

# BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK SZEREPE A HŐMÉRSÉKLET ADAPTÁCIÓS FOLYAMATOKBAN. A NÖVÉNYEK HIDEGTŰRÉSÉNEK PROBLÉMÁI

[FARKAS TIBOR, VIGH LÁSZLÓ és HORVÁTH IBOLYA

Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete, Szeged

A környezet hőmérséklete fontos szerepet játszott és játszik ma is az állatok és növények elterjedésében. Földünk egyenlítői vidékeit melegkedvelő állatok és növények népesítik be, a sarki régiókat pedig hidegkedvelő szervezetek, amelyek közül számos meglepően alacsony hőmérsékletek elviselésére is vállalkozik. A mérsékelt övi régiókban a hőmérsékleti adaptációnak széles skálájára alkalmas szervezetek élnek. A meleg égövi növények nagy hányada már nem túl alacsony pozitív hőmérsékleti tartományokban is károsodik (hidegérzékeny növények), mások csak a víz fagyáspontja alatti hőmérsékleteken károsodnak (hidegtűrő növények), ismét mások megfelelő edzés után aránylag alacsony negatív hőmérsékleteket is elviselnek (fagyűrő növények).

Annak ellenére, hogy a hőmérséklet az az egyik környezeti tényező, melyhez valamennyi élő szervezetnek alkalmazkodnia kellett, azokat az élet-tani és biokémiai folyamatokat, amelyek alkalmazkodóképességüket szabályozzák, még ma sem ismerjük pontosan. Viszont egyre parancsolóbbnak látszik az a szükségyszerűség, hogy ezeket alaposan megismerjük, hiszen a Földünkön egyre több embert kell élelemmel ellátni változatlan termőfelület igénybevételeivel. Ha ismernénk azokat a „fogásokat”, amelyeket a hideg-, ill. fagyűrő növények alkalmaznak alacsony, sokszor negatív hőmérsékletek elviselésére, nemcsak hogy redukálhatnánk az évente rendszeresen jelentkező fagykárokat, de esetleg befolyásolhatnánk bizonyos növények horizontális elterjedését is. Nem elképzelhetetlen az sem, hogy ezen ismeretek birtokában a növények hőmérsékleti optimumait is befolyásolhatnánk és így pl. az üvegházak fűtő-energiaigényét csökkenthetnénk. Az ilyen irányú kutatásoknak elméleti vonatkozásaikon túlmenően, komoly gyakorlati jelentőségük is van.

Az utóbbi évtizedekben végzett kutatások egyik jelentős eredménye az a következtetés, hogy a biológiai membránok azok a struktúrák, amelyek a környezet hőmérsékletének változásaira talán a legeggyértelműbben válaszolnak, és lényegében a válasz minősége határozza meg a szervezet hőmérsékletéhez való alkalmazkodóképességét. A hőmérsékletet felfoghatjuk úgy is, mint egy membrán perturbáló ágenszt, melynek hatását a fennmaradás érdekében a szervezeteknek ki kell védeniök. A SINGER-NICOLSON (53)-féle fluid mozaik membrán modell alapján ez a válasz egy aránylag konstans fluiditás fenntartása

lehet. Alacsony hőmérsékleti viszonyok mellett ui. csak akkor lehetséges a sejt fennmaradása, ha legkülönbözőbb membránstruktúrák kellőképpen fluidak. Ellenkező esetben e szerkezetek a folyadékkristályos állapotból egy merevebb, gélszerű állapotba mennek át, aminek következtében megszűnik szemi-permeabilitásuk, növekszik a membránkötött enzimek aktivációs energiája és felborul a sejt anyagsere-egyensúlya. Mindezek együttesen tartós sejtkárosodáshoz és pusztuláshoz vezethetnek (29). De nemcsak a gél állapotban levő membránstruktúrák alkalmatlanok tartós életfolyamatokra, de az ún. „hyperfluid” membránok is. Egy bizonyos kritikus hőmérsékleti érték felett a membránok kettős réteg szerkezete fel is bomolhat.

### Homeoviszkozus adaptáció

A hőmérséklet hirtelen csökkenései ellen a membránok általában túl vannak biztosítva. A folyadékkristályos — szilárd gél fázisátmeneti hőmérsékletek jóval alacsonyabban vannak, mint a fiziológias hőmérséklet. Az I. táblázatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy kb. egy 15—20 °C különbség van a membránok fázisváltozási hőmérséklete és a sejtműködés optimális hőmérséklete között. Az a tény, hogy még a patkány máj plazmamembránja is mutatja ezt a különbséget, egy egyetemleges regulációs mechanizmusra hívja fel a figyelmünket. Valószínűleg az adaptáció szempontjából éppen ennek a hőmérsékletkülönbségnek a fenntartása a lényeges. Ennek a feltevésnek a helyességét

### I. táblázat

Biológiai membránok folyadékkristályos — szilárd gél állapot átmeneti hőmérséklete és a biológiai hőmérsékletek közötti különbségek

Membrán eredete	$T_{ph}-T_C$	Irodalom
<i>Escherichia coli</i>	16	53
<i>Escherichia coli</i>	17	26
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27	1
<i>Anacystis nidulans</i>	23	15
<i>Anacystis nidulans</i>	12	56
<i>Boerhavia annulata</i>	23	42
<i>Camissonian claviformis</i>	25	42
<i>Brassica oleracea</i>	13	51
<i>Triticum aestivum</i>	16	22
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	24	12
<i>Carassius auratus</i>	11	8
<i>Cyprinus carpio</i>	15	2
<i>Lepomis cyanellus</i>	20	9
<i>Rattus norvegicus</i>	18	36
Átlag	18,6	—

$T_{ph}$  = fiziológias hőmérséklet,  $T_C$  = membránok fázisátalakulási hőmérséklete.

látszanak SINENSKY (52) *E. colin* végzett kísérletei igazolni. Kimutatta, hogy e baktériumból izolált membránok fázisváltózási hőmérséklete mindig 15–16 °C-kal volt alacsonyabb, mint a tenyésztés hőmérséklete. Más prokarióta és eukarióta szervezetek is képesek membránjaik fluiditását (mikroviszkozitását) meglehetősen szűk határok között szabályozni és ez a válasz meglehetősen gyors (7, 23, 36). Első megközelítésben igaznak tekinthetjük, hogy tökéletes hőmérsékleti adaptációhoz egy ilyen 15–20 °C-os hőmérsékletkülönbség fenntartása szükséges. Azok a szervezetek, amelyek nem képesek ennek a hőmérsékletkülönbségnek a biztosítására, változó mértékben károsodhatnak alacsonyabb hőmérsékleteken.

### *A membrán fluiditásának szabályozási lehetőségei*

A membránok fizikai állapotának meghatározásában elsősorban a lipid-komponensek játszanak szerepet. A lipidösszetevőket tekintve mind a foszfolipidek poláris fejcsoportja és az észterező zsírsavaknak a minőségi és mennyiségi viszonyai, mind pedig a sztereoidok foszfolipidekhez viszonyított aránya lehetnek azok a tényezők, melyeket figyelembe kell venni a kérdés értékelésekor. Kimutatták, hogy azonos zsírsavösszetétel esetében a szintetikus foszfatidilkolinok fázisváltózási hőmérséklete alacsonyabb, mint a foszfatidiletanolaminoké (II. táblázat) és ez a fejcsoport sajátos térszerkezeti és töltésbeli különbözőségeire vezethető vissza (31, 43). Azt a tényt, hogy egy zsírsav olvadáspontja annál alacsonyabb, minél rövidebb vagy minél telítetlenebb a lánc, már régen ismerik. A II. táblázat egyben a zsírsavlánc hatását is mutatja a fázisváltózási hőmérsékletre. A sztereoidok adagolására általában növekszik a természetes és mesterséges membránok fázisváltózási hőmérséklete, ha azok eleve már fluid állapotban vannak (5, 37). Ilyen tekintetben az állati szervezetben előforduló koleszterol és a növényi szervezetekben előforduló stigma-, szito- és kampesterol azonos módon viselkednek (32).

