

Zárójelentés

Gabonafélék stresszadaptációját befolyásoló jelátviteli folyamatok tanulmányozása

(K75584 sz. OTKA pályázat)

A tervezett kísérletek célja, hogy jobban megértsük a növények változó környezetre adott válaszreakcióit. A munka első fázisában gabonafélék hidegedzése során vizsgáltuk a fény hatását a poliamin- és hormonszintre. Előkísérleteink szerint a NO-mentes *Arabidopsis* növények hidegérzékenysége fokozódott. Ezeket a vizsgálatokat terveztük folytatni több mutáns vonal bevonásával, valamint a NO mint jelátvivő, és más szabályozási utak kapcsolatának felderítésével. Az *Arabidopsis* mint modellnövény felhasználásával kapott eredmények sok esetben csak korlátozott mértékben általánosíthatók oly mértékben, hogy ezáltal gabonafélék stresszadaptációs folyamatait értelmezni tudjuk. Erre való tekintettel a vizsgálatok második felében párhuzamos összehasonlító kísérletekkel, többek közt mikrochip technika alapuló génexpressziós vizsgálatokkal azt tanulmányoztuk, hogy a modellnövényekben fontosnak ígérkező jelátviteli utak, valamint stresszellenállóságot szabályozó folyamatok mennyire befolyásolják a gabonafélék stresszellenállóságát is. Az egyes jelátvivő, valamint védő vegyületekkel kapcsolatos eredményeink alapot biztosíthatnak az adott vegyületek mint stressztoleranciát fokozó anyagok gazdaságos felhasználásának kidolgozásához.

A munkaterv a következő volt:

1.év

Növényi anyag nevelése, mintagyűjtés, fotoszintézis mérések. A fény gabonafélék egyes élettani paramétereire (elsősorban glutation-anyagcsere, hormonális változások, stb.) gyakorolt hatásainak vizsgálata alacsony hőmérsékleti edzés során különböző fagyállósággal rendelkező gabonafajtákban.

2.év

Az első év vizsgálatainak folytatása, továbbá különböző jelátviteli utakat (elsősorban abszcizinsav, NO, stb.) érintő mutáns és transzgenikus modellnövények (*Arabidopsis*) élettani vizsgálata: ezen belül elsősorban az adott gének stressztűrő képességet befolyásoló hatásainak tanulmányozása.

3.év

Azon genotípusok, melyek stressztűrő képességet jelentősen befolyásoló géneket hordoztak, további élettani vizsgálatai: kapcsolatok felderítése az adott gén, valamint egyéb jelátviteli utak között. A

modellnövényekben jelentősnek talált jelátviteli utak tanulmányozása gabonafélékben annak felderítése érdekében, hogy a kapott eredmények mennyire általánosíthatók a gazdaságilag jelentős gabonafélék esetében is.

4.év

Az előző évi kísérletek folytatása, lezárása, ellenőrző kísérletek végzése, publikációk lezárása.

Eredmények

Az **első évben** a fény hatását vizsgáltuk eltérő fagyállósággal rendelkező gabonafélék egyes élettani paramétereire. Vizsgálatainkhoz az Mv Emese jó fagyállóságú őszi búzát és a Nadro gyenge fagyállóságú tavaszi búzát használtuk. A búzák edzése 5°C-on történt normál és alacsony fényintenzitáson, valamint 20°C-on magasabb fényintenzitáson. Kontrollnak 20°C-on, normál fényintenzitáson nevelt növényeket használtunk.

