

# „TÖLGYFAJOK KÖRNYEZETI HATÁSOKRA ADOTT VÁLASZREAKCIÓINAK KÉMIAI VIZSGÁLATA”

## ZÁRÓJELENTÉS AZ OTKA T 046408 SZ. KUTATÁSI PROJEKTRŐL

A kutatás 1 nemzetközi folyóiratban megjelentetett közleményt, 2 nemzetközi konferencia előadást, 3 magyarországi tudományos előadást, 1 TDK dolgozatot és 1 benyújtás előtt álló Ph. D. disszertációt (Pozsgainé Harsányi Mónika), valamint 2 nemzetközi és 1 magyarországi kiadású folyóiratban megjelentetni szándékolt dolgozatot eredményezett. A projekt eredmények későbbi közlésére vonatkozó, az OTKA zárójelentés elvi útmutatójában rögzített lehetőséggel élni kívánunk.

A projekt tézisei:

1. A csírázó makk tömege és sűrűsége lineárisan korrelál egymással ( $r^2 > 0.95$ ). A relatív tömeg és sűrűség korrelációját jellemző regressziós egyenesek meredeksége makkegyedektől független állandósága fajspecifikus tulajdonság. A csírázó makk relatív tömege és sűrűsége közötti korreláció tette lehetővé, hogy az egyedfejlődés kezdeti stádiumát – a csírázási szakaszt – az eddigi gyakorlattól eltérően finomabb felbontású állapotokra osszuk fel. Az azonos relatív tömegű és sűrűségű makk-egyedek azonos fejlődési állapotúaknak tekinthetők. A relatív tömeg és sűrűség értékeken alapuló egyedfejlődési állapotokba való besorolás - a csíranövények környezeti körülmény és stresszhatás vizsgálatainál - a mért biokémiai paraméterek szórását hagyományos besorolású kísérletekhez viszonyítva majdnem egy nagyságrenddel csökkentette.
2. A vizsgálatokhoz választott biokémiai indikátorok (endogén formaldehid-szint, totálfenol-tartalom, fehérjetartalom, kataláz, peroxidáz és polifenol-oxidáz aktivitások) egyesített halmazán – az indikátorok skaláris értékeiből származtatott vektorra – egyedfejlődési és stresszhatás specifikus változások tapasztalhatók.
3. A peroxidáz és polifenol-oxidáz aktivitások anyagcsere-szabályozásból fakadó lineáris korrelációjának, s paramétereinek (meredekség, határozottsági fok, korrelációs érvényességi tartomány, tengelymetszet) időbeli megváltozása leképezi az egyedfejlődés és a stressz-indukálta fiziológiás állapotváltozásokat. Megállapítottuk és diszkusszáltuk a lineáris enzimkorreláció létezésének és érzékelésének szükséges feltételeit. Módszert dolgoztunk ki az egymáshoz viszonyítva arányosan szabályozott enzimaktivitások korrelációjának érzékelésére. Polifenol-oxidáz és peroxidáz enzimek korrelációja esetében módszerünk szokatlanul magas, de egyértelműen magyarázható és magyarázott  $r^2 > 0.95$  határozottsági fokú lineáris regressziókat eredményez.

Eredmények

## A TÁROLÁS ÉS A CSÍRÁZÁS HATÁSA A SZAPORÍTÓANYAG FIZIKAI TULAJDONSÁGAIRA

A magvak duzzadása fizikai, kémiai és biokémiai folyamatok összesége, ami a raktározott tápanyagok kolloid sajátságaiból fakad. A szénhidrátok, lipidek és fehérjék hidrofil funkciók csoportjai (-NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH, stb.) elsősorban hidrogénhid kölcsönhatáson keresztül, magukhoz vonzzák a vízmolekulákat, maguk körül hidrátburkot kialakítva. A makromolekulák, illetve a raktározott vízdoldható vegyületek oldódása növeli az intracelluláris tér ozmózis nyomását, ami a szabad kapillárisok oldattal történő feltöltődését segíti elő. A hidrolitikus biokémiai folyamatok a tárolt makromolekulákat (lipidek, keményítő, fehérjék)

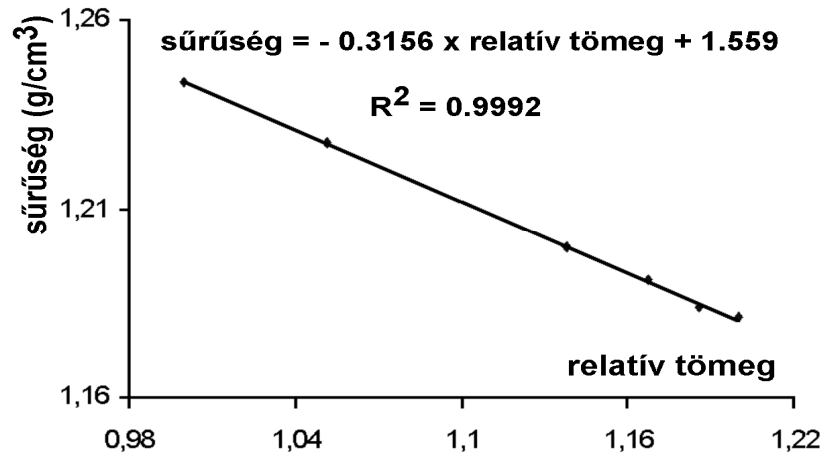
építőegységeikre bontják. A mólszám növelő reakciókban a kis molekulatömegű vegyületek (cukrok, aminosavak) az intracelluláris tér oldott anyagokkal való telítődéséig növelik az ozmózisnyomást, fenntartván a magvak duzzadását kísérő folyamatos vízfelvételt.

A tömegnövekedés a vízfelvétel, s egyszersmind a mag légzésének következménye. A csírázó makk tömegét a raktározó szövetekbe kerülő víz és oxigén mennyisége növeli, míg a kibocsátott szén-dioxidé csökkenti. Mivel az egységnyi makktérfogatra vonatkoztatott szén-dioxid mennyisége kisebb a felvett, fajlagos víz és oxigén együttes mennyiségénél, ezért a csírázó makk tömege növekedni fog.

A vízfelvétel szükségszerű velejárója a makksűrűség megváltozása. A hidrolitikus folyamatok a raktározó szövetek szilárd halmazállapotú, víznél nagyobb sűrűségű makromolekuláris anyagtartalmát csökkentik. A lebontott keményítő és fehérjék térfogatát az intracelluláris tér makromolekuláris anyagoknál kisebb sűrűségű oldata tölti ki. A tápanyagok mobilizációjában, a raktározó sejteken belül egyre csökken az oldat sűrűségénél nagyobb sűrűségű tápanyagok térfogata. Így a csírázás makk szikleveleinek sűrűségcsökkenését idézi elő.

