

Abiotikus stressztényezők hatása a kukorica (*Zea mays* L.) anyagcseréjére és egyedfejlődésére c. tematikus OTKA pályázat zárójelentése (T 379897)

1. A pályázat célja

A pályázat egyik célja - korábbi, más területen elért eredményeinkre alapozva - a kukorica fiatalkori hidegtűrésének további tanulmányozása volt. Arra kívántunk választ kapni, hogy a kénanyagcsere intermedierje, az S-metilmetionin (SMM) mennyiben tudja a kukorica alacsony hőmérséklettel szembeni ellenállóságát befolyásolni, és ha igen akkor milyen módon és mértékben. Kísérleteinket a fotoszintézis, a poliaminok és az antioxidáns enzimek szintjén végeztük. A másik cél a kukorica tőszámnövelésével összefüggő proterandria jelenségének tanulmányozása volt a nővirágzatban lezajló biokémiai változások nyomon követése, a tőszámsűrítés és a mikroklíma közötti kölcsönhatások, valamint virágzásdinamikai vizsgálatok elemzése révén. A proterandriával összefüggő tervezett kísérletekből csak az utóbbiakat tudtuk megvalósítani. Ennek okai: a kért pályázati összeg 70%-át kaptuk csak meg, majd ezt követően két alkalommal különböző mértékben csökkentették a kutatásra fordítható pénzt, majd 2004-től megszűnt az ÁFA visszaigényelhetősége. Ezek az okok nem tették lehetővé a proterandriával kapcsolatos drága biokémiai kísérletek megvalósítását. Ugyanakkor az eredeti tervtől eltérően kibővítettük az SMM-nal kapcsolatos kutatást a poliaminszintézis kulcsenzimeinek génexpressziós vizsgálatával, valamint először alkalmaztuk a hazánkban újdonságnak számító több hullámhosszú fluoreszcencia-leképző rendszert.

A pályázatban részt vevő kutatók a következők voltak:

MTA MGKI: Horváth Eszter, Janda Tibor, Kósa Eszter (PhD hallgató), Páldi Emil, Szalai Gabriella

ELTE Növényélettani Tanszék: Lásztity Demeter, Rácz Ilona, Szegő Dóra (PhD hallgató), Szigeti Zoltán

Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Agrometeorológia Tanszék: Anda Angéla, Burucs Zoltán, Lőke Zsuzsanna

2. Az S-metilmetionin hatása a membrán integritásra magasabb rendű növényekben alacsony hőmérsékleti stressz alatt

Ismert, hogy az alacsony hőmérséklet hatására a membránok kémiai összetétele (lipidösszetétel, szteroid-foszfolipid arány, telítetlen zsírsavak mennyisége stb.) és fizikai-kémiai tulajdonságai megváltoznak. Az alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező membránsérülések miatt megnövekszik a plazmalemma áteresztőképessége, és a citoplazma anyagának kiáramlása. A jó hidegtűrő-képességgel rendelkező káposztafélék magas S-metilmetionin (SMM) tartalma miatt feltételeztük, hogy ez a vegyület alacsony hőmérsékleti stresszhatást csökkentő, membránintegritást elősegítő tulajdonsággal rendelkezhet, és ezt az ionkiáramlás mérésével kívántuk igazolni. Az SMM, mint a kénanyagcsere meghatározó intermedier vegyülete a legtöbb növényben, ha eltérő mennyiségben is, de megtalálható. Kísérleteink során arra kívántunk választ kapni, hogy az SMM milyen mértékben képes az alacsony hőmérsékleti stressz során a sejtmembránok integritását megvédeni, illetve a membránsérülések mértékét csökkenteni.

Az elektrolitkiáramlással (EL) összefüggő méréseket borsóban (*Pisum sativum* L. cult. Rajnai törpe), szójababban (*Glycine max* L. cult. Imola), kukoricában (*Zea mays* L. hybrid MvSC

429), és 8 eltérő fagyállóságú és különböző származású őszi búzafajtában (*Triticum aestivum* L. cultivars: jó fagyálló: Mironovszkaja 808, Martonvásári 4 (Mv 4), közepesen fagyálló: Bánkúti 1201, Bucsányi 20, Beauchamp, Martonvásári 14 (Mv 14) gyenge fagyállóságú: Vitka és Rana) végeztük. A búzafajták fagyállóságát a martonvásári intézetben kifejlesztett fagyállósági teszt alapján fitotronban határozták meg. A poliaminok mennyiségi és minőségi analízisét HPLC módszerrel végeztük egy Merck-Hitachi gyártmányú készülékkel. Az elektrolitkiáramlás mértékét levél és gyökér mintákban mértük. A vezetőképességet Orion 100 típusú (Expotech, USA) berendezés segítségével határoztuk meg.

Eredmények

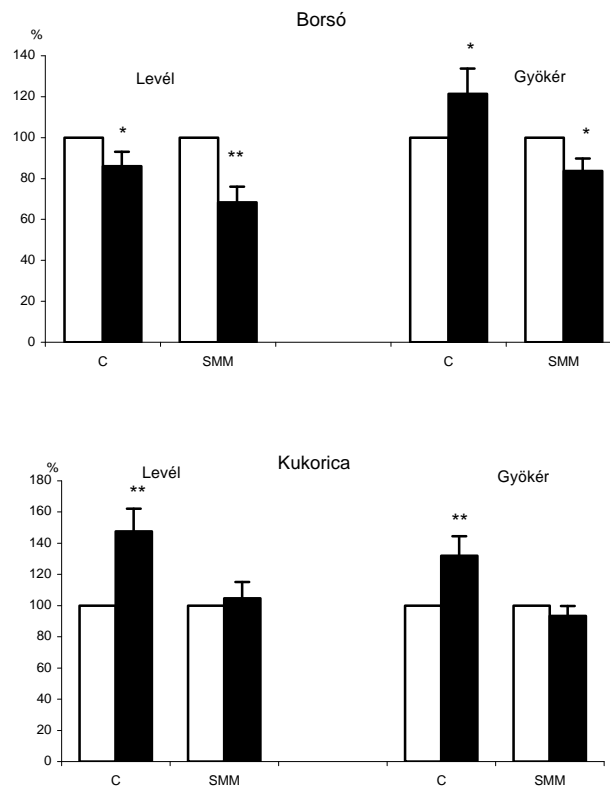
Vizsgálataink során a hidegkezelés és az SMM közötti kölcsönhatást tanulmányoztuk az alacsony hőmérséklettel szemben toleráns (borsó) és érzékeny (kukorica) fajok leveleiben és gyökereiben (**1. ábra**). A megfigyelések azt mutatják, hogy az alacsony hőmérséklet (3°C) mindkét fajban a kontroll növényekben az EL mértékét növelte (kivéve a borsó levelét), míg az SMM kezelés csökkentette, vagy a kontrolléval megegyező szinten tartotta. A két növényfaj összehasonlításából - mint várható volt - az is kitűnik, hogy az alacsony hőmérséklet nagyobb stresszt jelentett a szubtropikus eredetű kukoricára, mint a jó hidegtűréssel rendelkező borsóra.

A továbbiakban azt tanulmányoztuk, hogy az SMM milyen mértékben tudta befolyásolni az EL mértékét alacsony hőmérsékleti kezelés hatására eltérő fagyállóságú és származású búzafajtákban. Választ kívántuk kapni arra a kérdésre is, hogy az EL mértéke és az adott genotípus fagyállósága között van-e összefüggés. Az eredmények azt igazolták, hogy a hidegkezelés (0°C, 24 óra) a gyenge fagyállóságú búzafajtákban (Bucsányi 20, Vitka, Rana) mind a levélben, mind a gyökérben, míg a közepes fagyállóságú búzafajtákban (Bánkúti 1201 Beauchamp, Mv 14) elsősorban a gyökérben növelte az EL mértékét. A vizsgált fajták közül kiemelkedett a kitűnő fagyállósággal rendelkező Mironovszkaja 808, ahol a hidegkezelés hatására - a hideg-indukálta szintézisek beindulása miatt - már eleve csökkent az ionkiáramlás (**2. ábra**). Az SMM a hidegkezelés okozta EL növekedését az esetek többségében a kontroll szintjére (Mv 4, Bánkúti 1201, Beauchamp, Bucsányi 20, Vitka, Rana), vagy az alá csökkentette elsősorban a gyökerekben, valamint a Mironovszkaja 808-as fajta levelében és gyökérében egyaránt. Megállapítható, hogy az SMM egyértelműen csökkentette a hidegkezelés okozta membránkárosodást, mely a gyökerekben volt nagyobb mérvű. Az is igazolható, hogy a gyenge fagyállóságú genotípusok membránjai mind a levélben, mind a gyökérben nagyobb mértékben károsodtak, mint a közepes fagyállósággal rendelkező fajtáké. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a hideg-indukálta membránkárosodás, azaz az EL mértéke és az adott búza genotípus fagyállósága között összefüggés van. Ennek a kölcsönhatásnak a valószínűségét tovább erősíti az, ha a búza genotípusok EL adatait a kitűnő fagyállósággal rendelkező Mironovszkaja 808-as fajtában kapott adatokkal hasonlítjuk össze.