### II. táblázat

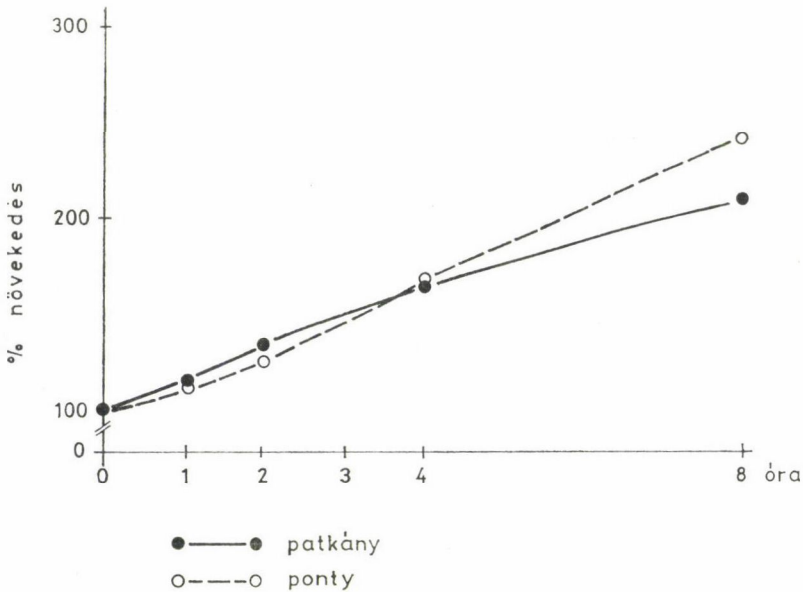
Szintetikus foszfolipidek fázisváltózási hőmérsékletei

Foszfolipid	$T_c$	Foszfolipid	$T_c$
18 : 0/18 : 0 PC	+58	18 : 0/18 : 0 PE	+89
16 : 0/16 : 0 PC	+41	16 : 0/16 : 0 PE	+65
14 : 0/14 : 0 PC	+24	—	—
12 : 0/12 : 0 PC	0	—	—
18 : 0/18 : 1 PC	+3	—	—
18 : 1/18 : 1 PC	-20	18 : 1/18 : 1 PE	+42

PC = foszfatidilkolin, PE = foszfatidiletanolamin.

### A membrán fluiditásának önszabályozása

A legtöbb prokariota és eukariota szervezet a zsírsavösszetétel megváltoztatásával válaszol a környezet hőmérsékletének változásaira. Általában vagy a zsírsavak telítetlenségi fokát növelik, vagy pedig a lánchosszát csökkentik, ha csökken a hőmérséklet. Bizonyos baktériumoknál kimutatták, hogy ilyenkor egy zsírsavdehidrogenáz indukálódik, amely a palmitinsavat a megfelelő monoén zsírsavvá alakítja (43). Eukariótákban, különösen a magasabb rendű szervezetekben, a dehidrogenázok indukciónak több óra, így csak nagy késéssel tudná követni ez a rendszer a hőmérséklet ingadozásait. Elsősorban a *Tetrahymena pyriformis*-on végzett kísérletekből tudjuk, hogy a telített zsírsavak telítetlen zsírsavakká történő dehidrogénezésének mértéke többek között a membrán fluiditásától függ (55). Különböző perturbensek segítségével változtatták a membránok fizikai állapotát, melyet a palmitinsav CoA dehidrogenáz aktivitásának megfelelő változása kísért (35,55). Az 1. ábra mutatja, hogy lényegében hasonló a helyzet gerincesek esetében is, beleértve a meleg vérvű állatokat is. Kísérleteinkben hal (ponty) és patkány májszeleteket  $5^{\circ}\text{C}$ , ill.  $15^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltunk és mértük az izolált mikroszomák sztearinsav CoA dehidrogenáz aktivitását. Kitént, hogy az alacsony hőmérsékleten történő inkubáció előrehaladtával az olajsav képződésének mértéke arányosan növekszik. Ezt úgy értelmezzük, hogy az inkubáció hőmérsékletén az egyébként  $+8^{\circ}\text{C}$ , ill.  $18^{\circ}\text{C}$ -on



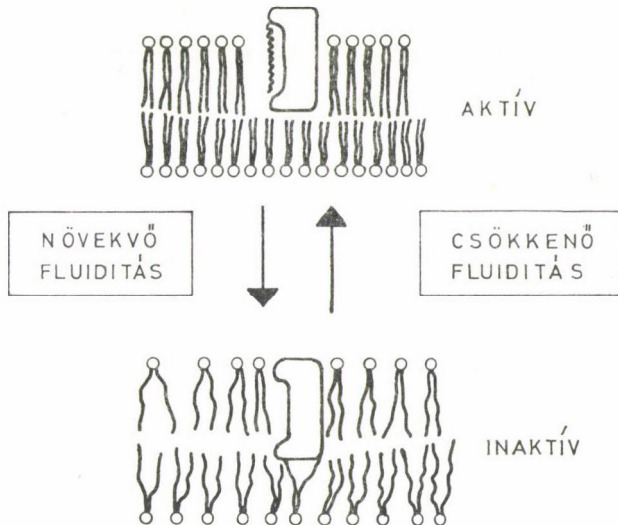
1. ábra. Máj sztearinsav CoA dehidrogenáz aktiválódása hőmérséklet csökkentés hatására. Patkány és hal máj szeleteket  $15^{\circ}\text{C}$ -on ill.  $5^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltunk különböző ideig, majd meghatározott idek elteltével mikroszomákat készítettünk és mértük az enzim aktivitását  $15^{\circ}\text{C}$ -on

III. táblázat

Benzilalkohol hatása patkánymáj  
mikroszóma készítmény sztearinsav  
CoA dehidrogenáz aktivitására

Benzilalkohol (mM)	Relatív aktivitás
0	100
10	90
25	78
50	60

tranzicionáló membránok (I. táblázat) fokozatosan merevebbé váltak, aminek következtében az enzim aktivitása módosult. Hasonló értelmű választ kapni akkor is, ha patkánymáj mikroszóma készítmény fizikai állapotát kémiai perturbensekkel (benzilalkohol) módosítjuk. A benzilalkohol fluidizáló hatását a sztearinsav CoA dehidrogenáz aktivitásának csökkenése kísérte (III. táblázat). Nagyon valószínű tehát, hogy a membránok fizikai állapotának zsírsavak segítségével történő szabályozásában e szerkezetek tranzicionális állapota fontos szerepet játszik. Jelenlegi elképzeléseink szerint a dehidrogenáz a lipidszféra fluiditásától függő mértékben merül el a membránban és így változó mértékben férhető csak hozzá a szubsztrát számára. Természetesen az enzimfehérje térszerkezete is módosulhat a vertikális irányú mozgás következtében, hiszen egyszer egy inkább vizes, máskor pedig egy inkább hidrofob régióban tartózkodik. A 2. ábra sematikusabban ábrázolja ezt a hipotézist.



