

Zárójelentés (T37195 sz. pályázat)

Cím: Szalicilsav által szabályozott védekező mechanizmusok vizsgálata gabonafélékben

A pályázat célja

Hazánkban a növénytermesztőknek minden évben többféle stressztényezőre is számítaniuk kell. Ezek közé tartozik az alacsony és magas hőmérséklet, a szárazság, a nehézfém szennyezés, valamint a különböző patogének támadásai. A növények többféle védekező mechanizmusokat dolgoztak ki az egyes stresszhatások kivédésére. Az utóbbi időben derült ki, hogy a szalicilsav több élettani folyamatban szerepet játszik, köztük egyes stresszhatások védelmének indukciójában is.

A pályázat egyik fő célja annak felderítése, hogy vajon a szalicilsav által közvetített védekező mechanizmusnak milyen kapcsolata van egyéb, különböző stresszhatásokra indukálódó védekező folyamatokkal. Vizsgálni kívánjuk továbbá, hogy gabonafélékben milyen szerepe van a szalicilsavnak a különböző, Magyarországon leggyakoribb biotikus stresszhatások elleni védelemben.

A pályázat tervezett ütemezése

1. év

Fiatal kukoricánövények membánlipid összetételének, valamint poliamin tartalmának exogén szalicilsav hatására bekövetkező változásának vizsgálata

2. év

Stressz-indukálta szalicilsav metabolizmus vizsgálata. Gabonafelek hidegedzése, valamint szárazság- só-, nehézfém-, valamint biotikus stresszek során szalicilsav és származékaiban bekövetkező változások tanulmányozása. Szalicilsav hatása fitokelatín szintáz enzim működésére gabonafélékben.

3. év

Szalicilsav és abszcizinsav metabolizmus kapcsolatának vizsgálata. *In vitro* szalicilsav hatására bekövetkező *in vivo* abszcizinsav változás (valamint *vica versa*).

4. év

Szalicilsav metabolizmusában résztvevő anyagok különböző biotikus stresszhatásokra bekövetkező változásának vizsgálata gabonafélékben.

Eredmények

Korábban kimutattuk, hogy szalicilsavval (és bizonyos rokon vegyületeivel) fiatal kukoricánövény hidegtűrése fokozható. Először tehát azt néztük meg, hogy hidegstressz során mit befolyásolhat az *in vitro* szalicilsav.

Ismert, hogy a membránoknak jelentős szerepük van az alacsony hőmérséklethez való adaptációban. Ezért megvizsgáltuk a szalicilsav hatását membánlipidek összetételére

hidegstressz során. Kísérleteinket kukorica növényeken (Norma hibrid) végeztük. A növényeket tápoldatban neveltük a martonvásári fitotron PGV-36 típusú növénynevelő kamrájában. A két hetes növények egy részét 0,5 mM szalicilsavat tartalmazó tápoldatba helyeztük 1 napra a nevelési hőmérsékleten (22/20 °C). Ezután 1 illetve 3 napig 2°C-ra helyeztük őket. Ezt követően extraháltuk a membránlipideket, szilikagél vékonyrétegen elválasztottuk a különböző lipidfrakciókat, majd a savasan hidrolizált zsírsavakat metilészter formában gázkromatográfon analizáltuk. Az exogén szalicilsav hatására nem találtunk jelentős változást a membránlipid frakciók zsírsavösszetételében a nem kezelt növényekhez viszonyítva. Tehát megállapíthatjuk, hogy a szalicilsav valószínűleg nem a membránlipidek zsírsavösszetételének megváltoztatásával váltja ki a hideg elleni védőhatását.

