparison of freezing injury in oat and rye: Two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology*. 104:467–78.
- Weijers, D., Nemhauser, J. & Yang, Z. 2018. Auxin: small molecule, big impact. *Journal of Experimental Botany*. 69:133–6.

- Welling, A., Rinne, P., Viherä-Aarnio, A., Kontunen-Soppela, S., Heino, P. & Palva, E.T. 2004. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *Journal of Experimental Botany*. 55:507–16.
- Wilkins, K.A., Matthus, E., Swarbreck, S.M. & Davies, J.M. 2016. Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–17.
- Williams, B.J., Pellett, N.E. & Klein, R.M. 1972. Phytochrome Control of Growth Cessation and Initiation of Cold Acclimation in Selected Woody Plants. *Plant Physiology*. 50:262–5.
- Wingler, A., Tijero, V., Müller, M., Yuan, B. & Munné-Bosch, S. 2020. Interactions between sucrose and jasmonate signalling in the response to cold stress. *BMC Plant Biology*. 20:1–13.
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T. & Macarisin, D. 2011. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*. 233:971–83.
- Xu, D., Li, J., Gangappa, S.N., Hettiarachchi, C., Lin, F., Andersson, M.X., Jiang, Y., Deng, X.W. & Holm, M. 2014. Convergence of Light and ABA Signaling on the ABI5 Promoter. *PLoS Genetics*. 10.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*. 6:251–64.
- Yang, C. & Li, L. 2017. Hormonal regulation in shade avoidance. *Frontiers in Plant Science*. 8:1–8.
- Yang, Y., Qi, M. & Mei, C. 2004. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant Journal*. 40:909–19.
- Yuan, P., Yang, T. & Poovaiah, B.W. 2018. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 19:1–11.
- Zadoks, J.C. & Board, E. 1999. Data sheet highlights close coupled pumps. *World Pumps*. 1999:9.
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D. & Thomashow, M.F. 2003. Cold Induction of Arabidopsis

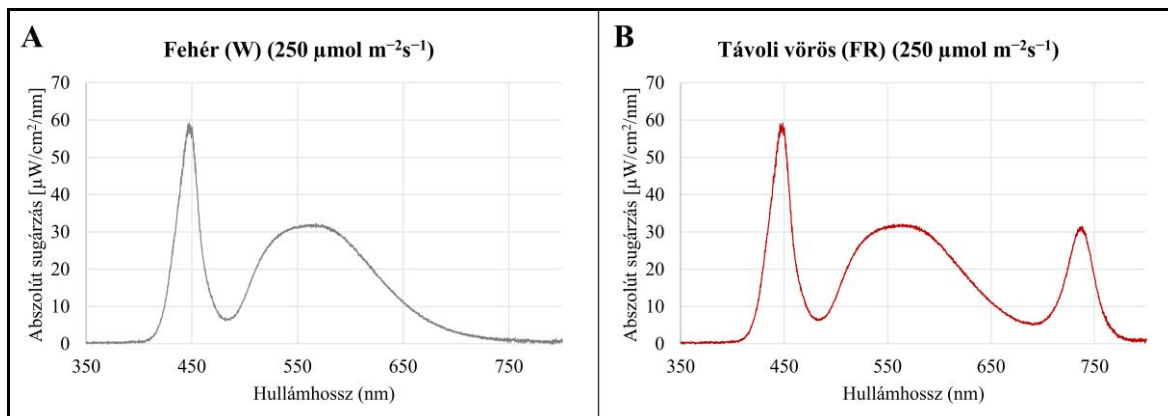
- CBF Genes Involves Multiple ICE (Inducer of CBF Expression) Promoter Elements and a Cold-Regulatory Circuit That Is Desensitized by Low Temperature. *Plant Physiology*. 133:910–8.
- Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D.S., McKinney, S.A. & Higgins, T.J.V. 1995. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene. *Planta: An International Journal of Plant Biology*. 196:84–94.
- Zhao, Y. 2014. Auxin Biosynthesis. *The Arabidopsis Book*. 12:e0173.
- Zhou, M., Chen, H., Wei, D., Ma, H. & Lin, J. 2017. Arabidopsis CBF3 and DELLAs positively regulate each other in response to low temperature. *Scientific Reports*. 7:1–13.
- Zhou, Y., Zhang, D., An, J., Yin, H., Fang, S., Chu, J., Zhao, Y. & Li, J. 2018. TCP transcription factors regulate shade avoidance via directly mediating the expression of both PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs and auxin biosynthetic genes. *Plant Physiology*. 176:1850–61.
- Zhu, H., Li, X., Zhai, W., Liu, Y., Gao, Q., Liu, J., Ren, L., Chen, H. & Zhu, Y. 2017. Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* Makino). *PLoS ONE*. 12:1–17.
- Zhu, J.K. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 167:313–24.
- Zolotarov, Y. & Strömvik, M. 2015. De novo regulatory motif discovery identifies significant motifs in promoters of five classes of plant dehydrin genes. *PLoS ONE*. 10:1–19.