2. ábra. Lehetséges kapcsolat a membrán rendezettség és a zsírsavdehidrogenáz aktivitása között

A növények nem fotoszintetizáló szöveteiben a sejtnedv  $O_2$  telítettsége határozza meg a dehidrogénezés mértékét. Alacsonyabb hőmérsékleteken több  $O_2$  van oldva a szövetekben és így a dehidrogénezés intenzívebb (15).

Számos esetben azt is megfigyelték, hogy bizonyos sejtek képesek membránjaik fluiditásának izoterm körülmények között történő szabályozására is. Fibroblaszt tenyészetek membránjainak fluiditása állandó maradt függetlenül attól, hogy a táptalaj milyen foszfolipid fejcsoport prekurzort tartalmazott. Ezek a sejtek a kolin fejcsoport fluidizáló hatását a foszfatidilkolin zsírsavláncai telítettségi fokának növelésével, az etanolamin membránmerevítő hatását pedig a zsírsavlánkok telítetlenségi fokának növelésével védték ki (47, 48). Hasonló jelenség növények esetében is megfigyelhető. WARRING és munkatársai (59) etanolamin adagolásával paradicsomlevelekben növelte a foszfatidyl-etanolamin szintjét, amit olajsav felhalmozódása követett. Saját kísérleteinkben a foszfatidilkolin szintjét növeltük búza csíranövényekben. E foszfolipid szintjének emelkedésével párhuzamosan csökkent a foszfolipidekben a telítetlen zsírsavak aránya. Ez a membrán hidrofob övének nagyfokú rendeződését vonta maga után (20).

#### Hőmérsékletadaptáció növényi sejtekben

A hidegérzékeny növények membránjai 10–12 °C körül mutatnak fázisváltozást (43). Ez az a hőmérsékleti érték, mely alatt e növények kisebb-nagyobb károsodást szenvednek. Különböző hidegérzékenységgű *Passiflora* fajok hidegtűrése és az izolált foszfolipidek fázisváltozási hőmérséklete között pozitív korrelációt tudtak kimutatni (39) és ez lényegében a két jelenség közötti oki kapcsolatra is utal.

A fagyűrés mértéke és a membránok fizikai állapota közötti pozitív kapcsolatra utalnak különböző fagyállóságú búzaféléken végzett vizsgálataink. Ismeretes, hogy a fagyűrés kialakulása egy ún. edzési folyamat során történik.

#### IV. táblázat

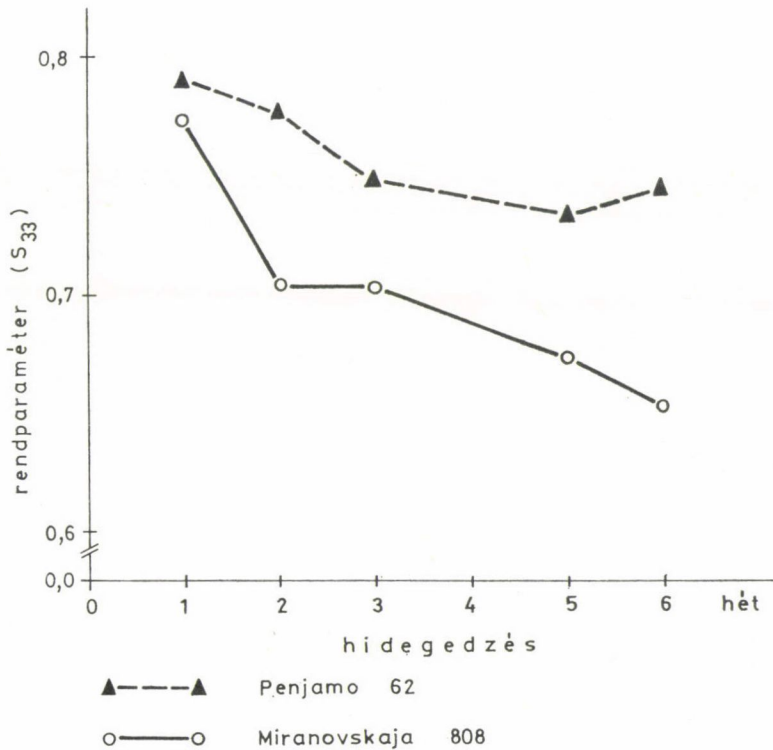
Különböző fagyűrésű edzetlen és edzett búzafajták foszfolipidjeinek fázisváltozási hőmérsékletei

Búzafajta	Fázisváltozási hőmérséklet		Túlélés —15 °C-on %
	edzetlen	edzett	
Miranovszkaja 808	8,0	—0,2	82
Bezosztaja	9,2	2,2	82
Kavkaz	9,6	4,2	77
Fertődi	13,0	5,0	57
Bánkúti	12,6	4,8	53
Száva	10,2	6,2	17

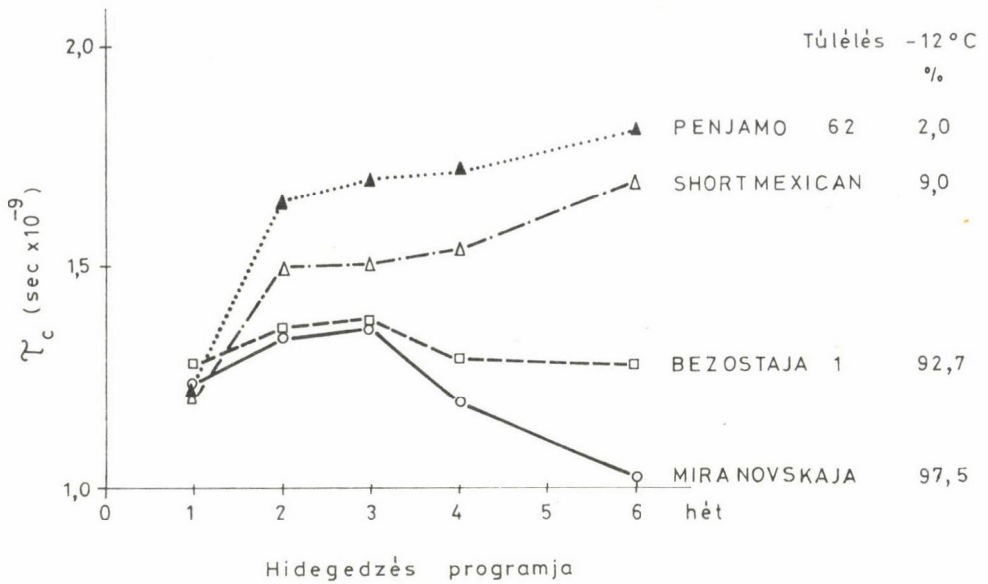
A méréseket elektron spin rezonaci spektroszkopiás technikával végeztük 16-doxyl sztearinsav spinjelölő segítségével.

Ennek a folyamatnak a során akár természetes, akár mesterséges körülmények között, a környezeti hőmérséklet és a megvilágítás mértéke fokozatosan csökken (19). Különböző fagyűrűsű, de nem edzett búzafélékből izolált foszfolipidek fázisváltási hőmérséklete közel azonos értéket mutatott (8–12 °C) és megközelítőleg 12–14 °C-szal volt a tenyésztési hőmérséklet (22 °C) alatt (IV. táblázat). Az edzési folyamat hatására azonban a fázisváltási hőmérséklet értékek szétváltak; a legfagyérzékenyebb fajták foszfolipidjeinek fázisátalakulási hőmérséklete alig csökkent, viszont a fagyállóbb fajtáké a fagyűrűsük mértékének arányában fokozatosan csökkent. A legalacsonyabb értéket a vizsgált legfagyállóbb fajta érte el.