Ezek után, mivel a poliaminoknak szerepük lehet a membrán stabilizálásában, vizsgáltuk az exogén szalicilsav hatására bekövetkező változásokat a poliaminszintben. Kísérleteinkben szintén kukoricánövényeket használtunk (Norma hibrid) és a fent leírt módon neveltük és kezeltük szalicilsavval. Ezután 3 napos 5 °C-os hideghatásnak tettük ki a növényeket. Hidegkezelés előtt és után gyűjtöttünk mintát (levél). A poliaminokat HPLC-vel választottuk el. Detektálásuk danzil-kloridos származékképzést követően fluoreszcens detektorral történt. A putreszcin mennyisége megemelkedett a 3 napos hideghatás során, de ez az emelkedés nem volt olyan nagy mértékű, mint az egynapos szalicilsav kezelést követően. Az egynapos, nevelési hőmérsékleten történt szalicilsav kezelés hatására a putreszcin szint kb. háromszorosára emelkedett és ugyanezen a szinten maradt a hidegkezelés alatt is. A spermidin mennyisége nem változott sem a 3 napos hidegkezelés, sem az egy napos szalicilsav kezelés hatására nevelési hőmérsékleten. Viszont a szalicilsavval előkezelt növényekben a hidegkezelés során megemelkedett a spermidin mennyisége. A spermin mennyisége csökkent a hideg hatására. Szalicilsav hatására (nevelési hőmérsékleten) ez a csökkenés még kifejezettebb volt. A legnagyobb mértékű spermin csökkenést a szalicilsavval előkezelt és hideghatásnak kitett növényekben tapasztaltunk. Korábban ismert, hogy a 0,5 mM szalicilsav kezeléssel fokozni lehetett a fiatal kukorica növények hidegtűrését. Az is ismert, hogy a poliaminok szerepet játszanak az alacsony hőmérsékleti stressz során is. A kapott eredményekből megállapíthatjuk, hogy a szalicilsav előkezelés megemelte a putreszcin és a spermidin szintjét, és ez is hozzájárul valószínűleg a szalicilsav védőhatásához (Németh és mtsai, 2002).

A hidegstressz vizsgálata után más abiotikus stresszeknél tanulmányoztuk a külsőleg adagolt szalicilsav hatásait. Mivel a szalicilsav hidegnél leírt védőhatását csak úgy tudtuk elérni, ha a tápoldathoz adagoltuk a szalicilsavat (a föld öntözése szalicilsavas oldattal, valamint a levelek permetezése nem volt hatásos), ezért a szárazságstresszes kísérleteket is tápoldatban végeztük. Kukorica (Norma hibrid) és búza (Mv Emma) növényeket neveltünk tápoldatban 10 napig, majd a növények egy részét 0,5 mM szalicilsav oldattal kezeltük egy napig. Ezután a növények egy csoportját szárazságstressznek tettük ki (15%-os PEG kezelés) 3 napig. Az egy napig szalicilsavval kezelt növények nettó fotoszintézise kb. 25 %-kal csökkent. A 15%-os PEG kezelés kezdetben hasonló csökkenést okozott, de 3 nap után már jóval kisebb volt ez a paraméter. A PEG-gel és szalicilsavval is kezelt növények esetében már az első napon nagymértékű csökkenés volt megfigyelhető a nettó fotoszintézisben. A sztóma áteresztőképességnél is hasonló változásokat tapasztaltunk. A membránok állapotának jellemzésére egyik jól használható paraméter az ionkiáramlás mérés, de mivel anyagigényes, ezért csak a kísérlet végén, a kezelés 3. napján végeztük el. Nem volt szignifikáns változás a csak PEG-gel vagy szalicilsavval kezelt növényekben a kontrollhoz képest, viszont a szalicilsavval és PEG-gel is kezelt növények esetében az ionkiáramlás megnőtt, főleg a

kukorica növények esetében volt jelentős ez az emelkedés, búzánál csak kisebb mértékű volt. Tehát megállapíthatjuk, hogy esetünkben a szalicilsav nemcsak, hogy nem nyújtott védelmet a szárazság stressz ellen, hanem még fel is nagyította annak károsító hatását (Németh és mtsai, 2002).