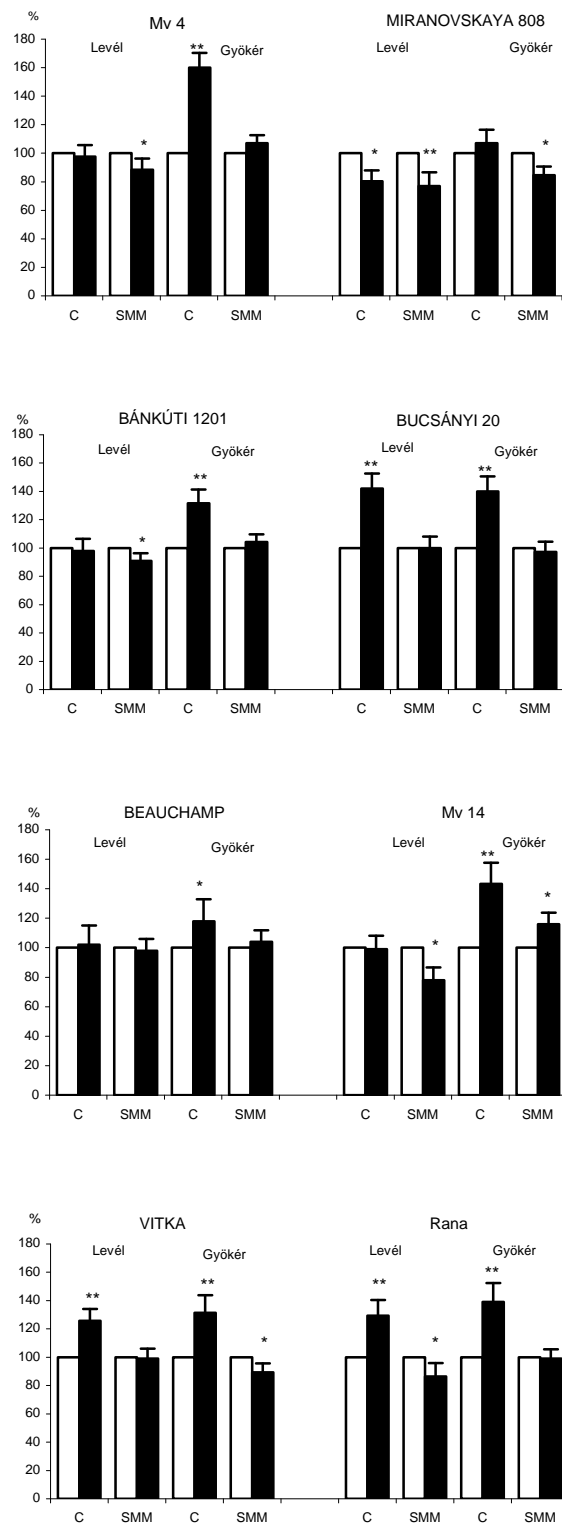
A poliaminok, az oldható cukrok, egyes aminosavak és a kvaterner ammónium vegyületek védőhatást biztosítanak a növényi sejteknek az abiotikus stressztényezőkkel (alacsony és magas hőmérséklet, szárazság, sóhatás, stb.) szemben. Kutatásaink további részében arra kerestük a választ, hogy az SMM stimulálhatja-e a poliaminszintézist, ha igen, akkor milyen mértékben, valamint a metioninból kiinduló szintézisút szerepet játszik-e a spermidin (Spd) és a spermin (Spn) képződésében, felhasználva e folyamatot specifikusan gátló MGBG-t. Az SMM-indukálta poliaminszintézist 2 egyszikű, és 2 kétszikű növényfajban (búza, kukorica, szója és borsó) vizsgáltuk úgy, hogy az egyik kísérlet sorozatban a tápoldatba csak exogén SMM-t, míg a másikba az SMM mellett a metioninból kiinduló poliaminszintézis-út enzime, az SAMDC specifikus gátlóját, MGBG-t is adtunk. A kontroll sem SMM-t, sem MGBG-t nem

tartalmazott. Az eredmények mind a borsónál (**3. ábra**), mind a kukoricánál (**4. ábra**) azt mutatták, hogy a 0,1 g/l koncentrációban alkalmazott SMM szignifikánsan megnövelte a kontrollhoz képest a putreszcin (Put), az agmatin (Agm) és a Spd mennyiségét. Legnagyobb mértékben a Put, utána az Agm szintje nőtt. A Spn mennyisége az SMM-kezelés hatására egyik növényfajban sem változott. További két növényfajjal (búza és szója) elvégzett kísérletek eredményei (itt külön nem közöljük) gyakorlatilag ugyanezt a szignifikáns tendenciát mutatták, mint amit a kukoricában és a borsóban kaptunk, és megerősítették az SMM poliaminszintézist serkentő hatását.

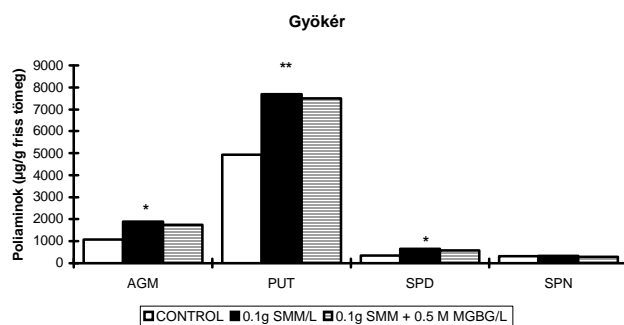
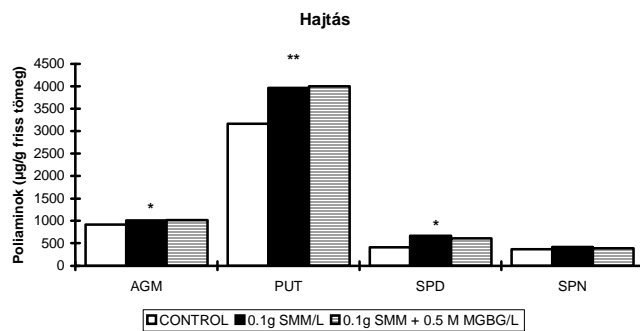
Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az SMM membránintegritást védő hatása azon alapszik, miszerint az SMM stimulálja a polikationos karakterű poliaminok szintézisét, melyek a membránfehérjék anionos csoportjaihoz kötődve védik annak struktúráját, és így csökkentik az EL-t alacsony hőmérsékleti stressz körülmények között.



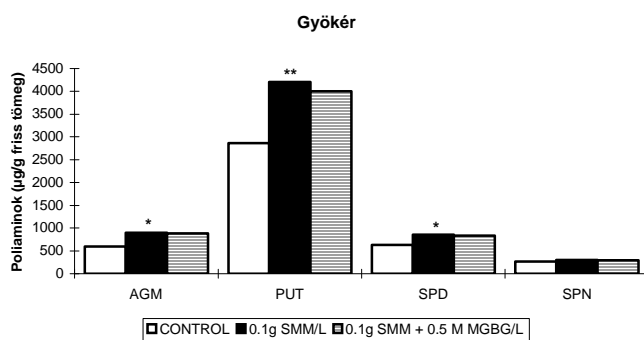
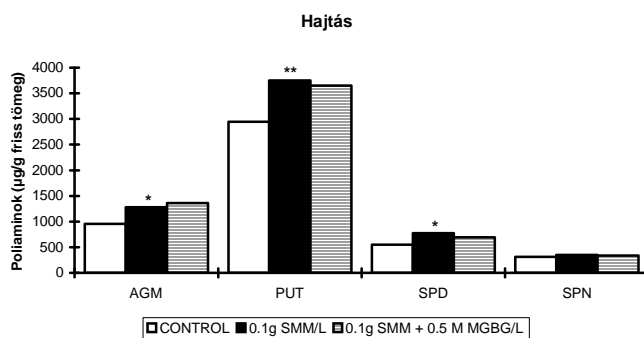
1. ábra: SMM hatása 14 napos borsó, valamint 10 napos kukorica elektrolitkiáramlására. Az értékek a kontroll (20°C) százalékában vannak megadva. □=20°C; ■ = 3°C (24 óra, sötét); C = kontroll; SMM = 0.1g/L. *:p < 0.05; **: p < 0.01.



2. ábra: SMM hatása 10 napos búza növények elektrolitkiáramlására. Az értékek a kontroll (20°C) százalékában vannak megadva. □ = 20°C; ■ = 0°C (24 óra, sötét); C = kontroll; SMM = 0.1g/L. *:p < 0.05; **: p < 0.01.



3. ábra: SMM és MGBG hatása 14 napos borsó poliamintartalmára levélben és gyökérben.
*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.



4. ábra: SMM és MGBG hatása a 12 napos kukorica poliamintartalmára levélben és gyökérben.
*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

3. Az SMM hatása a spermidinszintézisre és az elektrolitkiáramlásra beltenyésztett kukoricavonalakban alacsony hőmérsékleten.

Az SMM, mint intermedier vegyület, a metioninból szintetizálódik. Az SMM-ből két anyagcsere-út ágazik el. Ezek közül az egyik végterméke a kloroplasztiszból szintetizálódó, igen erős ozmotikumként ismert dimetilszulfon propionsav, míg a másik úton putreszcinn beépülésével a 3 aminocsoportot tartalmazó poliamin, a spermidin képződik. Jelen munka keretében - az előzőekben leírt eredményekre alapozva – azt kívántuk tanulmányozni, hogy az exogén SMM milyen módon és mértékben tudja befolyásolni alacsony hőmérsékleti stressz alatt a spermidinszintézist és az elektrolitkiáramlás mértékét e stresszorral szemben eltérő viselkedésű, és a hibrid előállításban használt beltenyésztett kukoricavonalakban. E kísérletsorozatban alacsony hőmérséklettel szemben toleráns (A 632, F7 cmsC, W 153 R), és érzékeny (N 6, Co 158, Mo 17) vonalakat vizsgáltunk. A vonalak használatát az indokolta, hogy a beltenyésztett vonalak genetikailag homogénebbek, és egyben az abiotikus stresszekkel szemben érzékenyebbek.

A 3 hetes, normál hőmérsékleten nevelt kukorica növényeket 1 napig 0,01% SMM-t tartalmazó tápoldatban kezeltük. Ezután a növényeket SMM-t nem tartalmazó tápoldatban alacsony hőmérsékleti stressznek (8°C) tettük ki 5 napig. A spermidin mennyiségét HPLC módszerrel, a levélmintákban bekövetkező ionkiáramlás mértékét pedig Orion 100 típusú vezetőképesség-mérővel követtük nyomon. Kontrollnak minden esetben az SMM kezelést nem kapott mintákat vettük. A méréseket a hidegkezelés első, harmadik és ötödik napján vett mintákból végeztük.

