

## Zárójelentés OTKA K 72542 2012

A pályázat célja a korábban *in vitro* mikrspóra szelekcióval előállított oxidatív stressztoleráns kukorica DH vonalak utódainak stresszfiziológiai és biokémiai jellemzése volt, annak érdekében, hogy megállapítsuk a szelektált vonalak rendelkeznek-e fokozott hideg és szárazságtűréssel, ill. feltárjuk, hogy van-e összefüggés a növények fokozott oxidatív stressztoleranciája háttérében álló megnövekedett antioxidáns kapacitásuk, valamint a hideg és szárazságtűrésük között.

Vizsgálatainkat 14 db *in vitro* mikrspóra szelekcióval előállított oxidatív stressztoleráns kukorica DH vonal utódain végeztük. Ezek a növények különböző reaktív oxigén gyököket képző vegyületekkel (paraquat (Pq), tert-butylhydroperoxide, B vagy BHP), szemben mutatnak toleranciát. Összehasonlításként a szelekcióhoz használt hibrid kukorica vonalat, valamint a szelekciós hatásnak ki nem tett DH növények utódait használtuk.

A pályázat célkitűzésének és a munkatervben megfogalmazottaknak megfelelően az első két évben teszteltük a korábban *in vitro* mikrspóra szelekcióval előállított oxidatív stressztoleráns kukorica DH vonalak szuboptimális hőmérsékleti kezelésre adott válaszreakcióit annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgált vonalak közül melyek rendelkeznek fokozottabb hidegtűréssel is. Megvizsgáltuk, hogy a mért paraméterek összefüggésbe hozhatók-e a növények antioxidáns kapacitásával, ill. az antioxidáns enzimek hidegindukált válaszreakcióival.

Mivel hazánkban a hidegstressz a kukoricát elsősorban a vetés ill. a kelést követő korai időszakban éri, vizsgálatainkban elsődlegesen a csírázaskori ill. fiatalkori hidegstressz hatásokra összpontosítottunk.

A kukorica szubtrópusi eredetű és igen érzékeny a hidegre. 15 °C alatt fejlődése erősen lelassul és fiziológiai szempontból károsodhat. Hideg hatására jelentős mértékben csökken a csírázó magvak száma, megnyúlik a csírázáshoz szükséges idő, lassul a kibújó gyököcskék és rügyecskék növekedése. Fiatal növénykorban ért hidegstressz hatására a növény fotoszintetikus aktivitása jelentős mértékben csökken, ami megmutatkozik úgy a CO<sub>2</sub> asszimiláció csökkenésében, mind a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokat lelassulásában. Tartós hidegben a fotoszintetikus folyamatok olyan mértékű károsodása is megfigyelhető, mely már megnyilvánul a kloroplastisz szerkezeti átalakulásában, a pigment-tartalom jelentős mértékű csökkenésében. Így a fotoszintetikus folyamatok ill. pigmentek vizsgálatával jól jellemezhetők az egyes szelektált vonalak fiatalkori hidegtűrése.

Mindezek alapján a csírázaskor alkalmazott stressz esetén a szemterméseket Petri-csészében csíráztattuk és meghatároztuk a csírázás mértékét (csírázási %-ban kifejezve), a csírázáshoz szükséges napok számát, valamint a csíranövények gyökernövekedési rátáját (mm/nap). Fiatal növény korban (4-5 hetes növények, 4-6 leveles állapot) alkalmazott 24 órás ill. 1 hetes hidegkezelés (8°C) során mértük a növények fotoszintetikus aktivitásának csökkenését a CO<sub>2</sub> fixálás és fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok (klorofill *a* fluoreszcencia indukció és quenching analízis) detektálásán keresztül. Az 1 hetes kezelés végén mértük a fotoszintetikus folyamatok lelassulása ill. csökkenése eredményeképpen bekövetkező károsodás mértékét a növények klorofill (*a+b*) tartalmának változásán keresztül, valamint a hideg okozta növekedés lelassulásának mértékét.

Eredmények:

Normál (22°C) és alacsony (8°C) hőmérséklet hatása a növények csírázóképeségére:

Szobahőmérsékleten (22°C) csíráztatott magok közül a növények kb. fele (a hibrid és még 7 szelektált vonal) utódai jó csírázóképeséggel rendelkeznek, amit a magas csírázási % (80-95%) és a gyors (3.5-4.5 napos) csírázási idő is jelez. Ugyanakkor a többi utódvonal csírázási képessége alacsonynak mondható (35-55%-s csírázás %). Ennek megfelelően a csírázási index (CSI= Csírázási %/csírázáshoz szükséges napok száma) 3-30 között változott. Az alacsony hőmérséklet (8 °C) 3-4 –szeresére növelte a csírázáshoz szükséges időt és a legtöbb vonal esetében jelentősen (40-70%-al) csökkentette a magok csírázási %-t is. Ez a csírázási index drasztikus csökkenését (0.6-7) eredményezte. Kísérleteink szerint hibrid növény nagyfokú hidegérzékenységet mutat. Ugyanakkor 7 szelektált vonal esetében a csírázási % csupán 10-20%-s csökkenése volt tapasztalható hidegkezelés hatására, noha a csírázáshoz szükséges idő ezen vonalak esetében is megnőtt. A csírázási % ill. csírázási index alapján a hideg hatására bekövetkező változások ( $CS\%T8^{\circ}C / CS\% T22^{\circ}C$  ill.  $CSI\%T8^{\circ}C / CSI\% T22^{\circ}C$ ) szerint a 14 oxidatív stressztoleráns vonal közül 7 (3 paraquat, 2 t-BHP és 2 riboflavin+metionint tartalmazó táptalajról származó növény utódai) hideggel szemben is toleránsabbnak mutatkozott. A 4 napos korban alacsony hőmérsékletnek kitett csíranövények gyökérnövekedési rátája is megerősítette ezeket az eredményeket.

1. táblázat: Hideg hatása a csírázásra különböző oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalakon, valamint a kontroll DH (K) ill. a szelekcióhoz használt hibrid (A-18) kukorica növényekben. Csírázási % és az eltelt napok száma szoba (T22°C) és alacsony (T8°C) hőmérsékleten. Az egyes vonalak csírázási ((CSI), valamint hidegtűrési indexe (CTI).

