

A T46150. sz. pályázat (Alacsony hőmérsékleti stressztolerancia és antioxidáns aktivitás közti kapcsolat vizsgálata gabonaféléknél) zárójelentése

Ritkán múlik el olyan év hazánkban, hogy a szélsőséges kontinentális éghajlatból eredően ne kelljen valamilyen súlyos gazdasági következményekkel járó káros környezeti tényezővel számolni. Hol egy hosszantartó, súlyos aszály, hol a rossz időben, rossz helyen lezúduló túlzott csapadékmennyiségből eredő belvíz, hol a túlságosan kemény tél, vagy túl meleg nyár, esetleg valamilyen kártevő hirtelen megjelenéséből adódó járvány teheti tönkre az adott év, vagy akár egy évtized munkáját. A növénynevelőknek és a termesztőknek is egyaránt az az érdekük, hogy olyan növényekkel dolgozhassanak, melyek a környezet változásait a lehető legkisebb mértékű károsodás mellett tolerálják. Ahhoz, hogy ilyen növényeket elő lehessen állítani, mindenképp a növények egyes védekező és szabályozási folyamatait kell megismerni.

Ehhez kapcsolódóan a kutatási tervben a következő feladatokat vállaltuk:

- Búza-rozs addíciós vonalak felszaporítása; Gabonafélék alacsony hőmérsékleti edzés során bekövetkező antioxidáns működésének vizsgálata az edzés kezdeti szakaszában: az egyes antioxidáns válaszreakciók sorrendjének meghatározása, a köztük levő esetleges kapcsolatok felderítése.
- Speciális genetikai anyagok, elsősorban búza-rozs addíciós vonalak fagyállóságának tesztelése fitotroni klímakamrákban, és az antioxidáns rendszerük működésének vizsgálata.
- Különböző alacsony hőmérsékleti edzéstörvények hatásainak tanulmányozása az anyagcsere különböző szintjein abból a célból, hogy elkülönítsük a tényleges fagyállóság kialakulásához szükséges folyamatokat az alacsony hőmérsékleten fellépő stresszfolyamatoktól különböző gabonafélékben.
- Különböző stresszfaktorok antioxidáns válaszindukcióinak összehasonlítása gabonafélékben.

A megfelelő mértékű télállóság kialakításához még a kiváló fagyállósággal rendelkező őszi gabonafajták esetében is fontos, hogy mielőtt fagypon alatti hőmérsékletre kerülnének, bizonyos idejű alacsony, de még fagypon feletti hőmérsékleten történő edzési perióduson essenek át. Ismert, hogy az alacsony hőmérséklet nemcsak a hidegérzékeny, hanem a hidegtűrő növényekben is megnöveli a reaktív oxigénfajták mennyiségét. Vizsgálataink korábbi erre vonatkozó kísérletsorozatában azt tanulmányoztuk, hogy milyen kapcsolat van a

gabonafélék fagyállósága és egyes antioxidáns enzimek aktivitása között. Az edzett és edzetlen növényeket összehasonlítva megállapítottuk, hogy a bokrosodási csomó esetében a vizsgált enzimek közül edzés hatására jelentős növekedést a glutation-S-transzferáz (GST), a levélben szintén a GST, továbbá a guajakol-peroxidáz (POD) és az aszkorbát-peroxidáz (APX) mutatott. Az egyes antioxidáns enzimek közül azonban csak a hidegdedzett növények leveléből kivont APX és POD enzimek aktivitása mutatott szoros korrelációt a fagyállósággal. A fitotroni körülmények között kapott vizsgálataink eredményei szerint a különböző antioxidáns enzimek edzés során bekövetkező változásai azt mutatják, hogy az egyes gabonafajok eltérő stratégiát dolgoztak ki a reaktív oxigénformák mennyiségének szabályozásához. A későbbi vizsgálatokban mindezt újabb, több genotípus bevonásával végzett fitotroni és szántóföldi kísérletekkel is megerősítettük. Ennek részeként többek közt rozs (Imperial) és tavaszi búza (Chinese Spring) addíciós vonalainak fagyállóságát is teszteltük. Az Imperial nevű rozsfajta fagyállósága egyértelmű, a mortalitási arány mindössze néhány százalék. Ezzel szemben a donorként alkalmazott tavaszi búzafajta száz százaléka kihalt. Az addíciós vonalak közül a leghatékonyabb túlélőnek az 5R és 6R vonalak bizonyultak, melyek esetében kismértékű fagyállóságnövekedés (30, ill. 10%) kimutatható volt, az antioxidáns enzimek aktivitása azonban nem különbözött olyan mértékben az egyes genotípusokban, hogy magyarázhatná a vonalak megemelkedett fagyállóságát (publikáció: előkészületben).