A glutation-S-transzferáz enzim aktivitása mindkét fajtánál, mindhárom edzésnél megnőtt, de az Emesében kicsit nagyobb mértékben. A poliaminok mennyiségének változását is néztük a különböző edzési körülmények között. A putreszcin szintje Nadroban hidegben mindkét esetben lecsökkent, de fényben nagyobb mértékben. Emesében viszont alacsony hőmérsékleten fényben nagymértékű növekedést, míg kismértékű megvilágításnál csökkenést tapasztaltunk. A spermidin szintje alacsony hőmérsékleten fényben mind a Nadroban, mind az Emesében megnőtt. A spermin szintje viszont csak a Nadroban növekedett hidegben, de mind normál, mind alacsony fényintenzitás mellett. Néztük az indolecetesav és az abszcezinsav változását is. Emesében 20°C-on magas fényintenzitásnál az indolecetsav mennyisége nagymértékben megemelkedett, de alacsony hőmérsékleten is megnőtt a szintje mindkét megvilágításnál, ha nem is olyan nagymértékben. Nadroban a kontrollban már eleve magasabb volt a szintje, mint Emesében, de edzés hatására nem változott. Az abszcezinsav szintje mindkét fajtában lecsökkent az edzések hatására.

Végeztünk fagyállósági kísérleteket is a különböző edzési módok tesztelésére 3 tavaszi (Nadro, Lona, Azteca 67) és 3 őszi (Mv Emese, Mv 4, Cheyenne) búzával. A normál fényben 5 °C-on 12 napig hidegedzett búzákat 1 napig -12 °C-on tartottuk, majd néztük a túlélést. A túlélési %-ok a következők voltak: tavaszi: Lona: 0%; Nadro: 6,7%; Azteca 67: 13%. Őszi: Mv 4: 50%; Mv Emese: 53%; Cheyenne: 90%. A 20 °C-on magas fényintenzitáson (500 µmol/m² s) edzett növényeket -10 °C-on fagyasztottuk 1 napig és utána néztük a túlélést. Tavaszi: Azteca 67: 10%; Nadro: 17%; Lona: 18%. Őszi: Cheyenne: 44%; Mv 4: 49%; Mv Emese: 73%. Edzés nélkül a növények közül egy sem élte túl a -10 °C-os fagyasztást sem. Tehát megállapíthatjuk, hogy normál hőmérsékleten, de magasabb fényintenzitáson is elérhető valamilyen edzettségi fok, még ha nem is ugyanakkora, mint alacsony hőmérsékleten normál fényviszonyok között. Az őszi búzák nemcsak alacsony hőmérséklettel, hanem normál hőmérsékleten magasabb fényintenzitással is jobban edzhetőek, mint a tavaszi fajták.

A **második évben** különböző jelátviteli utakat érintő mutáns és transzgenikus modellnövények (*Arabidopsis*) élettani vizsgálata: ezen belül elsősorban az adott gének stressztűrő képességet befolyásoló hatásainak tanulmányozása volt a feladat.

Az *Arabidopsis*-ban végzett hideg- és fagytűrési vizsgálatokhoz a következő mutánsokat és transzgenikus növényeket használtuk: vtc: alacsony C-vitamin tartalmú mutáns; Glo: magas C-vitamin tartalmú transzgenikus növény; NOS: mitokondriális GTPáz mutáns, csökkent NO szinttel; Sid3-2: SA szintézisút sérült a kloroplasztisban; Eds 5-1: a SA transzportja gátolt a kloroplasztisból; NahG: SA-t bontó transzgenikus növény, ill. a Col-0: vad genotípus.

Hidegedzett (3- 4 °C) és edzetlen növényeken fagyasztási tesztek végeztünk. A bonitálási adatok és a membránkárosodás mérése alapján csak a hidegedzettek éltek túl. Megállapítottuk, hogy a mutáns és transzgenikus növények is hidegedzhetők, bár a későbbi túlélés mértéke alacsonyabb, mint a vad genotípusnál. Az egyes genotípusok közötti túlélési különbségek a következőképpen alakultak: a vtc, a Glo és a NahG esetén kisebb, a NOS, valamint a Sid 3-2 és az Eds 5-1 esetén nagyobb a túlélők aránya.

Vizsgáltuk az egyes genotípusok közötti anyagcsere különbségek változásait kontroll (20 °C) hőmérsékleti körülmények között, valamint az előzetes hidegedzés hatására. A klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterekben ($\Delta F/F_m'$ és F_v/F_m) kontroll hőmérsékleten csak a NOS mutánsban volt eltérés a többi genotípushoz képest.

