

A TETRAZOLIUM REDUKCIÓ ÉS AZ ÉLETKEPESÉG KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ VIZSGÁLATA

GÁSPÁR SÁNDOR

a mezőgazdasági tudományok kandidátusa

Országos Vetőmagfelügyelőség, Budapest

A növényi szövetek dehidrogenáz aktivitásának meghatározására, valamint szövetmetszetekben és magvakban a redukáló helyek kimutatására kiterjedten használják a 2, 3, 5-trifeniltetrazolumkloridot (TTC) azon tulajdonsága miatt, hogy redukálódva vízben oldhatatlan vörös színű 2,3,5-trifenilformazán (TF) alakban kiválik.

Hazánkban a tetrazolumsók alkalmazása csupán a biológiai kutatások területére korlátozódott. A gazdaságilag fontos vetőmagvak vizsgálatára kutatómunkánk megkezdéséig a TTC-t nem használták. Jóllehet az évente fémzároltan és egyéb módon felhasználásra kerülő őszi árpa és őszi búza vetőmagvakból származó közel húszezer minta csírázóképeségének meghatározására — az aratástól az újbóli vetésig rendelkezésre álló viszonylag rövid idő és a vetőmag csírányugalma miatt — egyedül a csíráztatás módszerével nehezen volt elvégezhető. Ezért a csíráztatás mellett előtérbe került a topografikus tetrazolum-módszer alkalmazásának szükségessége annál is inkább, mivel a TTC redukció alapján a csírányugalomban levő magvak életképessége is kimutatható [LAKON (1942)].

A szakirodalomban a kalászos vetőmagvak TTC vizsgálatával Lakon 1942-ben megjelent alapvető tanulmányát követően csupán néhány publikáció foglalkozott. Ezek között BETHMANN (1956), ADER (1958) és COPELAND et al. (1959) voltak, akik nagy mennyiségű vizsgálati anyagra vonatkozóan közöltek eredményeket. Azonban a vetőmag csírázóképesége és a TTC módszerrel kimutatott életképessége közötti összefüggést biometriai módszerrel nem vizsgálták.

A TTC-t a növényi szövetek dehidrogenáz aktivitásának meghatározására a biológiai kutatás területén számos külföldi és néhány hazai kutató alkalmazta. Hazai vonatkozásban JÁMBOR (1958), JÁMBOR és DÉVAI (1959) közölt módszert növényi szövetek dehidrogenáz aktivitásának meghatározására. Ugyanezen közleményükben tesznek említést arról, hogy a magas szubsztrát-koncentráció a szövetek formazán-képzését gátolja. Hasonló megállapítást tett SATO (1962) is kiegészítve azzal, hogy a gátlás kifejlődése a szövet korától függ.

A topografikus tetrazolum-módszernek a hazai magvizsgálati gyakorlatba való bevezetését, illetve a módszer javítását és a TTC alkalmazási területeinek kibővítését szolgáló kutató munkánk során az alábbi kérdések vizsgálatával foglalkoztunk:

1. Milyen összefüggés van a TTC-vel meghatározott életképesség és csírázóképeség százalékos értéke között árpa és búza vetőmagnál.

2. Felállítható-e olyan regressziós egyenlet, amellyel a potenciális csírázóképeségből (életképesség) a tényleges csírázóképeség kiszámítható.

3. A TTC módszer alkalmazhatósága túlsávázott, valamint fuzáriummal fertőzött vetőmagvaknál.

4. A magvak formazán-képzése a TTC és foszfát-koncentrációtól függően. A TTC hatása szövetek oxigénfelvételére.

5. A kationok, szövetmennyiség és az inkubálás módjának hatása az embriók formazán-képzésére.

6. A szubsztrátum milyenségének és koncentrációjának hatása a formazán-képzésre.

7. A csíraszövetek korának, életképességének és funkcióbeli eltérésének hatása a formazán-képzésre szervessav és cukor szubsztrátumok jelenlétében.