A spermidinnel kapcsolatos eredményeket értékelve megállapíthatjuk, hogy a hidegkezelés hatására mind a három hidegtűrő vonalban szignifikánsan emelkedett a spermidin mennyisége. Ez a növekedés két vonalban (A 632, F7 cmsC) nagyobb mértékű volt, mint a W 153 R esetében. Ez a változás egyértelműen - más stresszorok esetében is megfigyelt - stressz-indukált poliaminszintézis részeként fogható fel. Az SMM kezelés hatására a spermidin mennyiségében jóval kisebb emelkedés volt megfigyelhető, mint a kontroll növényekben, melyek csak hidegkezelést kaptak. Ez csak a hideggel szemben toleráns vonalakra jellemző, és azt bizonyítja, hogy ezekben a genotípusokban a hideg hatására nagyobb mértékű szintézisbeli emelkedés következik be, mint az SMM hatására.

Egész más képet kaptunk, amikor a hideggel szemben érzékeny vonalakat értékeltük. A csak hidegkezelést kapott kontroll növényekben hideg-indukált spermidinszintézis jóval kisebb mértékben volt megfigyelhető, szignifikáns mértékben csak az N 6 vonalban, és ebben az esetben is csak a hidegkezelés 3. és 5. napján. Hideghatásra bekövetkező spermidinszint emelkedés az N 6 vonalban a hidegtűrőknél mért érték 20%-át tette ki. Az SMM kezelés hatására - a hidegtűrő vonalakkal ellentétben - szignifikáns spermidinszint emelkedés volt kimutatható. Ez a növekedés mind a három vonalban szignifikáns volt. Ezekben a genotípusokban igazolható volt az SMM-indukált spermidinszintézis ténye. Az SMM-indukált spermidin mennyisége a N 6 és Mo 17 vonalokban nagyobb volt, mint a Co 158-ban. Az SMM-indukált spermidin a 3. napon érte el a maximumot, és utána szignifikánsan már nem változott. Ez a tendencia mind a 3 hidegre érzékeny vonalban megfigyelehető volt.

Az SMM-indukált spermidin - ismerve az SMM metabolizációját - membránt védő hatását levélmintákban az elektrolitkiáramlás mérésével követtük nyomon. Mint, ahogy az várható volt, az SMM-indukált spermidin kisebb mértékben csökkentette az elektrolitkiáramlást a hideggel szemben toleráns vonalokban, mint az érzékenyekben. Bár mindkét genotípus csoportban szignifikáns volt az SMM hatása, ennek mértéke az érzékeny vonalokban volt a leglátványosabb.

4. Az SMM-kezelés és a fotoszintézis közötti kölcsönhatás tanulmányozása alacsony hőmérsékleti stressz alatt.

Ismert tény, hogy a szubtropikus eredetű kukorica korai fejlődési stádiumában érzékeny az alacsony hőmérséklettel (chilling) szemben. A kukorica esetében a 13°C az a hőmérsékleti küszöbérték, ahol a klorofill szintézise és lebontása egyensúlyban vannak. Ez alatti hőmérséklet a víz fagyáspontjáig szuboptimális. Kutatásunk során azt kívántuk bizonyítani, hogy az SMM-nak védő szerepe van szuboptimális hőmérsékleteken. Az eddigi megfigyelések alapján a fotoszintetikus aktivitás nyomonkövetése a klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek közül a változó és maximális fluoreszcencia arányának (Fv/Fm) mérésével történt (PAM 2000 típusú hordozható műszer). Ez a paraméter a PS II potenciális fotoszintetikus hatékonyságát jól jellemzi. Ezt az össz-klorofilltartalom meghatározásával egészítettük ki, melyet az automata Minolta SPAD 502-es automata klorofillmérővel mértünk. Újdonságként alkalmaztuk a több hullámhosszú fluoreszcencia leképzőrendszert is, melyet a BME a karlsruhei egyetemmel közösen fejlesztett ki. E módszer alapját az képezi, hogy különböző stresszorok hatására fellépő válaszreakciók során a növényekben jellegzetes fluoreszcencia sajátosságokkal rendelkező metabolitok is felhalmozódnak. A stresszhatások közvetve, vagy közvetlenül a fotoszintetikus rendszer módosulását, vagy akár károsodását is okozhatják, ezért a legfontosabb fotoszintetikus pigment, a klorofill-a fluoreszcencia jellemzői is megváltoznak. A leképzőrendszerben a növényi minta fluoreszcenciáját egy 16,7 Hz-cel villogó Xe lámpa gerjeszti, melynek a növényi mintát érő gerjesztő fénye 355 nm hullámhosszú. A minta által emittált fluoreszcencia egy optikai és erősítő rendszeren keresztül jut a CCD kamerába. A kamerában lévő szűrőknek a fényútba helyezése biztosítja, hogy a kibocsátott fluoreszcens fényből a megfelelő hullámhosszúságú jusson a xenon lámpa villogásával szinkronizált, nagy felbontású CCD kamerába, s képezzen így 440, 520, 690 és 740 nm-nél teljes képet az objektumról. A kapott értékekből számított fluoreszcencia arányok (F440/F690, F440/F740, F690/F740) jól tükrözik a fiziológiai alapváltozásokat. E módszer alkalmazásával azt kívántuk bizonyítani, hogy az alacsony hőmérsékleti hatást e berendezés segítségével is nyomon lehet követni.

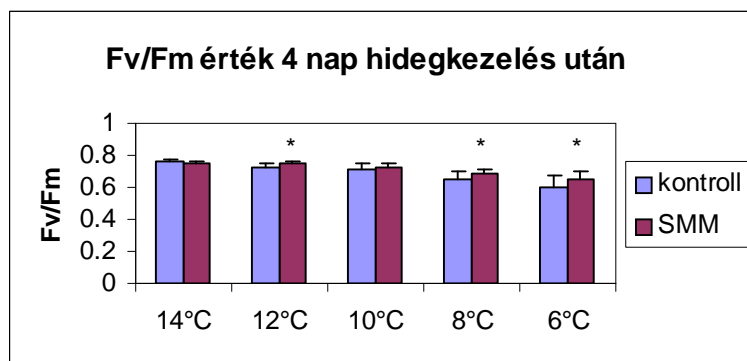
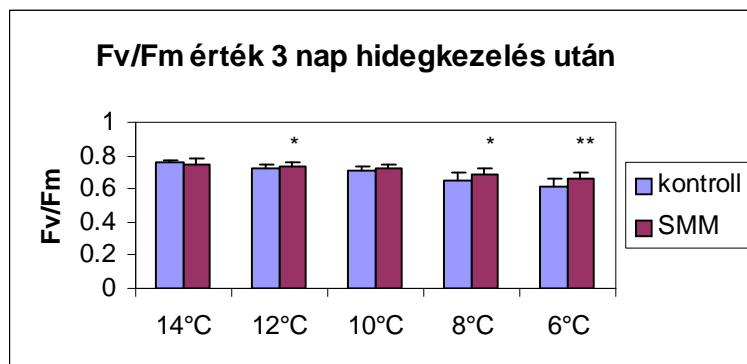
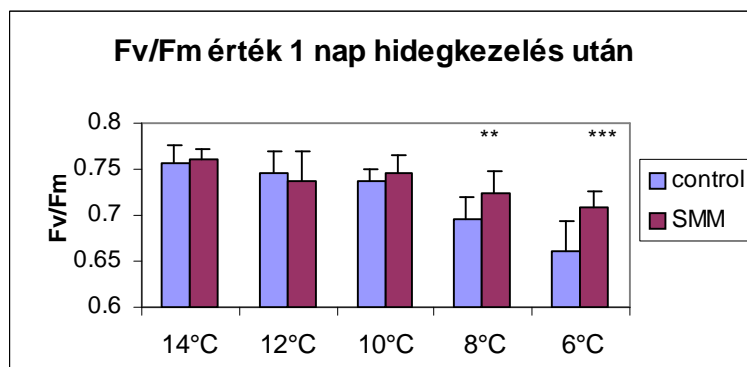
Munkánk során az SMM fotoszintézisre gyakorolt hatását tanulmányoztuk alacsony hőmérsékleti gradiens függvényében. Kísérleteinkben a Norma hibrid 2 hetes növényeit a martonvásári fitotron un. inhomogén kamrájába helyeztük el. A hőmérsékleti gradiens 6 és 14°C között változott. A mintavételeket, illetve a méréseket a kezelés első, harmadik és negyedik napján végeztük. A vizsgálatok során megmértük az Fv/Fm klorofill-a fluoreszcencia indexet, valamint nyomon követtük az össz-klorofilltartalom alakulását. Azok a stressztényezők, amelyek közvetlenül hatnak a PS II működésére, ilyen az alacsony hőmérséklet is, az Fv/Fm index csökkenését eredményezik. Az eredmények azt mutatják, hogy a szuboptimális tartomány legalacsonyabb hőmérsékletein (6 és 8°C) az SMM növelni tudja az Fv/Fm hányadost, ami arra utalt, hogy e vegyület védőhatást biztosított a PS II rendszer számára. E hőmérsékleteken kívül szignifikáns emelkedés 12°C-on is kimutatható volt (**1. ábra**).

Ezt a védőhatást bizonyítja az össz-klorofill tartalom alakulása is. Amint az a **2. ábrából** látható ugyanaz a szignifikáns tendencia volt megfigyelhető, mint az Fv/Fm hányadosnál. Az SMM 6, 8 és 12 °C-on növelni tudta az össz-klorofill mennyiségét, ami azt sugallja, hogy e vegyület a klorofill bioszintézisét elősegítette, ugyanakkor a klorofill lebontási folyamatát lassította.