A statisztikailag bizonyított vízfelvétel fajlagos állandósága miatt, a makkok abszolút tömegnövekedése mérettől függő, míg a sűrűség csökkenése mérettől független paraméterek. A fizikai sajátságokban adódó különbség - a tömeg extenzív, a sűrűség intenzív (fajlagos) fizikai tulajdonság - kiküszöbölhetővé vált a csírázási makktömeg nyugalmi állapotú makktömegekre való vonatkoztatásával. Az így definiált relatív tömeg tehát, a sűrűséghez hasonlóan mérettől független tulajdonság, fajlagos mennyiség, amely a csírázás folyamán az egységnyi makktömegekre jutó tömegnövekedés mértékét fejezi ki.

A relatív tömegnövekedés és a sűrűségcsökkenés lineárisan korrelálnak egymással, a sűrűség-relatív tömeg adatpárookra nagyon jó közelítéssel ( $r^2 > 0.95$ ) egyenesek illeszthetők.



**1. ábra.** Egy csírázó makk sűrűségének és relatív tömegének korrelációja..

Az egyenesek meredeksége, mint fizikai sajátság az egységnyi relatív tömegnövekedésre jutó sűrűségcsökkenést fejezi ki. Fajon belül a korrelációs egyenesek meredekségei között szignifikáns eltérés statisztikailag nem mutatható ki, tehát az egységnyi relatív tömegnövekedésre jutó sűrűségcsökkenés állandónak tekinthető az ontogenezis folyamán, ami a csírázó tölgy makk biológiai sajátsága.

A tölgy makk sűrűség-relatív tömeg értékpárok lineáris korrelációjának kísérletes nyomon követésével, az azonos egyedfejlődési állapotokhoz tartozó makkegyedek kiválasztási bizonytalanságát sikerült csökkenteni, redukálva ezzel a mért stresszváltozók (pl. enzimaktivitások) értékeinek szórását is.

Kocsányos tölgy makk csírázása is lineárisan korreláló tömeg és sűrűség értékeket szolgáltatott, de a csermakkétól eltérő meredekség mellett. A csermakk csírázását jellemző tömeg és sűrűség közötti függvénykapcsolatot jellemző eredményeket a Journal of Theoretical Biology c. folyóiratban jelentettük meg.

### **A szaporítóanyag minőségének tárolás alatti jellemzése**

Az erdészetben széleskörűen alkalmazott hűtőkamrás tárolási módszert kísérletsorozattal modelleztük. A makktételeket  $1\pm 1$  °C-on, 80-90 % relatív páratartalom mellett, hűtőszekrényben tároltuk. A tárolás folyamán a makkminőség nyomon követésére néhány biokémiai paraméter (endogén formaldehidtartalom, fehérje ill. totálfenol-tartalom, kataláz, peroxidáz és polofenol-oxidáz aktivitások) megváltozását vizsgáltunk.

A makkminőség tárolás alatti jellemzésére csíráképeségi vizsgálatokat hajtottunk végre. Ehhez 2004 november végétől a 2005 május elejéig, havi időközökkel a tárolt makktételből véletlenszerűen válogatva, 50-50 darab terméshéjától megfosztott tölgyemköt köldökükkel lefele, sterilizált perlitágyba helyezve csíráik megjelenéséig csíráztattunk.

A cser és a kocsányos tölgy makktételek tárolás alatti minőségváltozása szignifikáns eltérést nem mutatott. Mind a cser- és mind a kocsányos tölgy makk a 90 % körüli csíráképeségi sajátosságukat a vegetációs időszak kezdetéig megőrzik, majd azt követően a csírázási százalékok jelentősen leesnek (kb. 35%-os csökkenés). A tárolási vizsgálat megállapításai az erdészeti gyakorlat tapasztalataival összhangban vannak. Ez a tapasztalat a stresszvizsgálataink csemeteigényét biztosítandóan kísérleti tervezésünk egyik pillérévé vált.

Fehérjetartalom: Az enzimaktivitás értékek vonatkoztatási alapjául szolgáló fehérjetartalmat ugyancsak erre az időszakra vizsgáltuk. A kapott adatok átlagértékei statisztikailag nem különböztethetőek meg egymástól. A tárolás alatt az alkalmazott vizsgálati módszer esetében a makk fehérjetartalma állandó értékűnek tekinthető (160-190  $\mu\text{g/ml}$ ). A fehérjetartalom állandóságát állapították meg Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) magjainak kontrolált körülmények (16 °C, 40 % relatív páratartalom) mellett biztosított tárolása során (FAWUSI, 1989), és a *Quercus serrata*, *Quercus mongolica* és vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) szaporítóanyagaira elvégzett tárolási vizsgálatok során (SHIMADA, 2001).

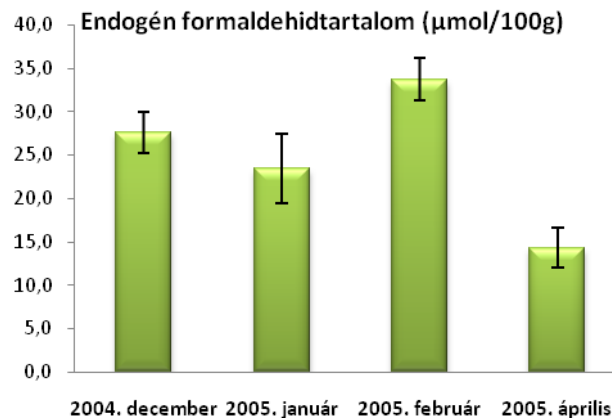
Fenoloidtartalom: A vizsgált tárolási időszak folyamán, az alkalmazott körülmények mellett a nyugalmi állapotú kocsányos tölgy makk összes fenoltartalma nem változott meg szignifikánsan (7-9 mmol/100g). A makk az alacsony hőmérsékletű tárolás alatt is megtartja magas fenoloidok koncentrációját. Eredményünket nagymértékben alátámasztják SHIMADA (2001) *Quercus serrata* és *Quercus mongolica*, valamint vadgesztenye növényfajokra vonatkozó eredményei és WOOD (2005) fehér, ill. vörös tölgyemköt (*Q. alba*, ill. *Q. rubra*) végzett kísérletei. Nedves talajréteg alatt tárolt makktételek esetében nem tapasztaltak figyelemreméltó módosulásokat a tanninok, mint fenoloidok koncentrációértékeiben.