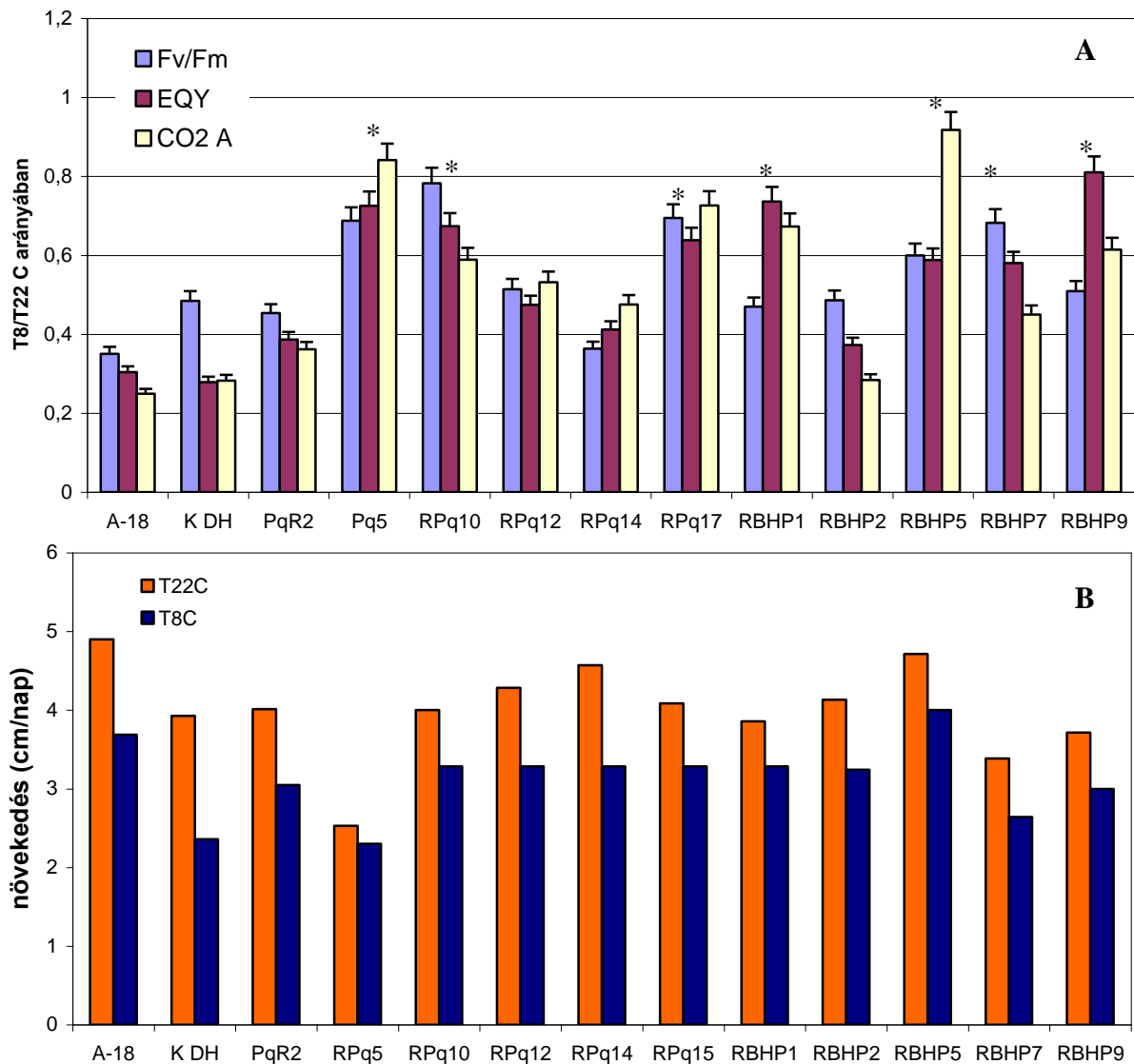
|       | T22 |     |      | T8  |     |     | CTI         |             |
|-------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-------------|-------------|
|       | CS% | Nap | CSI  | CS% | Nap | Csl | CS%         | CSI         |
| A18   | 98  | 3,5 | 28,0 | 50  | 14  | 3,6 | 0,51        | 0,13        |
| K     | 50  | 6   | 8,3  | 15  | 15  | 1,0 | 0,30        | 0,12        |
| PqR2  | 60  | 5   | 12,0 | 30  | 16  | 1,9 | 0,50        | 0,16        |
| PqR5  | 90  | 4   | 22,5 | 85  | 13  | 6,5 | <b>0,94</b> | <b>0,29</b> |
| PqR10 | 75  | 4   | 18,8 | 60  | 14  | 4,3 | <b>0,80</b> | <b>0,23</b> |
| PqR12 | 38  | 6   | 6,3  | 10  | 17  | 0,6 | 0,26        | 0,09        |
| PqR14 | 95  | 4   | 23,8 | 90  | 13  | 6,9 | <b>0,95</b> | <b>0,29</b> |
| PqR17 | 50  | 5   | 10,0 | 20  | 18  | 1,1 | 0,40        | 0,11        |
| B1    | 89  | 3   | 29,7 | 80  | 13  | 6,2 | <b>0,90</b> | <b>0,21</b> |
| B5    | 75  | 4   | 18,8 | 80  | 13  | 6,2 | <b>1,07</b> | <b>0,33</b> |
| B7    | 60  | 3,5 | 17,1 | 20  | 15  | 1,3 | 0,33        | 0,08        |
| B9    | 35  | 4,5 | 7,8  | 15  | 15  | 1,0 | 0,43        | 0,13        |
| R5    | 80  | 4   | 20,0 | 50  | 13  | 3,8 | <b>0,63</b> | <b>0,19</b> |
| R8    | 55  | 3,5 | 15,7 | 25  | 15  | 1,7 | 0,45        | 0,11        |
| R9    | 90  | 3   | 30,0 | 90  | 13  | 6,9 | <b>1,00</b> | <b>0,23</b> |

Fiatal növény korban alkalmazott hidegstressz hatása a fotoszintetikus folyamatok és a növekedés alakulására

A fiatal növény korban alkalmazott hideg hatására bekövetkező fotoszintetikus folyamatok lelassulásán és a pigment-tartalom változásán keresztül vizsgáltuk a növények hidegtűrését. A fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok lelassulását és károsodását jelző fluoreszcencia indukciós paraméterek (EQY, Fv/Fm), valamint a CO<sub>2</sub> asszimiláció (A) csökkenés mértéke alapján a hidegre legérzékenyebbnak a hibrid növény mutatkozott. A hidegkezelés 65-75%-al csökkentette a fenti paraméterek értékeit a szobahőmérsékleten mért értékekhez képest. Ehhez képest a legtöbb oxidatív stressztoleráns növényben az alacsony hőmérséklet okozta

csökkenés mértéke kisebb volt, általában 10-40% körül mozgott. Ez alól csak 3 szelektált vonal volt kivétel, de a csökkenés mértéke ezen növények esetében sem haladta meg a 40-60%-t. Az 1 hetes hidegkezelés után mért klorofill (a+b) ill. növekedési ráta (cm/nap) csökkenés alapján 6 ill. 7 vonal mutatkozott hidegtűrőbbnek a hibrid növényhez képest.

1. ábra: Hidegindukált változások a fotoszintetikus paraméterekben (A): (a PS II optimális (Fv/Fm) és effektív (EQY) kvantumhatásfoka; A, CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta), valamint a hideg hatása a növekedésre (B) különböző oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalakon, valamint a kontroll DH (K) ill. a szelektációhoz használt hibrid (A-18) kukorica növényekben.

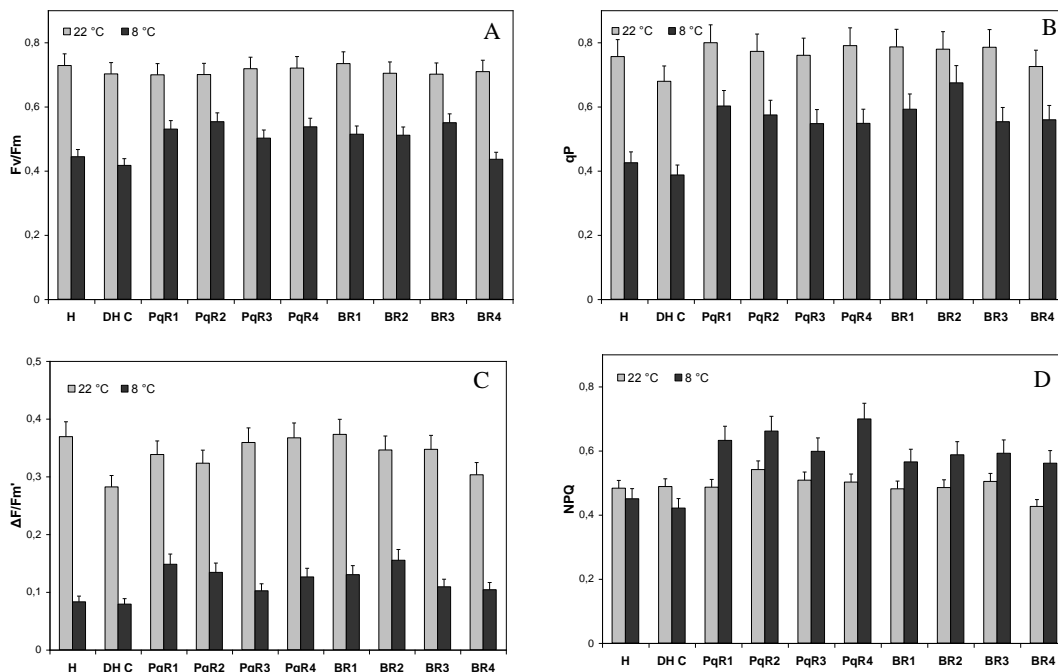


A fiatal növény korban alkalmazott hideg hatására bekövetkező fotoszintetikus folyamatok változásait egyes szelektált vonalakban részletesen megvizsgáltuk. A klorofill a fluoreszcencia indukció és quenching analízis segítségével végzett vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy szobahőmérsékleten (22°C) nem volt szignifikáns különbség az egyes genotípusok fotoszintetikus elektron transzport aktivitásában fényátlás alatti (340  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fényintenzitáción. Sem a PS II optimális és effektív kvantumhatásfokát jelző Fv/Fm ill.  $\Delta F/Fm'$  paraméterekben, sem a fényenergia fotokémiai hasznosulását jelző fotokémiai (qP), ill a hő formájában történő energia kisugárzásra utaló nem-fotokémiai (NPQ) kioltások paraméterekben nem találtunk lényeges eltéréseket az egyes genotípusok között (2. ábra).

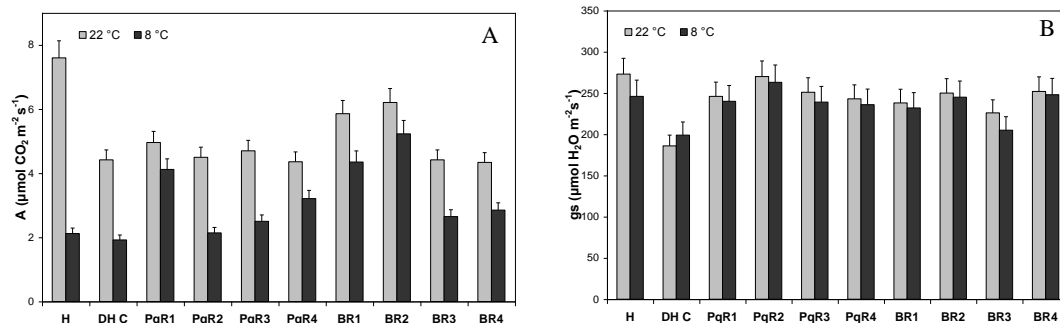
A telítési fényintenzitáson mért CO<sub>2</sub> asszimilációs képesség sem mutatott szignifikáns különbségeket az egyes homozigóta dihaploid genotípusok között, noha a kontrollként használt hibrid növények magasabb CO<sub>2</sub> asszimilációs rátát mutattak szobahőmérsékleten (3. ábra).