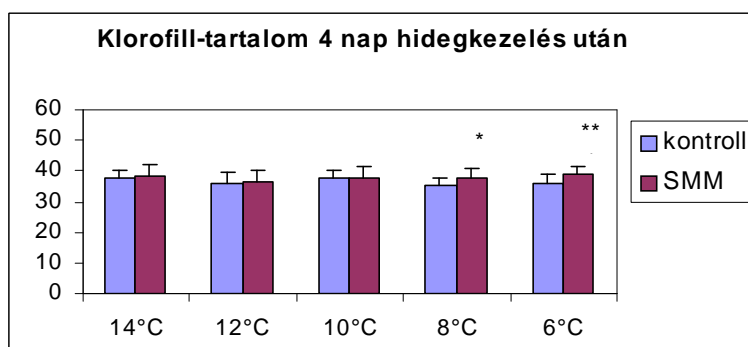
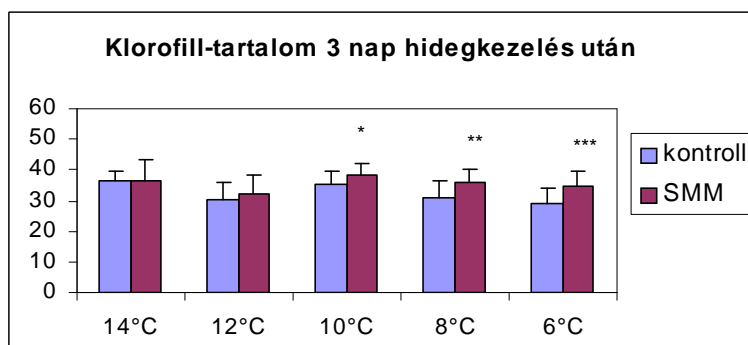
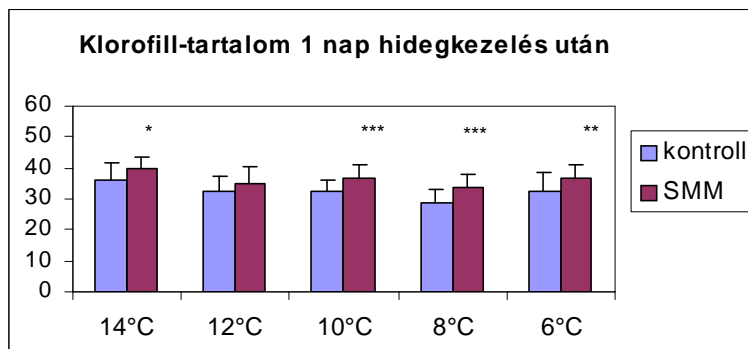
Kísérleteinkben alkalmaztuk az ELTE Növényélettani Tanszékén meglévő több hullámhosszú fluoreszcencia leképzőrendszert is. A hideg- és SMM-kezelt kukorica leveleinek fluoreszcencia emisszióját képeztük le 440, 520, 690 és 740 nm-nél. Az F440/F690 és a többi arány is azt mutatja, hogy az alacsony hőmérséklet stresszként hat a kukoricára.

Ugyanakkor az SMM hatását megbízhatóan kimutatni nem tudtuk. A gradiens magasabb hőmérsékletein (12 és 14°C) tendenciájában ugyan pozitív, de gyenge védőhatás vélelmezhető. Az F690/F740 arányban némi védőhatás látszik, már alacsony hőmérsékleteken is. Ez az arány az *in situ* klorofilltartalom inverz indikátora. Ez a módszer érzékenysége nál fogva kitűnően alkalmazható a stresszhatások kimutatására akkor, ha a kezelt növényi részt - az esetek többségében levelet - a mintavétel után a lehető leggyorsabban tudjuk mérni.

Mivel magyarázható az SMM fotoszintézist védő hatása? Erre kétféle magyarázat szolgál: a) a sejt citoplazmájában szintetizálódó SMM-indukált spermidin, mely a membránok integritásának megőrzésében jeleskedik, b) az SMM metabolizációja során több enzimatikus lépésben, a kloroplasztisban szintetizálódó dimetilszulfon propionsav, mely igen erős ozmotikumként fejti ki védő hatását.



1. ábra: Fv/Fm érték alakulása 6-14°C-os hőmérsékleti gradiens mellett kontroll és SMM-kezelt növényekben.



2. ábra: 6-14°C hőmérsékleti gradiens hatása a relatív klorofill-tartalomra kontroll és SMM-kezelt kukorica növényekben.

5. SMM-kezelés hatása az antioxidáns enzimek aktivitására alacsony hőmérsékleti stressz során

A növények abiotikus stresszekkel szembeni ellenállóképességének kialakításában fontos szerep jut az antioxidáns enzimeknek, melyek a stresszhatás nyomán keletkező reaktív oxigénformák eliminálásában vesznek részt. Így elképzelhető, hogy az SMM részben ezen enzimszerepen keresztül fejti ki hatását a kukorica növények alacsony hőmérséklettel (chilling) szembeni ellenállóképességére.

Munkánk során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy 5°C-os hidegkezelés során milyen ütemben aktiválódnak az egyes antioxidáns enzimek, valamint, hogy a kontroll és az SMM-kezelt növények között mutatkozik-e különbség e tekintetben. Ennek érdekében a hidegkezelés 1., 4. és 6. napján vett mintákban mértük a következő antioxidáns enzimek

aktivitását: glutation-reduktáz, glutation-S-transzferáz, kataláz, aszkorbát-peroxidáz és guajakol-peroxidáz.

Eredményeink alapján (**1. ábra**) megállapíthatjuk, hogy mindegyik vizsgált antioxidáns enzim aktiválódott az 5°C-os hidegkezelés hatására, bár különböző mértékben és ütemben. A glutation-reduktáz, a glutation-S-transzferáz és a kataláz aktivitása már az első napra elérte a maximumát. A glutation-reduktáz és a kataláz aktivitása jelentősebb mértékben, kb. 2-szeresére nőtt, a glutation-S-transzferáz ezzel szemben csak mintegy 1,5-szeresére. A kataláz esetében azonban már a 4. naptól csökkenő tendenciát tapasztaltunk, míg a másik két enzim a 6. napig megtartotta magasabb aktivitását. Az aszkorbát-peroxidáz aktivitása igen nagy mértékben fokozódott a hidegkezelés hatására, már az első napon kétszeresére, a negyedik napra pedig a maximumát elérve 5-szörösére növekedett. A guajakol-peroxidáz az első napon még nem mutatott változást, aktivitása a 4. napra is csak kis mértékben, nem szignifikáns mértékben nőtt meg.

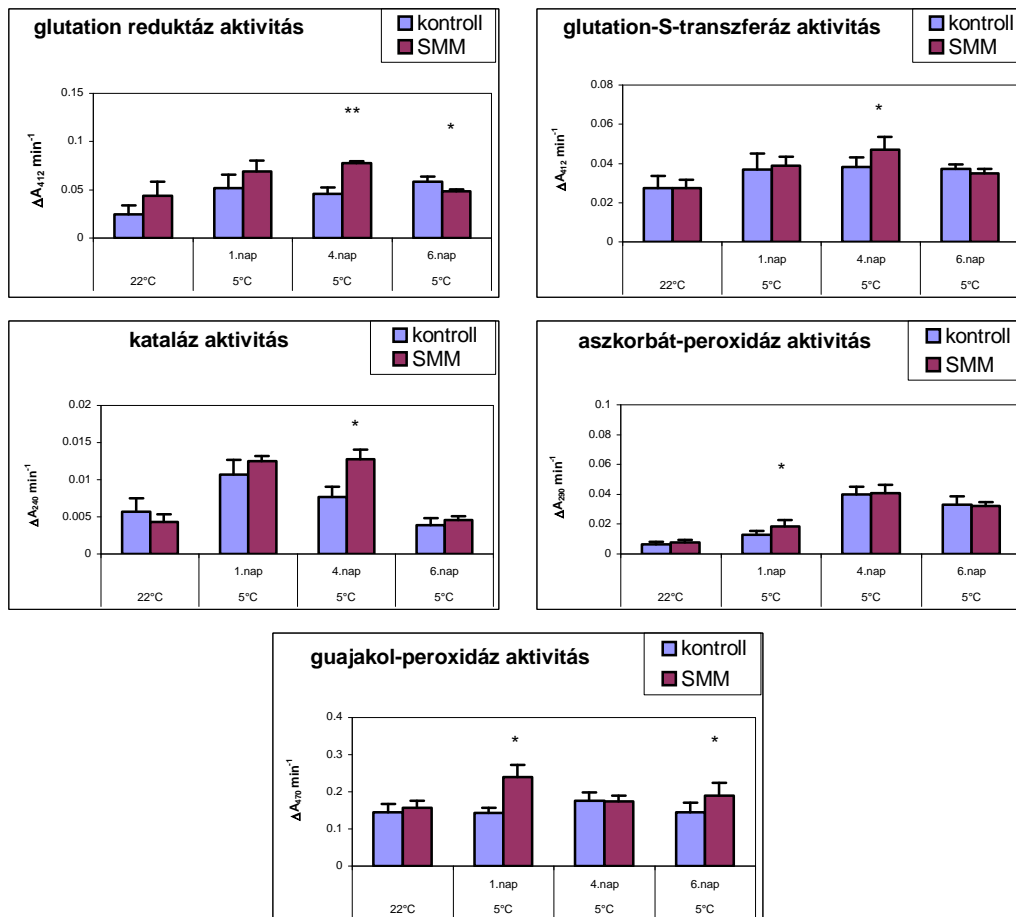
Az SMM-kezelés hatására különbséget találtunk egyes enzimek aktiválódásának ütemében illetve mértékében. Már a hidegkezelés előtt, 22°C-on is nagyobb aktivitással bírt a glutation-reduktáz enzim az SMM-kezelt növényekben. Ugyanakkor a kataláz aktivitása kis mértékben ugyan, de csökkent az SMM-kezelés nyomán. A hidegkezelés során a glutation-reduktáz, a glutation-S-transzferáz és a kataláz enzimek az első napon hasonló mértékben aktiválódtak az SMM-kezelt és a kontroll növényekben, azonban az SMM-kezelés hatására aktivitásuk a 4. napra tovább nőtt, és így szignifikáns mértékben meghaladta a kontroll növényekét. A 6. napra azonban mindhárom enzim aktivitása jelentős mértékben csökkent. Az aszkorbát-peroxidáz az első napon nagyobb mértékben aktiválódott az SMM hatására, háromszorosára nőtt az enzim aktivitása, a 4. és 6. napon azonban nem mutatott különbséget a kontroll növényekhez képest. A guajakol-peroxidáz aktivitása a kontrollhoz viszonyítva korábban, már az első napra, és nagyobb mértékben megnőtt az SMM-kezelt növényekben (1. ábra)

Összefoglalásképp elmondható, hogy az SMM-kezelés hatására a glutation-reduktáz, a glutation-S-transzferáz és a kataláz enzimek nagyobb mértékben aktiválódtak a hidegkezelés 4. napjára. Az aszkorbát-peroxidáz esetében az aktiválódás ütemét gyorsította fel az SMM, míg a guajakol-peroxidáz enzimnél mind az aktiválódás ütemére, mind mértékére pozitív hatással volt az SMM-kezelés.