Anyag és módszer

A tetrazóliumsók alkalmazásával kapcsolatos módszertani problémák tisztázására 7 növényosztályba tartozó 10 növényfaj magjaival végeztünk kísérleteket.

Mivel a vizsgált fajok legtöbbjének termése és maghéja a tetrazoliumsók számára átjárhatatlan, ezért a magvakat a termés és maghéj eltávolítása és egyben az enzimműködés megindítása végett fajtól függően 20–30° C-os vízben 20 órán keresztül áztattuk.

Az egy- és kétsziklevelűek osztályába tartozó magvak szöveteinek a különböző kezelések (szervessavak, cukrok, foszfát, kationok, eltérő hőmérséklet stb.) hatására a formazán-termelésben megnyilvánuló viselkedését a kezeletlen kontrollhoz viszonyítottan értékeltük.

A sejtekből a formazánt — CHIARIONI és PICCADORI (1954), valamint MARRE és ARRIGONI (1954) módszerét kissé módosítva — acetonnal vontuk ki, és TTC esetében 480 nm, míg az INT esetében 482 nm-nél fotometráltunk.

A vizsgálatokhoz szükséges csíranövényeket szűrőpapírtekercsben történő csíráztatással, a meggyengült életrejmű magvakat eltérő kondíciójú raktározással (+ 40° C hőmérséklet és 98–100% rel. páratartalom), illetve beltenyésztéssel állítottuk elő.

Az ország különböző helyein fémzárolt, összesen több mint ezer árpa és búza vetőmag mintának párhuzamosan meghatároztuk a csírázóképeségét és topografikus módszer szerint TTC-vel az életképeségét. A kapott eredményekből korrelációs számításokat, lineáris regresszióanalízist végeztünk és megvizsgáltuk a regressziók homogenitását.

A nagy adagú csávázószer csírázóképeséget károsító hatásának vizsgálatára 200 g/q-tól 1600 g/q-ig terjedő Germizán-adagokkal csáváztunk búza vetőmagot és vizsgáltuk a vetőmag csírázóképeségét, talajban való kelését, üvegházi körülmények között.

Minden kísérlet legalább négyszeres részismétlésből állt. A részismétlések között előfordult kiugró értékek szignifikanciáját és aktivitás vizsgálatok esetén a Dixon-féle r-kritérium, míg a csírázóképeségi vizsgálatoknál az MSz 6354–68-ban megadott tolerancia táblázat alapján értékeltük.

Kutatási eredmények

1. A tetrazoliumsók toxicitása

Árpa, búza és borsó embriók formazán-képzésük maximumát 10^{-2} – $5 \cdot 10^{-2}$ M TTC koncentrációnál érték el. 10^{-1} M TTC koncentráció már jelentősen gátolta a formazán-képzést. A TTC a magvak csírázását is erősen csökkentette, és még 10^{-4} M koncentrációban is toxikus volt a csíranövényekre.

A tetrazoliumsók toxicitása az embriók oxigénfelvételének gátlásában is megnyilvánult. Az INT (jodo-nitrotetrazoliumklorid) a TTC-nél is erősebben gátolta az oxigénfelvételt. Ennek magyarázatát még nem ismerjük. Borostyánkősav-oldatban a búza és az árpa embriók oxigénfelvétele TTC jelenlétében rohamosan csökkent. A glukóz ellenben megakadályozta az oxigénfelvétel TTC részéről történő gátlását.

A tetrazoliumsók oxigénfelvételt gátló hatásának legvalószínűbb mechanizmusa az lehet, hogy a versengő gátlás révén megzavarják a terminális elektrontranszport normális működését, és ezzel az energiaellátásban zavart okoznak.

2. A tetrazoliumsók élő szövetben való redukcióját befolyásoló tényezők

Embrióknál a redukció szempontjából optimális hőmérsékletet +40° C illetve +45° C-nak találtuk attól függően, hogy az INT-t vagy a TTC-t alkalmaztuk indikátorként. A magvak csírázóképeségét jelentősen csak 50° C vagy a feletti hőmérséklet károsította. 50° C hőmérsékleten azonban a dehidrogenázok aktivitásuk 50%-át még megtartják. Ez lehet az oka annak, hogy bizonyos esetekben a topografikus tetrazolim-módszerrel a magvak hőkárosodását nem lehet kimutatni.