Az antioxidáns enzimek aktivitásváltozását kontroll és hidegedzett növényeken vizsgáltuk. Hideg hatására a Col-0 -ban szignifikánsan csökkent az aszkorbát-peroxidáz aktivitása, a vtc-ben növekedett a glutation-reduktáz-, csökkent kataláz és az aszkorbát-peroxidáz aktivitás a kontrollhoz képest. A NOS mutánsban csak a glutation-reduktáz aktivitása növekedett szignifikánsan a kontrollhoz képest. Kontroll körülmények között szignifikánsan alacsonyabb szabad- és kötött szalicilsav szintet mutattunk ki a vad típushoz képest a Sid3-2, a NahG és az Eds-1 esetén. A NOS mutánsban és a Glo transzgenikus fajtában a kötött szalicilsav szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Hidegedzés hatására a vtc-ben csökkent a szabad szalicilsav mennyisége. A kötött forma esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a Col-0, a vtc és a NahG, kisebb mértékben az Eds 5-1 és a Sid 3-2 esetében.

Négy vizsgált poliamin (agmatin, putreszcin, spermidin, spemin) közül a putreszcin szintje szignifikánsan megemelkedett, a spermin szintje pedig csökkent a mind a vad, mind a mutáns genotípusokban.

A harmadik évben feladatunk volt a különböző jelátviteli utak tanulmányozása gabonafélékben annak felderítése érdekében, hogy az *Arabidopsis*-ban kapott eredmények mennyire általánosíthatók a gazdaságilag jelentős gabonafélék esetében is.

A kísérletekhez az Mv Emese őszi és a Nadro tavaszi búzát használtuk. 10 napos növényeket edzettünk 5°C-on normál és alacsony fényintenzitáson. Meghatároztuk a prolin és a totál fenol mennyiségét, valamint a NO, és különböző hormonok szintjét.

Mivel a NO szintje nagyon gyorsan változik környezeti hatásokra ezért már a hideghatást követő 3. órában mértük a szintjét a növények gyökerében. Normál fényen a tavaszi búza gyökerében gyorsan emelkedett a mennyisége, míg alacsony fényen nem volt változás. Az őszi búzában is megnőtt a NO mennyisége normál fényen, de csak a gyökér csúcsához közeli területeken, ellentétben a tavaszi fajtával, ahol az egész gyökérben. Alacsony fényintenzitáción itt sem tapasztaltunk változást. Két nappal a hidegedzés kezdete után már nem volt szignifikáns eltérés a NO szintben a kiindulási értékekhez képest.

A prolin és a totál fenol tartalmat 12 napon át mértük a hidegedzés alatt. A totál fenol tartalom nem változott szignifikánsan, míg a prolin mennyisége a 3. napon emelkedést mutatott mindkét fajtában normál fényen, míg alacsony fényintenzitáción itt sem tapasztaltunk változást.

A fénynek a búza fagyállóságának kialakulásában betöltött szerepének jobb megismeréséhez micorarray módszerrel összehasonlító génexpressziós vizsgálatot is végeztünk. A két fajtában 484, ill. 349 gént mutattuk ki, melyek kifejeződése fényfüggést mutatott. Ezek nagy része a fotoszintetikus apparátus működését érintette, de ezek mellett több jelátviteli, hormonális folyamatokhoz kapcsolható, valamint stressztűrésben szerepet játszó géneket is találtunk.

Növényi hormonok

Citokininek:

Normál fényen az Mv Emese őszi búzában nem változott a bioaktív citokininek mennyisége, míg alacsony fényintenzitáción ezek mennyisége csökkent.

Ezzel ellentétben a Nadroban (tavaszi búza) megnőtt a citokininek mennyisége normál fényen, míg alacsony fényintenzitáción kismértékű csökkenést tapasztaltunk.