M2. TOVÁBBI MELLÉKLETEK

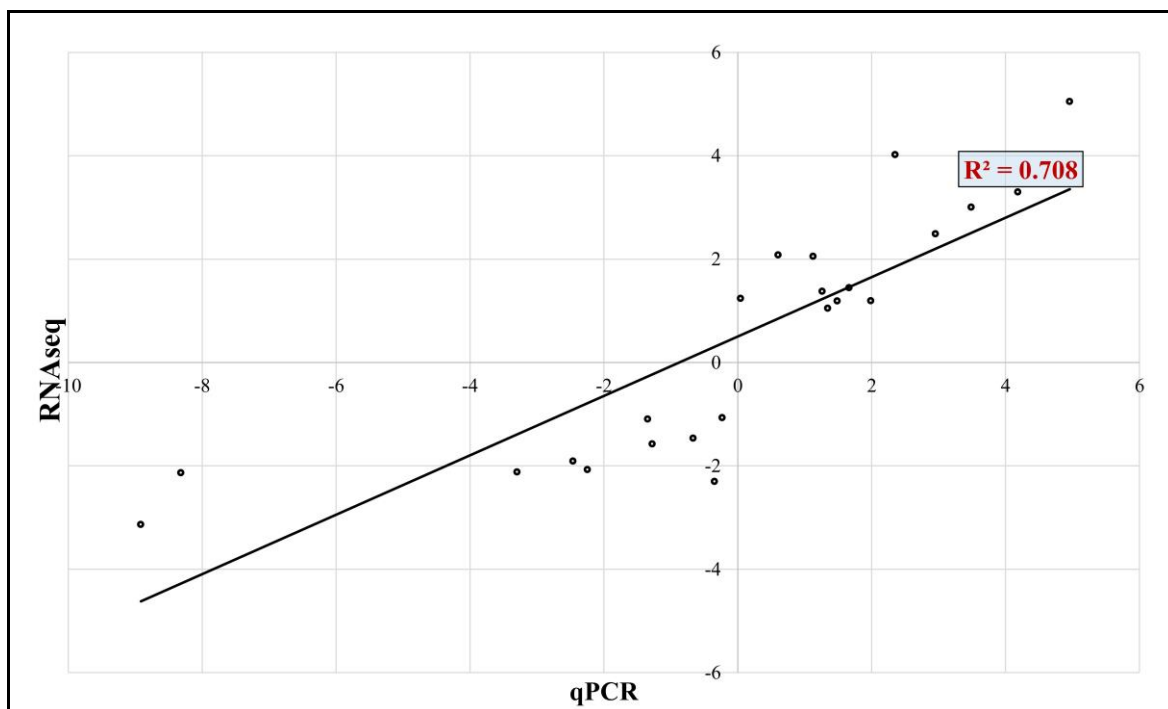
M2. 1. Ábra Az első kísérleti rendszerben felhasznált fények spektrális összetétele. **A:** a fehér fény spektrális összetétele $125 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson. **B:** a fehér fény spektrális összetétele, távoli vörös fénykiegészítéssel $125 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson. **C:** a fehér fény spektrális összetétele $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson. **D:** a fehér fény spektrális összetétele, távoli vörös fénykiegészítéssel $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson. **E:** a fehér fény spektrális összetétele $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson. **F:** a fehér fény spektrális összetétele, távoli vörös fénykiegészítéssel $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitáson.