Katalázaktivitás: Hasonlóan az előbb említett fenoltartalom állandóságához, a kataláz aktivitása sem változott meg az ontogenezis kezdeti stádiumaiban. A kataláz aktivitások statisztikailag azonos értékűeknek tekinthetők a tárolás öt hónapja alatt (4-5  $\mu\text{mol O}_2/\text{gsec}$ ). Nem értelmezhető statisztikai differencia az egyes hónapokban elvégzett mérések átlagértékei között. Ez az eredmény a vörös tölgy makkal folytatott vizsgálatok eredményeivel összhangban van (BROWN, 1939).

A kataláz aktivitás mérése lényegében nem járul hozzá a tárolás alatt bekövetkező esetleges minőségromlás indikálásához.

**Endogén formaldehidtartalom:** A ciklikusan jelentkező, jó termésből származó makk kezelésével és tárolásával foglalkozó tématerület jelentős irodalmi háttérrel rendelkezik. Megállapítást nyert, hogy a jelentős minőségromlás nélküli, alacsony hőmérsékletű tárolás alapfeltétele a szikkasztott makk gázcseréjének biztosítása és nedvességtartalmának kb. 35-40 % közötti értéken tartása.

A csertölgy esetében elvégzett hasonló kísérletsorozatban a tárolás endogén formaldehid ciklusra gyakorolt hatásának vizsgálatához, a 2004. december és 2005. április közötti időszakban történt a nyugalmi állapotú makk endogén formaldehidtartalmának meghatározása.

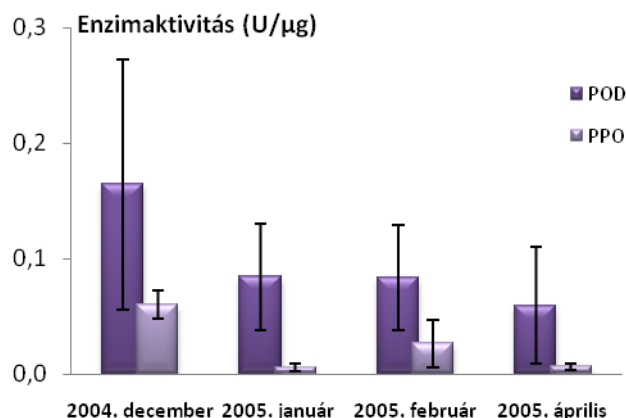


**2. ábra.** Az endogén formaldehidtartalom változása a kocsányos tölgy makk szikleveleszöveteiben.

A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy a tárolt, nyugalmi állapotú makkok vegetációs időszakot megelőző endogén formaldehidtartalma változatlan értéken marad. Ezt követően mennyisége szignifikánsan megemelkedik, majd április hónapra több mint 50 %-kal csökken (lásd. 2. ábra).

A cser és kocsányos tölgy esetében megállapítást nyert az a tendencia, miszerint a nyugalmi állapotú makk a vegetáció kezdetekor maximális endogén formaldehid-képző potenciállal rendelkezik. A tavaszi vetésen túli tárolás során az endogén formaldehid-szint csökken, ami a hosszabb időtartamú makktárolás alatt bekövetkező minőség csökkenéssel lehet kapcsolatban. A tárolás körülményeinek körültekintő megválasztása és betartása elengedhetetlen feltétele a makk minőségének minél hosszabb távú megőrzésében. Fontos tény, hogy e kémiai paraméter alkalmas a makkminőség tárolás alatti jellemzésére. Értéke determinisztikusan változik a tárolás folyamán, s e két tölgyfaj esetében analóg módon.

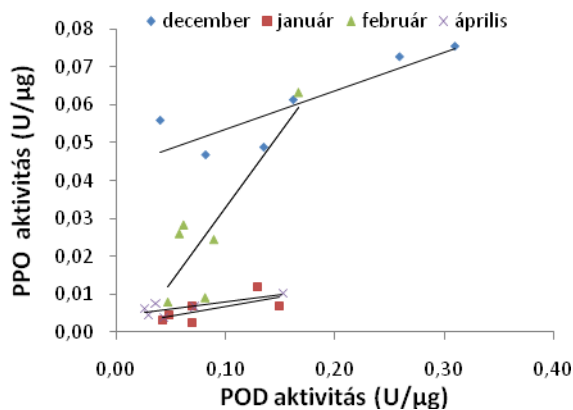
**Peroxidáz és polifenol-oxidáz aktivitások:** A tárolás alatt a növényekben fiziológiai állapotváltozások mellett, biokémiai módosulások is végbemennek. Ezekben a folyamatokban a reaktív oxigéngyökök különböző intenzitással keletkeznek. Erre válaszreakcióként védekezési mechanizmusok aktiválódnak. Az antioxidáns enzimek aktivitásai sejtszabályozási mechanizmusok hatására megváltozhatnak. A makktétel fiziológiai és biokémiai folyamatainak tárolás során bekövetkező változásait a peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimek aktivitásai jól reprezentálhatják. A makkok szikleveleiből mért peroxidáz és polifenol-oxidáz aktivitások átlagértékeit szemlélteti a raktározási periódusban a 3. ábra:



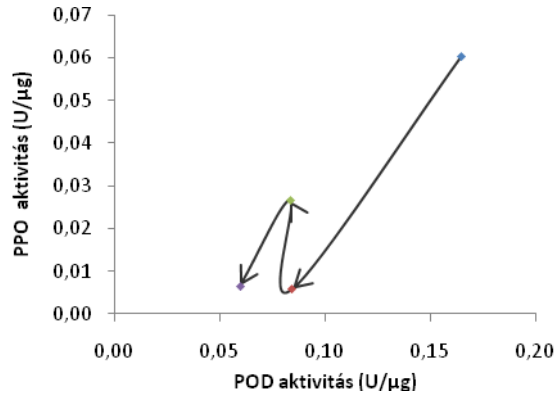
**3. ábra.** A POD és PPO enzimek aktivitása kocsányos tölgy makk szikleveleszöveteiben.

A  $1 \pm 1$  °C-on, 80-90 % relatív páratartalom mellett hűtőben tárolt kocsányos tölgy makktétel enzimaktivitási értékeit decembertől áprilisig nyomon követve azt tapasztaltuk, hogy a peroxidáz és a polifenol-oxidáz aktivitások abszolút értékei a tárolás második hónapjára drasztikus mértékű csökkenésen mennek keresztül. Ezt követően értékük stagnál, állandó összfehérje-tartalom mellett. Tendenciaként megállapítható, hogy a két enzim aktivitásainak módosításait párhuzamosan, egymással összehangoltan hajtja végre. Ha az egyik enzim aktivitása csökken, akkor hozzá ugyanolyan mértékű csökkenés társul a másik enzim részéről, és fordítva.