Búza és árpa embriók által termelt formazán-tömeg a bemért anyaggal (10–80 mg) proporcionális és az összefüggés az $Y' = 130 + 59,4X$ lineáris regressziós egyenlettel kifejezhető volt. Ez azt jelenti, hogy tág határok közötti bemérésekből kapott eredmények is összehasonlíthatók.

A TTC-nek mint lassan penetráló anyagnak behatolását vákuum-infiltrációval repce embrióknál elő lehetett segíteni, és ezáltal a szövetek formazán-képzése kétszeresére emelkedett. Azonban borsónál az infiltrálásnak nem volt hatása. Így nem lehetett egybehangzóan azt állítani, hogy az infiltrálás minden esetben elősegíti a TTC behatolását a szövetekbe.

Árpa, kukorica és borsó embriók endogén dehidrogenáz aktivitását 10^{-1} M foszfát puffer fokozta, a búza embriókét pedig csökkentette. 10^{-3} M-koncentrációban a $ZnSO_4$ ellen-

I. táblázat

Árpa és búza embriók O_2 felvétele vízben és $10^{-1}M$ foszfát oldatban

Faj	Oxigénfelvétel ml/10 embrió/10,5 óra	
	vízben	$10^{-1}M$ foszfátban
Árpa	150	124
Búza	128	160

ben jelentősen növelte a búza embriók formazán-képzését. Árpa és búza embriókkal végzett vizsgálataink szerint a foszfát az oxigénfelvétel szabályozásán keresztül módosítja a szövetek formazán-képzését (I. táblázat).

Búza és árpa embriók telítődési függvényéből az tűnik ki, hogy az endogén-aktivitás meghatározásához legalább 25–30 órás inkubációs idő kell. Természetesen ebben az esetben különös gondot kell fordítani a sterilítésra.

A citrátkör egyes intermediereinek hatása az egy- és kétszikű magvak formazán-képzésére

Jó csírázóképeségű búza, kukorica, repce, len, napraforgó, borsó, paradicsom és akác magvakból kipreparált, az inkubáció 20. órájában levő embriókban, a TTC-nek formazánánná való redukcióját a közel fiziológias koncentrációban levő piroszólósav, α -ketóglutársav, borostyánkősav és almasav kisebb—nagyobb mértékben gátolta, az árpa embriókban pedig növelte a formazán-képzést (II. táblázat).

A formazán-képzést gátló hatás nem járt együtt az embriók oxigénfelvételének gátlásával. Ez arra mutat, hogy a gátlás — a faj adott fiziológiai állapotától és anyagcsere-típusától függő — specifikus TTC hatás következtében jöhet létre.

A külsőleg adott szubsztrátum formazán-képzést gátló hatása nem a sejtek plazmolízise miatt következett be. Ugyanis napraforgónál és repcénél azt találtuk, hogy már $10^{-2}M$ szubsztrát koncentráció is gátol, pedig az alkalmazott szubsztrátok ozmotikus koncentrációja a gyenge disszociáció miatt nem érte el a plazmolízishez szükséges kb. 10 atmoszférát. A különböző fajoknál azonos szubsztrátum és koncentráció mellett gátlás vagy serkentés következett be. Ebből gondolni lehet arra is, hogy a csírázás korai szakaszában az egyes fajokban más-más anyagcsere utak játszanak vezető szerepet, és ennek következtében az enzim—szubsztrát viszony módosulhat.