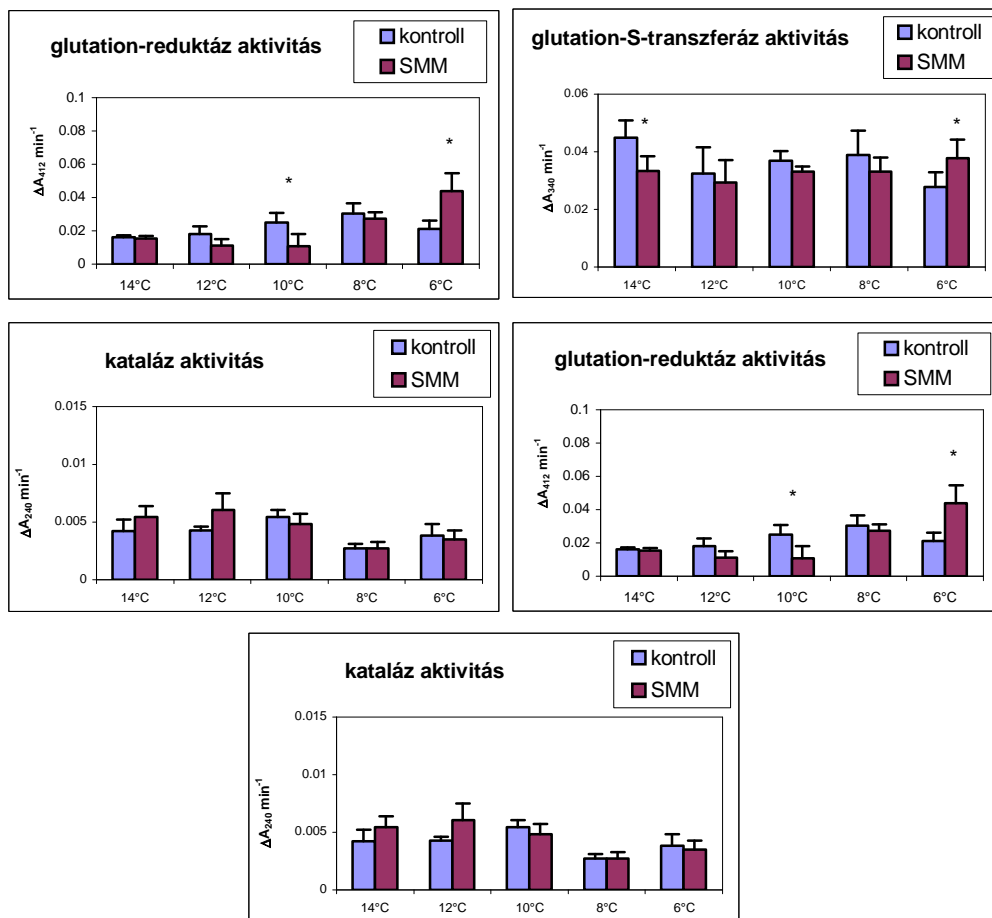
Egy következő kísérletsorozatban (**2. ábra**) megvizsgáltuk az S-metil-metionin hatását a kukorica növények antioxidáns védekező enzimrendszerére különböző mértékű hidegkezelések (14, 12, 10, 8 és 6°C-os chilling stressz) mellett. Az enzimaktivitás méréseket a hidegkezelés 4. napján végeztük. A glutation-reduktáz enzim aktivitása a kontroll növényekben 10°C-on kezdett emelkedni, maximumát a 8°C-os hidegkezelés során érte el. Az SMM-kezelés hatására csak 8°C-on indult meg az enzim aktiválódása, és 6°C-on még tovább erősödött, így szignifikánsan meghaladta a kontroll növényekben mért értéket. A glutation-S-transzferáz aktivitása a 14°C-on hidegkezelt kontroll növényekben volt a legmagasabb. Az alacsonyabb hőmérsékleteken egyre kisebb aktivitást tapasztaltunk, 6°C-on pedig már szignifikánsan kisebb volt az enzim aktivitása, mint 14°C-on. Az SMM kezelt növények között nem volt szignifikáns különbség a glutation-S-transzferáz aktivitásában a különböző hőmérsékleteken, így 14°C-on alacsonyabbnak, míg 6°C-on már magasabbnak bizonyultak a kontrollnál. A kataláz aktivitása hasonlóan alakult a kontroll és az SMM kezelt növényekben. A legmagasabb aktivitást a kontroll növényeknél a 10°C-os kezelésnél, az SMM-kezeltéknél 12°C-on tapasztaltuk. Alacsonyabb hőmérsékleten (8 és 6°C-on) ennél szignifikánsan kisebb aktivitást mértünk. Az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitásában nem mutatkozott különbség a kontroll növények esetében a különböző mértékű hidegkezelések között. Az SMM-kezelés hatására azonban minden hőmérsékleten szignifikánsan magasabb értéket ért el az enzim aktivitása. A legmagasabb aktivitást 8°C-on tapasztaltuk. A guajakol-peroxidáz aktivitása szintén nem változott a kontroll növényekben a különböző hőmérsékletek mellett. Az SMM

hatására azonban 6°C-on érte el az enzimaktivitás a maximumát, meghaladva a kontroll növényekben 6°C-on mért értéket (**2. ábra**).

Ezen eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az SMM-kezelés hatása elsősorban alacsonyabb hőmérsékleten számottevő: 6°C-on megnövelte mind a glutation-reduktáz, mind a glutation-S-transzferáz és a guajakol-peroxidáz aktivitását a kontrollhoz képest. Az aszkorbát-peroxidáz enzim esetében minden vizsgált hőmérsékleten megmutatkozott az SMM enzimaktivitást fokozó hatása, míg a kataláz enzim aktivitásában nem okozott statisztikailag szignifikáns eltérést az SMM-kezelés egyetlen hőmérsékleten sem.



1. ábra: 5°C-os hidegkezelés hatása az egyes antioxidáns enzimek aktivitására kontroll és SMM-kezelt növényekben.



2. ábra: 14-6°C-os hidegkezelés hatása az egyes antioxidáns enzimek aktivitására kontroll és SMM-kezelt növényekben.

6. SMM-indukált gének expressziójának vizsgálata kukoricában

A jelen munka során azt tanulmányoztuk, hogy ribonómiai szinten hogyan követhető nyomon az SMM szerepe. Tisztázni kívántuk, hogy milyen hatást gyakorol a különböző stresszorok és az SMM hatására egyaránt megnövekedett mennyiségben található poliaminok szintéziséért felelős gének expressziójára, illetve, hogy befolyással lehet-e olyan, a transzkripciót szabályozó faktorok szintézisére, melyek több, az adott stresszre jellemző válaszreakciókban szerepet játszó gén expresszióját együtt szabályozzák.

Ismeretes, hogy a poliaminok bioszintézisére a növényekben alternatív lehetőségek állnak rendelkezésre, melyek különböző módon változnak stresszhatásokra. A legrövidebb szénláncú általánosan előforduló putreszcin szintézise történhet az ornitinből közvetlenül, ornitin-dekarboxiláz (ODC) által katalizált reakcióban, míg az argininből több lépésben (agmatin és karbamoilputreszcin intermedieren át) szintén dekarboxilációval induló reakcióval, melyet az arginin-dekarboxiláz (ADC) katalizál. A putreszcin ugyanakkor prekürzora a spermidin és spermin bioszintézisnek, melyek egy, ill. két aminopropil csoport hozzákapcsolásával keletkeznek a spermidin-szintáz (SPDS) és a spermin-szintáz (SPMS) katalizálta reakciók eredményeként. A folyamatban dekarboxilált S-adenozil-metionin (SAM) szerepel

aminopropil-donorként, melyet a SAM-dekarboxiláz (SAMDC) enzim állít elő. A folyamatban szereplő valamennyi gén expresszióját vizsgáltuk a spermidin képződésig bezárólag, 10 napos fitotroni körülmények között nevelt kukorica levélből, szemikvantitatív RT-PCR módszerrel, referenciaként a konstitutívan expresszálódó aktin gént használva. A génextpresszió változásokat óránkénti mintavétellel vizsgáltuk.

Módszertan

A növények nevelése fitotroni körülmények között történt (14 fényperiódus 100 μ E, 20, ill 24 $^{\circ}$ C, 70-80% relatív páratartalom). Az SMM hatásának vizsgálatához a növényeket 9 napos korokban 0,01%-os SMM tartalmú Hoagland oldatra tettük át, majd 24 óráig ezen tartottuk 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24 óra múlva mintát véve az első 2 sorozatnál, 2, 3, 4, 6, és 24 óra múlva a másik két sorozatnál. A hideghatás vizsgálatához a 9 napos növényeket 5 $^{\circ}$ C-os hőmérsékletre fénytermosztátba tettük (csökkentett fényintenzitás mellett (30 uE), a kombinált (SMM+hideg) kezeléshez pedig az egy napig 0,01%-os SMM-el hasonló módon előkezelt növényeket tettük 5 $^{\circ}$ C-os fénytermosztátba, a hidegkezelés ideje alatt SMM-et már nem tartalmazó Hoagland oldatra. A mintavételi időket ld. az SMM kezelt sorozatoknál.