Nemrégiben mutatták ki, hogy egyes nehézfémek hatására ún. fitokelatinok szintetizálódnak, melyek segítik a nehézfémek „ártalmatlanná tételét”. Vizsgálni kívántuk a szalicilsavnak a hatását a fitokelatin szintáz enzimre, mely kulcsfontossággal bír a növénynek az egyes nehézfémek elleni védekezésében. A szalicilsav fitokelatin-szintáz enzimre gyakorolt hatását kukoricában (Norma hibrid) néztük. 1 napig 0,5 mM szalicilsavval kezelt kukorica növény gyökerében lecsökkent a fitokelatin-szintáz aktivitás. Ha a szalicilsavas előkezelés mellé még Cd-ot is kapott a növény, akkor ez a csökkenés még nagyobb mértékű volt. Levélben viszont mind szalicilsav kezelés hatására, mind szalicilsav+Cd hatására megnőtt az enzim aktivitása (Pál és mtsai, 2002).

A továbbiakban a különböző stresszhatásokra bekövetkező **endogén** szalicilsav szint változásokat vizsgáltuk.

A hidegstressz hatására bekövetkező változásokat búza fajtákban ((Cheyenne (Ch), Chinese Spring (CS), CS/CH 5A) valamint zabban (Gerald) néztük. A szabad szalicilsav szint a Ch/CS5A kromoszóma szubsztitúciós vonalban 10 napon át tartó 5 °C-os hideg hatás után megnőtt, míg a többi genotípusban és a zabban nem változott. A Geraldban (zab) már eredetileg is magasabb volt a szabad szalicilsav szint, mint a búzában. A kötött szalicilsav mennyisége 10 napos hidegkezelés után szintén a CS/Ch5A genotípusban nőtt meg jelentősen, de a Geraldban is láthattunk kismértékű emelkedést.

A további stresszek hatását kukoricán (Norma hibrid) vizsgáltuk. A szárazság stressznél a tápoldathoz 11 illetve 21% polietilén-glikolt (PEG) adtunk, ezzel idézve elő a szárazságot. 1 és 2 napos PEG-es kezelést követően gyűjtöttünk mintát (levél, gyökér) szalicilsav méréshez. A szabad szalicilsav szint csak 2 napos 21 %-os PEG kezelés hatására nőtt meg a levelekben (a többi kezelésnél változatlan maradt), míg a gyökérben minden esetben csökkent a kontrollhoz képest. A kötött szalicilsav levélben a 11%-os PEG hatására mind az 1, mind a 2 napos kezelés hatására lecsökkent, a 21%-os PEG-nél az első nap csökkent, míg a második nap megnövekedett a mennyisége. A gyökérben minden esetben csökkent.

A sóstresszt 50 ill. 200 mM NaCl-ot adva a tápoldathoz 1 ill. 2 napig vizsgáltuk. A levélben a szabad szalicilsav szint nem változott az 50mM NaCl-dal kezelt növényekben, míg a 200 mM-osokban kis mértékben megnőtt. A gyökérben nem tapasztaltunk változást. A kötött szalicilsav szint mindkét kezelésnél mind levélben, mind gyökérben lecsökkent (Szalai és mtsai, 2004, 2005).

Cd stressznél 10, 25 és 50 µM-os oldatokat használtunk, mellyel egy hétig kezeltük a növényeket. A levélben mind a szabad, mind a kötött szalicilsav szintje megemelkedett mind három koncentrációnál. A gyökérben a szabad szalicilsav tartalom a 25 és 50 µM-os kezeléseknél megnőtt, míg a kötött csak az 50 µM-osnál. A többi esetben nem tapasztaltunk változást (Pál és mtsai, 2005, 2006a,b).

Bár a pontos mechanizmus még nem tisztázott, az abszcizinsav (ABA) részvétele különböző védekező folyamatokban (pl. alacsony hőmérséklet, szárazság ellen) régóta

elfogadott. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy van-e kapcsolat a szalicilsav, valamint az abszcizinsav által indukálódó folyamatok között.

Vizsgálni szeretnénk volna az *in vitro* abszcizinsav hatására bekövetkező *in vivo* szalicilsav változás (valamint *vica versa*). Ebből sajnos csak az abszcizinsav kezelés hatására bekövetkező *in vivo* szalicilsav változás mérése valósult meg, mivel a lecsökkentett pénzügyi támogatás miatt az abszcizinsav mérésére szolgáló kettek árát már nem tudtuk kigazdálkodni az egyébként is drága HPLC-s mérések mellett.