Ez a jelenség természetesen izolált membránok esetében is tanulmányozható. A fagyállóság két szélső esetét képviselő Penjamo 62 és Miranovszkaja 808 búzafajtákból izolált kloroplasztiszok lipidjeinek rendezettségi állapota az edzési folyamat során eltérő módon alakult (3. ábra) és az edzési folyamat végére követte az anyanövény fagyűrűsének mértékében megfigyelhető elrendeződést (58).



3. ábra. Kloroplasztisz lipidek rendezettségi állapotának változása a hidegedzés során, egy fagyérzékeny és egy fagyűrűs búzafajtában



4. ábra. Protoplaszt plazmalemma fluiditásának változása a hidegedzés során különböző fagy-tűrési búzafajtákban. Csíranövényeket hidegedzésnek vetettük alá, az edzés különböző fázisaiban leveleikből protoplasztokat készítettünk. A plazmalemmaiba spin jelölt zsírsavat jutattunk és mértük a zsírsav rotációs korrelációs állandóját

Lényegében hasonló képet kapni akkor is, ha izolált protoplasztok plazmalemmájának fizikai állapotváltozását vizsgáljuk a hidegedzés során. A 4. ábra mutatja, hogy a rossz fagy-tűrő búzafajtákban a membránok mikroviszkózitása az edzés során fokozatosan növekszik. Ez valószínűleg a természetes öregedési folyamatokra vezethető vissza, ennek a folyamatnak a során ui. fokozatosan növekszik a membránok rendezettsége. A jó fagy-tűrő fajtákban azonban ez a természetes öregedési folyamat bizonyos környezeti körülmények hatására megfordul és a plazmalemma fokozatosan csökkenti mikroviszkózitását. Az edzési folyamat végére ismét a legfagyállóbb fajtának lett a legfluidabb a plazmamembránja (57).

#### Kapcsolat a lipidösszetétel és a hideg, ill. fagy-tűrés mértéke között

##### a) Zsírsavösszetétel

A fenti megfontolások alapján a membránok hidrofób övében kell a probléma megoldására keresni a választ. A rendelkezésre álló adatok többsége azt látszik igazolni, hogy a zsírsavak telítetlenségi fokának a hőmérsékletcsökkenésével párhuzamos növekedése (46, 58, 60, 64) egymagában nem magyarázza a növények hideg-, ill. a fagy-tűrésének kialakulását. WILSON (63) víz stressz-



## V. Táblázat

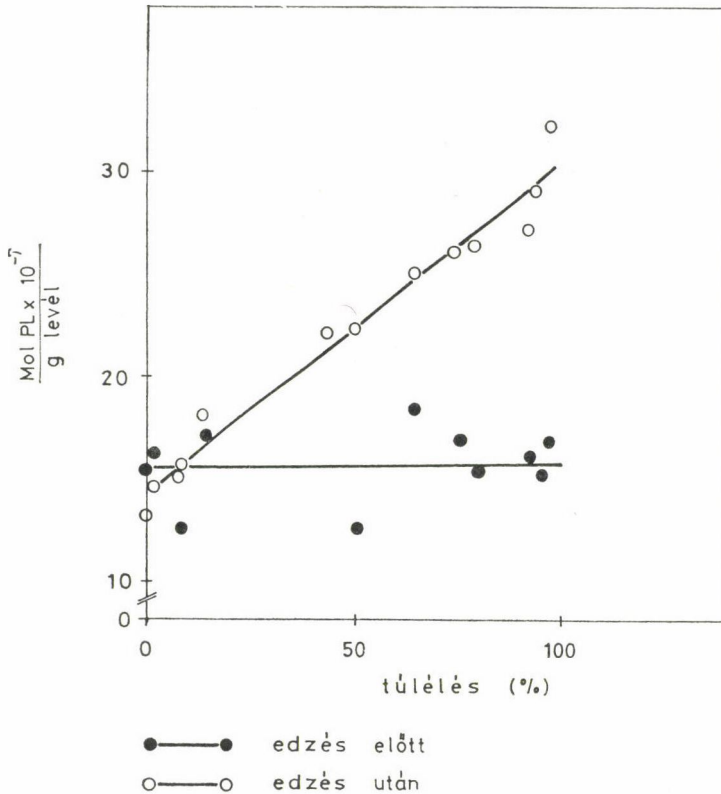
Tisztított foszfolipidek és kloroplasztiszok zsírsavösszetétele edzetlen és edzett búzafajtákban

Búzafajta	Kezelés	Zsírsav							Telített Telítetlen
		16 : 0	16 : 1	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3		
Miranovszkaja 808 Foszfolipid	edzetlen	23,05	7,07	0,73	4,27	19,02	45,85	0,31	
	edzett	18,71	5,95	1,13	2,83	19,28	52,09	0,24	
Penjamo 62 Foszfolipid	edzetlen	22,85	6,65	0,54	3,08	17,17	49,70	0,30	
	edzett	22,25	2,82	1,25	2,72	22,79	59,59	0,30	
Miranovszkaja 808 Kloroplasztisz	edzetlen	16,6	4,1	2,4	4,3	7,0	65,4	0,23	
	edzett	15,3	4,7	1,3	4,4	12,2	62,1	0,20	
Penjamo 62 Kloroplasztisz	edzetlen	17,4	4,6	2,1	5,4	7,2	63,1	0,24	
	edzett	18,0	7,4	2,7	7,9	10,4	53,7	0,26	

nek alávetett bab növényekben is tudott hidegtűrést indukálni, noha ezeknek a növényeknek a foszfolipidjeiben, ellentétben a hideg edzettekkel, nem is növekedett a telítetlenség mértéke. WILLEMOT (61) ugyancsak sikeresen indukált víz stressz alkalmazásával a zsírsavösszetétel megváltoztatása nélkül fagy-tűrést búzában. PATTERSON a már említett vizsgálataiban (39) szintén azt bizonyította, hogy *Passiflora* fajok foszfolipidjeinek zsírsavösszetétele közel azonos volt, noha lényeges különbségek voltak hidegtűrésük mértéke és foszfolipidjeik fázisváltózási hőmérséklete között. Sem a különböző fagyállóságú búzafélékből izolált foszfolipidek, sem a tisztított kloroplasztiszok zsírsavösszetétele első ránézésre nem tükrözi a fagyállóságukban észlelt különbségeket (V. táblázat). Figyelembe véve azonban a telített/telítetlen zsírsav hányados értékeit (V. táblázat) nyilvánvaló a zsírsavösszetétel szintjén fellépő fluidizálódási tendencia a fagyálló búzafajták esetében. A zsírsavak telítetlenségi fokának hőmérsékletcsökkenésével kapcsolatos növekedése így valószínűleg nem egy nem specifikus válasz eredménye lehet, mint az HARRIS és JAMES (15) megfigyeléséből következne. Ha ui. a zsírsavdeszaturazok aktivitása (és ennek következtében a telítetlen zsírsavak szintje) a szövetek oxigén telítettségének mértékével volna arányos, a telített/telítetlen zsírsav hányados értékei közel azonosnak kellett volna lenniök. A telítetlenségi fok mértéke a fagyálló Miranovszkaja 808 búzaféle leveleinek foszfolipidjeiben aktív adaptációs folyamat eredménye lehet, mely esetleg összehasonlítható a patkány és hal mikroszóma sztearinsav CoA aktivitásában az inkubációs hőmérséklet csökkentésekor fellépő növekedésével.