A glutaminsav a kukorica embrióban megszüntette a piroszólósav és citromsav formazán-képzésre gyakorolt gátló hatását. Ez arra utal, ahogy a formazán-képzést végső soron a fölös mennyiségben felhalmozott oxálcetsav gátolja. E feltevésünk ellen szólt az a tény, hogy a glutaminsav önmagában is gátolt, és repce embrióknál a borostyánkősav formazán-képzést gátló hatását csak mérsékelte, de nem szüntette meg teljesen. Kukorica és repce embriókban $10^{-3}M$ KCN jelentősen gátolta a formazán-képzést, pedig a citokrom-oxidáz gátlása és az oxálcetsav kiküszöbölése révén serkentenie kellett volna. Ezért jelenleg nem lehet bizonyítani, hogy a csírázás előtti állapotban levő embriók formazán-képzését a külsőleg adott intermedierek oxálcetsav felhalmozódás útján szabályozzák-e.

II. táblázat

Intermedierek hatása az embriók formazán-termelésére. Értékek a kezeletlen százalékában. Inkubáció $30^\circ C$, 20 óra

Szubsztrát ($2,85 \times 10^{-2}M$)	Árpa	Búza	Repce	Len	Napraforgó
Kezeletlen	100	100	100	100	100
Piroszólósav	168	93	81	96	100
α -ketóglutársav	145	96	55	69	71
Borostyánkősav	122	77	74	69	81
Almasav	206	102	74	76	71

4. A citrátkör intermediereinek hatása a különböző korú és funkciójú csíraszövetek formazán-képzésére

Az életerős magvakban a citrátkör egyes intermediereinek a formazán-képzésére kifejtett gátlásának okát kutatva — árpa, búza, borsó, kukorica és repace embriók esetében — azt figyeltük meg, hogy a gátlás a magvak életerejének gyengülésével (hosszabb, kedvezőtlen feltételek alatti raktározás, beltenyésztés stb.) megszűnik (III., IV. táblázat).

Az intermedierek az embrióknál megfigyelttel ellentétben többnapos csíranövényben már nem gátolták a sejtek formazán-képzését. A gátlás megszűnése annak a következőképpen lehet, hogy az embriókban uralkodó anyagcsere-viszonyok a csírázás során fokozatosan megváltoznak.

A nagy szubsztrátum koncentrációnak a TTC formazán-átalakulásra kifejtett — egyes esetekben jelentős — gátló hatása több irányú vizsgálataink alapján jelenleg a következőkkel

III. táblázat

Három évig normális feltételek között raktározott egyszeres keresztezésű kukorica hibrid vetőmag-minták élettani mutatóinak alakulása

Hibrid	Raktározás éve	Csírázó-képesség %	Hajtás		Termelt formazán, mg		A vizes oldat %-ában
			súly mg/l	növ.	vízben	SA-ban	
WF9 × M14/A	1966	77	36,7	23,4	63	50	0,79
	1969	62	24,9	15,6	54	48	0,89
WF9 × M14/B	1966	89	35,6	20,9	64	47	0,71
	1969	56	26,0	12,7	42	73	1,74
WF9 × M14/C	1966	80	33,2	25,9	74	51	0,69
	1969	60	23,9	13,8	61	95	1,56
WF9 × N6	1966	64	31,7	17,1	48	46	0,96
	1969	64	17,5	8,4	42	63	1,50
156 × MIN6	1966	94	33,0	18,5	55	37	0,67
	1969	98	21,9	14,3	64	76	1,19

SA = borostyánkősav

IV. táblázat

Életerős és gyenge életerejű árpa, búza és repace embriók TT- és INT- formazán termelése vízben (V) valamint $2,85 \times 10^{-2}$ mol citrom- (CA) és borostyánkősav (SA) oldatban 30° C-on 20 óra alatt

Faj	Csírázó-képesség %	TTC					INT				
		mg formazán			V - %-ban		mg formazán			V - %-ban	
		víz	CA	SA	CA/V	SA/V	víz	CA	SA	CA/V	SA/V
Árpa 1.	97	45	112	97	248	127	30	83	68	276	220
	2.	67	15	64	32	426	213	15	42	36	280
Búza 1.	81	31	72	52	141	102	39	85	68	217	158
	2.	33	22	75	42	341	191	16	49	44	300
Repace 1.	84	46	31	23	67	50	20	48	40	210	200
	2.	37	18	22	19	122	105	14	40	33	285