Az mRNS kinyerés 10 napos növények első és második leveléből Genoprep mRNA Beads módszerrel történt, a szemikvantitatív RT-PCR pedig Fermentas RT-Kit segítségével a gyártó ajánlása szerint, kontrollként ACTIN gént amplifikálva. A szemikvantitatív RT-PCR-t Su et al. 2004. módszere szerint végeztük. (Su Y-H, Frommer WB, Ludewig U. Plant Physiol. 2004;136:3104-3113.) A tervezett és felhasznált primerek:

ADC:

Saját tervezésű, AY104315 szekvenciára tervezve

Primerek: ZmADCf: AGGTGATGTACGAGGTGCTG

ZmADCr: TGTGGACACTGACGCGTTC

ODC:

Saját tervezésű, AY123224 szekvenciára és a paradicsom AF030292 szekvenciára tervezve

Primerek: Le-Zm-ODCf: AATGGGTCCAAAATACGGCGC

Le-Zm-ODCr: CGGTCGTAAAGTACACAGTTC

SAMDC:

Saját tervezésű, Y07767, AY103590, BT018615, BT016840 szekvenciákra tervezve

Primerek: ZmSAMDCf: CTGTCTTATGGTGACCTTGTC

ZmSAMDCr: GTTCACATGCTTACAGACGAC

SPDS:

Cikkből vett primerpár: Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis: Margarita Rodríguez-Kessler¹, Angel G. Alpuche-Solís¹, Oscar A. Ruiz² and Juan F. Jiménez-Bremont^{1,*}

Plant Growth Regulation (2006) 48:175–185

SPDS-MAIZE-5 5'-TGCAGCAGCGGCACTGAC-3' and

SPDS-MAIZE-3I 5'-GGAGGTGAGTAACCATTTCTGGTA-3'

Actin:

Félig saját tervezésű, J01238 szekvenciára tervezve

Primerek:

Zm-actinF: cikkből változtatott: ATTCAGGTGATGGTGTGAGC

A cikkbelihez képest 1 nukleotiddal eltolva.

Plant Physiol. 2000 August 1; 123(4): 1313–1324.

A Comparative Analysis of the Plant Cellulose Synthase (*CesA*) Gene Family¹

Neta Holland,² Doron Holland,² Tim Helentjaris, Kanwarpal S. Dhugga, Beatriz Xocnostle-Cazares,³ and Deborah P. Delmer*

Zm-actinR: CTGTA^{CT}CTCCTTCTAGGTGG

Saját tervezésű.

CBF:

Saját tervezésű, AF450481 szekvenciára tervezve

Primerek:

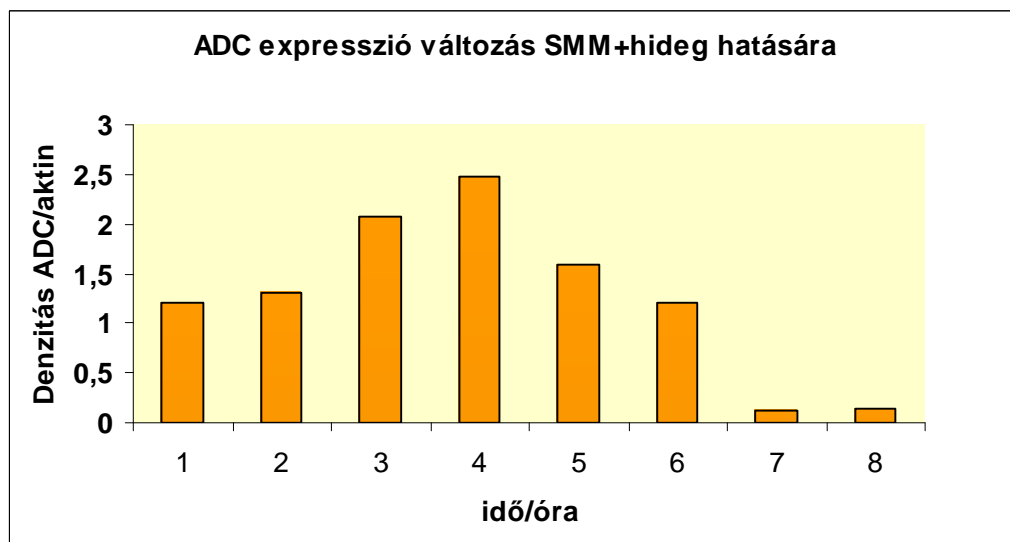
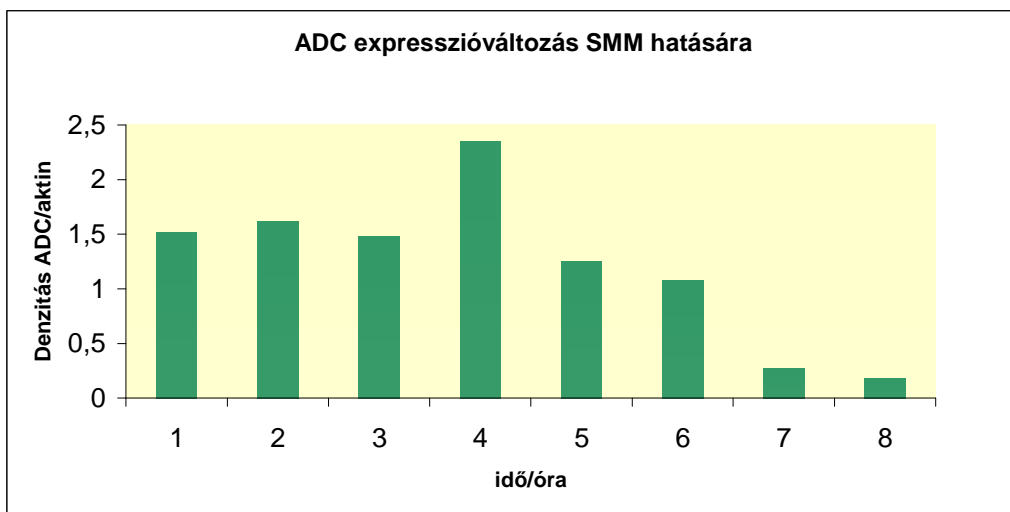
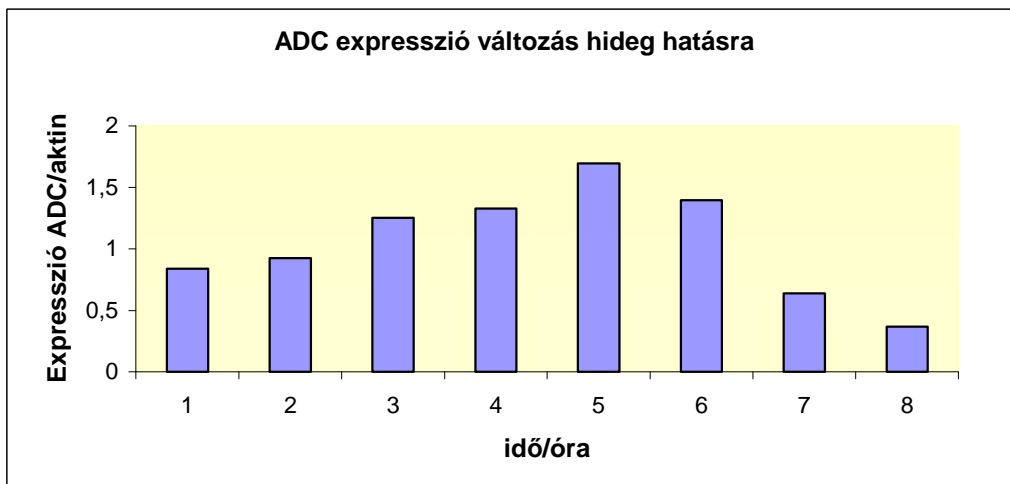
ZmCBF1f: CAGCAAGCTCAAGCAGTCAG

ZmCBF1r: CTTGAGCACGTGCCTGTGAA

Rev. Compl.: TTCACAGGCACGTGCTCAAG

Eredmények

A poliamin-bioszintézis enzimei közül a legnagyobb változást az ADC expressziójában tapasztaltuk, mely mindhárom kezelés hatására jelentősen megemelkedett a kezelést követő harmadik óráig, majd ezt követően a 24 órás periódus végére a kiindulási kontrollhoz hasonló szintre csökkent. Az SMM és az SMM+hideg hatására bekövetkező növekedés meghaladta a csupán hidegkezelés hatására bekövetkező génexpresszió növekedést (**1. ábra**). Ugyanakkor az alternatív, ornitinből kiinduló putreszcin szintézisért felelős ODC gén expressziójában csak jelentéktelen változásokat tudunk kimutatni a 24 órás periódus alatt. Ez az eredmény jó összhangban van egyrészt azzal a korábbi megfigyelésünkkel, mely szerint SMM hatására a putreszcin szint jelentősen emelkedik, valamint azzal az agmatin- és putreszcinszint hideghatásra bekövetkező változásaira vonatkozó, ugyancsak korábbi eredményünkkel, mely szerint stresszhatásra főleg az argininből kiinduló putreszcin bioszintézis út aktiválódik és játszódik le. A spermidin-szintáz gén expressziója viszonylag magas szintről indulva a harmadik-negyedik óráig kismértékű emelkedést mutatott mindhárom kezelés esetében, majd a 24. órára csökkent.