M2. 2. Ábra A második kísérleti rendszerben használt fények spektrális összetétele $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitással. **A:** a fehér fény spektrális összetétele **B:** a fehér fény spektrális összetétele, távoli vörös fénykiegészítéssel.



M2. 3. ábra Az RNAseq validálása qPCR-rel történő összehasonlítással. Az R-négyzet egy statisztikai mérőszáma annak, hogy az adatok milyen közel vannak az illesztett regressziós vonalhoz. Az X tengelyen a qPCR-rel mért génexpressziós szintek láthatók. Az Y tengelyen az RNAseq expressziós szintjei vannak feltüntetve. Az ábrán szereplő adatok Log_2 -ben vannak megjelenítve.



M2. 1. táblázat A Grant GP-200-R4 fagyasztó készülék fagyasztási programjai a különböző mintavételi időpontok alapján. **Program 1.:** A még nem akklimatizációs hőmérsékleten (15 °C) vett minták fagyasztási programja. **Program 2.:** Az alacsony hőmérsékleten (5 °C) kezelt minták fagyasztási programja.

Program 1.				Program 2.		
Fázis	Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)		Fázis	Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)
A minták bekerülésének ideje	2 °C	3 óra		A minták bekerülésének ideje	2 °C	3 óra
A hőmérséklet csökkenése / A fagyreakció kezdete	0 °C	1 óra		A hőmérséklet csökkenése / A fagyreakció kezdete	0 °C	1 óra
A hidegedződés modellezése	-2 °C	18 óra		A hidegedződés modellezése	-2 °C	18 óra
Fagyasztási hőmérsékletek	-5 °C	1 óra		Fagyasztási hőmérsékletek	-8 °C	1 óra
	-7 °C	1 óra			-10 °C	1 óra
	-9 °C	1 óra			-12 °C	1 óra
A program vége	2 °C	∞		A program vége	2 °C	∞
Összesen: 25 óra				Összesen: 25 óra		

M2. 2. Táblázat A hormonanalízis eredményeit összefoglaló táblázat. **FR-M:** A 18 napos árpa növények tíz napig történő FR kezelése 15 ° C-on. **FR-M / FR-C (28):** 28 napos FR edzett növények további hét napig 5°C-on történő kezelése. **FR-C (18):** 18 napos egyedek kombinált hideg (5 °C) és FR kezelése hét napon keresztül. **W** - fehér fény; **FR** – táboli vörös fénnel kiegészített fehér fény.