Kísérletünk során azt vizsgáltuk, hogy az ABA kezelés milyen hatással van normál nevelési körülmények (22/20°C) között és alacsony hőmérsékleti stressz (5°C) során a kukorica növényre, valamint hogyan befolyásolja az abszcizinsav az említett körülmények között az endogén szalicilsav és o-hidroxi-fahéjsav (oHCA) tartalmat a kukorica levélben és gyökérben.

Kukorica magokat (Norma hibrid) 3 napig csíráztattuk 26°C-on, majd 10 napig neveltük 22/20°C-on, 16/8 órás fény/sötét periódussal, 200mikromol m⁻² sec⁻¹ fényintenzitás mellett. A növényeket négy csoportra osztottuk és a kontroll mellett három koncentrációban (50, 75, 100 µM) 1 napos abszcizinsav kezelést alkalmaztunk. A gyökerek lemosása után a növényeket abszcizinsavat nem tartalmazó tápoldatba és 5°C-ra helyeztük át, egész napos megvilágítás mellett egy napra.

Az egy napos ABA kezelés optimális hőmérsékleti körülmények között nem okozott látható változást. Viszont a PSII aktuális fotokémiai hatékonyságát jelző $\Delta F/F_m'$ klorofill fluoreszcencia indukciós paraméter csökkent. Az abszcizinsavas kezelés egyik koncentrációban sem befolyásolta jelentősen a szabad szalicilsav és szabad oHCA tartalmat a levélben és a gyökérben.

Az egy napos chilling legnagyobb mértékben a kontroll csoportot károsította, míg az egy napos ABA előkezelés csökkentette a hideg okozta tüneteket. Ezen védő hatást a látható különbségek mellett a PSII maximális fotokémiai hatékonyságot jellemző Fv/Fm klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterben és az elektrolit kiáramlásban mért eltérések is alátámasztják.

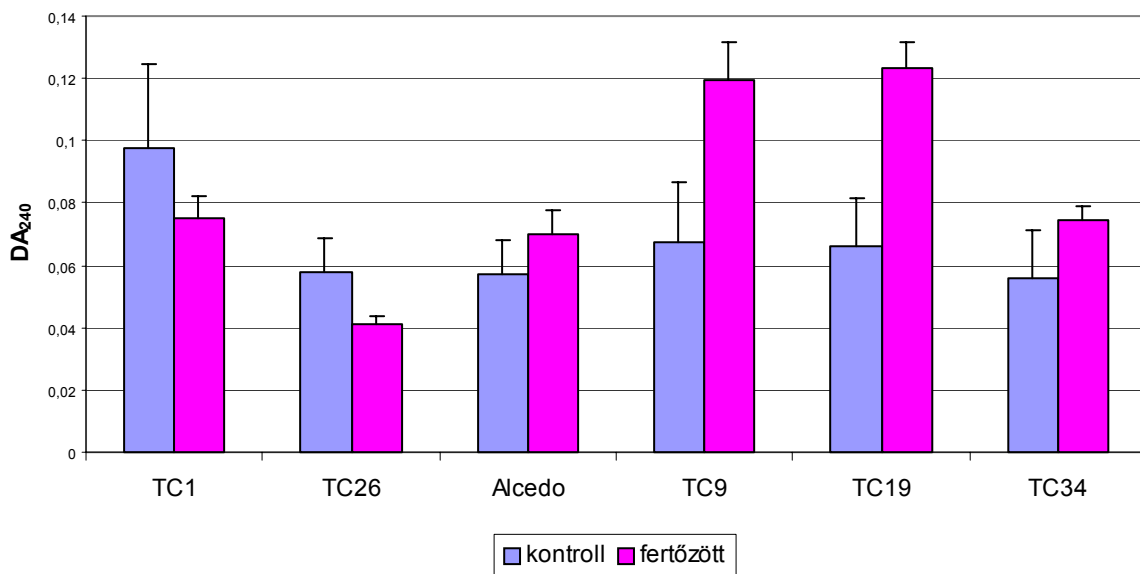
Az egy napos hidegkezelés minden esetben növelte a szabad szalicilsav tartalmat, és az ABA előkezelést kapott növényekben ez a növekedés kifejezettebb volt a kontrollhoz képest, mind a levélben, mind a gyökérben. A szabad oHCA szint csak az ABA előkezelt növények levelében és gyökerében emelkedett meg a hideg stressz hatására. A kötött szalicilsav és oHCA tartalom a levelekben az ABA kezelést követően nem változott. Az ezt követő chilling hatására mind a kötött szalicilsav, mind a kötött oHCA tartalom megnövekedett. Viszont az ABA előkezelés a kötött szalicilsav akkumulációt kis mértékben, míg a kötött oHCA akkumulációt majdnem negyedére csökkentette.