Auxin:

A Nadroban már eleve kétszer annyi auxin volt, mint az Mv Emesében, de hideg hatására nem nőtt meg az auxin mennyisége benne, míg az MV Emesében emelkedett a szintje, mely normál fényintenzitációnál még kifejezettebb volt.

ACC és MACC:

Az ACC az etilén prekursora, az MACC pedig az ACC malonil konjugátuma. Az Mv Emesében az ACC szintje végig emelkedett a 12 napos hidegedzés során mind normál, mind alacsony fényintenzitáción, míg az MACC szintje csak normál fényen emelkedett folyamatosan, alacsony fényintenzitáción egy kezdeti emelkedés után csökkent a szintje. Nadroban alacsony fényintenzitáción az ACC szintje kezdetben nőtt, majd lecsökkent, míg normál fényen nem változott a mennyisége. Az MACC szint sem változott szignifikánsan a hidegedzés alatt egyik fényintenzitáción sem.

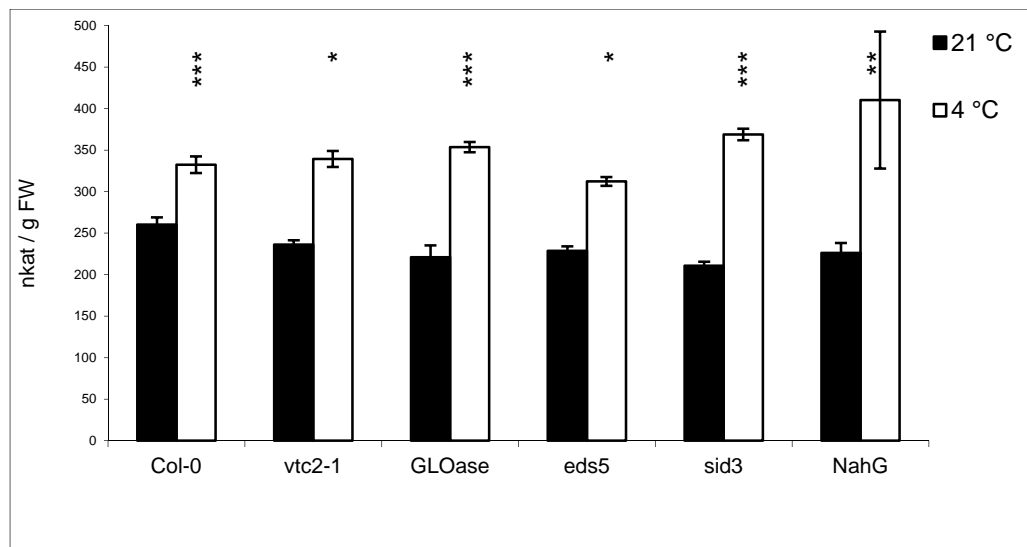
A **negyedik évben** az antioxidáns védekezőrendszer egy fontos elemének, az aszkorbát-glutation ciklusnak a három kulcsenzimét vizsgáltuk.

Glutation-reduktáz (GR)

A GR sok más biokémiai reakció mellett az aszkorbát-glutation ciklus fontos résztvevője. A GR aktivitás stressz hatására általában megemelkedik.

A vizsgálatokban használt növényekben szignifikánsan alacsonyabb volt a GR aktivitása 21°C-on a sid3-ban, az eds5-ben, a GLOáz-ban és a NahG-ben, mint a Col-0 -ban. A hidegedzés után a genotípusok közötti különbségek lecsökkentek.

A kontroll és az edzési hőmérsékleten mért adatokat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a GR aktivitása mindegyik genotípus esetén szignifikánsan megemelkedett.



A glutation reduktáz (GR) aktivitásának változása a hidegedzés hatására. A feltüntetett szignifikanciaszintek az edzési hőmérsékleten mért GR aktivitás értékek és a kontroll hőmérsékleten mért értékek egymástól való különbségét jelentik adott genotípus esetén (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$) $n=5$.