A két enzim aktivitásváltozásának hasonló tendenciája inspirált bennünket az aktivitásaik közötti korreláció létezésének vizsgálatára. A kovariancia analízis alkalmazása a peroxidáz és polifenol-oxidáz aktivitások lineáris korrelációjának hipotézisét alátámasztotta. A lineáris korrelációt jellemző regressziós egyeneseket és az egyenesek súlypontjának enzimaktivitási síkban való vándorlását a 4-5. ábrák mutatják be:



**4. ábra.** A POD és PPO enzimek korrelációja kocsányos tölgy makk szikleveleszöveteiben különböző tárolási időpontokban. (dec.:  $PPO=0.137POD+0.035$ ,  $r^2=0.93$ ; jan.:  $PPO=0.096POD-0.001$ ,  $r^2=0.783$ ; feb.:  $PPO=0.389POD-0.003$ ,  $r^2=0.874$ ; márc.:  $PPO=0.044POD + 0.004$ ,  $r^2=0.812$ )



**5. ábra.** A korrelációs tartományok súlypontjának enzimaktivitási síkban történő vándorlása a tárolás folyamán.

A 2004. decemberi és a 2005. januári regressziós egyenesek meredekségei között szignifikáns különbség nincs, azonban érvényességi tartománya mindkét irányban, jelentős mértékben leszűkül. A regressziós tartományok súlypontjai a tárolás folyamán a kiindulási állapottól csökkenő, majd januártól februárig növekvő és végül újra csökkenő tendenciát mutatnak. (Az enzimkorreláció elméleti értelmezését lásd az Enzimkorrelációs vizsgálatok c. fejezetben).

**I. táblázat.** Az indikátorok egyesített változási mintázata a makktétel tárolása során.

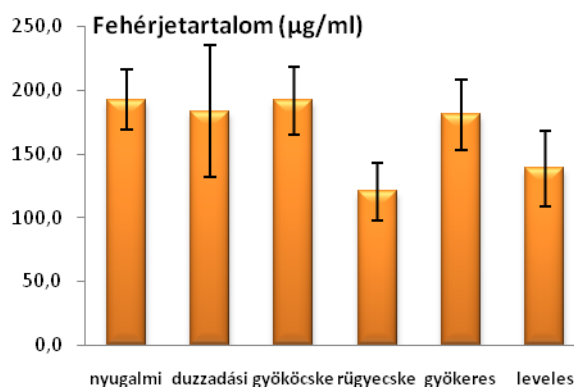
Tárolás	Endogén formaldehidtartalom	Fenoloidtartalom	KAT aktivitás	POD aktivitás	PPO aktivitás	Összfehérje-tartalom
2005. december-2006. január	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	↓	változatlan
2006. január-2006. február	↑	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan
2006. február-2006. április	↓	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan

## EGYEDFEJLŐDÉS JELLEMZÉSE BIOKÉMIAI PARAMÉTEREKSEL

Csíráztatási kísérleteinkhez tömeg és sűrűség alapján válogatott makkegyedeket választottunk. A kocsányos tölgy makk egyedfejlődését végigkísérő relatív tömeg-sűrűség adatpont-párokra illesztett lineáris regressziós egyenesek meredekségei között szignifikáns eltérés statisztikailag nem volt kimutatható, tehát az egységnyi relatív tömegnövekedésre jutó sűrűségcsökkenés állandónak tekinthető az ontogenezis folyamán, ami a csírázó tölgymakkok biológiai jellegzetessége.

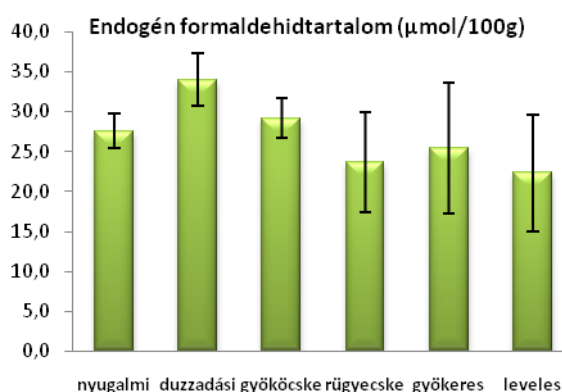
A germináció kezdeti szakaszában jelentős változások következnek be a magok anyagkészletét illetően. Fehérjetartalomra vonatkozólag fajtól, növényi résztől, és a vizsgált egyedfejlődési állapottól függően eltérő adatok lelhetők fel az irodalomban. Mivel az enzimaktivitásokat összfehérje-tartalomra szokás vonatkoztatni, feltétlenül szükséges volt az erre vonatkozó adatok meghatározása és kiértékelése.

A sziklevél-, gyökér- és levélszövetekből meghatározott fehérjetartalmak összmenyisége a 6. ábrán látható.



**6. ábra** Sziklevél fehérjetartalom változása kocsányos tölgy csemeték egyedfejlődése során.

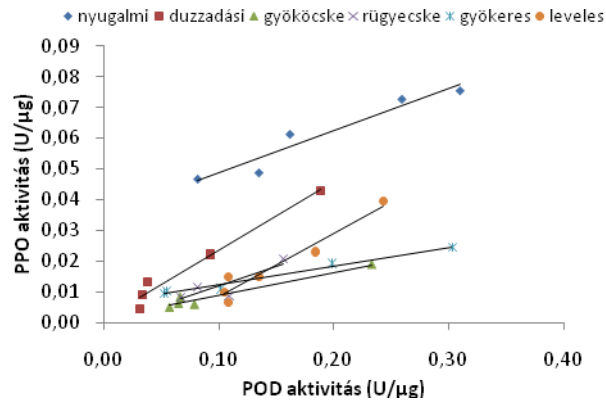
Az endogén formaldehid-tartalom vonatkozásában kijelenthető, hogy ez a vizsgálati paraméter érzékeny markere az ontogenezisnek. Értékeiben bekövetkező változások determinisztikusan követik az egyes egyedfejlődési állapotokat, s mind a csertölgynél, mind a kocsányos tölgnél tendenciaszerűen azonos útvonal szerint, mely ugyancsak egyedektől független legalább fajspecifikus sajátásra enged következtetni. Az endogén formaldehid-tartalom kezdeti növekedése intenzív demetilizációs folyamatokra, míg azt követő csökkenése metilizációs folyamatok előtérbe kerülését tükrözi vissza.



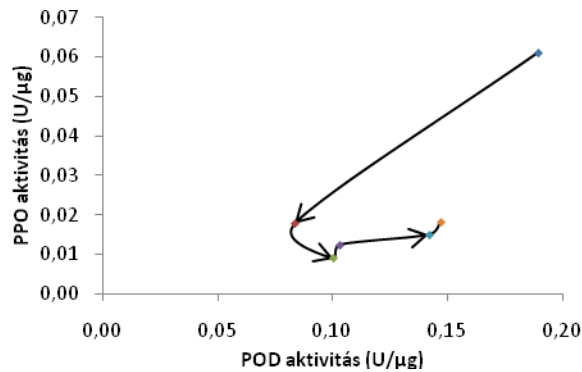
**7. ábra.** Az endogén formaldehidtartalom változása kocsányos tölgy csemeték sziklevélszövegeiben az egyedfejlődés alatt.