Alacsony hőmérsékleti kezelés hatására úgy a fluoreszcencia indukciós és quenching paraméterek (kiv. NPQ), mind a CO<sub>2</sub> fixálás mértéke jelentős mértékben csökkent minden DH genotípus és a hibrid (H) esetében is, ami a fotoszintetikus elektron transzport és a CO<sub>2</sub> asszimilációs folyamatok együttes csökkenésére utal (2. és 3. ábra). A CO<sub>2</sub> asszimiláció csökkenésében az elektrontranszport folyamatok lassulásának meghatározó szerepére utal az, szoros korreláció ( $r=0.83$ ,  $n=14$ ) mutatható ki a lineáris elektrontranszport aktivitás és a CO<sub>2</sub> asszimiláció csökkenése között, valamint, hogy kísérletünkben az alacsony hőmérsékleti stressz nem indukált sztómazáródást egyik genotípus esetében sem (3. ábra).

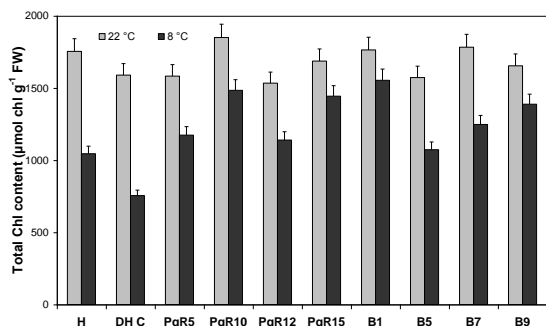
A genotípusok összehasonlítása során megállapíthattuk, hogy az  $F_v/F_m$ ,  $qP$ ,  $\Delta F/F_m'$ , valamint az asszimilációs ráta (A) csökkenése nagyobb mértékű volt a hibrid és kontroll DH vonalakban, mint az oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalak esetében (2. és 3. ábra). Ugyanakkor az alacsony hőmérséklet hatására jellemző NPQ növekedés, ami a hő formájában történő energia kisugárzás mértékének növekedésére utal, nem volt megfigyelhető a hibrid és kontroll DH kukorica növények esetében (2. ábra D). Alacsony hőmérsékleten, a fotoszintetikus elektrontranszport lassulása, valamint az alternatív hő formájában történő energia kisugárzás háttérében álló védekező mechanizmusok korlátozottsága a reaktív gyökök (pl. triplétt állapotú klorofilok) ill. reaktív oxigén formák felhalmozódását eredményezik, ami a fotoszintetikus apparátus ill. pigmentek károsodásához vezet. Kísérleteinkben az 1 hetes hidegkezelés már jelentős (40-50 %) klorofill (a+b) tartalom csökkenést idézett elő a hibrid és kontroll DH növényekben, míg az oxidatív stressztoleráns növényekben ez a csökkenés csupán 10-25% volt (4. ábra).



2. ábra. Hideg hatása (8°C) a PS II optimális,  $F_v/F_m$  (A) és effektív  $\Delta F/F_m'$  (C) kvantumhatásfokát, a fotokémiai,  $qP$  (B) és nem-fotokémiai, NPQ (D) quenching paraméterekre különböző oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalakban, valamint a kontroll (DH C) és a hibrid (H) kukorica növényben. Kontroll mérés 22°C-on történt.



3. ábra. Hideg hatása (8°C) a levelek CO<sub>2</sub> asszimilációjára (A) és a sztómazáródást jelző sztómakonduktancia, gs (B) paraméterekre különböző oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalakban, valamint a kontroll (DH C) és a hibrid (H) kukorica növényben. Kontroll mérés 22°C-on történt.

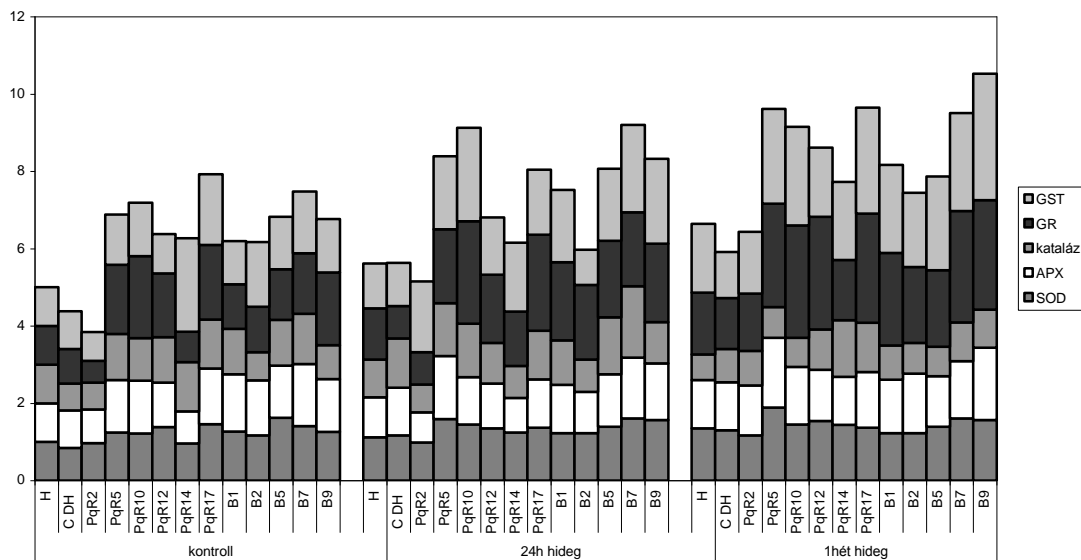


4. ábra. Klorofill tartalom változása tartós (1 hét) hidegkezelés hatására különböző oxidatív stressztoleranciával rendelkező DH vonalakban, valamint a kontroll (DH C) és a hibrid (H) kukorica növényben. Kontroll mintákat a kezelés előtt vettük.

Mivel a reaktív oxigén formák eliminálásában az antioxidáns enzimeknek központi jelentőségük van, a kutatások második évében megvizsgáltuk, hogy az hogyan változnak az antioxidáns enzimek aktivitásai az egyes vonalakban alacsony hőmérséklet hatására és, hogy ezek aktivitása összefüggésbe hozhatók-e a növények hidegtűrésével. Éppen ezért vizsgálatainkban meghatároztuk a főbb antioxidáns enzimek (szuperoxid dizmutáz (SOD), aszkorbinsav peroxidáz (APX), kataláz, glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz(GST)) aktivitásait stresszmentes (22°C) körülmények, valamint 24 órás és 1 hetes hidegkezelést követően.

Eredményeink azt mutatták, hogy stresszmentes körülmények között (T=22°C-on, 250-350  $\mu\text{mol/m}^2 \text{ s}$ , 80% RH) szobahőmérsékleten megvizsgálva a növények antioxidáns kapacitását azt tapasztaltuk, hogy számos (10 db) oxidatív stressztoleráns DH vonal antioxidáns kapacitása magasabbnak bizonyult, mint a kontrollként használt hibrid és DH növényeké. Az egyes enzimek vizsgálata során kimutattuk, hogy az antioxidáns kapacitás növekedés 1 oxidatív stressztoleráns DH vonal esetében 1 (GsT), 2 oxidatív stressztoleráns DH vonal esetében 2 (APX, SOD), 2 vonalban 3 (APX, SOD, kataláz) és 2 vonalban 4 (APX, SOD, GR, GsT) antioxidáns enzim 30-250%-al magasabb aktivitásának köszönhető. 2 oxidatív stressztoleráns DH vonalban mind az 5 vizsgált enzim aktivitása magasabb volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *in vitro* szelekció eredményeképpen egy általános antioxidáns kapacitás növekedés jött létre a szelektált DH növényekben (5. ábra).

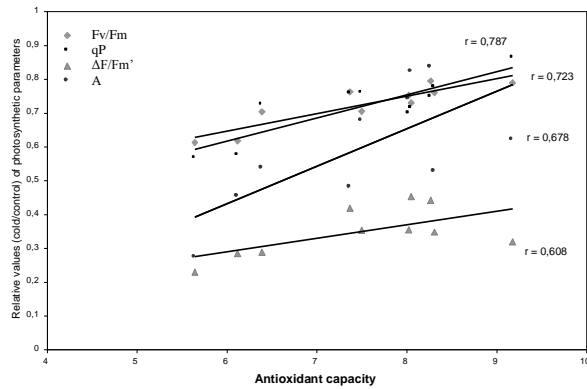
Hidegkezelés hatására ( $T=8^{\circ}\text{C}$ ) számos antioxidáns enzim aktivitása megemelkedett. Rövid idejű stresszkezelés (24h) hatására az antioxidáns kapacitás 20-40%-os növekedése volt megfigyelhető, míg tartós hideg (1hét) esetében az átlagos antioxidáns kapacitás növekedés 50-75%-os volt. Ugyanakkor jelentős különbségeket találtunk az egyes enzimek hidegindukált aktivitásváltozása között. Hideg hatására elsősorban a GR és GST enzimek aktivitása növekedett meg, alig volt hatása a SOD és APX aktivitására, a csak kismértékben növekedett, míg tartós (1 hét) hideghatás esetén a kataláz enzim aktivitásának csökkenése is megfigyelhető volt (5. ábra).