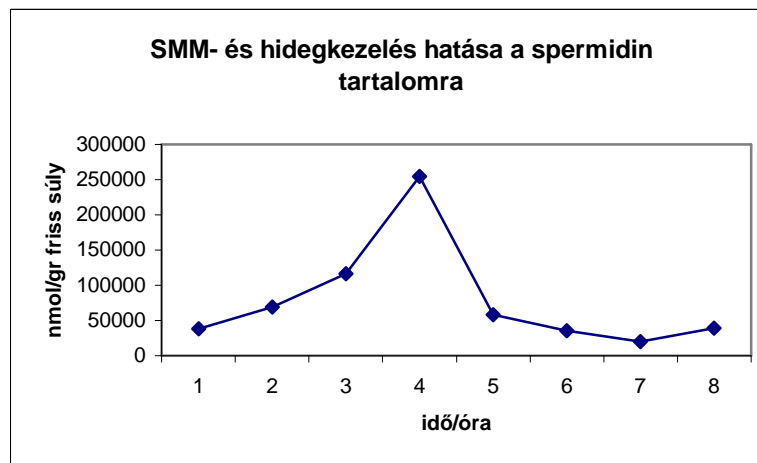


1: kontroll, 2: 1 óra, 3: 2 óra, 4: 3 óra, 5: 4 óra, 6: 6 óra, 7: 10 óra, 8: 24óra

1. ábra: Kukorica arginin-dekarboxiláz génexpresszió változása hidegkezelés, SMM-kezelés, valamint SMM+hidegkezelés hatására a szemikvantitatív RT-PCR gélelektroforetogramjainak aktinhez viszonyított relatív denzitásai alapján (értékelés Foretrix programmal).

A SAMDC expressziója viszonylag magas volt mindhárom kezelés alatt a kezelések kezdetétől fogva, tehát már a kontroll növényekben is. Expressziójában nem volt megfigyelhető ennyire tendenciózus emelkedés, ill. csökkenés sem az SMM, sem a hideg, sem pedig a kombinált kezelések hatására. Az, hogy a SAMDC expressziója nem korrelál nagyon szorosan az említett stressztényezők hatásával, feltehetően azzal magyarázható, hogy sem a szubsztrátja, sem pedig a terméke nem csak a poliamin-bioszintézisút intermedierje, így expressziója feltehetően még a poliamin bioszintézisben szerepet játszó egyéb enzimekhez képest is sokoldalúan szabályozott. Ez az eredmény jó összhangban van azzal a korábbi megfigyelésünkkel is, miszerint a spermidin mennyisége megnő ugyan az SMM hatására, de ezt az emelkedést a SAMDC-gátló MGBG nem befolyásolja, tehát a spermidin szintézisének más, a SAMDC működésétől független útvai is lehetnek, melyeket nemcsak a génextpresszió szintjén, hanem közvetlenül is befolyásolhat az SMM.

Az egyes poliaminok szintjében a különböző kezelések hatására bekövetkező változások jól tükrözik a szintézisükért felelős enzimek expresszióváltozásait. A putreszcin tartalom 6-szoros, a spermidin tartalom 5-szörös, a spermin tartalom mintegy 2-szeres emelkedést mutat az első néhány órában, melyet csökkenés követ.



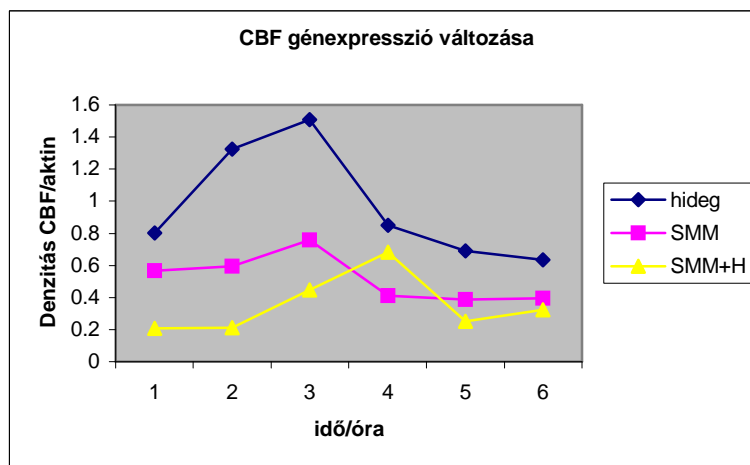
1: kontroll, 2: 1 óra, 3: 2 óra, 4: 3 óra, 5: 4 óra, 6: 6 óra, 7: 10 óra, 8: 24óra

2. ábra: Az SMM és hidegkezelés hatása a spermidintartalomra.

Az SMM hatására bekövetkező sokoldalú fiziológiai, és anyagcsereváltozások felvetették annak lehetőségét is, hogy az SMM valamilyen központi szabályozó faktoron keresztül fejti ki hatását, mely számos más gén expresszióját befolyásolja. Ilyen szabályozó fehérjefaktorok a stresszindukálta válaszreakciók ABA-független útjának szabályozó elemei, a CBF/DREB faktorok, melyek többféle stressz (hideg, szárazság, és sóstressz) hatására szintetizálódnak, és amelyek elősegítik azoknak a géneknek a stresszfüggő expresszió-növekedését, melyeknek enhancer régiójában az ún. C-repeat (CCGAC) szabályozó elem található. A hidegstresszre különbözőképpen reagáló növények mindegyikében megtalálható a CBF, az akklimatizációra képes és a nem akklimatizálódó növényekben egyaránt. A nem fagypon alatti hideghatást követően 15 percen belül megnő a növényekben a CBF expressziója, melyet 2-3 órán belül követ a CBF közvetítésével a hidegre együtt szabályozott C-repeat tartalmú gének indukciója. A hatás következtében megnő a hideggel szembeni ellenállóképesség mindkét növénytípusban, ez azonban csak az alkalmazkodni képes növényekben marad fenn hosszabb ideig, nem pontosan tisztázott okok miatt (pl. a szabályozott gének száma és típusa, tartósan magasabb CBF szint). A CBF-et konstitutívan expresszáló növények hidegindukció nélkül is

hidegtoleránsak, bár a konstitutív expresszióknak nemkívánatos pleiotrop hatásai vannak (csökkent növekedési képesség). Ezért a stressztűrő képesség fokozásában jelentősek lehetnek olyan kezelések, melyek időlegesen alkalmazva is hasonló stresszvédő hatást képesek kifejteni.

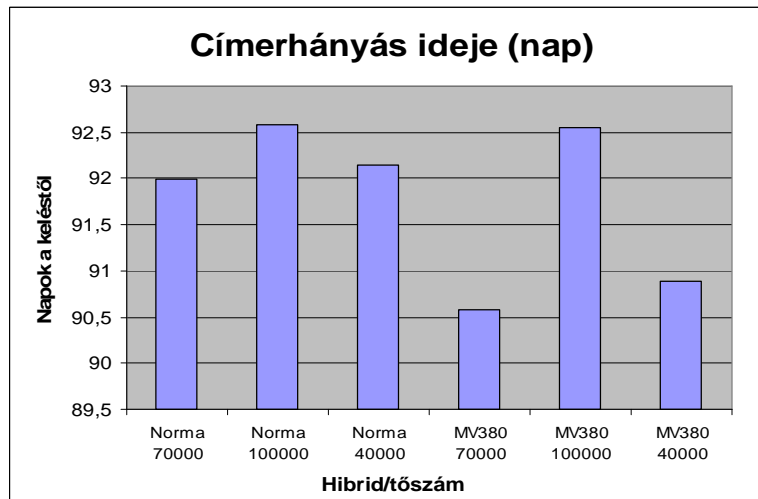
Az SMM-nek, valamint a hideg- és az együttes kezelésnek a CBF-expressziójára gyakorolt hatását a hidegérzékeny kukoricán vizsgálva megállapítottuk, hogy mind a hideg, mind pedig az SMM hatására viszonylag gyorsan, már az első órában mérsékelten megemelkedik a CBF expressziója, mely a második órától kezdve csökken. Az SMM-nal előkezelte növényen a hideghatásra (SMM+hideg) már nem mutathatók ki szignifikáns expresszióváltozások, feltehetően annak köszönhetően, hogy az egyébként a hosszabb távú hideghatást nem toleráló hidegérzékeny növényben már az SMM előkezelés hatására lejátszódtak azok a gyors változások, amelyek a rövid hideghatás kivédésében segítenek, azonban nem vezetnek az akklimatizáció kialakulásához (3. ábra).



3. ábra. A CBF faktor génexpresszióváltozása hidegkezelés, SMM- és SMM+hidegkezelés hatására a szemikvantitatív RT-PCR gélelektroforetogramjainak aktinhez viszonyított relatív denzitásai alapján (értékelés Foretrix programmal). A számok időtartama megegyezik a 2. ábránál leírtakkal.

7. Virágzásdinamikai vizsgálatok

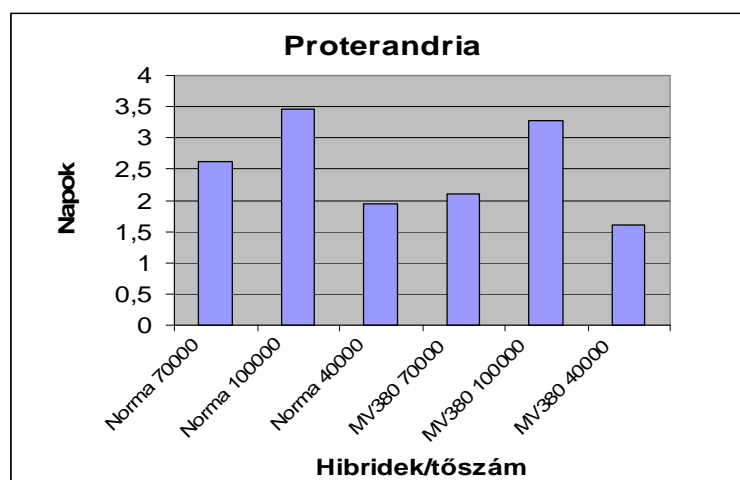
A vizsgálatokat három évben végeztük a Pannon Egyetem Georgikon Karán Keszthelyen, amelyekből a 2002-es eredmények kerülnek itt bemutatásra. A vizsgálatokhoz két hibridet használtunk (Norma, MV-380). Minden egyes kísérleti növényt megjelöltünk (kb. 2500 db-ot) egyszer a címerhányáskor, másodszor pedig a bibék megjelenésének napján. A jelölések alapján kiszámítottuk a keléstől eltelt napokat (1. ábra), majd a virágzás eltolódását a két virágzat között. Kifejeztük továbbá az egyes kezelések blokkjain belül az első és utolsó virágzatok megjelenése közötti időt is, amely a virágzás elhúzódásának mértékét mutatja meg hibridenként és a tőszám függvényében. A statisztikai próbák markáns szignifikáns különbségeket jeleztek a hibridek és a sűrítési kezelések között is.