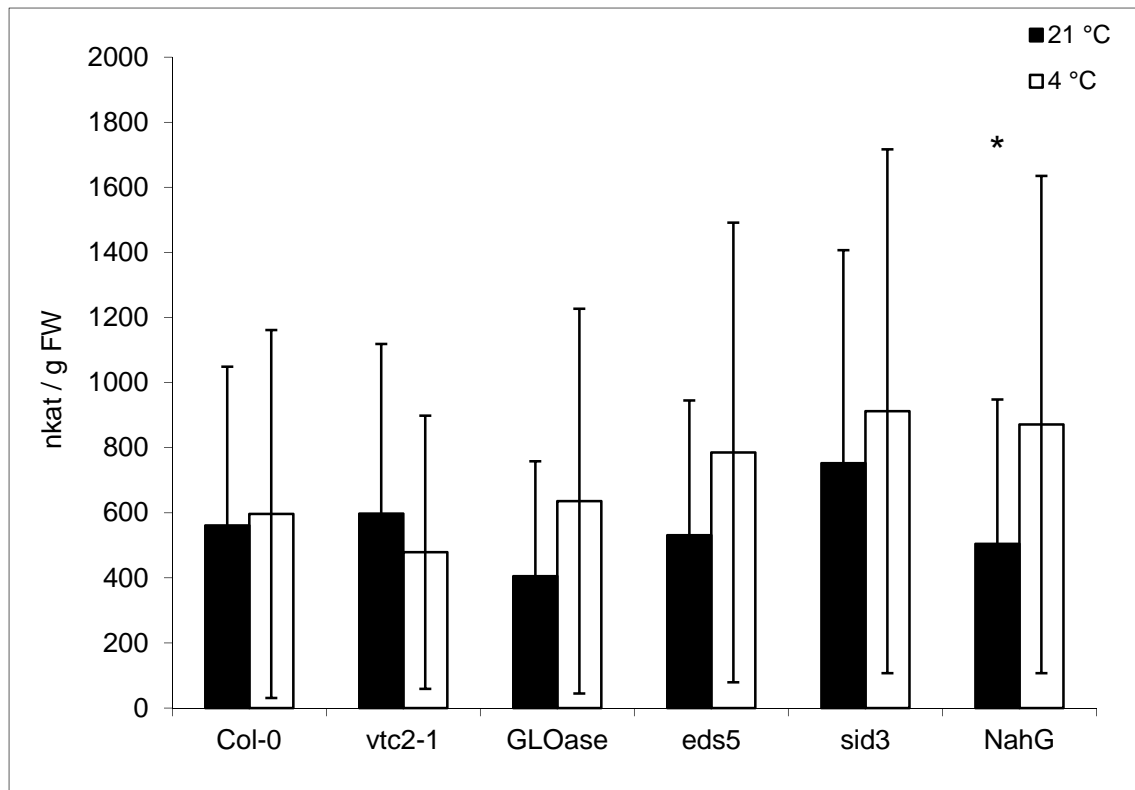
Aszkorbát-reduktáz (AR)

Az aszkorbát-glutation ciklus másik fontos enzime az AR. Ez az enzim a redukált glutation (GSH) közreműködésével az aszkorbát oxidált formáját (dehidroaszkorbát) alakítja vissza redukált formába. Szubsztrátja, a dehidroaszkorbát sokféle – az aszkorbát oxidációjával járó – biokémiai reakcióból származik. Stressz során az aszkorbátnak kulcsszerepe van antioxidáns védekezésben, ezért az AR aktivitása általában megemelkedik.

Vizsgálatainkban a kontroll hőmérsékleten csak a sid3 esetén volt szignifikánsan magasabb az AR működése.

A hidegedzés hatására a vtc2-1 mutánsok kivételével mindegyik genotípusban megemelkedett az aktivitás, ami azonban csak a NahG-ben volt szignifikáns. A vtc2-1 növényekben gyenge csökkenés

volt megfigyelhető. Edzési hőmérsékleten a genotípusok között nem volt jelentős különbség az enzim aktivitásában.