Az előzőekhez kapcsolódóan kiegészítő kísérletként kukorica hibridek és beltenyészett vonalaik hidegtűrését, valamint antioxidáns kapacitását vizsgáltuk. Ehhez kilenc beltenyészett vonalat és az ezekből létrehozott hat hibridet neveltünk, majd hidegkezeltünk fitotroni körülmények között. Megállapíthatjuk, hogy egyrészt a hibridek hidegtűrése rendszerint meghaladja a szülőkéét, másrészt a hibridek hidegtűrése rendszerint kiegyenlítettebb, mint a beltenyészett vonalaké. A kukorica esetében is igazolható, hogy bizonyos antioxidáns enzimek (pl. GR, APX) aktivitása már enyhe hideghatásra megnövekszik. Drasztikus stresszhatásra azonban már aktivitáscsökkenés tapasztalható. Ha a kukoricánövények hidegtűrésési és antioxidáns adatait egybevetjük, azt mondhatjuk, hogy a két paraméter közvetlenül nincs összefüggésben egymással: az antioxidáns értékekből kukoricavonalak, illetve hibridek hidegtűrésére nem lehet biztonsággal következtetni. Ebből adódik, hogy bár a magas antioxidáns aktivitás feltehetőleg hozzájárul az alacsony hőmérsékleti stresszt kísérő oxidatív károsodás jobb elviseléséhez, de önmagában nem elégséges a kellő mértékű hidegtoleranciához. Mindezek miatt egy adott antioxidáns enzim aktivitását mint hidegtűrésési markert kukorica esetében a gyakorlat számára nem javasoljuk (publikáció: Janda et al., 2005, *Cereal Res. Commun.* 33: 541-548.).

Különböző stresszorok hatásainak összehasonlítása érdekében kiegészítő összehasonlító vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy míg a polietilén-glikol kezeléssel indukált drasztikus szárazságstressz is önmagában csupán kismértékű változást okozott az egyes antioxidáns enzimek aktivitásában, *Drechslera tritici-repentis* gombafertőzés azonban

már kismértékű stressz esetén is a jelentős aktivitásemelkedést váltott ki (*publikáció: Janda et al., 2008, Cereal Res. Commun. 36: 53-64.*).

A következő kísérletsorozatokban a megvilágításnak az őszi búza fagyállóságát befolyásoló hatását vizsgáltuk. Először Mv Emese búzafajtát neveltünk 10 napig kontroll körülmények között (20/18 °C), majd a növények egy része alacsony hőmérsékleten (5 °C) edződött tovább 12 napig vagy normál megvilágítás (PPFD = 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), vagy alacsony fényintenzitás (PPFD = 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mellett. A növények másik része vagy kontroll körülmények között maradt, vagy 20/18 °C-on magasabb megvilágításra került (PPFD = 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A 12 napos edzést követő fagyteszt eredményei azt mutatják, hogy a fagyállóság mértéket nemcsak az edzési hőmérséklet, hanem a megvilágítás is jelentősen befolyásolja: egyrészt az alacsony hőmérsékleten végrehajtott edzés lényegesen hatékonyabb volt normál megvilágítás mellett, másrészt részleges fagyállóságot el lehet érni normál hőmérsékleten is, ha a nevelési fényintenzitást megemeljük. Ezeket az eredményeket két fagyasztási hőmérsékleten (-10 és -12 °C) végrehajtott tesztekkel erősítettük meg. Mindezek után arra kerestünk választ, hogy a fény milyen biokémiai, élettani folyamatokon keresztül járul hozzá a fagyállóság kialakulásához.