5. ábra: Az antioxidáns enzimek relatív aktivitásai kontroll ( $22^{\circ}\text{C}$ ) körülmények között és hidegkezelés követően. A relatív aktivitásokat úgy számoltuk, hogy a kontroll körülmények között mért hibrid növény aktivitásait 1-nek tekintettük, és ehhez viszonyítva határoztuk meg az egyes vonalak relatív aktivitásait, ill. a kezelések hatásait. A hibrid növényben 1 megfelelt, a 8.4, 3.37, 15.5 0.289 és 2.22  $\mu\text{M}$  szubsztrát/ g FW min aktivitásoknak a SOD, APX, kataláz, GR és GST enzimek esetében.

A genotípusok összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a kontroll körülmények között megfigyelt genotípusok közti különbségek a legtöbb (7) esetben fennmaradtak a hidegkezelés alatt is, vagyis ezek a növények stresszindukált körülmények között is magasabb antioxidáns kapacitással rendelkeznek, mint a kontroll hibrid és DH növények. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az oxidatív stressztoleráns DH növények hidegindukált körülmények között is képesek megőrizni nagyobb antioxidáns kapacitásukat, ami előnyt jelenthet a hideggel szembeni védekezésben.

Összevetve az antioxidáns enzimek vizsgálata során kapott, valamint a fiziológiai vizsgálatok eredményeit, megállapítható, hogy azon növények közül, melyek antioxidáns kapacitása meghaladja a kontroll növényekét (10 db), számos (7 db) a hideggel szemben is ellenállóbb volt. Megfigyelhető volt, hogy azon vonalak, melyek több antioxidáns enzimre nézve is magasabb aktivitással rendelkeztek, magasabb tolerancia indexet mutattak hideggel szemben is. Az antioxidáns kapacitás, valamint a mért fiziológiai paraméterek között jó ( $r=0.6-0.8$ ,  $n=14$ ) korreláció mutatható ki (6. ábra). A legszorosabb korreláció az Fv/Fm paraméter esetében volt. Mindezen eredmények alapján összefüggés mutatható ki a hidegtűrés és a megnövekedett antioxidáns kapacitás között.



6. ábra. Korreláció növények fotoszintetikus aktivitása (a mért Fv/Fm, qP,  $\Delta F/Fm'$  és CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta (A) ), valamint azok antioxidáns kapacitása között a hidegkezelés során.

Összességében vizsgálataink azt mutatják, hogy az *in vitro* szelekcióval előállított oxidatív stressztoleráns növények (14 db) közül számos (7 db) hideggel szemben is magasabb toleranciát mutatott, mely összefüggésbe hozható ezen növények megnövekedett antioxidáns kapacitásával. Mindezen vizsgálatok azt mutatják, hogy lehetséges hidegtűrő kukorica DH vonalak előállítása mikroszórak *in vitro* szelekciójával oxidatív stresszt indukáló vegyületek alkalmazásával.

A vizsgálataink további két évében arra keressük a választ, hogy az *in vitro* mikroszóra szelekcióval előállított oxidatív stressztoleráns kukorica DH vonalak milyen szárazságtűréssel rendelkeznek a kontroll növényekhez képest? Az általános adaptációs képesség fokozódása megnyilvánul-e a szárazságtűrés fokozódásában is?

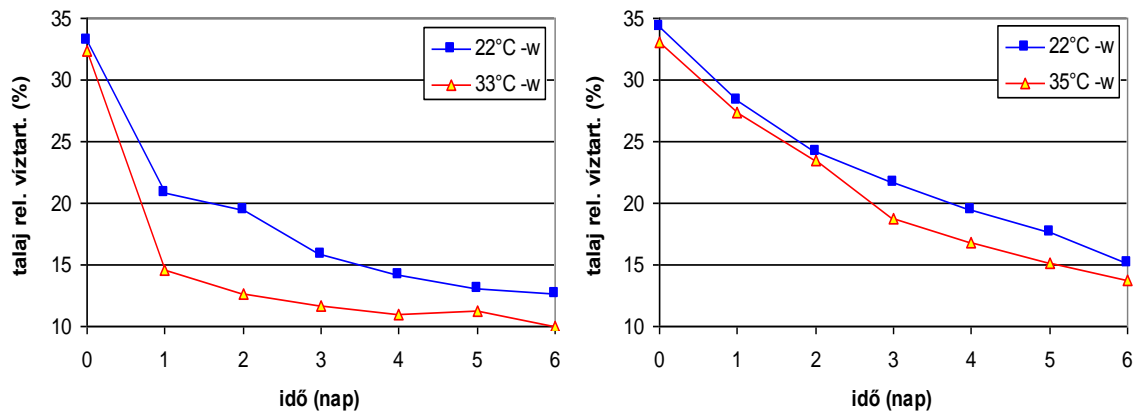
Mivel Magyarországon a szárazságstressz elsősorban a kifejlett növényeket éri, kísérleteinkben mi is a szárazság hatását a növények későbbi (virágzás előtt-termésképzés) fejlődési stádiumában vizsgáltuk. Kísérleteink egyrészt kontrollált fitotroni körülmények között végeztük, másrészt a megfelelő számú termésadat biztosítása érdekében a kevésbé kontrollálható szabadterületen elhelyezett cserepekben nőtt növényeken. A szárazságstresszt vízmegvonással idéztük elő, ami a talaj víztartalmának (v/v) 35%-ról, 10%-ra történő csökkenését eredményezte. A kísérlet végeztéig a talaj víztartalmát a továbbiakban 10 %-s értéken tartottuk, mivel ez alatt a növény elpusztult volna. A jó vízellátottságú növényeket (35%-os talajvíztartalom mellett) használtuk kontrollként. A szárazság-kezelést normál (26 °C) és magas (35 °C) hőmérsékleten is elvégeztük, mivel a szárazságot gyakran kíséri magas hőmérséklet is.

Eredmények:

Fitortonban végzett kísérletek:

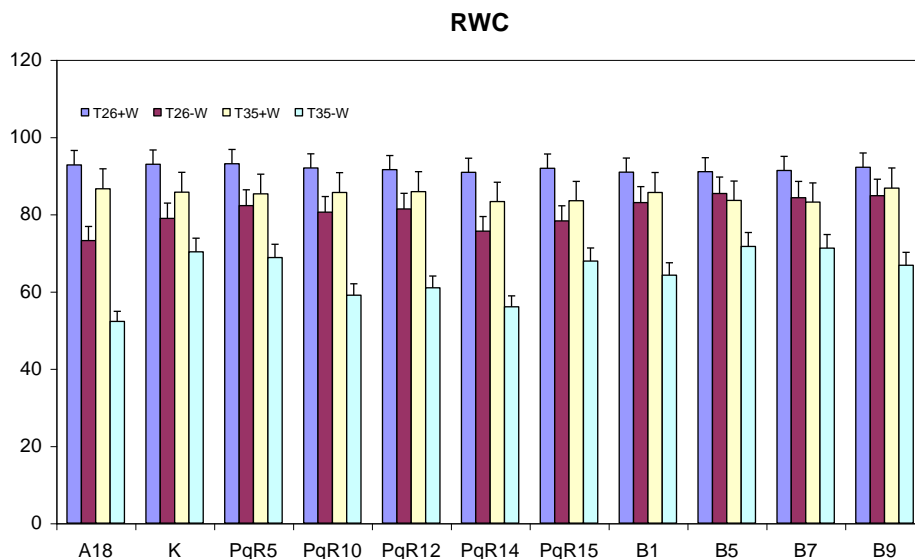
A szárazság fiziológiai hatását tekintve a legjelentősebbek, hogy szárazság stressz hatására úgy a talaj, mind a növények víztartalma jelentős mértékben csökken (RWC); csökken a szárazanyag produkció, elsődlegesen a levelek fotoszintetikus aktivitásának (CO<sub>2</sub> asszimilációjának) csökkenése következtében. Szárazság hatására megváltoznak a növények biokémiai folyamatai is, beleértve számos ozmoregulációban szerepet játszó anyag (pl. prolin) szintézisét, vagy az antioxidáns enzimek aktivitásának fokozódását.

A 10 hetes korig optimális vízellátottságon (35% talajvíztartalom) tartott növények locsolását megszüntetve nyomon követtük a talajvíztartalom csökkenését úgy normál (26 °C), mind magas (35 °C) hőmérsékleti kezelés mellett. Kísérleteinkben talajvíztartalom csökkenése mindkét hőmérsékleten kétféle tendenciát mutatott. Egyes növényeknél a talaj víztartalma gyorsan (2-3 napon belül), míg más növényeknél lassabban (3-4 nap alatt) csökkent le 10% -ra (7. ábra) . Ettől kezdve a növényeket úgy locsoltuk, hogy minden reggel a talaj víztartalma 10% legyen.



7. ábra. Talajvíztartalom változás a locsolás (rel víztart 35%) megszüntetése után.