A fenoloidtartalom és a kataláz aktivitása az egyedfejlődés jellemzésében nem bizonyultak eredményes indikátoroknak. Az ontogenezis folyamán értékeikben bekövetkező változások között szignifikáns statisztikai különbségek nem voltak kimutathatók.

A peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimek aktivitásai hasonló eredményeket mutattak, azonban korrelációs vizsgálatokkal a hatleveles állapotú csemeték kifejlődéséig tartó egyedfejlődési szakaszok közvetett úton jellemezhetőkké váltak. (Enzimkorreláció elméleti értelmezését lásd az Enzimkorrelációs vizsgálatok c. fejezetnél)



**8. ábra.** A tölgycsemete sziklevelészöveteiben mért POD és PPO aktivitások korrelációja az egyedfejlődés során. (nyugalmi:  $PPO=0.137POD+0.035$ ,  $r^2=0.931$ ; duzzadási:  $PPO=0.222POD+0.001$ ,  $r^2=0.971$ ; gyököcske:  $PPO=0.074POD+0.002$ ,  $r^2=0.952$ ; rügyecske:  $PPO=0.126POD-0.006$ ,  $r^2=0.742$ ; gyökeres:  $PPO=0.061POD+0.006$ ,  $r^2=0.979$ ; leveles:  $PPO=0.203POD-0.012$ ;  $r^2=0.933$ )



**9. ábra.** A korrelációs tartomány súlypontjának egyedfejlődést jellemző vándorlása az enzimaktivitási síkban.

Az alkalmazott enzimkorrelációs vizsgálattal az ontogenezis fiziológiás eseményeinek nyomon követése az abszolút enzimaktivitási értékekkel történő jellemzéshez képest a növényi fejlődés finomabb feltérképezését tette lehetővé. Az alkalmazott korrelációs összefüggések paraméterei (regressziós egyenesek meredeksége, regresszió érvényességi tartománya, regresszió határozottsági foka, tengelymetszet) az enzimaktivitások abszolút értékeihez viszonyítva a fejlődés alatt bekövetkező folyamatokkal szemben érzékenyebbek. A regresszió érvényességi tartományának kiszélesedése az intenzív fotoszintézist végző levélszövetek esetében egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a regressziós paraméter az anyagcsere-intenzitás eloszlás „tükrképe”. A regressziós egyenesek súlypontjainak enzimaktivitási térben való vándorlása az egyedfejlődésben fellépő szignifikáns változások jellegzetes útvonalait szimbolizálta.

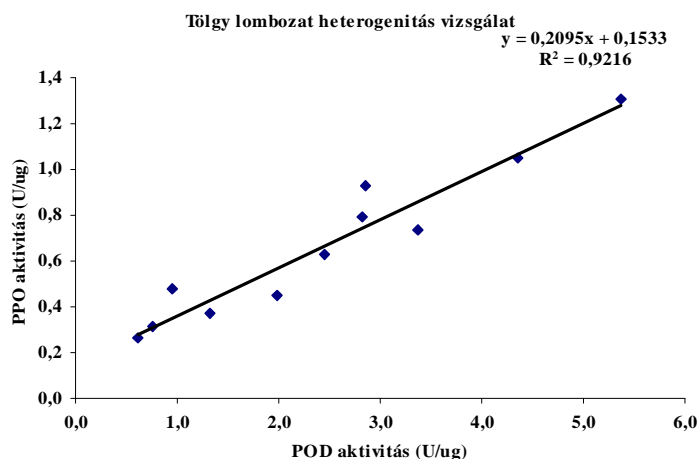


## II. táblázat. Az indikátorok változási mintázata a makk egyedfejlődése során.

Egyedfejlődés	Endogén formaldehid	Fenoloidtart.	KAT aktivitás	POD aktivitás	PPO aktivitás	Összfehérjehaté- tartalom
nyugalmi-duzzadási	↑	változatlan	változatlan	változatlan	↓	változatlan
duzzadási-gyököscke	↓	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan
gyököske-rügycske	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	↓
rügycske-gyökeres	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	↑
gyökeres-leveles	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan	változatlan

### Enzimaktivitások eloszlásvizsgálata

Egy kifejtett kocsányos tölgyfán (kb. 60 éves) végzett enzimaktivitás mérés eredményét mutatja be a 10. ábra. A lombzat anyagcsere-intenzitás eloszlása következményeként különböző helyekről, de azonos időpontban vett levélminták időfüggetlen enzimkorrelációt szolgáltattak. A POD és a PPO aktivitások külön-külön normál eloszlást követnek (Kolmogorov-Szmirnov-próba).



**10. ábra.** A lombkorona (*Q. robur*) fotoszintetikus intenzitás eloszlását követő PPO-POD enzimkorreláció szemléltetése regressziós egyenessel.

## STRESSZVIZSGÁLATOK

### Kocsányos tölgy makkok hidegstressz vizsgálata

Csírátzatott kocsányos tölgy makk 1 órás időtartamú,  $-20^{\circ}\text{C}$ -os, 1 óra időtartamú hidegstressz hatására, endogén formaldehidtartalmukat a kiindulási állapot negyedére csökkentették ( $13.45 \rightarrow 3.15 \mu\text{mol}/100\text{g}$ ). Helyi minimum elérése után, hat óra elteltével a formaldehid-szint a kontrollt meghaladó értéken maximumot ért el ( $17.56 \mu\text{mol}/100\text{g}$ ), majd értéke lecsökkent ( $10.36 \mu\text{mol}/100\text{g}$ ), s a kontroll állapotban meghatározott érték közelében stagnált ( kb.  $12 \mu\text{mol}/100\text{g}$ ).

A imbibíciós állapotú tölgy makkok totálfenol-tartalma a stressz alarmfázisában a kontroll állapothoz képest lecsökkent ( $7.31 \rightarrow 4.87 \text{ mmol}/100\text{g}$ ), majd megemelkedett ( $9.33 \text{ mmol}/100\text{g}$ ), és újra csökkent ( $7.87 \text{ mmol}/100\text{g}$ ). Kilenc órás hidegsokk hatására a fenoloidok összkoncentrációja közel 40 %-kal nagyobb volt a kontroll állapothoz képest.

Kataláz aktivitás vonatkozásában a változás jellegében tapasztalható tendencia ellenére statisztikailag nem voltak igazolhatók a mérési pontok közötti szignifikáns eltérések.