Kezelés	Hőmérséklet (°C)	Idő / Fény	Átlagok / Szórások	ABA	PA	9OH-ABA	IAA	OxIAA	PAA	SA	JA	cis-OPDA	cZ	tZ	iPR	cZR	cZOG	iP7G	iP9G
FR-M	15°C	1. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	16.15 2.18	36.61 6.66	15.93 3.15	50.11 5.35	35.04 2.72	759.37 98.89	282.60 19.96	48.55 20.21	5164.41 1943.06	224.42 29.43	3.01 1.31	17.51 5.77	246.67 10.15	68.35 3.58	28.65 5.72	0.60 0.67
		1. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	27.49 1.94	75.05 20.07	15.48 4.87	78.55 8.53	40.58 5.78	999.72 34.90	293.83 48.17	35.61 8.10	1335.20 122.38	350.48 57.17	6.32 1.99	10.62 0.90	265.34 32.83	68.55 8.93	29.59 1.02	2.23 3.13
		10. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	15.30 0.98	114.28 13.51	30.01 2.19	63.04 5.13	38.74 3.21	686.19 37.14	295.61 48.05	31.06 7.98	3238.08 669.72	237.18 29.59	2.82 0.71	12.91 0.78	180.22 33.44	117.40 8.82	34.94 0.93	1.61 0.57
		10. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	25.15 1.12	96.09 11.11	24.34 4.32	80.34 12.58	43.36 9.53	826.44 131.37	270.33 61.11	16.48 3.08	466.24 27.57	109.06 24.99	6.57 1.19	2.98 1.91	138.14 23.79	97.66 5.03	130.26 30.91	1.35 1.28
FR-M / FR-C(28)	5°C	1. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	37.34 5.75	147.39 9.28	24.08 3.76	71.98 1.35	65.41 4.84	782.92 7.96	309.28 38.98	8.44 0.97	1287.76 208.24	542.16 42.65	2.45 1.31	14.32 0.64	199.74 34.06	126.23 9.82	44.11 0.76	0.47 0.42
		1. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	27.64 3.46	93.67 11.57	19.19 0.46	67.12 8.76	33.00 4.16	865.42 86.45	251.68 26.81	2.44 2.17	477.63 47.79	85.83 10.10	4.91 0.63	5.40 1.70	166.86 33.03	86.11 18.06	55.02 12.70	0.49 0.47
		7. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	13.29 2.08	183.10 13.19	48.42 4.18	35.67 5.04	75.34 10.05	355.05 13.14	244.47 30.23	31.71 3.45	511.88 25.15	368.06 35.28	3.22 1.71	3.96 1.67	94.61 9.18	106.06 10.54	55.01 6.38	4.48 3.85
		7. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	16.64 2.46	114.49 3.13	17.15 0.34	53.96 8.04	29.85 0.09	480.22 13.56	265.86 53.11	13.04 1.01	447.72 1.21	114.57 9.05	4.00 0.96	4.44 2.02	100.54 21.30	100.75 12.30	23.51 8.37	0.25 0.42
FR-C(18)	5°C	1. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	26.21 3.93	183.26 17.52	43.74 14.90	50.07 10.81	43.16 5.92	1416.47 418.86	368.24 25.35	80.32 12.18	481.46 70.20	198.67 31.21	7.01 2.18	37.30 11.40	91.81 16.93	67.03 9.95	9.54 1.08	0.85 0.56
		1. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	30.99 4.16	271.55 19.63	46.81 10.14	41.34 4.24	43.86 14.57	3228.98 337.19	244.99 14.76	71.15 18.03	336.91 39.62	563.48 73.72	4.78 0.38	113.62 16.81	295.34 50.64	68.52 6.29	10.50 2.26	0.87 0.46
		7. nap W	ÁTLAG SZÓRÁS	23.63 1.90	169.10 23.31	48.12 12.92	69.67 10.70	40.23 13.00	2020.28 125.26	357.24 16.28	115.09 25.76	391.58 60.64	330.49 38.75	14.03 3.70	96.93 31.33	185.79 60.43	65.42 4.45	17.74 7.53	1.59 0.54
		7. nap FR	ÁTLAG SZÓRÁS	22.26 2.95	151.72 41.01	40.00 8.42	57.57 11.01	66.87 15.98	2305.86 522.77	180.20 43.20	73.01 19.85	381.76 163.96	1149.73 86.62	16.24 4.94	193.77 29.67	343.82 39.21	53.63 7.88	18.13 1.27	0.51 0.36

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Balázs Ervin Igazgató Úrnak, valamint a kapcsolódó pályázati forrásoknak (OTKA K 128575, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008) munkám és egyben tanulmányaim támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Galiba Gábor professzor úrnak, aki lehetőséget biztosított arra, hogy munkámat az Ő irányítása alatt végezhessem. Köszönettel tartozom a szakmai irányításáért és a kutatómunkámhoz elengedhetetlen feltételek biztosításáért. Az ő iránymutatása és folyamatos támogatása, valamint belém vetett hite erősítette a kutatói pályához való ragaszkodásomat.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani, Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet mindazon dolgozójának, akik segítségével ez a doktori (PhD) értekezés nem készülhetett volna el.

Köszönetet mondok továbbá Fehér E. Mónika és Horváth Imréné asszisztenseknek, akik a labormunkák gyorsabb és gördülékenyebb elvégzése mellett, számos mintavételnél is segítségemre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban külön köszönöm Édesanyámnak, aki odaadásával és szeretetével tette lehetővé, hogy azzá az emberré váljak, aki ma vagyok. Köszönöm továbbá családomnak és barátaimnak a biztatást és bátorítást, és természetesen azt is, hogy végig mellettem álltak az elmúlt években.