## b) Foszfolipidek mennyisége és összetétele

Döntő jelentőségű lehet az alacsony hőmérsékletek sikeres túléléséhez a membránfelület nagysága, amelyen a megfelelő életfolyamatok lejátszódnak. Vonzónak látszik feltételezni, hogy a fennmaradáshoz a fluiditás fenntartása mellett megfelelően megnövelt membránfelület is szükséges. Kimutatták, hogy



5. ábra. Összefüggés a foszfolipidek mennyisége és a fagyállás mértéke között búzában

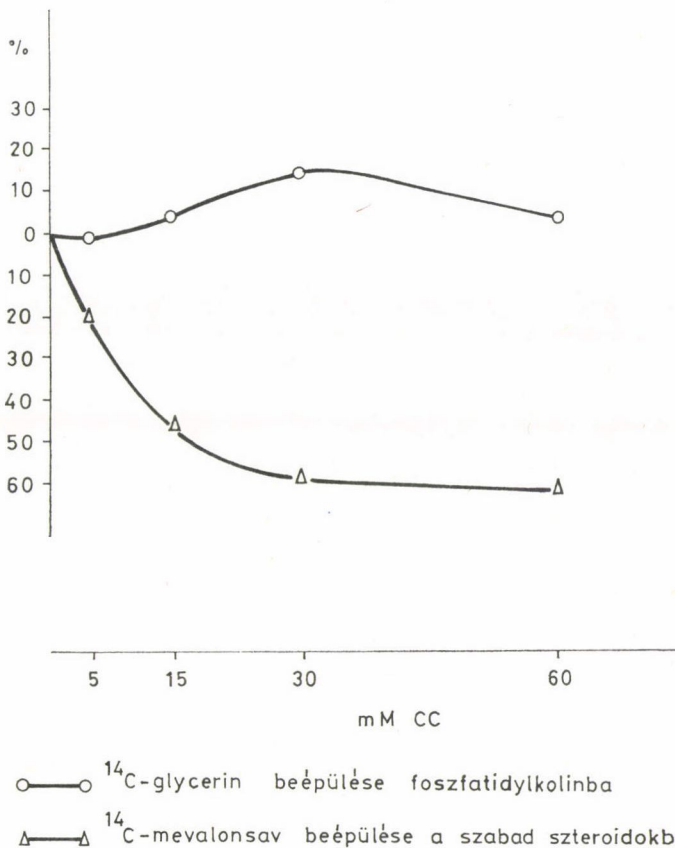
bizonyos fafélék kéregsejtjeiben a fagyállás nagymérvű növekedését nagyfokú membránfelhalmozódás kísérte (32, 33). Membránfelhalmozódás figyelhető meg több mezőgazdasági haszonnövény levelében is (18, 27, 49, 51), valamint hidegedzett és víz stressznek alávetett bab leveleiben (62, 63). A fagyállás mértéke és az edzés során bekövetkező membránfelhalmozódás között pozitív korrelációt tudunk kimutatni különböző fagyállóságú búzafélék leveleiben (5. ábra), ami szintén egy ok okozati összefüggésre utalhat.

A foszfolipid tartalomban megmutatkozó kvantitatív különbségeket a foszfolipidek poláros fejesoportjának összetételében, jól értelmezhető eltérések kísérték. Ezeknek az eltéréseknek a lényege az, hogy a fagyállás mértékével párhuzamosan növekedett a búzában a foszfatidilkolin aránya, elsősorban a foszfatidiletanolamin terhére. Így pl. az igen fagyérzékeny Penjamo 62-ben a foszfatidilkolin az összes foszfolipideknek mindössze 20,5%-át tette ki, míg a fagyálló Miranovszkaja 808-ban ez az érték 32% volt (19). Foszfatidilkolin hőmérsékletcsökkenésével kapcsolatos felhalmozódását több más esetben is megfigyelték, beleértve a hidegedzett, de egyébként hidegérzékeny babot (63) is. A foszfatidilkolin hőmérsékletcsökkenésével párhuzamos felhalmozódására

feltételezzük, hogy bizonyos stressz helyzetekben valamilyen hatásra a megfelelő prekursor (kolin) képződése felgyorsul és ennek egyik mérhető eredménye az említett foszfolipid felhalmozódása. A másik megnyilatkozási módja a növekedés lelassulása, amit minden hidegedzésnek kitett növénynél megfigyeltek és a hidegedzés egyik fokozatának tartanak (27). Ez utóbbi hatás a molekulában jelenlevő trimetilammonium ( $N^+$ ) $CH_3/3$ ) csoporttal hozható összefüggésbe és a növekedést szabályozó gibberellinsavak bioszintézisének gátlásán keresztül realizálódik (6).

c) Szeroid/foszfolipid arányok

Míthogy a trimetilammonium tartalmú vegyületek (beleértve a mezőgazdasági gyakorlatban használatos növekedés csökkentő hatású anyagokat is) a gibberellinsavak bioszintézisét egy meglehetősen korai fázisban gátolják



6. ábra. Foszfatidilkolin és szeroid bioszintézisének befolyásolása trimetilammonium fejcsoportot tartalmazó aminoalkohollal. Az inkubálás körülményeit a VI. táblázat lábjegyzete írja le. Az inkubációs medium azonban abszcizinsav helyett kolin kloridot tartalmazott

(6, 10), ugyanezen anyagok egyben a növényi szteroidok képződésére is kihatnak. Így ilyen vegyületek stressz helyzetekben való felhalmozódása fokozott foszfatidilkolin akkumuláció mellett csökkentheti a szteroidok szintjét. A feltevés helyességének ellenőrzésére búza leveleket inkubáltunk különböző koncentrációjú kolin klorid jelenlétében és mértük a  $^{14}\text{C}$ -glicerol foszfatidilkolinba és  $^{14}\text{C}$  mevalonsav növényi szteroidokba való beépülésének mértékét. A 6. ábra mutatja, hogy a foszfatidilkolin képződésének fokozódását a szteroidok képződésének csökkenése kísérte. A kísérlethől nyilvánvalóan következik az is, hogy az újonnan képződött membránokban a szteroidok foszfolipidekre vonatkoztatott mennyisége fokozatosan csökkent. A korábbiakban már utaltunk arra, hogy a membránok fluiditása jelentékeny mértékben függ a jelenlevő szteroidok mennyiségétől, ill. a foszfolipidekhez viszonyított arányuktól. Nyilvánvaló tehát, hogy a kísérleti körülmények között az újonnan képződő membránok fokozatosan fluidabbá váltak.

A szteroid/foszfolipid hányados értéke a fagyálló búzafajták, a hidegérzékeny bab és kukoricafélék leveleiben a hidegedzés során egyaránt csökkent. Ezzel szemben a fagyérzékeny Penjamo 62 búzafélében ez a hányados növekedett. Figyelembe véve azt, hogy ugyanebben a búzában a telített/telítetlen zsírsavhányados is növekedett, az előbbi változásokat mindenféleképpen egy adaptációs válasznak kell tekinteni. Nagy általánosságban mondhatjuk, hogy mind a hideg, mind a fagytyűrés kialakulásának a különböző membránstruktúrák megfelelő összetételének, ill. fázisállapotának kialakítása az egyik előfeltétele.