Megállapítható, hogy a vizsgált paraméterek 1 órás mintavételi lépésköz által meghatározott kritikus, Shannon-féle frekvenciaküszöb alatti tartományban ( $0.25 \text{ h}^{-1}$ ) az endogén formaldehidhez hasonló periodikus változásokat mutattak. A kiválasztott markerek közül a legérzékenyebben az endogén formaldehid-, illetve a összfenol-tartalom tükrözte vissza a stresszhatásra bekövetkező válaszreakciókat. Mindhárom indikátor esetében tapasztaltuk a kiindulási állapothoz képest csökkenő, minimum értéken áthaladó, majd növekvő, maximum értéket elérő és újra csökkenő tendenciát. Az indikátorok mértékének változásaiban tapasztalható hasonló tendencia ellenére gyenge lineáris korreláció állt fenn e tényezők között.

### Kocsányos tölgy csemeték hidegsressz vizsgálata

Mindhárom vizsgálati évben a levelek endogén formaldehidtartalma a  $4.5 \text{ órás } -20 \text{ °C-os}$  hideghatásra szignifikáns módon megemelkedett. Az összfenol-tartalom mennyiségében azonban a hidegsokk nem okozott számottevő változást. A kataláz aktivitásértékei kocsányos tölgy csemeték leveleiben egyöntetűen lecsökkentek (15-20%-os csökkenés). Az egyes években levelekből mért enzimaktivitások a viszonylag nagy szórás értékek miatt sem a peroxidáz, sem a polifenol-oxidáz esetében nem jeleztek meghatározó differenciákat. A fehérjék össz mennyiségének csökkenését 2005-ben lehetett kimutatni, azt követően koncentrációja egyik évben sem változott meg szignifikánsan.

A különböző származási helyű makktételekből nevelt csemeték vizsgálati paramétereik alapján összehasonlíthatókká váltak. Egyértelmű különbségek adódtak minden egyes indikátor vonatkozásában a gyulai Erdészetéből származó és a Kisalföldi Erdészeti Rt. vitnyédi telephelyéről származó makkegyedek között. Vitnyéd körzetéből begyűjtött makktétel endogén formaldehid-képző potenciálja nagyságrenddel kisebb volt az Alföldről származókéénál, a totálfenol-tartalom eredmények összehasonlításához hasonlóan. A peroxidáz kivételével, a gyulai makktételeket magasabb enzimaktivitás értékek jellemezték.

### III. táblázat. Az indikátorok változási mintázata hidegsokk esetén.

Kocsányos tölgy csemete hidegstressz	Endogén formaldehidtartalom	Fenoloidtartalom	KAT aktivitás	POD aktivitás	PPO aktivitás	Összfehérje-tartalom
2005: kontroll-hideg	↑	változatlan	↓	változatlan	változatlan	↓
2006: kontroll-hideg	↑	változatlan -	↓	változatlan	változatlan	változatlan
2007: kontroll-hideg	↑	változatlan -	↓	változatlan	változatlan	változatlan

### Kocsányos tölgy csemeték fényhiánysressz vizsgálata

A három egymást követő kísérleti évben a levelek endogén formaldehidtartalma szignifikánsan megemelkedett a három napos sötétben való tárolás hatására. A hidegstressznél tapasztalt stagnáló összfenol-tartalom e stresszesemény kifejeződése folyamán is változatlan koncentrációkat eredményezett. A kataláz és peroxidáz enzimek 72 órás fényhiánysstresszre bekövetkező bárminemű aktivitásbeli változásai nem voltak visszaigazolhatóak. A polifenol-oxidáz ezzel szemben szignifikánsan lecsökkent. A vizsgálat első évében tapasztalt fényhiánysstresszre bekövetkező fehérjemennyiségbeli csökkenést a két utolsó év kísérleti eredményei nem erősítették meg.

A makktételek egymáshoz való összehasonlításából kiderült, hogy az eddigi eredményekhez hasonlóan a csemetek fényhiánystresszre adott válaszreakciója tendenciájában és mértékében egyaránt ugyanolyan módon jutott kifejezésre.

**IV. táblázat.** Az indikátorok változási mintázata fényhiány esetén.

Kocsányos tölgy csemete fényhiánystressz	Endogén formaldehidtartalom	Fenoloidtartalom	KAT aktivitás	POD aktivitás	PPO aktivitás	Összfehérje-tartalom
2005: kontroll-fényhiány	↑	változatlan	változatlan	változatlan	↓	↓
2006: kontroll-fényhiány	↑	változatlan	változatlan	változatlan	↓	változatlan
2007: kontroll-fényhiány	↑	változatlan	változatlan	változatlan	↓	változatlan

### Kocsányos tölgy csemetek szárazságsressz vizsgálata

A szárazság kocsányos tölgy csemetékre gyakorolt hatásának vizsgálata során időben követtük nyomon a kiszáradás mértékét. A tölgy csemetek leveléből meghatározott magas endogén formaldehidtartalom már az első mintavételezés alkalmával a kimutatási határérték közelébe csökkent, s ezt követően értéke már nem is változott. A vízhiány mértékének fokozódásával az endogén formaldehid-képző potenciál alacsony értékre esett vissza (4.61 → 0.50  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ). Az endogén formaldehidtartalom csökkenése a csemete szárazságsstresszre bekövetkező demetilezési folyamatok háttérbe szorulására utal. A növény ellenálló-képessége a fiziológiás kiindulási érték alá esik, krónikus tünetek jelennek meg rajta, melyet pusztulása követ. A stressz lefolyása alatt a csemetek apoptózis közeli állapotba kerültek, a folyamat irreverzibilissé vált.

A biológiai rendszer a stressz hatására a fenolos anyagokat termelő folyamatainak intenzitását csökkentette, 5 hét vízmentes időszak után a fenoloidok mennyisége a kiindulási érték harmadára esett vissza (8.14→2.66  $\text{mmol}/100\text{g}$ ).

A kataláz aktivitása egy hónap szárazság után több mint kétszeresére emelkedett a kontroll növényben mérthez képest (14.52→33.21  $\mu\text{mol O}_2/\text{gsec}$ ), ami feltehetőleg a stressz hatására felboruló antioxidánsok és prooxidánsok közötti egyensúly során felszaporodó AOF közömbösítésében aktívan résztvevő enzim működésének következménye (SIES,1991). Ezt követően intenzitása egy újabb hét vízmentes időszak múltán szignifikánsan lecsökkent (17.04  $\mu\text{mol O}_2/\text{gsec}$ ). A vízhiány mértékét ebben a pontban a csökkent enzimaktivitási értékek egyértelműen visszatükrözték.