A virágzás előtt alkalmazott szárazság hatására a levelek relatív víztartalma (RWC) 20 % ill. 36 %-al csökkent a H és a DH C növényekben normál (26 °C) ill 35 °C-n. Az oxidatív stressztoleráns vonalakban az RWC tartalom csökkenés szignifikánsan kisebb (5-9 %, ill. 13-23 %) volt mindkét kísérleti körülmény esetében, ami a szelektált növények jobb vízhasznosítási képességére utal.



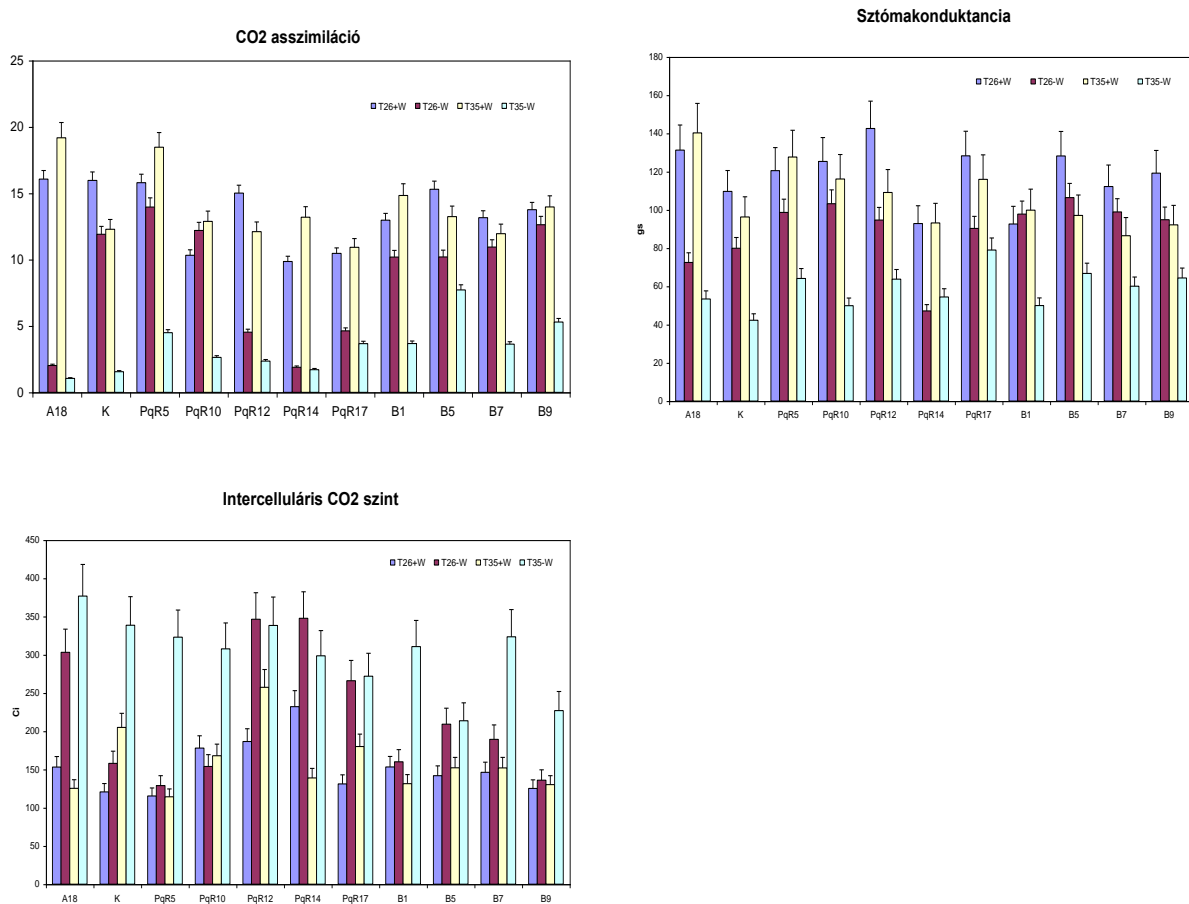
8. ábra: A növények leveleinek relatív víztartalma (RWC).

Emellett azonban fotoszintetikus aktivitásuk (CO<sub>2</sub> asszimiláció mértéke) is magasabb maradt, ami a szárazanyag termelés kisebb mértékű csökkenésére utal. Szárazság hatására a CO<sub>2</sub> asszimiláció mértéke 75 ill 90 %-al esett vissza a jó vízellátottságú növényekéhez képest a kontroll (hibrid, + DH C) növényekben, míg a szelektált vonalakban átlagosan 22 ill. 60% -s



CO<sub>2</sub> csökkenés volt megfigyelhető normál ill. magas hőmérsékleten alkalmazott szárazságstressz esetén (9. ábra). Mindez azt jelzi, hogy a szárazságstressz esetében az oxidatív stressztoleráns növények képesek víztartalmukat és CO<sub>2</sub> asszimilációs képességüket jobban megőrizni, mint a nem szelektált vonalak és a hibrid növények.

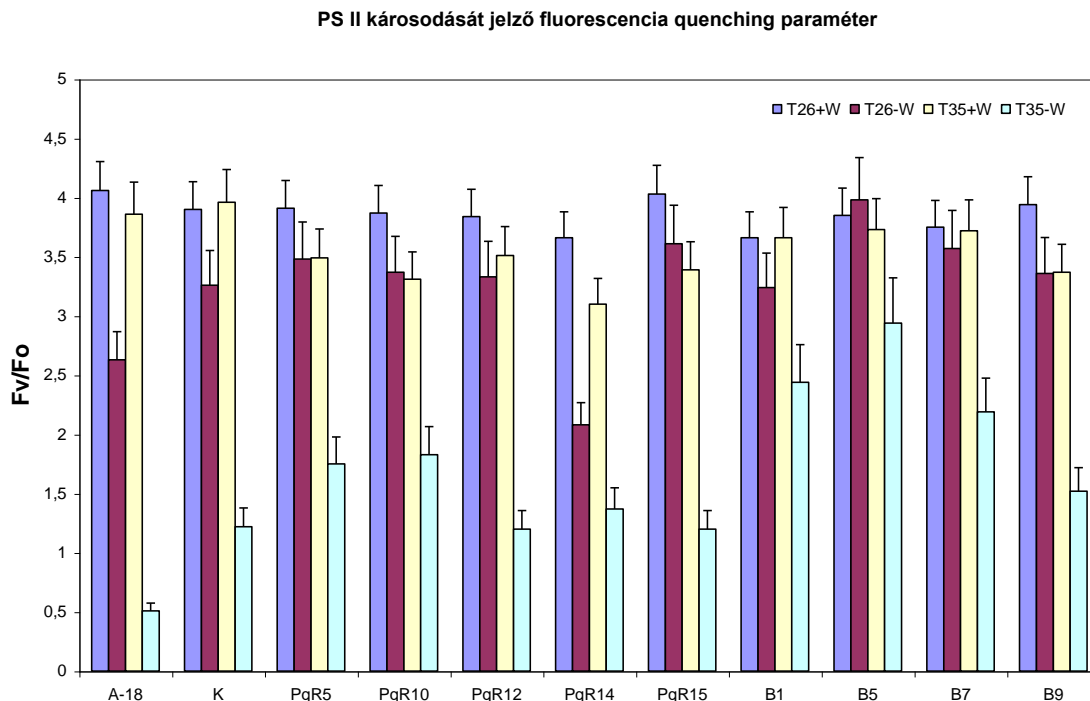
A CO<sub>2</sub> asszimiláció csökkenéssel párhuzamosan, a sztómakonduktancia (gs) is csökkent, ami a sztómák bezáródását mutatja. A sztómazáródáson kívül a szárazságstressz, különösen, ha magas hőmérsékleten történt a kezelés, az intercelluláris CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) szint megemelkedését is eredményezte, ami arra utal, hogy a CO<sub>2</sub> asszimiláció (Rubisco karboxiláz aktivitásának) csökkenésének hátterében, a sztómazáródás mellett egyéb un. metabolikus folyamatok (pl. Rubisco inaktívációja, csökkent regenerációs képessége, ATP hiány, megnövekedett fotorespiráció, stb.) is szerepet játszanak.



9. ábra: Az egyes vonalak intakt levelein mért CO<sub>2</sub> asszimiláció (A), a sztómazáródás (B) és az intercelluláris CO<sub>2</sub> szint (C) mértéke stresszmentes, ill szárazságnak kitett leveleken.

Klorofill a fluoreszcencia indukció és quenching analízis mérések alapján elmondható, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok (fény szakasz) kevésbé érzékenyek a szárazságstresszre, mint a sötét szakasz (CO<sub>2</sub> asszimiláció). Szárazságstressz hatására az Fv/Fm, qP, ΔF/Fm', NPQ fluoreszcencia paraméterek csak kisebb mértékben változtak. A legérzékenyebb paraméternek az Fv/Fo mutatkozott (10. ábra). Vizsgálataink azt mutatták, hogy úgy normál, mind magas hőmérsékleten alkalmazott szárazságstressz esetén a hibrid növény jelentősebb (35 % ill. 85%-os) Fv/Fo csökkenést mutatott, mint a szelektált növények (átlagos Fv/Fo csökkenés mértéke 14 ill. 40% volt normál ill. magas T-n). Mindez azt jelzi, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok károsodása szárazságstressz esetében az oxidatív stressztoleráns szelektált vonalakban kisebb mértékű, mint a kontroll növényekben.