#### *A hideg- és fagyállóság lehetséges hormonális szabályozása*

Nincsenek adataink arra nézve, hogy trimetilammonium tartalmú vegyület felhalmozódna az edzési folyamatok során, csak azt tudjuk, hogy foszforilkolin a növényi sejtnedv szervesanyag-tartalmának egy jelentékeny hányadát teszi ki (31). Elégé elfogadott azonban, hogy stressz helyzetekben — beleértve a hőmérsékleti stresszt is — abszcizinsav (ABA) halmozódik fel számos növény levelében (10, 13, 14, 18, 23). További bizonyíték, hogy ABA adagolása hideg- és fagytyűrést indukált számos növényben (4, 25, 45, 46). A hormonnak ez a hatása nem magyarázható a membránok fizikai állapotára gyakorolt közvetlen hatásával. Nem tudták kimutatni ui., hogy ABA valamilyen mértékben befolyásolta volna szintetikus foszfolipid membránok rendezettségi állapotát (39). Feltételezhetően a hormon közvetve vagy közvetlenül a lipidanyagcsere folyamatokat befolyásolja. Ezek a változások végül is a membránok lipidösszetételében, ill. fázisállapotában realizálódnak. A VI. táblázatban bemutatott kísérletben bab, búza, és kukorica leveleiből kivágott korongokat inkubáltunk jelzett mevalonsav, ill. jelzett kolin klorid jelenlétében és mértük az izolált szabad szteroidok, ill. foszfatidilkolin radioaktivitását. Mindkét vegyületcsoport képződésének mértéke az alkalmazott hormonkoncent-

VI. táblázat

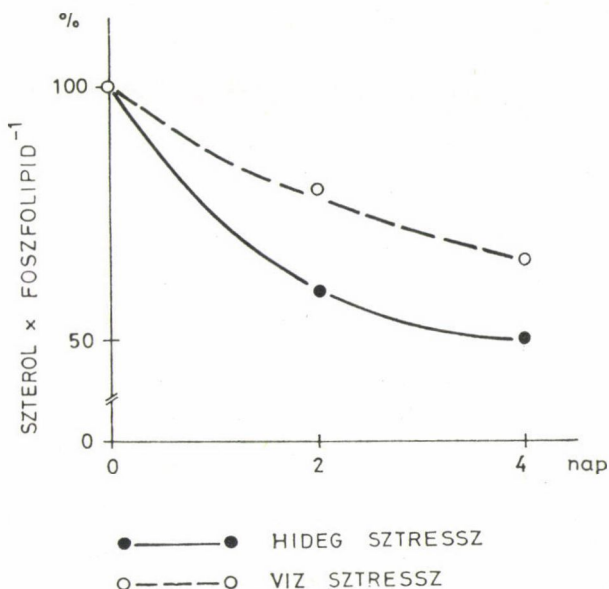
Abszcizinsav hatása szteroidok és foszfatidilkolin képződésére

Levélszöveteket olyan kálium-foszfát pufferban inkubáltunk szobahőn, mely változó mennyiségű abszcizinsavat és vagy <sup>14</sup>C-mevalonsavat (sp. a. 47 μCi × μMol<sup>-1</sup>, 5 · 10<sup>5</sup> dpm) vagy <sup>14</sup>C-kolin kloridot (sp. a. 49,5 μCi × μMol<sup>-1</sup>, 5 · 10<sup>5</sup> dpm) is tartalmazott. St = szabad szterin, PC = foszfatidilkolin.

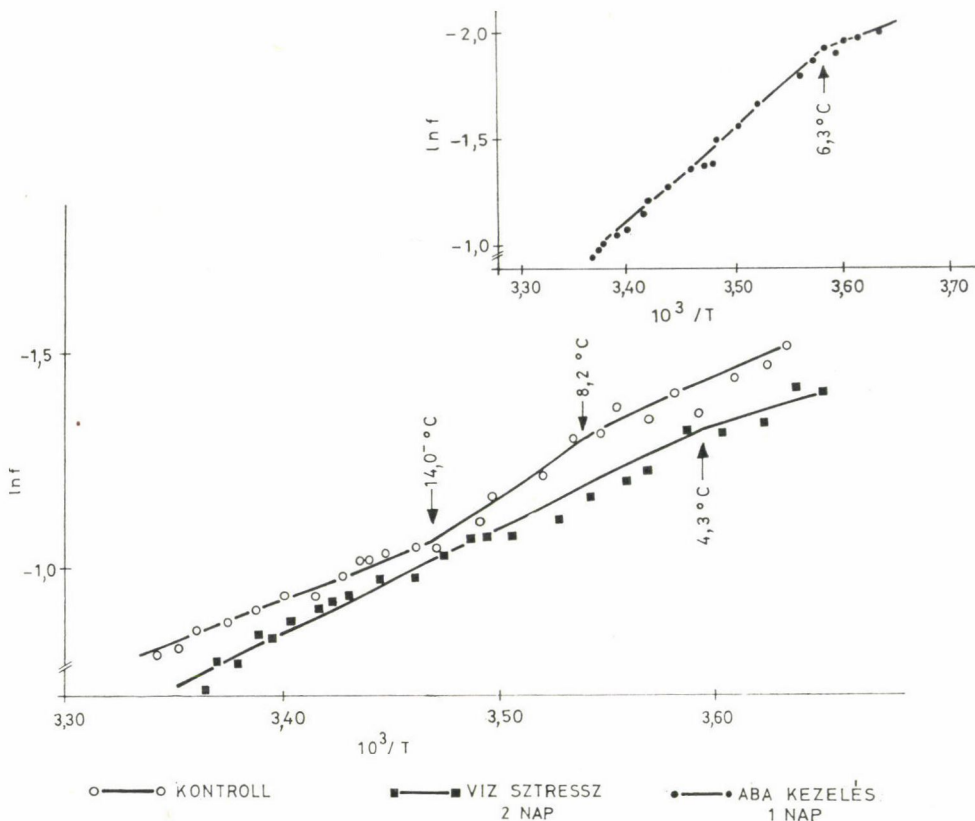
Faj	Bab			Kukorica			Búza		
	St	PC	St/PC	St	PC	St/PC	St	PC	St/PC
	pmol korong			pmol korong			pmol 50 mg		
ABA (M)									
0	31,88	5,03	6,33	12,50	4,62	2,70	7,39	23,0	0,32
10 <sup>-7</sup>	22,93	5,68	4,03	8,30	6,47	1,28	6,00	39,9	0,15
10 <sup>-6</sup>	22,79	6,56	3,47	6,79	7,02	0,96	5,36	46,7	0,11
10 <sup>-5</sup>	21,54	6,70	3,21	4,77	8,00	0,59	3,46	49,1	0,04
10 <sup>-4</sup>	17,81	8,46	2,10	2,65	8,80	0,30	—	—	—

ráció függvénye volt: a szteroidok képződését a hormon növekvő koncentrációi gátolták, a foszfatidilkolin képződését pedig serkentették. A számított szterol/foszfatidilkolin hányados értékei arra utalnak, hogy a membrán fluiditásának mértéke részben az intracelluláris ABA szint függvénye lehet.