A peroxidáz enzim esetében a kezdeti vízdeficit nem okozott jelentős változást az enzim működésében (kb. 32  $\text{U}/\mu\text{g}$ ). Aktivitása változatlan maradt, majd ezt követően egy nagyságrendi tartományt felölelő hirtelen csökkenést tapasztaltunk értékében (37.09→1.76  $\text{U}/\mu\text{g}$ ). A polifenol-oxidáz aktivitása ezzel szemben szignifikáns mértékű fokozatos csökkenésen ment keresztül (8.34→5.25→1.03→0.28→0.27  $\text{U}/\mu\text{g}$ ). Már az első mérési alkalom után aktivitása közel felére esett vissza, ami aztán még tovább csökkent, s hasonlóan a POD-hoz éppen kimutatható szinten állandósult. Olajfa csemetében ugyanilyen változások következtek be a három végoxidáz enzim vonatkozásában (SOFO et al., 2007). Az enzimek aktivitásainak megváltozása a sejtek állandó összfehérje-mennyisége mellett valósult meg.

**V. táblázat.** Az indikátorok változási mintázata szárazság esetén.

Kocsányos tölgy csemete szárazságsstressz	Endogén formaldehidtartalom	Fenoloidtartalom	KAT aktivitás	POD aktivitás	PPO aktivitás	Összfehérje-tartalom
---	-----------------------------	------------------	---------------	---------------	---------------	----------------------

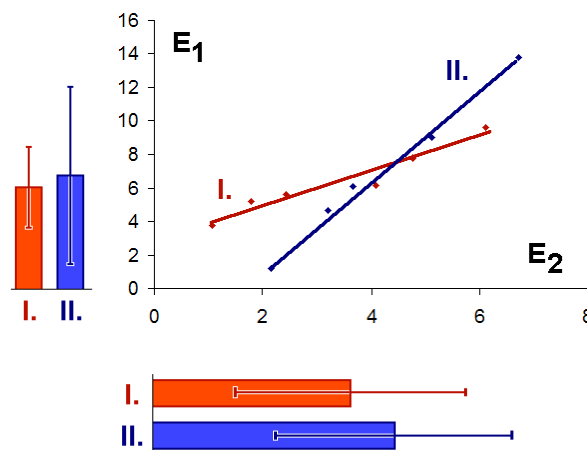
kontroll-I.	↓	változatlan	↑	változatlan -	↓	változatlan -
kontroll-II.	↓	változatlan -	↑	változatlan -	↓	változatlan -
kontroll-III.	↓	↓	változatlan -	↓	↓	változatlan -
kontroll-IV.	nem mért	nem mért	nem mért	↓	↓	változatlan -

## ENZIMKORRELÁCIÓS VIZSGÁLATOK

Az OTKA T 046408 sz., jelenlegi projektünk és a „Növényi stressz vizsgálata és értékelése szabályozáselméleti analógiák alapján” c. MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj pályamunka szinergiája eredményeként az elmúlt két évben a növényi stresszel kapcsolatos kutatásainkat és elképzeléseinket enzimmkorrelációs vizsgálatok kidolgozása, végrehajtása és fejlesztése uralja. Az enzimmkorrelációk létezése, ill. tapasztalása az anyagcsere-szabályozás működésének a szükségszerű következménye.

Az anyagcsere-szabályozását elsősorban a DNS-ben kódolt enzimek fehérjék regulációja testesíti meg. A DNS átírást követően a riboszómáknál a mRNS kódjának megfelelő összetételű fehérjék, enzimek szintetizálódnak. Az enzimek adott pillanatnyi mennyiségét a gének bekapcsolási gyakorisága egyértelműen meghatározza. Az anyagcsere-útvonalak sebességét, fluxusát az enzimmennyiségek határozzák meg. DNS reguláción keresztüli enzimmennyiség változtatással a sejt szabályozza anyagcseréjének intenzitását. Ha az anyagcsere-intenzitás változtatás során, a sejt két enzimének mennyiségét egymáshoz viszonyítva arányosan szabályozza, akkor az enzimmaktivitásoknak korrelálniuk kell egymással. Eltérő anyagcsere intenzitású, de azonos szöveti típusú biológiai minták enzimmaktivitás értékei lineáris enzimmkorrelációkat szolgáltathatnak. Vizsgálatainkban a növényi peroxidáz (POD) és polifenol-oxidáz (PPO) enzimmaktivitásokat mérve mi is ezt a sejt-szabályozásból fakadó jelenséget tapasztaltuk. A POD és PPO enzimeket erőteljes, lineáris korreláció jellemzi.

Tegyük fel, hogy két enzim ( $E_1$ ,  $E_2$ ) aktivitásának szabályozása az anyagcserében összehangolt, s így aktivitásaik egymással korrelálnak. Továbbá azt is tételezzük fel, hogy az enzimmaktivitások szabályozási összhangja egy pl. környezeti állapotváltozás hatására megváltozik. Ekkor az enzimmkorrelációt jellemző regressziós egyenlet meredeksége megváltozik. Az ábrán az egyik egyenes jelképezzon egy (I.) környezeti állapotot, s a másik (II.) egy az előbbitől szignifikánsan eltérőt (lásd 11. ábra).



**11. ábra.** Az enzimmkorreláció környezeti hatás érzékenysége.

Ha a regressziók érvényességi tartományában jelentős az átfedés, akkor az eltérő környezeti állapotokat az egyes enzimmaktivitások átlagértékei nem különböztetik meg egymástól, mivel

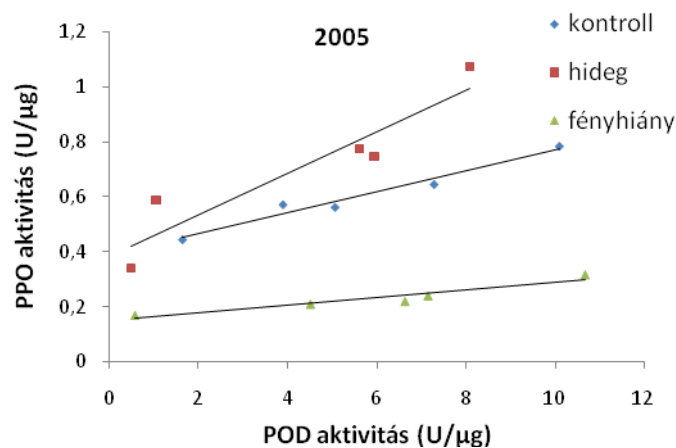
közöttük szignifikáns statisztikai eltérés nem mutatható ki. Ennek ellenére az enzimaktivitási síkban megjelenő regressziók között kovariancia analízissel szignifikáns eltérések tapasztalhatóak. Tehát az enzimaktivitások közötti korrelációkon keresztül a biológiai rendszereket érő környezeti hatásokat érzékenyebben vagyunk képesek megkülönböztetni egymástól.