A szalicilsav egyik legismertebb szerepe a növények patogénekkal szembeni rezisztenciájának kialakításában van. Szalicilsavval (és acetyl-szalicilsavval) egyes PR-proteinek (pathogenesis related) szintézise, valamint patogénekkal szembeni ellenállóság indukálható. A jelenséget először dohányban fedezték fel, de azóta más növényfajokban is kimutatták. Bár az exogén módon alkalmazott szalicilsav hatását főként a bejuttatás helye közelében fejtik ki, több, a szisztematikus szerzett rezisztencia (SAR) szerepet játszó PR-protein mRNS-ét is kimutatták dohányban szalicilsav hatására.

A biotikus stresszre bekövetkező endogén szalicilsav változásokat búza növényekben vizsgáltuk. Elsőként levélrozsda (*Buccinia triticulturae*) fertőzés hatását vizsgáltuk üvegházi körülmények között egy érzékeny (Alcedo) és egy rezisztens (LR9) búzafajtán. A növényeket 10 napig neveltük cserépben üvegházban, majd az első levelet fertőztük. A

növényeket a fertőzés után két héttel gyűjtöttük be, külön-külön szedve a különböző levélszinteket és azonos korú kontroll növényeket is szedtünk. Mértük különböző antioxidáns enzimek aktivitását (glutation reduktáz, glutation-S-transzferáz, aszkorbát peroxidáz, kataláz, guajakol peroxidáz) és az endogén szalicilsav szintet. Az aszkorbát és guajakol peroxidáz aktivitásokban kismértékű növekedés volt megfigyelhető fertőzés hatására, de ez nem volt jelentős. A szalicilsav szint nem változott jelentősen a fertőzés hatására. Vizsgálatainkat kiterjesztettük szántóföldre is. Thatcher alapú közel izogén törzsek közül vizsgáltuk az LR1 (TC1), LR9 (TC9), LR19 (TC19), LR26 (TC26) és LR 34 (TC34) gént hordozó törzseket, valamint az Alcedot, az üvegházban is használt szenzitív kontrollt. Ebből a TC1, TC26 és az Alcedo szenzitív, míg a TC9, TC19 rezisztens, a TC34 pedig felnőttkori rezisztens volt. A kontroll leveleket a közvetlenül a fertőzés előtt szedtük, mert nem tudtuk volna biztosítani, hogy ne fertőződjenek a növények. A fertőzött mintákat két hónappal később gyűjtöttük, amikor már jól kifejlődött a fertőzés. Itt is mértük az antioxidáns enzimek aktivitását és az endogén szalicilsav szintet. A glutation reduktáz aktivitása nem változott egyik esetben sem. A glutation-S-transzferáz, a guajakol peroxidáz és az aszkorbát peroxidáz aktivitása megnőtt a fertőzés hatására. A kataláz aktivitásban kismértékű csökkenés mutatkozott az érzékeny TC1, TC 26 fajtákban, míg az Alcedoban nem történt változás. A rezisztensekben megnőtt a kataláz aktivitása (1. ábra).