Az egyes klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek különböző körülmények közt történő hidegedzés során bekövetkező változásait tekintve azt mondhatjuk, hogy a PS2 maximális kvantumhatásfokát jelző F_v/F_m paraméter fényben 5 °C-on kismértékű csökkenést mutatott, ami arra utal, hogy ezek a növények az edzés alatt fotoinhibíciót is szenvedtek. Sötétben ilyen változás nem volt. Hasonló tendenciát mutatott az aktuális kvantumhatásfokot jelző $\Delta F/F_m'$ ($\Delta F = F_m' - F_s$), valamint a fotokémiai kioltás (q_p) is. Ezen paraméterek összehasonlításánál azonban figyelembe kell venni, hogy a mérési körülmények csupán az F_v/F_m paraméternél standardok (sötétadaptált állapot, és ilyen tartományban a hőmérsékletfüggés elhanyagolható), az utóbbi két paraméterben kapott különbségek nemcsak az „előéleti”, vagyis az eltérő fény- és hőmérsékleti viszonyokból is adódnak. A nem-fotokémiai kioltás (q_n) fényben történő edzés során jelentősen, alacsony fényintenzitásnál nem szignifikánsan magasabb volt.

A következőkben a távoli vörös fény által indukált termolumineszcencia sáv alakulását vizsgáltuk kontroll és edzett búzanövényekben. A kontroll, 20/18 °C-on nőtt növényekben az AG-sáv csúcshőmérséklete 41 °C körül volt. Normál megvilágítás mellett 12 napig hidegedzett növényekben a sáv alacsonyabb hőmérsékletre, 36 °C-ra tolódott el. Alacsony megvilágítás (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mellett történő edzés során mindez nem volt megfigyelhető, az AG-sáv csúcshőmérséklete a kontroll, edzetlen növényekével megegyező volt. A P700 oxidációs állapotának tanulmányozásához a sötétadaptált leveleket először 50 s-ig FR fényvel világítottuk meg, és követtük nyomon a sötétben történő re-redukció kinetikáját, mely kétkomponensű exponenciális görbével jól illeszthetőnek bizonyult. Ha a

különböző körülmények közt edzett búzanövényekben kapott exponenciális időkomponenseit összehasonlítjuk, látható, hogy a fényben történő hidegedzés hatására a redukció mértéke felgyorsul. Alacsony megvilágítás mellett végzett edzés hatására a gyors komponens időállandója nem változott, a lassú komponensé pedig megnőtt. Mindezek az eredmények a ciklikus elektrontranszportlánc edzés során bekövetkező fokozott működésére utalnak (*publikáció: Apostol et al., 2006, Z Naturforsch. C. 61c: 734-740*).

Ismert, hogy a membránlipidek kulcsszerepet játszanak a hőmérsékleti adaptációban. Vizsgáltuk a foszfatidilglicerol (PG) zsírsavösszetételének változásait különböző megvilágítás melletti fagyállósági edzés során Mv Emese őszi búzafajtában. A legkifejezettebb változás a hexadekánsav-összetételben következett be. Levelekben ez a lipid nemcsak telített, hanem transz helyzetű egyszeresen telítetlen formában is előfordul. Ennek aránya (t16:1/16:0) alacsony hőmérsékleti edzés során jelentősen lecsökkent. A csökkenés mértéke fényben nagyobb volt, mint sötétben, sőt magas fényintenzitás mellett normál hőmérsékleten is bekövetkezett. A C-18-as zsírsavak telítetlenségi foka ebben a lipidosztályban nem változott számottevően. A foszfatidil-etanolamin (PE) lipidosztály zsírsavösszetételének változását tanulmányozva megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott edzési körülmények között szignifikáns változás csak akkor következett be, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten és fényben történt. Ebben az esetben mind a 16:0, mind a 18:0 zsírsavak részaránya mintegy 30%-kal csökkent, a 18:3 zsírsav részaránya viszont megnőtt, ami jelentős változást eredményezett a telítetlenségi indexben is. Más vizsgált lipidosztályokban, mint pl. monogalaktozil-diacil-glicerid (MGDG), vagy digalaktozil-diacil-glicerid (DGDG) szignifikáns változást nem tapasztaltunk. Összehasonlító vizsgálatként nemcsak alacsony hőmérséklet, hanem egy gazdasági szempontból is fontos nehézfém, a kadmium hatását is vizsgáltuk egy másik gabonaféle, a kukorica membránlipid-összetételére. Kimutattuk, hogy érdekes módon nemcsak az alacsony hőmérsékleti adaptáció, hanem bizonyos koncentrációjú kadmiumstressz is képes membránfluiditás-növekedést előidézni. Ez is példa lehet arra, hogy különböző eredetű stresszorok átfedő jelátviteli utakon keresztül hasonló válaszreakciókat indukálnak (*publikáció: Janda et al., 2007, Phytochemistry 68: 1674-1682*).