Figyelembe véve a levelekben mért POD és a PPO aktivitások eloszlásának normál jellegét és értékeiknek legalább egy nagyságrendi tartományra kiterjedő megjelenésüket, továbbá a növényi anyagcsere egy levélen belüli inhomogenitását, a tárgyalt enzimek és esetlegesen más enzimek közötti korrelációk csak akkor fedik fel magukat, ha az aktivitások mérése ugyanabból a növényi kivonatból történik. Ezt a megállapítást tekintjük az adott időállapotról vonatkozó, lineáris enzimkorrelációk érzékelésének szükséges feltételének.

### Hideg- és fényhiánystressz

Az extrém, hirtelen bekövetkező hideg és a fényhiányos állapot esetében tapasztalt állandónak tekinthető peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimaktivitások egymáshoz viszonyítva arányosan változtak meg a stresszesemények folyamán. Az adott körülmények mellett alacsony POD aktivitáshoz alacsony értékű PPO aktivitások társultak és fordítva, tehát az enzimek aktivitása az anyagcsereben összehangoltan szabályozott volt.

Mindhárom évben a 72 óráig fényhiányos körülmények között tartott hatleveles állapotú kocsányos tölgy csemetek enzimkorrelációs egyeneseinek meredeksége a kontroll állapothoz viszonyítva szignifikánsan lecsökkent ( $R^2=0.9$ ). A hidegsokknál 2005-ben meredekség növekedést tapasztaltam 0.87-es határozottsági fokkal, míg 2007-ben változatlan eredményeket kaptunk jóval gyengébb  $R^2$  (0.54) értékkel. A határozottsági fokok relatíve nagy értékei az anyagcsere szabályozott voltát tükrözik vissza. Az enzimkorrelációk érvényességi tartományai szignifikánsan változtak meg, ami az anyagcsere heterogenitásából ered, s a metabolizmus intenzitás-eltéréseit egzakt módon szimbolizálja.

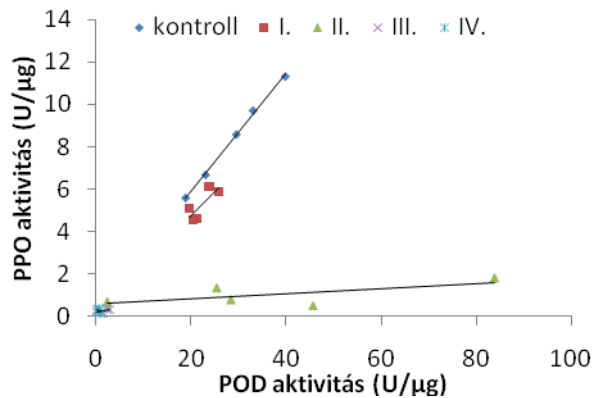


**12. ábra** A kocsányos tölgy csemete enzimkorrelációs egyenesei hideg és fényhiánystressz alatt 2005-ben. (kontroll:  $PPO=0.381POD+0.388$ ,  $r^2=0.965$ ; hidegsokk:  $PPO=0.755POD+0.385$ ,  $r^2=0.872$ ; fényhiány:  $PPO=0.139POD+0.149$ ,  $r^2=0.909$ )

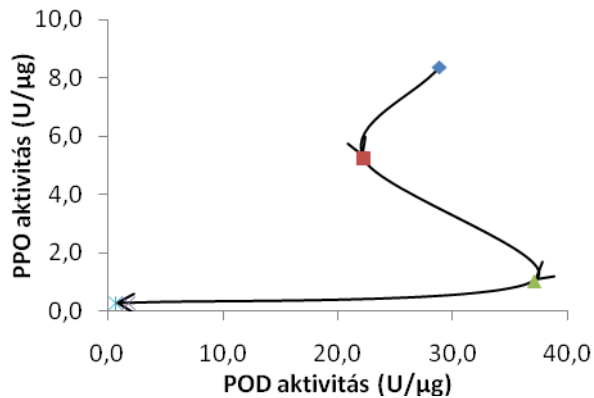
### Szárazságstressz

A peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimek korrelációs egyenesei a csemetek vízhiányos állapotának fokozódásával drámai változásokon mentek keresztül. A korreláció határozottsági fokának egyenletes csökkenésével a regressziós súlypontok enzimaktivitási síkban kirajzolt útvonala a stressz-szindróma fázisait is jelképezi. A meredekség csökkenésével egyidejűleg a regressziós tartományok szűkülését, kiszélesedését, majd újabb erőteljes beszűkülését

tapasztaltuk. A regressziós paraméterekben a szárazság tehát minden tekintetben szignifikáns módosulásokat eredményezett. A sejt enzimaktivitásait szárazság esetében is egymáshoz viszonyítva arányosan szabályozta. A metabolizmus szárazságra bekövetkező fiziológias állapotváltozása köszönt vissza az enzimkorrelációt jellemző regressziós egyenesek paramétereinek, nevezetesen a meredekségnek, a határozottsági foknak és az érvényességi tartománynak a megváltozásában.



**13. ábra.** A kocsányos tölgy csemete enzimkorrelációs egyenesei szárazságstressz alatt. (kontroll:  $PPO=0.284POD+0.21$ ,  $r^2=0.998$ ; (I.):  $PPO=0.232POD+0.097$ ,  $r^2=0.638$ ; (II.):  $PPO=0.011POD+0.612$ ,  $r^2=0.4134$ ; (III.):  $PPO=0.0618POD+0.172$ ,  $r^2=0.343$ ; (IV.):  $PPO=-0.142POD+0.369$ ,  $r^2=0.120$ ).



**14. ábra.** A korrelációs tartományok súlypontjának dinamikája a szárazságstressz alatt.

## IRODALOM

Brown, J. W. (1939) Respiration of acorns as related to temperature and after-ripening. *Plant Physiology* 14: 621-645

- Fawusi, M. O. A. (1989) Seed germination, emergence, biochemical changes and early seedling performance in Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) following controlled environment storage. *Biotronics* 18: 29-35
- Shimada, T. (2001) Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed-hoarding. *Ecological Research* 16 (4): 803–808
- Sies, H. (1991) Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London
- Sofo, A., Manfreda, S., Dichio, B., Fiorentino, M. and Xiloyannis, C. (2007) The olive tree: a paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* 4: 2811-2835
- Wood, M. D. (2005) Tannin and Lipid Content of Acorns in Scatterhoards and Larderhoards. *Northeastern Naturalist* 12 (4): 463–472

Sopron, 2008. február 26.

Németh Zsolt István  
s.k.