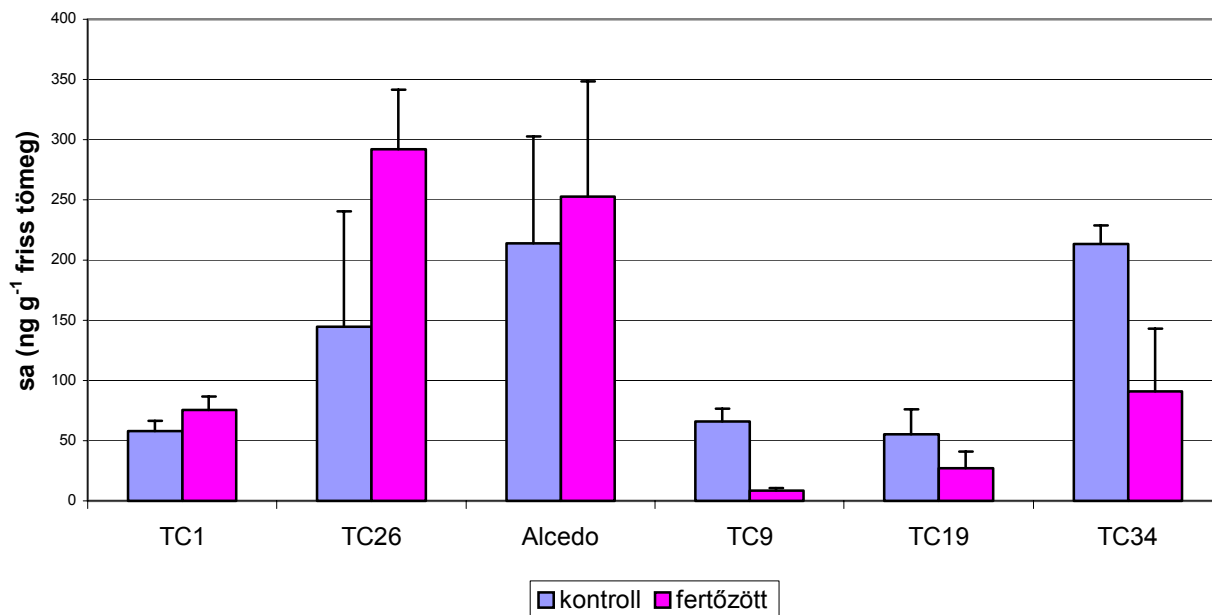
CAT aktivitás búza levélben levélrozsda fertőzés során



1. ábra. Kataláz enzim aktivitása búza levélben levélrozsda fertőzés során szántóföldi körülmények között.

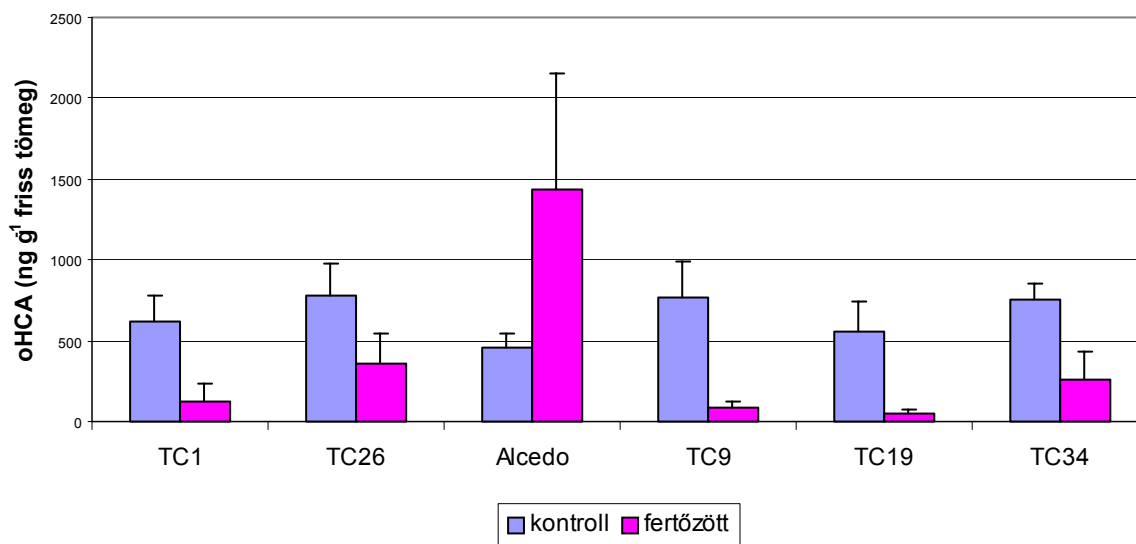
A szabad szalicilsav szint az érzékeny TC1, TC26 fajtákban megemelkedett, míg az Alcedoban nem történt változás, a rezisztens fajtákban viszont csökkent (2. ábra). A kötött szalicilsav mind a szenzitív (TC1, TC26), mind a rezisztens (TC19, TC34) fajtában megnőtt, kivéve az Alcedot és a TC9-et. Az o-hidroxi-fahéjsavat is mértük. Ez a szalicilsav egyik prekürzora növényekben. A fertőzés hatására lecsökkent a szintje, kivéve az Alcedot, amiben megemelkedett (3. ábra).