1. ábra: A virágzás kezdete a különböző kezelésekben.

Az ábrán látható, hogy a virágzás kezdetében nincs nagy eltérés a két hibrid között, az azonban feltűnő, hogy az MV-380 érzékenyebben reagál a tőszám változásaira.

A proterandria megállapítása a vizsgálat legfontosabb célkitűzése volt. Nagyszámú minta kellett ahhoz, hogy a különbségek megbízhatóan kirajzolódjanak. A **2. ábra** mutatja, hogy a két hibrid közötti különbség szinte csak órákban mérhető, és minden esetben a Norma hibridnél telt el hosszabb idő a két virágzat megjelenése között. A kontrollként is felfogható normál 70000-es tőszámnál a hibridek 2,6 illetve 2,1 nap eltérést mutattak. A tőszám a két hibridnél azonos tendenciák mellett jelentősen befolyásolta a vizsgált időtényezőt. A sűrű állományban 3,5 illetve 3,3 nap volt a különbség, míg a ritka állományban ehhez képest jelentősen rövidebb időket, 2,0 illetve 1,6 napot állapítottunk meg. A kísérletből egyértelműen levonható a következtetés, hogy a tőszám erősen hat a virágzatok közötti időperiódus hosszára. A sűrítés növeli, a ritkítás pedig megrövidíti a címerhányás és a bibék megjelenése közti időt. Az is bizonyítást nyert, hogy a hibridek hasonlóan reagálnak, de a reakcióik között így is szignifikáns különbségeket találunk.

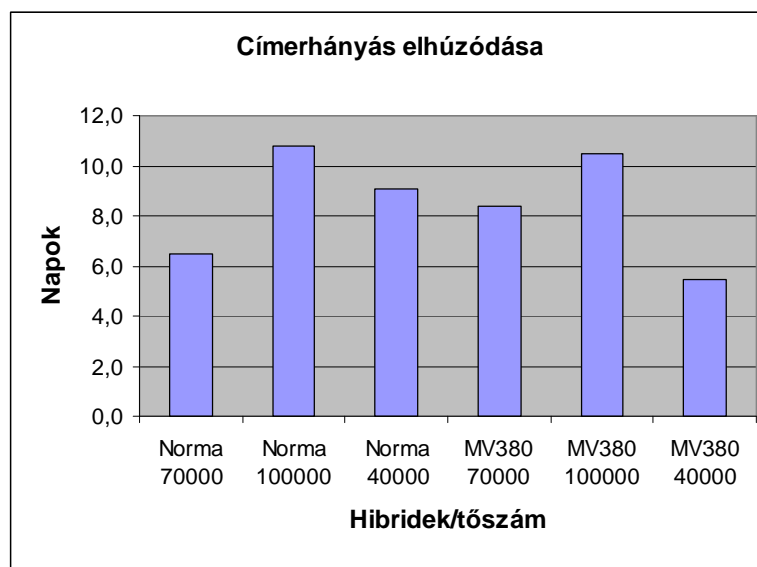


2. ábra: A proterandria mértéke a szántóföldi kezelésekben.

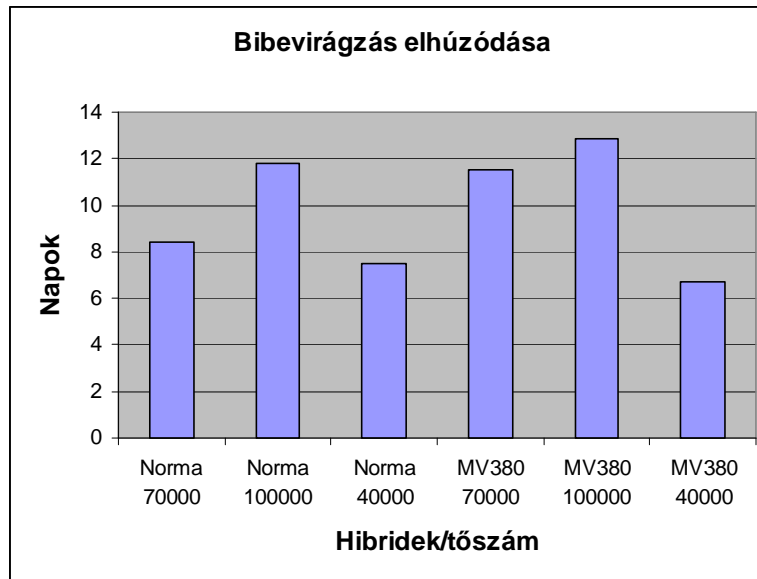
A részletes felvételnek köszönhetően módunk volt a virágzás elhúzódásának vizsgálatára is. A **3. ábrán** azt mutatjuk be, hogy milyen maximális eltéréssel jelent meg a címer a növényeinken, vagyis mennyire húzódott el a pollenszórás az egyes kezelésekből. Az értékek szóródásához nagyban hozzájárult, hogy a rendellenesen fejlődő növények is szerepelnek az adataink átlagaiban.

A hibridek között és a sűrítési kezeléseket között is jelentős különbségeket találtunk. A Norma hibrid a normál tőszám mellett 6,2 nap maximális különbséget jelzett, az MV-380 ugyanebben a kezelésben 8,2 napot. A sűrű állományokban kiegyenlített az eredmény, nagyon elhúzódó címerhányást tapasztaltunk mindkét hibridnél. Itt 10,4 illetve 10,3 napot állapítottunk meg. A ritka állományokban ismét jelentős különbségek alakultak ki. A Norma címerhányása 8,5 nap különbséget jelzett, az MV-380 pedig csak 5,8 napot. Megállapíthatjuk, hogy a sűrű tőszám egy hosszán elhúzódó címerhányást eredményez, de a Norma hibrid a ritka állományra is elhúzódó virágzással reagált.

A nővirágzat megjelenését a szélsőséges tőszámok még jelentősebben befolyásolták (**4. ábra**). Az optimális tőszám mellett a Norma hibridnél 8,2 nap, az MV-380-nál pedig 10,8 nap átlagos különbséget állapítottunk meg. Ez mintegy két nappal haladja meg a címervirágzás idejét. A sűrű állományokban, hasonlóan a címerhányáshoz ismét kiegyenlítődtek a hibrid különbségek. A Normánál 10,4 napot, az MV-380-nál pedig 10,2 napot mutatnak a nagyatlagok. A ritka tőszám a Norma hibridre hatott erőteljesebben, mert ez volt az egyetlen kezelés, ahol hosszabb ideig tartott a virágzása, mint az MV-380 hibridnek. A két hibrid ebben az összehasonlításban hasonló tendenciákat mutatott, és összességében az MV-380 hibrid bibe- virágzása volt a vontatottabb.



3. ábra: A tőszám hatása a címerhányás elhúzódására.



4. ábra: A tőszám hatása a bibevirágzás elhúzódására.

8. A kukorica hibridek sugárzásvisszaverő képességének komponensei különböző tőszámsűrűség mellett

Az energia és hőegyensúly komponenseinek tanulmányozását végeztük el két kukorica hibrid esetében 3 eltérő tőszámsűrűség (40000, 70000 és 100000 növény/ha) mellett. Az egyik hibrid szárazságtűrő (Norma, FAO 370), míg a másik viszont vízigényes (Mv NK 424 SC, FAO 480) volt. A kísérleteket szabadföldi körülmények között és Thornthwaite típusú evapotranspirométerekben végeztük Keszthelyen. Megállapítottuk, hogy a tőszámban bekövetkező növekedés nemcsak a levélfelület nagyságát, hanem a különböző növénymagasságokban a levelek megoszlását is befolyásolja. Az extinkciós koefficiens, mely a sugárzásbehatolás mennyiségi értékelését teszi lehetővé, magasabb volt az öntözött kísérletekben. Ezzel ellentétben a kisebb tőszámsűrűségnél a lombzat nyitott maradt a vegetációs periódusban, másképpen viselkedett a zárt állományhoz képest, ami az összehasonlíthatóságot lehetővé tette. Alacsonyabb tőszámnál, valamint a vízigényes hibridnél kisebb sugárzásvisszaverő képességet mértek. A talaj-növény rendszerben a legtöbb energia a ritka vetésű hibrideknél állt rendelkezésre. A talaj felszínére érkező sugárzást döntően az állomány zöldfelület alakulása határozta meg. Az állományban maradó energiát a talajfelszín és az állomány tetejéről visszavert energia összegével csökkentett globálsugárzás adja. Ennek értéke kisebb tőszámnál a kisebb, a sűrűbb tőszámnál a nagyobb. Az állományban maradó energia szolgál forrásul a párolgásnak, s a szenzibilis, vagy érzékelhető hőnek. Minél alacsonyabb volt az állomány összes energiája, annál nagyobb arányú lett abból a párolgási látens hő.

Kiegészítés

A pályázat keretében elért eredményekből az alábbi kéziratokat küldtük el bírálatra a felsorolt szerkesztőségekbe:

- Kósa, E., Rácz, I., Horváth, E., Lásztity, D., Páldi, E.: Effect of S-methylmethionine on spermidine synthesis and on electrolyte leakage in inbred maize lines at chilling temperature. (submitted to Maydica)

- Szegő, D. Rácz, I., Kósa, E., Páldi, E., Lásztity, D.: Expression of S-methylmethionine-induced genes in maize. (submitted to Journal of Plant Physiology)
- Anda, A., Lőke, Zs.: A sugárzás- és hőháztartási mérleg komponenseinek alakulása eltérő sűrűségű kukorica hibrideknél. (elküldve a Növénytermelés szerkesztőségébe)