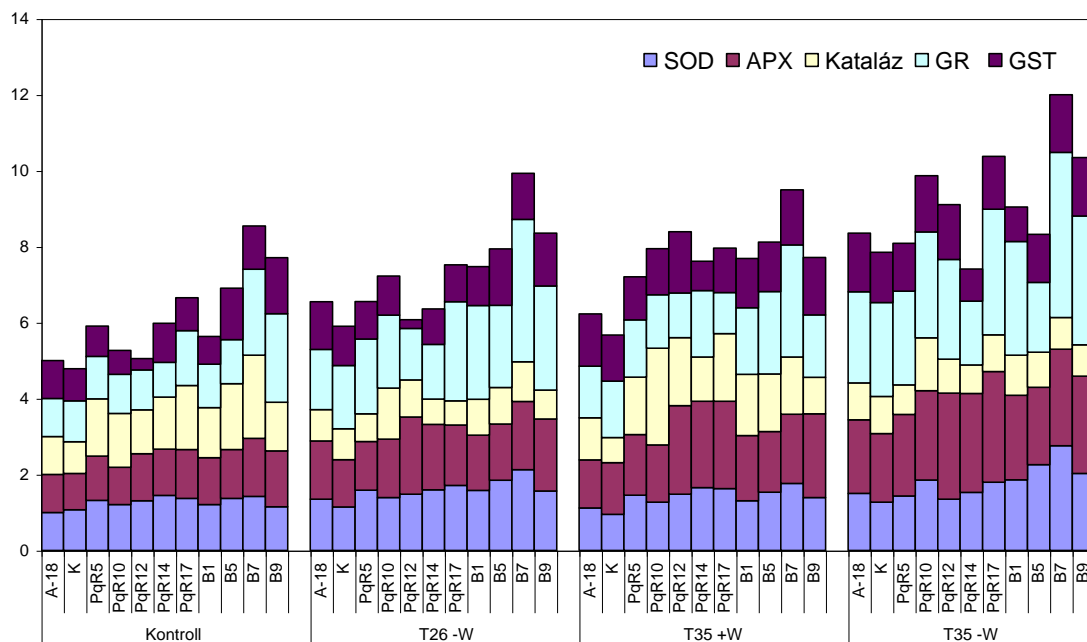
Különösen megfigyelhető ez a normál ( $T=26^{\circ}\text{C}$ ) hőmérsékletű szárazságstressz esetén, ahol az oxidatív stressztoleráns vonalakban a PS II károsodása szinte elhanyagolható (10. ábra).



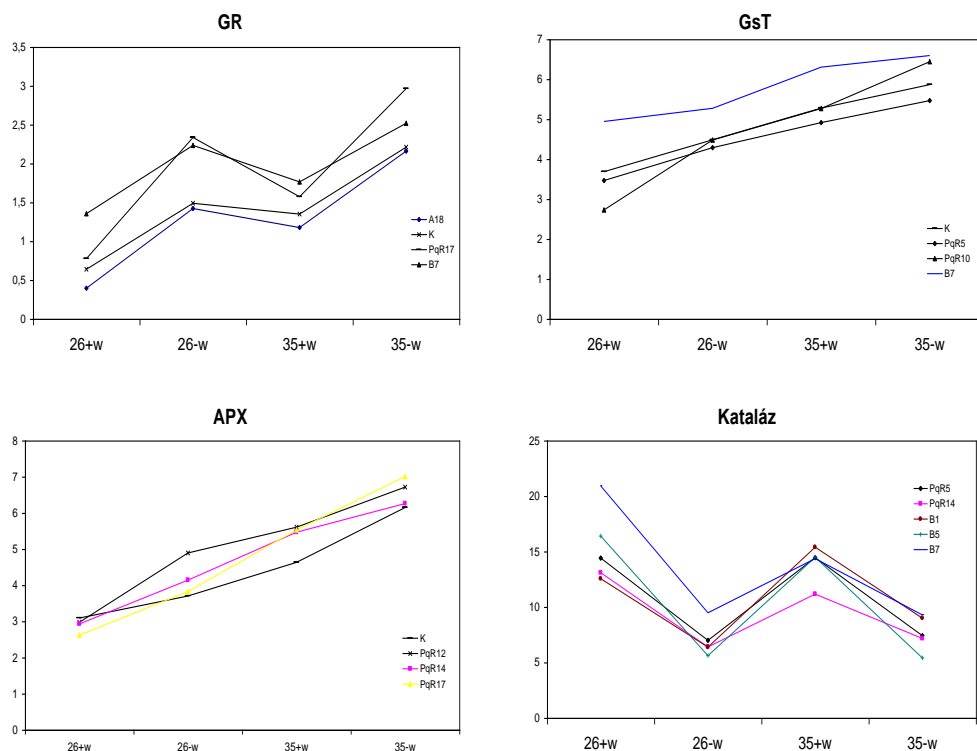
10. ábra A PS II károsodását jelző fluoreszcencia ( $F_v/F_o$ ) paraméter változása különböző hőmérsékletű szárazság-stressznek kitett növényeken.

Az antioxidáns enzimek (szuperoxid dizmutáz, SOD; aszkorbát peroxidáz, APX; glutation reduktáz, GR; glutation-S-transzferáz, GST) sztrezzindukált változását is nyomon követtük. Jelen kísérletsorozatban is megfigyelhető volt a korábbi fejlődési stádiumokban tapasztalt jelenség, miszerint az oxidatív stressztoleráns növények magasabb antioxidáns kapacitással rendelkeznek stresszmentes ( $26^{\circ}\text{C}$ , jó vízellátottság) körülmények között is, mint a kontroll (H és DH C) növények (11. ábra). Szárazság hatására ( $26^{\circ}\text{C}$ -on) leginkább a GR enzim aktivitása emelkedett meg, de az oxidatív stressztoleráns vonalakban emellett megfigyelhető volt a SOD enzim aktivitásának növekedése is. Magas hőmérsékleten alkalmazott szárazságstressz a GR, SOD és APX indukcióját eredményezte minden vonal és a hibrid növény esetében. Meg kell azonban jegyezni, hogy a szárazság, függetlenül a hőmérséklettől, nem okozott növekedést a kataláz enzim aktivitásában, sőt sok esetben aktivitáscsökkenés is megfigyelhető volt (12. ábra). Összességében számos szelektált, oxidatív stressztoleráns DH vonal (antioxidáns enzimeinek aktivitása, a növények antioxidáns kapacitása szárazságstressz körülmények között is meghaladta a kontroll vonalakét. Mindemellett azonban szoros ( $r > 0.6$ ) korrelációt nem tudtunk kimutatni a növények antioxidáns kapacitása és a szárazságtűrésük mértéke között.

### Relatív enzimaktivitások

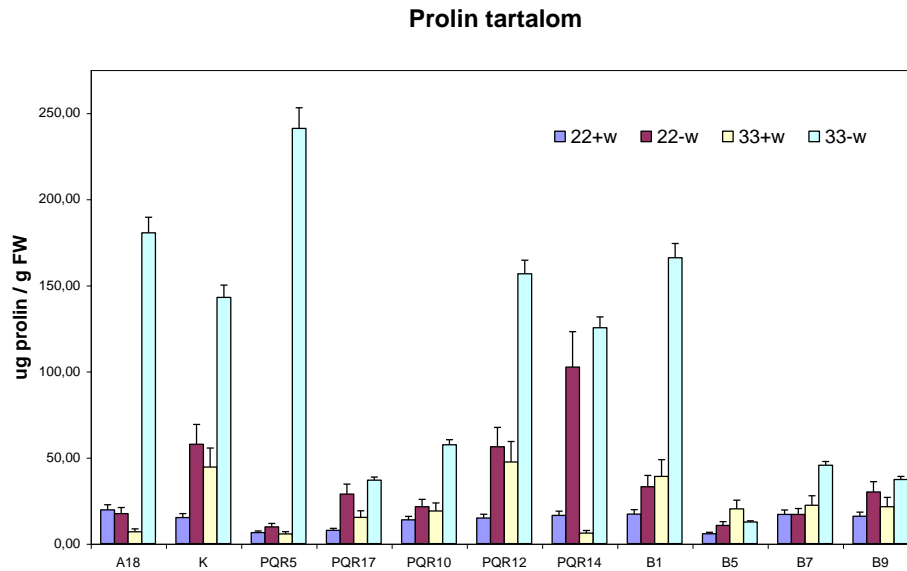


11. ábra: Az antioxidáns enzimek relatív aktivitásai normál és (26 °C) magas (35 °C) hőmérsékleten alkalmazott szárazság esetén. A relatív aktivitásokat úgy számoltuk, hogy a kontroll körülmények között mért hibrid (A-18) növény aktivitásait 1-nek tekintettük, és ehhez viszonyítva határoztuk meg az egyes vonalak relatív aktivitásait, ill. a kezelések hatásait. A hibrid növényben 1 megfelelt a 13,6, 3.46, 12.9 0.596 és 4.34  $\mu\text{M}$  szubsztrát/ g FW min aktivitásoknak a SOD, APX, kataláz, GR és GST enzimek esetében.