1. = életerős

2. = gyenge életerejű

magyarázható: A feleslegben adott szubsztrátum nem amiatt gátol, mert akadályozza a TTC odajutását a redukció helyére — mint azt eddig feltételezték, — ugyanis akkor az INT-vel is gátlást kellett volna kapnunk. Az INT formazán alakulását azonban egy esetben sem gátolta a szubsztrát jelenléte sem életerős, sem meggyengült életerejű magvakban. Sokkal inkább feltehető, hogy a szubsztrátum a TTC redukciót a légzési lánc redox állapotára kifejített hatásán keresztül módosítja. Ezt a feltételezést nagyban támogatja a TTC-nél pozitívabb redukciós potenciálú INT-vel kapott eredmény (IV. táblázat). Feltehető azonban az is, hogy a gátlás csak látszólagos és a csökkent formazán-mennyiség onnan származik, hogy az életerős magban a képződött formazán az erős redukciós apparátus szintelen termékké túlredukálja. A képződött formazán fokozatos eltűnését burgonyagumószeletekkel végzett kísérletünkben megfigyeltük.

5. Cukrok hatása egy- és kétszikű magvak embrióinak formazán-termelésére

Az árpa, búza és kukorica embriók formazán-képzését a glukóz, fruktóz és a szaharóz növelte. A búzánál az inkubáció alatti levegőtlen körülmények fokozták a cukrok serkentő hatását. Feltehetően ezzel kapcsolatos, hogy a búza az árpával ellentétben szinte érzéketlen a csíraágy túlnedvesítésével szemben.

A kétszikű magvak embrióinak formazán-termelését az alkalmazott cukrok — fajtól függően — többé-kevésbé szintén serkentették. Hét–nyolcnapos árpa, búza és kukorica csíranövényben a vizsgált monoszaharidok és a szaharóz ellenben már nem növelték a formazán-képzést, sőt a borsó csírákban a glukóz 10^{-1} és 10^{-2} M koncentrációban gátolta a formazán-képzést.

6. Az árpa és búza vetőmag TTC-vel meghatározott életképességének és csírázóképeségének össze-függése

Kísérleteinkben több száz minta összehasonlító vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az aratás után még 1–2 hónappal fémzárolt őszi árpák között is 37%-ban, és az őszi búzák között 12–19%-ban van olyan vetőmagtétel, amelyeknél az utóérés hiánya miatt, csíráztatással — előhűtés alkalmazása mellett — sem lehet kimutatni a maximális csírázóképeséget [GÁSPÁR (1967)].

Az utóérésen átment kalászos vetőmagvak csírázóképesége és topografikus tetrazolium-módszerrel meghatározott életképessége között őszi búzáknál 0,4%, őszi árpáknál 1%-ban előfordulhat tolerancián kívüli eredmény [GÁSPÁR (1965)].

A TTC-vel meghatározott életképesség sem a nagy (100–96%), sem a közepes (96–90%) értékhatárok között nem volt magasabb a csírázóképeségnél.

Több búza vetőmagminta vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy 100–96% csírázóképeség értékhatárok között a csírázóképeség már hat havi raktározás után 2,7%-kal csökkent. A 90–95% csírázóképeségű vetőmag ellenben gyakorlatilag változatlan maradt.

Az őszi búza és őszi árpa vetőmag élet- és csírázóképesége között minden vizsgált évben szoros korrelációt mutattunk ki, amely $P = 0,1\%$ -os szinten volt szignifikáns. A korrelációs koefficiensek ellenben egymástól szignifikánsan különböztek, azaz az összefüggések szorossága fajonként eltérő.

Az élet- és csírázóképeség között általában lineáris regressziót találtunk. Azonban az egyes évek eltérően befolyásolták a regressziós együtthatót, ezért több év adatait nem lehetett kifejezni egyetlen lineáris regressziós egyenlettel [GÁSPÁR (1968)].