Szabad szalicilsav tartalom változása búza levélben levélrozsda fertőzés során



2. ábra. Szabad szalicilsav szint változása búza levélben levélrozsda fertőzés hatására szántóföldi körülmények között.

Szabad o-hidroxi-fahéjsav mennyiségének változása búza levélben levélrozsda fertőzés hatására



3. ábra. Szabad o-hidroxi-fahéjsav mennyiségének változása búza levélben levélrozsda fertőzés hatására szántóföldi körülmények között.

A fenti eredményekből látszik, hogy az üvegházi kísérletekhez sikerült kiválasztanunk azt az érzékeny fajtát, az Alcedot, amiben gyakorlatilag alig volt változás az antioxidáns enzimek aktivitásában és a szalicilsav szintben fertőzés hatására. Választásunk azért esett rá, mert

általában levélrozsánál ezt használják szenzitív kontrollként. Ez a tulajdonsága magyarázhatja azt, hogy a védekezési reakciói alig működnek.

A pályázat mindenekelőtt néhány abiotikus és biotikus stresszfaktor, és azok kivédésére szolgáló folyamatok jobb megismerésére irányult, így döntően alapkutatás jellegű volt. Összegzésül megállapíthatjuk, hogy az exogén szalicilsav abiotikus stresszek során befolyásolja a növények stressztűrő képességét, és hogy mind abiotikus, mind biotikus stresszek hatást gyakorolnak a szalicilsav metabolizmusra.

Irodalomjegyzék

Németh M., Janda T., Horváth E., Páldi E., Szalai G.: ***Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize***, Plant Science, 162: 569-574., (2002) (folyóiratcikk)

Pál M., Szalai G., Horváth E., Janda T., Páldi E.: ***Effect of salicylic acid during heavy metal stress***, Acta Biol. Szegediensis, 46:119-120., 2002 (konf.kiadv.)

Pál M., Horváth E., Janda T., Páldi E., Szalai G.: ***Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (Zea mays L.) plants***. Physiol. Plant. 125: 356-364. (2005) (folyóiratcikk)

Pál M., Eszter Horváth, Tibor Janda, Emil Páldi and Gabriella Szalai: ***Physiological changes and defence mechanisms induced by cadmium stress in maize***. J. Plant Nutr. Soil Sci. 169: 1-8. (2006a) (folyóiratcikk)

Pál M., Eszter Horváth, Tibor Janda, Emil Páldi, Gabriella Szalai: ***The effect of cadmium stress on phytochelatin, thiol and polyamine content in maize***. Cereal. Res. Com. (in press). (2006b) (folyóiratcikk)

Szalai G., Pál M., Páldi E., Janda T.: ***Effect of salt stress on the endogen salicylic acid content in maize (Zea mays L.) plants.***, Acta Physiologiae Plantarum 26: 237. (2004) (abst).

Szalai G., Páldi E., Janda T.: ***Effect of salt stress on the endogenous salicylic acid content in maize (Zea mays L.) plants***. Acta Biol. Szegediensis, 49: 47-48. (2005)