12. ábra. Egyes enzimek tipikus aktivitásváltozásai a különböző kezelések során.

Megvizsgáltuk a szárazságra indukálódó prolin-tartalom változását is a növényekben. Jelentős mértékű 2-4 x-s ill. 10-20x-os prolin-tartalom növekedés volt megfigyelhető normál (26°C) és magas (35°C) hőmérsékletű szárazság-kezelés esetén. Érdekes megfigyelés volt azonban, hogy a növények prolin tartalma nem mutatott korrelációt a szárazság-stressz mértékével.



13. ábra. A különböző kezeléseknél kitétt növények leveleinek prolin tartalma (az RWC mérésével azonos levélminta eredményei).

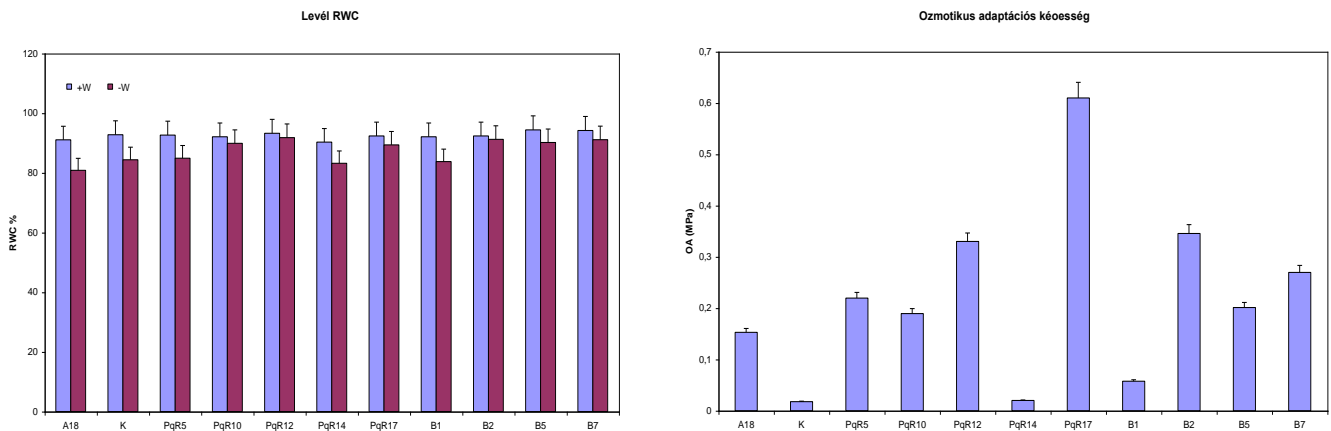
A fitotrónon végzett kísérleteink összességében azt mutatják, hogy a szárazságstressz hatására bekövetkező RWC és fotoszintetikus paraméterek változásai jól korrelálnak az oxidatív stressztolerancia mértékével, ugyanakkor a szárazságtűrés és a növények prolin ill. antioxidáns kapacitása között a korreláció már kisebb mértékű. Valószínűsíthető ez azért is, mert a szárazság igen összetett komplex fiziológiai folyamat, és több folyamat együttes hatásának eredményeképpen alakul a szárazságtűrés. Az antioxidáns enzimek szerepe ezekben csak kisebb mértékben meghatározó jelentőségű.

Szabad területen végzett kísérletek.

A szárazságnak a virágzásra és termésképzésre gyakorolt hatását fitotroni körülmények között csak limitált mintaszámban tudtuk elvégezni, ezért e vizsgálatokat főként a szabadban végzett kísérletek során végeztük. Ennek megfelelően a hőmérsékletet nem tudtuk kontrollált körülmények között tartani, csak a víztartalmat. Problémát jelentett továbbá, hogy az egyes vonalak és a hibrid virágzási ideje között 2-3 hét eltérés is volt, így a kísérlet kezdete (de nem az időtartama) az egyes vonalak esetében különbözött. Ezekben a kísérletekben a szárazságkezelést a pollenfejlődés kezdeti (meiosis korban, mikrosporogenezis) stádiumában idéztük elő. A talaj víztartalmát 12%-ra csökkentettük vízmegvonással, majd ezen az érteken tartottuk a kezelés végéig.

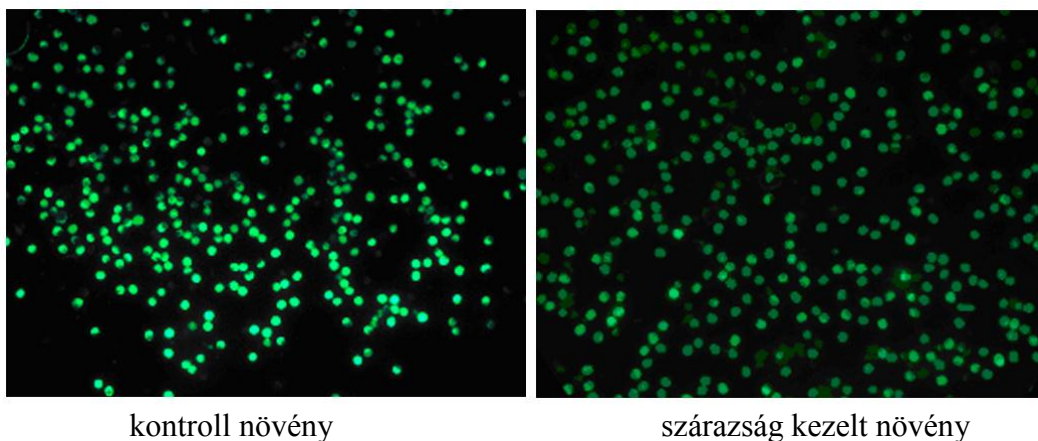
A fitotroni kísérletekhez hasonlóan a szabadföldi kísérletekben is a hibrid ill. kontroll DH növény mutatta a legnagyobb RWC csökkenést (10%) vízmegvonás hatására, bár ezek az értékek lényegesen kisebbek voltak a fitotronban mért adatokhoz képest. Ennek oka valószínűleg, hogy a reggeli harmatból a növények könnyebben tudtak vizet felvenni. Ugyanakkor a korábban jobb RWC értékeket mutató oxidatív stresstoleráns DH vonalakban

az RWC tartalom ezen kísérletben is jobb paramétereket mutatott. A levelek ozmotikus potenciáljának vizsgálata arra is fényt derített, hogy két kivétellel a szelektált növény ozmotikus adaptációs képessége meghaladta kontroll DH és a hibrid növény ozmotikus adaptációját, megerősítve ezzel a korábbi eredményeket.



14. ábra. A szabadföldi kísérlet során a levelek relatív víztartalma (A) jó vízellátottságnak (35% talaj víztartalom) és szárazságnak (12%-os talajvíztartalom) kitett növényekben. Az egyes vonalak ozmotikus adaptációs (OA) képessége (Field Crop Res. 76, 2002153).

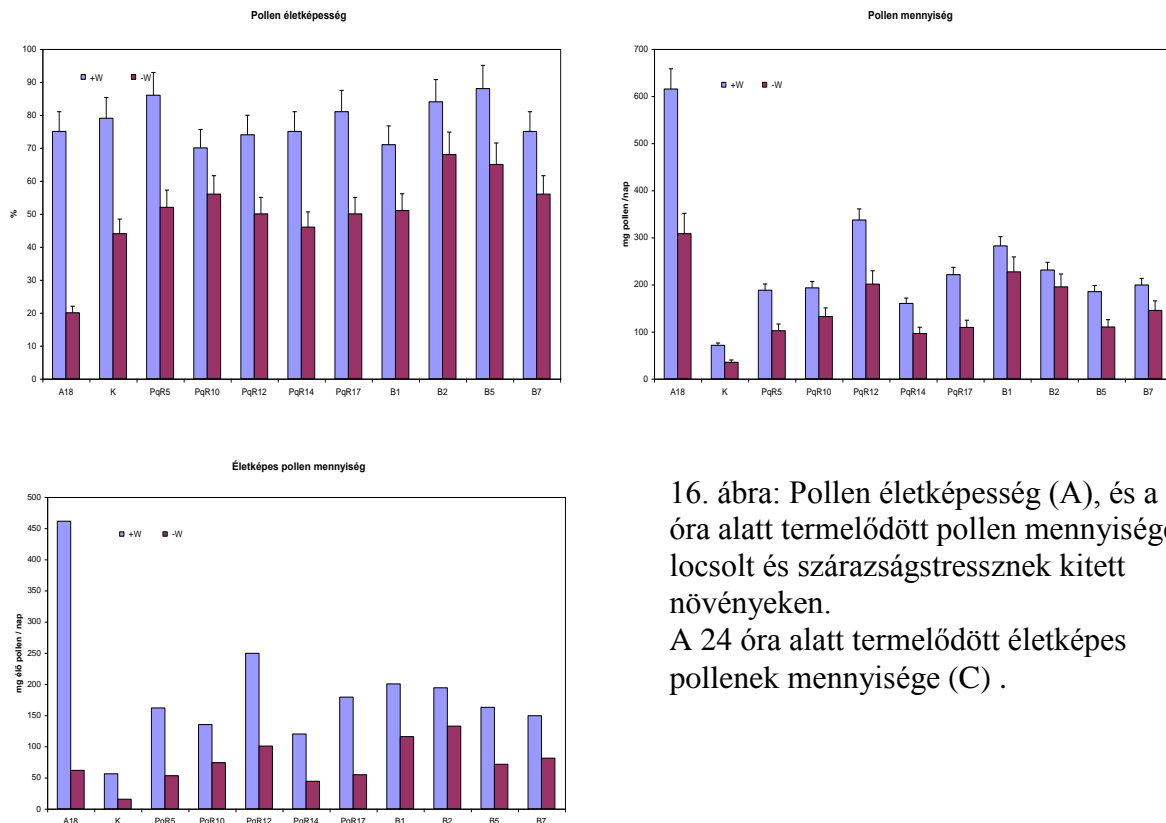
Pollenfejlődés vizsgálata során, a megtermékenyítés napján (amikor a bibe receptív állapotba került a pollen fogadására) megmértük a pollenek életképességét (FDA festés, ) (15. ábra). A porzásokat követő napon (még mindig ideális állapot a porzásra) pedig néztük a 24 óra alatt termelődött pollen mennyiségét.