7. TTC módszer alkalmazhatósága speciális esetekben

A búza vetőmag Germizánnal történő porcsávázásakor a szokásos adag négyszeres mennyisége sem okozott csíranövény károsodást, mivel a mag termés- és maghéja megakadályozza a csávázószernek az embrióig való behatolását. Ez abból látható, hogy még abszurd mennyiségű csávázószer használata esetén is a csírák először normálisan fejlődnek. Később azonban a csíraágyra került nagy mennyiségű higanytartalmú szer a csíragyökereken keresztül felszívódik és a csíranövényt megöli. Az ilyen károsodást a TTC természetesen nem jelezheti [GÁSPÁR–BENYO (1968)].

Nedves csávázásakor a túladagolt csávázószer már az embriókat is károsítja, és a csírázás egyáltalán nem indul meg. Ha a károsodás nem letális, a csírázás megindul, de a csíranövények erősen megrövidült és megvastagodott gyökér- és hajtásképletekkel rendelkeznek. Az abnormális csírák egy része azonban később normális növényké fejlődik (V. táblázat). A TTC teszttel a túlsávázás miatt elhalt embriók kimutathatók. A növekedésben gátolt embriók dehidro-

V. táblázat

Nedves Germizán-KF-fel túlsávázott Libellula őszi búza vetőmagminták laboratóriumi csírázóképesége, TTC-életképesége és kelési %-a a földben

Minta száma	Csírázóképeség %	Eltérés a csírázóképeség és kelés között %	Kelés %	Eltérés a TTC és kelés között %	TTC-életképeség %
100/137	65	18	83	3	80
/138	68	9	77	2	79
/139	68	10	78	2	80
/141	68	12	80	6	74
/144	70	1	71	15	86
/143	71	15	86	4	82
/140	72	4	76	5	81
/145	72	12	84	4	80
/142	79	13	92	2	94
/135	84	9	93	2	95
Átlag	71,7	10,0	81,7	1,4	83,1

SzD₅% 3,7

genáz rendszere azonban a TTC-t még formazánná képes redukálni, így a növekedési depresszió miatt abnormálisnak ítélt csírák TTC-vel nem jelezhetők.

A túlsávázásra utaló tünet esetén TTC teszttel ajánlatos meggyőződni arról, hogy az embriók redukációs képességgel rendelkeznek-e. Ha ez fennáll, a vetőmagot a talajban kelés-képességre kell tájékozódás céljából megvizsgálni legalább 21 napos vizsgálati időszak alatt.

A fuzáriummal megtámadott búza vetőmag csíráztatással meghatározott csírázóképesége és TTC módszer szerinti életképesége között még 22%-os eltérést is találtunk. Ez azonban annak a következménye, hogy a TTC módszerrel a szemből kiemelve a valóban életképes fuzáriumtól még nem károsított embriók alapján mutatjuk ki az életképeséget. Az így kimutatott életképeség a vetőmag potenciális csírázóképesége.

A fuzáriummal fertőzött búza vetőmag gyenge csírázóképesége két ok miatt következik be: 1. A fuzárium az embrió a szem fejlődése alatt már teljesen elpusztította. 2. Az embrió egészséges, de a szem felületileg fertőzött és a mag csírázásával együtt fejlődő gomba a fiatal csírákat elpusztítja. Ez utóbbi kártétel csávázással csökkenthető. A fuzáriumtól elhalt embrió TTC-vel kimutatható.

A fuzáriummal fertőzött vetőmagvak Germizán-kezelése utáni csíráztatása alapján megállapítottuk, hogy a csávázás hatására a fertőzés 75%-al csökkent. A csávázott magtélélek csírázóképesége pedig már hibahatáron belül megegyezett a TTC-életképeséggel. Ezzel kísérletileg igazoltuk, hogy a fertőzött szemek 75%-ában az embriók életképesek maradtak. A TTC módszer valóban a vetőmag ténylegesen elérhető csírázóképeségét jelezte. A maximális csírázóképeség elérhető, ha a vetőmag számára a csírázás optimális feltételeit biztosítjuk. Az optimális feltételek biztosítása közé tartozik a csírák megvédése a kórokozók támadásától.