Az antioxidáns aktivitás kimutatása céljából 5 fontos antioxidáns enzim aktivitásának változását vizsgáltuk különböző hőmérsékleten és megvilágítás mellett végrehajtott edzés során. Alacsony hőmérsékleti edzés (5 °C) 12 nap után kismértékű, de statisztikailag szignifikáns emelkedést indukált a glutation-reduktáz (GR) enzim aktivitásában. Ezen emelkedésnek a mértéke alacsony megvilágítás mellett nem volt szignifikáns. Hasonló jellegű változás mutatható ki az APX enzim aktivitásában is. Ennél azonban emelkedés volt tapasztalható akkor is, amikor alacsony hőmérsékleten, alacsony fényintenzitáson edződtek a növények. A kataláz enzim aktivitása mindhárom esetben kismértékben, de statisztikailag szignifikánsan megnőtt. Mindezen enzimekkel szemben a POD enzim aktivitása abban az esetben nőtt meg, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten, alacsony fényintenzitás mellett

zajlott. A szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitása egyik esetben sem mutatott szignifikáns változást (*publikáció: Janda et al., 2007, Phytochemistry 68: 1674-1682*).

Mind az antioxidáns enzimek alacsony hőmérsékleten bekövetkező változásai, mind számos egyéb védekező mechanizmus aktiválása kapcsolatba hozható egy jelátvivő anyag, a szalicilsav működésével (*publikációk: Janda et al., 2007, In: Salicylic acid. A plant hormone; Horváth et al., 2007 J. Plant Growth Regul. 26: 290-300*).

Ezért az adott kísérleti rendszerünkben vizsgáltuk egyrészt a szalicilsav, másrészt ennek egy feltételezett prekursorának az *orto*-hidroxi-fahéjsavnak (oHCA) a változását is. A szalicilsav mennyisége mind szabad, mind kötött formában nemcsak alacsony hőmérsékletű, fényben történő edzés során, hanem normál hőmérsékleten magas fényintenzitás mellett is megnőtt. A szabad szalicilsav mennyiségének növekedése statisztikailag szignifikáns volt kis fényintenzitás mellett történő hidegedzés során is. A szabad *orto*-hidroxi-fahéjsav mennyisége mind a négyfajta mintában közel azonos volt. Ezzel szemben a kötött forma mennyisége nagyságrendekkel megnőtt abban az esetben, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten, normál megvilágítás mellett zajlott. Egyéb esetekben, tehát alacsony megvilágítás mellett, vagy nagy fényenél normál hőmérsékleten ilyen változás nem volt kimutatható. (*publikáció: Janda et al., 2007, Phytochemistry 68: 1674-1682*).

Mindezek az eredmények megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a szalicilsavfüggő jelátviteli út szerepének tanulmányozásakor nemcsak magára a szalicilsavra, hanem egyes prekursorainak a változásaira is figyelemmel kell lenni (*publikációk: Horváth et al., 2007, Biol Plant 51: 480-487; Pál et al., 2005, Physiol. Plant. 125: 356-364*).