A hormon intracelluláris szintje és a membránok lipidösszetétele közötti kapcsolat további tisztázása céljából, fiatal babszöveteket hideg stressznek vetettünk alá úgy, hogy 22 °C-on nevelt példányokat több napra 5 °C-ra



7. ábra. Hidegstressz hatása bablevél szabad szterin és foszfolipid tartalmára



8. ábra. Víztressz, ill. abszcizinsav hatása a membránok fázisállapotára bab levelében

helyeztünk. Mértük a levelekben az összfoszfolipid és az összsztsterol szintet és meghatároztuk a szterol/foszfolipid hányadosát. Bablevelek hidegedzését általában 12 °C körül végzik, ez a kísérlet egy erőltetett hidegedzésnek tekinthető. E folyamat során a levelekben fokozatosan emelkedett a foszfolipidek mennyisége. Ez a megfigyelés lényegében megegyezik WILSON (63) eredményeivel. Ő a 12 °C-on edzett bablevelekben figyelt meg membránfelhalmozódást. Ezzel párhuzamosan saját kísérleteinkben csökkent a szteroidok mennyisége és a két folyamat együttes eredményeképpen a szteroid/foszfolipid hányados értéke (7. ábra). Víztressznek kitett bablevelekben szintén csökkent ennek a hányadosnak az értéke (7. ábra). Ismeretes, hogy ezek a növények sokkal hideg/fagy-tűrőbbek. Többszörösen bizonyított tény az is, hogy a víztressz során az abszcizinsav szintje többszörösére emelkedik.

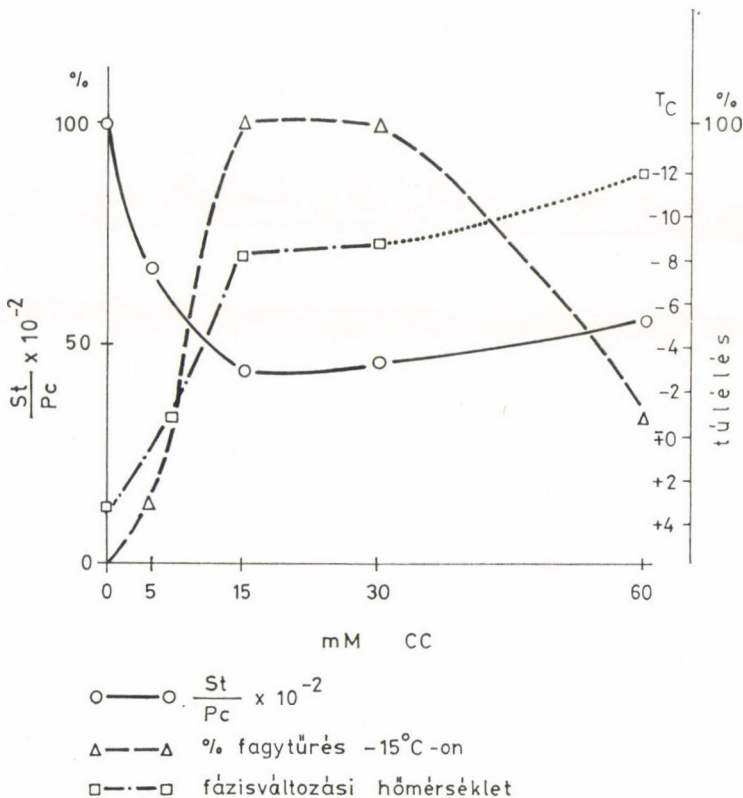
Mint említettük, a szterol/foszfolipid hányados csökkenése fluidabb membránok képződésére utal. Így ez a tény magyarázatot adhat a szstresszelt növények fokozódott hidegtűrésére (10, 29). További alátámasztását adják ennek a feltevésnek azok a kísérleteink, amelyekben víztressznek alávettett, ill.

ABA-val permetezett levelek membránjainak fizikai állapotát vizsgáltuk TEM-PO spin jelölő in vivo körülmények között, a membránokba való beépítésével (14).

A 8. ábrán láthatjuk, hogy a kezeletlen levelek membránjai 14 °C körül kezdenek fázisseparatorációt mutatni és ez a folyamat 8 °C körül fejeződik be. A vízstressznek kitett levelekben a vártan megfelelően csökkent a fázisseparatoráció alsó hőmérséklete. Ugyanez a helyzet a hormonnal kezelt levelek esetében is (l. inszert). Így nagyon valószínű, hogy mind a levelek hormonális egyensúlya, mind pedig membránjaik fizikai állapota fontos szerepet játszik a hideg/fagyűrés kialakulásában és hogy ez a két folyamat egymással kapcsolatban lehet.

*Fagyállás indukálása membránmódosítással*

Ha a membránok fizikai állapota, ill. foszfolipidjeik összetétele és a szteroid/foszfolipid hányados értéke valóban befolyásolja a növények fagyűrését, akkor ezt megfelelő kísérleti elrendezésben demonstrálni is lehet. Növél-



9. ábra. Kapcsolat a membránok lipidösszetétele, fázisváltási hőmérséklete és a levelek fagyűrésének mértéke között egy búzafajtában (Miranovszkaja 808)

nyi membránok foszfolipid összetételét korábban bizonyos aminoszteroidok segítségével másoknak már sikerült módosítaniuk (59). Mi búzanövényeket olyan vízkultúrákban neveltünk, mely kolin kloridot is tartalmazott. Kimutattuk, hogy a foszfatidilkolin szintje a levelekben aránylag széles koncentráció tartományban arányos volt a prekursor tenyésztési mediumban való koncentrációjával (20). A 9. ábra azt mutatja, hogy a foszfatidilkolin szintjének emelkedésével párhuzamosan csökkent a szterol/foszfatidilkolin hányados értéke, ill. a membránok fázisdiszperziójának alsó hőmérsékleti tartománya, vi. ezek a szerkezetek fokozatosan fluidabbá váltak. Ezzel egyidejűleg a levelekben nagymértékű fagyállás fejlődött ki. Fontos megemlíteni, hogy ezeket a leveleket előzőleg nem tettük ki hideg edzésnek. Más szóval a membránok összetételének megfelelő módosításával edzetlen növényekben olyan mértékű fagytürelést tudtunk létrehozni, amelyre egyébként csak a hidegedzési folyamatok során tehetnek szert. Más növények membránjainak hasonló módosítása (szőlő, bab, uborka, paprika) hasonló eredményekre vezetett. Megfelelő kísérletek után elképzelhető, hogy számos növény levelében *in vivo* körülmények között olyan membránmódosításokat lehetséges létrehozni, amelyek végül is pl. a tavaszi fagykárok redukcióját eredményezhetik.

Természetesen tudatában vagyunk annak, hogy a fagyállás ilyen szinten való megközelítése egy túlságos leegyszerűsítése egy igen komplex folyamatnak. Most nem térhetünk ki az intra- és intercelluláris víz megfagyásának kérdéseire és arra a stresszre sem, amely a protoplazmát a hőmérséklet-csökkenéssel kapcsolatos deszikkálódás során éri. Megjegyezzük azonban, hogy a sótűrő növények általában jobb hidegtűrők is, valamint azt, hogy bizonyos foszfolipidek fejcsoportjának prekursorai (kolin), ill. annak egyes származékai (betain) a növényekben természetes ozmotikumként viselkedhetnek, de egyúttal csökkenthetik az intracelluláris szabad víz fagyáspontját is.