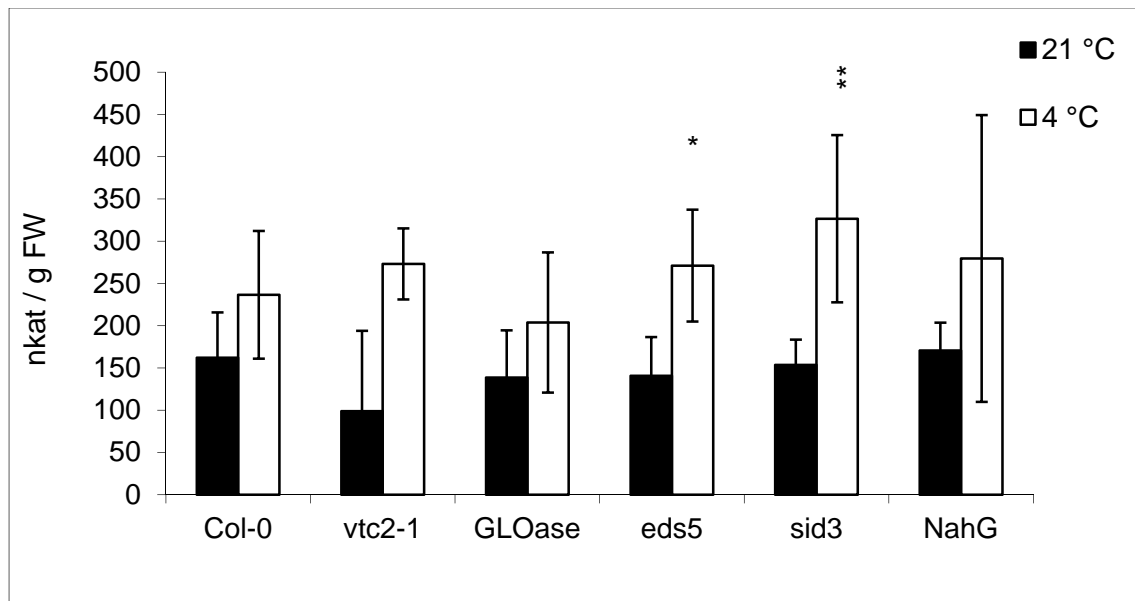


Az aszkorbát reduktáz (AR) aktivitásváltozása a hidegedzés hatására. A feltüntetett szignifikanciaszintek az edzési hőmérsékleten mért AR aktivitás értékek és a kontroll hőmérsékleten mért értékek egymástól való különbségét jelentik adott genotípus esetén (* : $p \leq 0,05$) $n=5$.

Aszkorbát-peroxidáz (APX)

Az APX a növényekben a stressz során keletkezett H_2O_2 bontását végzi az aszkorbát redukált formájának segítségével. Vizsgálatunkban a hidegstressz alatt a következőket változásokat állapítottuk meg. Az enzimaktivitás minden genotípus esetén magasabb volt, mint a hidegedzés előtt, azonban szignifikáns változás csak az eds5 és a sid3 esetén volt megfigyelhető.

Az egyes mutánsok, valamint a transzgenikus vonalak között egyik hőmérsékleten sem volt jelentősebb eltérés.



Az aszkorbát-peroxidáz (APX) aktivitásváltozása a hidegdedzés hatására. A feltüntetett szignifikanciaszintek az edzési hőmérsékleten mért APX aktivitás értékek és a kontroll hőmérsékleten mért értékek egymástól való különbségét jelentik adott genotípus esetén (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$) $n=5$.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a glutation-reduktáz a hideg hatására fokozott aktivitásemelkedést mutatott. A monodehidroaszkorbát-reduktáz aktivitása az edzési hőmérsékleten szintén magasabb volt. Az aszkorbát-peroxidáz aktivitása csak a SA-hiányos mutánsokban volt magasabb.