Az AG termolumineszcencia sáv változása mint a különböző stresszfaktorok indikátora

A vizsgálatok fontos részét képezték az egyes stresszfaktorok hatásainak termolumineszcenciával (TL) történő tanulmányozása is. Termolumineszcenciát fotoszintetizáló anyagból hagyományosan általában a mintának jóval fagypontra alá való hűtése után mérnek. Az újabb vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a fagyasztás bizonyos esetekben jelentős mértékben befolyásolhatja a növények TL kibocsátását. Kísérleteinkben az előzetes fagyasztás különböző TL komponensekre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk különböző növényfajokon. Búzát és kukoricát összehasonlítva megállapítottuk, hogy a két faj távoli vörös fény által indukált TL görbéje már a kontroll körülmények között lévő növényekben is jellegzetesen eltért: búzában a B-sáv csúcshőmérséklete jelentősen alacsonyabb volt, mint kukoricában. Fagyasztás után búzában a membránkárosodásból eredő protongradiens megszűnésének köszönhetően ez az érték a magasabb hőmérsékletek irányába tolódott. A 40-45 °C körüli csúcshőmérséklettel jellemezhető AG-sáv búzanövényekben fagyasztás után is kimutatható volt, szemben a hidegérzékeny kukoricával, ahol már egy rövid idejű -1,5 °C-os fagyhatás is szignifikáns hatással van a távoli vörös fény által indukált TL

görbére: az AG-sáv amplitúdója jelentősen lecsökken, csúcspozíciója a magasabb hőmérsékletek irányába tolódott. Alacsonyabb hőmérsékleti kezelések hatására kukoricában az AG-sáv fokozatosan tovább csökken, majd egy küszöbérték alatt teljesen eltűnt. A B-sáv jelentősen alacsonyabb hőmérsékleti fagyasztás után kezdett csak csökkenni, mint az AG-sáv. Ez jól látszik abból, hogy -3,3 °C-os fagyasztás után, mikor az AG-sáv már teljesen eltűnt, a B-sáv még nem változott. Egy küszöbérték alatt azonban egy hirtelen amplitúdócsökkenés következett be, de szemben az AG-sávval, a B-sáv még jóval alacsonyabb hőmérsékletek mellett is detektálható volt. Borsó növényekben a távoli vörös fényel indukált AG-sáv viselkedése a búzáéval egyezett meg, muskátliban viszont egy kritikus hőmérséklet alatt TL jel egyáltalán nem volt detektálható. A távoli vörös fényel indukált TL görbe fagyasztásra történő viselkedése uborka és tök esetében a kukoricára és a búzára (ill. borsóban) jellemző görbék közé esett: a csökkenő hőmérséklettel az AG-sáv fokozatosan csökkent, majd akárcsak a kukoricában, egy küszöbérték alatt teljesen eltűnt. A távoli vörös fény által indukált B-sáv azonban, akárcsak a búzában vagy a borsóban felfelé tolódott. Ennek amplitúdója gyakorlatilag nem csökkent szignifikánsan. Mindezzel szemben érdekes módon az egy elektronátmenetet megengedő ún. *single turnover* fényfelvillanással (*flash*-sel) indukált B-sáv nem mutatta ugyanezt a felfele tolódást. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy intakt levelekben a *flash* gerjesztés egy összetett sávot eredményez, melynek magasabb hőmérsékleti komponense tulajdonképpen egy AG-sáv (*publikáció: Janda et al., 2004, Photochem. Photobiol. 80: 525-530*).

Az eredmények gyakorlati alkalmazásának lehetőségei

A vizsgálataink fő célja néhány kiemelkedően fontos gazdasági növény különböző típusú stresszhatásokra bekövetkező válaszreakcióinak jobb megismerése volt. Ezekről az eredményekről többek közt azt várjuk, hogy lehetőséget biztosítanak arra, hogy célirányosabban lehessen kiválasztani azokat a folyamatokat, amelyek akár hagyományos növénynemesítési eljárással, akár biotechnológiai úton történő befolyásolásával a növények stressztűrő képessége hatékonyabban növelhető.

A kísérletek során több esetben (pl. termolumineszcencia alkalmazása különböző növényfajok esetében, vagy búza esetében egyes antioxidáns enzimek vizsgálata során) sikerült összefüggést találni az egyes vizsgálat paraméter változása ill. az adott növény stressztűrő képessége között. Ezek a felismerések alkalmasak lehetnek a gyakorlat számára megfelelő tesztmódszerként való felhasználásra is.

Mindezek mellett a szalicilsavval és rokon vegyületeivel kapcsolatos eredményeink biztató alapot biztosítanak az adott vegyületek mint stresszvédő anyagok nagyléptékű, gazdaságos felhasználásának kidolgozásához.