15. ábra Pollen életképesség vizsgálata FDA festéssel.

Szárazságstressznek kitett növényekben úgy a pollen mennyisége, mind az életképes pollenek száma jelentős mértékben csökkent a kontroll (locsolt) növényekhez képest (16. ábra), jelezve, hogy a szárazságstressz a pollenfejlődésen keresztül is drasztikus mértékben befolyásolhatja a termés mennyiségét. Természetesen a termelt pollen mennyisége a hibrid növény esetében lényegesen meghaladta a DH növényekét, ugyanakkor az életképes pollenek mennyisége éppen a hibrid növényekben csökkent a legnagyobb mértékben a kezelés során, drasztikusan csökkentve az életképes pollenek mennyiségét (16 C). Az oxidatív stresszoleráns

DH vonalak közül számos esetben bár a pollen mennyisége kisebb volt, mint a hibridé, az életképes pollenek aránya magasabb volt.



16. ábra: Pollen életképesség (A), és a 24 óra alatt termelődött pollen mennyisége (B) locsolt és szárazságstressznek kitett növényeken.  
A 24 óra alatt termelődött életképes pollenek mennyisége (C).

A terméselemek tanulmányozása során vizsgáltuk a magkötést, a magok szemtelítődését jelző 1000 szem tömeget, valamint pár hónapos nyugalmi időszak után megnéztük a különböző kezelésekből származó magvak csírázóképeségét. Ahol lehetséges volt keresztporzásokat (ugyanazon genotípuson belül) is végeztünk: Szárazságnak kitett növényt poroztuk normál vízellátottságú növényről származó virággal (-W ♀ x +W ♂) és fordítva, jó vízellátottságú növény bibéjét poroztuk szárazságnak kitett növény pollenjével (+W ♀ x -W ♂). Ezzel a pollen és a bibe állapotának a termésképzésben betöltött szerepét kívántuk vizsgálni. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy sok esetben egyes DH növényekben a hím és nővirágzási idők annyira eltértek (>, mint 4 nap), hogy önporzást nem mindig tudtunk végezni. Megfigyelhető volt az is, hogy a sok esetben azért nem tudtunk keresztporzást végezni, mert a szárazságnak kitett növény bibéje csak jóval lassabban fejlődött (bújt ki a bibeszál), mint a locsolt növények virággal. Ezért nincs mindenhol adat a táblázatban.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a szárazságstressz hatására a magkötési % jelentős mértékben csökkent minden genotípus esetében, de drasztikusan a hibrid és kontroll DH vonalban. Keresztporzásokban (ahol kaptunk eredményt) azt tapasztaltuk, hogy a magkötési % jobban csökkent akkor, amikor a bibe növénye volt szárazságkezelés alatt, mint akkor, amikor a pollent adó növénye. Úgy tűnik, hogy szárazságstressz hatására, bár a pollen mennyisége és minősége (életképessége) is csökkent a szárazság során, marad még annyi, hogy korlátozott mértékben ugyan, de megtermékenyítse a bibét. Viszont, amikor a bibe növénye volt szárazságkezelés alatt, a magkötési % csökkenés drámai volt. Sok esetben virágzási idő eltolódások miatt nem kaptunk termést. A genotípusok összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a szárazságstressznek kitett oxidatív stressztoleráns DH növények közül 6 genotípus jobb magkötési tulajdonságokat mutatott, mint a kontroll DH és a hibrid növény.

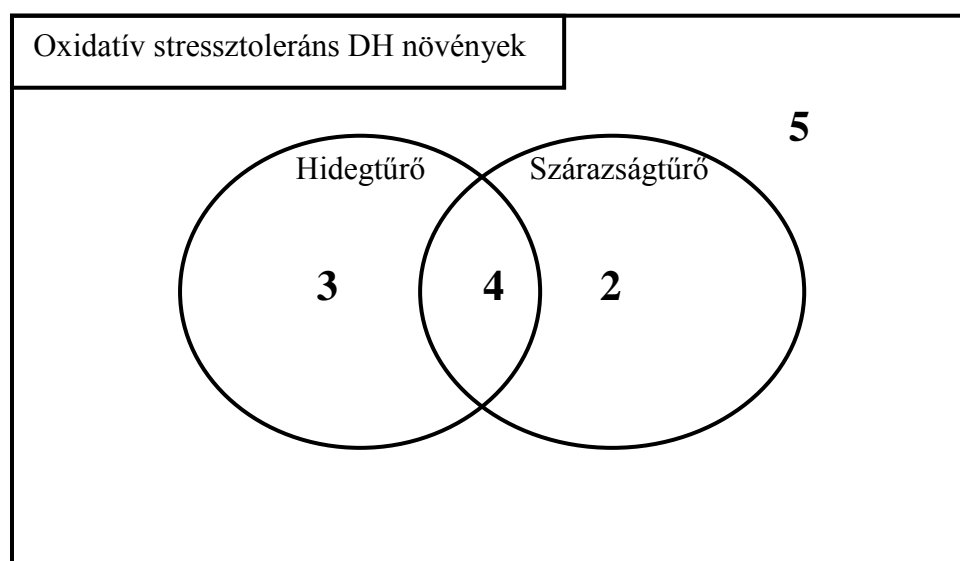
2. táblázat: Különböző genotípusok és hibrid növény magkötése stresszmentes (+W) ill. szárazságnak (-W) kitett növények megporzása után. A magkötést, az elméleti (sor x oszlopszám) és valós szemszám hányadosaként adtuk meg. A valós szemszám nem tartalmazza a csövek végén található kisebb, életképtelen szemeket.

|       | Magkötési % |           |             |             | 1000 szem tömeg |     |
|-------|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------------|-----|
|       | +W          | -W        | +W ♀ x -W ♂ | -W ♀ x +W ♂ | +W              | -W  |
| A 18  | 78          | 28        | 38          | 2           | 281             | 189 |
| K     | 38          | 12        | -           | -           | 132             | 87  |
| PqR5  | 75          | 36        | -           | -           | 176             | 104 |
| PqR10 | 85          | <b>45</b> | 64          | 27          | 188             | 132 |
| PqR12 | 80          | <b>47</b> | 42          | -           | 206             | 166 |
| PqR14 | 77          | 27        | 26          | 13          | 262             | 145 |
| PqR17 | 89          | <b>54</b> | 70          | 26          | 174             | 125 |
| B1    | 68          | <b>44</b> | 41          | 19          | 200             | 175 |
| B2    | 63          | <b>46</b> | 76          | 38          | 245             | 160 |
| B5    | 76          | <b>43</b> | -           | -           | 193             | 162 |
| R7    | 80          | 36        | -           | -           | 195             | 145 |

A bibe és a termés fejlődését meghatározó source-sink kapcsolat feltárására irányuló kísérleteink is lezajlottak, az eredmények feldolgozása későbbre várható.

### Összesítés

Összesítésként elmondható, hogy több fejlődési stádiumban (csírázás, fiatal növénykor, virágzás előtti vegetatív ill. generatív életfázisban) vizsgáltuk az oxidatív stressztoleráns növények különböző abiotikus (hideg és szárazság) stressztűrését. Mindezen részletes és komplex vizsgálatok összesített eredményeképpen elmondható, hogy a vizsgált 14 vonal közül 7 mutatott hidegtűrés a korai fejlődési stádiumban és 6 szárazságtűrést a virágzás előtt ill. alatt. 4 vonal mindkét stresszel szemben toleránsnak bizonyult.



Mindezek azt igazolják, hogy *in vitro* mikrospóra szelekcióval, oxidatív stresszt indukáló vegyületek felhasználásával az utódnövények abiotikus stressztűrése fokozható.

Mindezidáig a pályázathoz kapcsolódóan számos (7) publikáció jelent megjelent, ill. eredményeinket hazai és nemzetközi tudományos konferenciákon is bemutattuk előadások (2) ill. poszter (1) formájában. Mindemellett egyes eredmények még feldolgozás alatt állnak, így további publikációk megjelenése várható.