#### IRODALOM

1. ABBAS, C. A., CARD, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 469—476 (1980).
2. BALWANTH, S., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I.: Kézirat
3. BOROCHOV, A., HALVEY, A. H., BOROCHOV, H., SHINITZKY M.: *Plant Physiol.* **61**, 812—815 (1978).
4. BOUSSIBA, G., RIKIN, A., RICHMOND, A. E.: *Plant Physiol.* **56**, 337—339 (1975).
5. BROCKERHOFF, H.: *Lipids* **9**, 645—650 (1975).
6. CATHEY, H. M.: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **15**, 271—302 (1964).
7. COSSINS, A. R.: *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 395—411 (1977).
8. COSSINS, A. R., KENT, J., PROSSER, C. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 341—358 (1980).
9. DAIE, J., CAMPBELL, W. E.: *Plant. Physiol.* **67**, 26—29 (1981).
10. DENNIS, D. T., KUIPER, C. D., WEST, C. A.: *Plant Physiol.* **40**, 948—952 (1965).
11. DICKENS, B., THOMPSON, G. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **664**, 211—218 (1981).
12. EZE, J. M. D., DUMPROFF, E. B., THOMPSON, J. E.: *Physiol. Plant* **51**, 418—422 (1981).
13. FEY, R. L., WORKMANN, M., MARCELLOS, M., BURKE, M.: *Plant Physiol.* **63**, 1220—1222 (1979).
14. FURTADO, D., WILLIAMS, W. P., BRAIN, A. P. R., QUINN, P. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **555**, 352—357



15. HARRIS, P., JAMES, A. T.: *Biochem. J.* **112**, 325—330 (1969).
16. HENSON, I. E., QUARRIE, S. A.: *Z. Pflanzenphysiol.* **101**, 431—438 (1981).
17. HIRON, R. W. P., WRIGHT, S. T. C.: *J. Exp. Bot.* **24**, 769—781 (1973).
18. HORVÁTH, I., VIGH, L., BELEA, A., FARKAS, T.: *Physiol. Plant* **49**, 117—120 (1980).
19. HORVÁTH, I., VIGH, L., FARKAS, T.: *Planta* **151**, 103—108 (1981).
20. HORVÁTH, I., VIGH, L., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I., DUDITS, D.: *Planta*, **153**, 476—480 (1981).
21. HORVÁTH, I., VIGH, L., ONDRIAS, C., FARKAS, T.: *Kézirat*
22. HOAD, G. V.: *Planta* **132**, 287—290 (1978).
23. HUAG, L., LORCH, S. K., SMITH, G. G., HUAG, A.: *FEBS Lett.* **43**, 1—5 (1974).
24. IRVING, R. M., LAMPEHAR, F. O.: *Plant. Physiol.* **43**, 9—13 (1968).
25. JANOFF, A. S., GUDTE, S., MCCROATHY, E. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **598**, 641—669 (1980).
26. KACZPERSKA-PALACZ, A.: *Acta Horticulturae* **81**, 23—35 (1978).
27. KUIPER, P. J. C.: *Plant. Physiol.* **45**, 684—686 (1970).
28. LEVITT, J.: *Responses of Plants to Environmental Stress*. Acad. Press. Ny. Y. (1972).
29. LYONS, J. M.: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **24**, 445—466 (1973).
30. MAIZEL, J. K., BENSON, A. A., TOLBERT, N. E.: *Plant Physiol.* **31**, 407—408 (1956).
31. MCKERSIE, B. D., THOMPSON, J. E.: *Plant Physiol.* **61**, 639—643 (1978).
32. MCKERSIE, B. D., THOMPSON, J. E.: *Physiol. Plant.* **63**, 802—805 (1979).
33. MICHAELSON, D. M., HORWITZ, A. F., KLEIN, M. P.: *Biochemistry* **13**, 2605—2612 (1974).
34. NANDINI-KISHORE, S. G., KITAJIMA, S. G., THOMPSON, G. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **471**, 157—161 (1977).
35. NEMECZ, GY., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I.: *Arch. Biochim. Biophys.* **207**, 256—263
36. NOZAWA, A. R., IIDA, H., FUKUSHIMA, H., OKHI, K., OHNISHI, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **367**, 134—147 (1974).
37. OLDFIELD, E., CHAPMAN, D.: *FEBS Lett.* **23**, 285—297 (1972).
38. PARUPS, E. V., MILLER, E. V.: *Physiol. Plant.* **42**, 415—419 (1978).
39. PATTERSON, B. D., KERNICK, J. R., RAISON, J. K.: *Phytochemistry* **17**, 1089—1092 (1979).
40. PHILLIPS, M. C., FINER, E. G., HAUSER, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **290**, 397—402 (1972).
41. PIKE, C. S., BERRY, J. A.: *Plant Physiol.* **66**, 238—241 (1980).
42. QUINT, O. F., FULCO, A. J.: *Biol. Chem.* **248**, 6885—6895 (1973).
43. RAISON, J. K.: *Symposia of the Society of Experimental Biology. XXVII. Rate Control of Biological Processes.* (1973).
44. RIKIN, A., RICHMOND, A. E.: *Physiol. Plant.* **38**, 95—97 (1976).
45. RIKIN, A., ASTOMOND, D., GITLER, C.: *Plant. Cell. Physiol.* **20**, 1537—1546 (1979).
46. ROCHE, De La, I. A.: *Acta Horticulturae* **81**, 84—89 (1978).
47. SCHROEDER, F., PERLMUTTER, D. F., GLASOR, M. and VAGELOS, P. R.: *J. Biol. Chem.* **251**, 5016—5026
48. SCHROEDER, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **511**, 356—376 (1978).
49. SIKORSKA, E., KACZPERSKA-PALACZ, A.: *Physiol. Plant.* **47**, 144—150 (1979).
50. SIKORSKA, E., ONDRIAS, C., FARKAS, T.: *Acta Biol. Acad. Sci. hung.* **32**, 267—274 (1981).
51. SIMONOVITCH, H. D., RHEME, B., POMEROY, K., LAPAGE, M.: *Cryobiology* **5**, 202—225 (1968).
52. SINENSKY, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 522—525 (1974).
53. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: *Science Ny. Y.* **175**, 720—731 (1972).
54. SINGH, J., De la ROCHE, SIMONOVITCH, D.: *Nature* **257**, 669—670 (1975).
55. TOMPSON, G. A.: Jr. in *Low Temperature Stress in Crop Plants*. Acad. Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco (1977).
56. TSUKAMOTO, Y., KEKI, T., MITSUI, T., ONO, T. A., MURATA, N.: *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 673—675 (1980).
57. VIGH, L., HORVÁTH, I., HORVÁTH, L. I., DUDITS, D., FARKAS, T.: *FEBS Lett.* **107**, 291—294 (1979).
58. VIGH, L., HORVÁTH, I., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I., BELEA, A.: *Phytochemistry* **18**, 787—789 (1979).
59. WARRING, A. J., BREIDENBACH, R. W., LYONS, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **471**, 157—161 (1976).
60. WILLEMOT, C., HOPE, H., WILLIAMS, R., MICHAUD, R.: *Cryobiology* **14**, 87—93 (1977).
61. WILLEMOT, C., PELLETIER, L.: *Can. J. Plant Sci.* **59**, 639—643 (1979).
62. WILSON, J. M., CRAWFORD, R. M. M.: *New Phytol.* **73**, 805—820 (1974).
63. WILSON, J. M.: *New Phytol.* **76**, 257—270 (1976).
64. WILSON, R. F., RINNE, R. W.: *Plant Physiol.* **57**, 270—273 (1976).
65. YOSHIDA, S., SAKAI, A.: *Plant. Cell. Physiol.* **14**, 53—59 (1973).