

Az exogén és endogén szalicilsav közötti jelátviteli út tanulmányozása búzában és modellnövényekben stresszkörülmények között (K101367)

Zárójelentés

Régóta ismert, hogy a szalicilsav (SA) jelátvivő molekula a növények védekező mechanizmusa során. Ezenkívül a SA az abiotikus stresszérzékenység csökkentésére is alkalmas vegyület lehet. Már számos kezelési mód (magok SA áztatása vetés előtt, vízkultúrához adagolás, öntözés vagy permetezés SA-oldattal) védelmet nyújtott számos növényfajnak abiotikus stresszfaktorok ellen. Az azonban nem ismert, hogy a külsőleg adagolt SA közvetlenül véd-e, vagy az endogén SA szintjének szabályozásán keresztül hat. Ezenkívül számos egyéb tényező, mint pl. a genetikai háttér, is befolyásolhatja a SA hatását. Ezt különösen fontos figyelembe venni, ha a kétszikű növényekben (Pl. *Arabidopsis*ban vagy dohányban) kapott eredményeket az egyszikű gabonaféléknél is értelmezni szeretnénk. Ezen kérdések tisztázása közelebb hozhat minket a szabályozó mechanizmusok jobb megértéséhez.

Jelen pályázat fő célja az volt, hogy a különböző SA kezelések hatásait tisztázzuk, s ezen kívül még a SA-függő jelátviteli utak és más védekező mechanizmusok közti összefüggéseket is tanulmányozzuk.

A kísérletekhez a munka kezdeti szakaszában búzanövényeket kezeltünk különbözőképpen szalicilsavval (SA): egyrészt a magvakat áztattuk, másrészt a tápoldathoz adagoltuk a szalicilsavat. Vizsgáltuk a kétféle kezelés által kiváltott biokémiai/élettani folyamatokat, hasonlóságokat, különbségeket. A kísérletekhez Mv Emese (őszi) és a Nadro (tavaszi) fajtákat használtuk. Mindkét kezelés 0,5 mM SA-val történt. A magáztatás során 1 éjszakára SA oldatba és desztillált vízbe (kontroll) áztattuk a magokat. A tápoldathoz adagolt SA kezelés során az ültetéstől számított 7. napon adagoltuk a tápoldathoz a SA-t, 24 órán át rajta hagytuk, majd sima tápoldatra cseréltük. Szedtünk mintákat a kezelést követő napon endogén SA-ra, ACC-re és lipidperoxidációs mérésre is levélből és gyökérből. A megmaradt növényeket 1 hétig tápoldatban neveltük és utána megismételtük a mintaszedést. A mintákat feldolgoztuk, megmértük és kiértékeljük. A kiértékelés alapján a levélben az endogén SA a tápoldathoz adagolt SA hatására megnőtt, mind a szabad SA frakcióban, mind a metanolban oldódó kötött SA frakcióban és a metanolban nem oldódó kötött SA frakcióban is, mind a két fajta búza esetén. A gyökér esetén is a tápoldathoz adagolt SA

megnövelte az endogén SA szintjét mind a három frakcióban, mind a két fajta búzánál. A levélben és gyökérben az ACC és MACC szintek változásánál is látható a tápoldathoz adagolt SA hatása, valamint a két fajta búza esetén a mintázat hasonló volt. A lipidperoxidáció mértékét MDA mérésével határoztuk meg. A levelek esetén szintén a tápoldathoz adagolt SA növelte meg az MDA mennyiségét. A két fajta búza mintázata hasonló volt itt is. Az eredmények tükrében a további vizsgálatokat leszűkítettük az Mv Emese (őszi) fajtára.

Mivel azt tapasztaltuk, hogy a SA kezelések oxidatív stresszt okoztak, ezért a pályázat 2. évében vizsgáltuk az antioxidáns hatású flavonoidok mennyiségének változásait is. A flavonoidok, a SA-hoz hasonlóan, a fenil-propanoid úton szintetizálódnak. A közös pont a fahéjsav, ahonnan a flavonoidszintézis a SA-val ellentétben nem az orto-, hanem a para-hidroxi-fahéjsavon át folytatódik. A flavonoidok vizsgálata során mértük a myrecetint, kaempferolt, quercetint és a rutint is. A myrecetin a levélben a kezelések hatására nem változott, mindössze a 7 napos minták esetén láttunk csökkenést, mind a kontrollban, mind a kezelt minták esetén. A gyökér mintáknál a szabad frakcióban a kezelések hatására megnőtt 1 nappal az SA tápoldathoz adagolása után, 7 nappal később pedig még mindig magas volt a kontrollhoz képest. A metanolban oldódó kötött frakcióban a tápoldathoz adagolt SA kezelés hatására megnőtt, de 7 nap után lecsökkent a myrecetin. A kaempferol a levélminták esetén a szabad frakcióban nem változott, míg a kötött frakcióban a tápoldathoz adagolt SA hatására csökkent. A gyökérben a kötött frakcióban a tápoldathoz adagolt SA hatására az 1 napos mintáknál csökkent, majd a 7 napos mintáknál megnőtt a kaempferol tartalom, míg a makromolekulákhoz kapcsolódó kötött az 1 napos minták esetén csökkent és utána nem változott. A quercetin a levélben nem változott a szabad frakció kivételével, ahol a tápoldathoz adagolt SA hatására a 7 napos mintákban megnőtt. A gyökérmintáknál a szabad frakcióban 7 nap után csökkent a tápoldathoz adagolt SA hatására és 1 nap után szintén csökkent a kötött frakcióban is. A rutin a szabad frakcióban a tápoldathoz adagolt SA hatására kis mértékben megnőtt, és a kor előrehaladtával a kötött frakcióban is megnőtt a levelek esetén. A gyökérben a szabad frakcióban a tápoldathoz adagolt SA hatására 1 nap után csökkent, de 7 nap után megnőtt. Összességében azt mondhatjuk, hogy a gyökérben megnőtt a flavonoidok szintje a SA kezelés hatására.

A második évben elkezdtük a microarray vizsgálatokat is. A kísérleti elrendezés ugyanaz volt, mint a fent már részletesen leírt flavonoidos kísérletnél. A mintákat az 1 napos tápoldatos SA kezelés után szedtük. A validálást, az adatok elemzését

és az adatok kiértékelését a pályázat 3. évében végeztük el. Az eredményekről megállapítható, hogy 3 fő anyagcsereút génexpressziójára gyakorolt hatást a SA. Az egyik ilyen a fenil-propanoid útvonal, melynek a SA bioszintézis is részét képezi, valamint a flavonolok is ide tartoznak. Ezenkívül még a fruktánok és a glutation anyagcseréjéhez kapcsolódó gének is expresszázódtak. Ezek közül a pályázat hátralevő részében a fenil-propanoid útvonal részletesebb vizsgálatát végeztük el a pályázat hátralevő részében, megvizsgáltuk a kiválasztott gének expressziójának változását nem csak levélben, hanem a gyökerekben, valamint csíranövényekben is. Az eredményeket 2016-ban a *Frontiers in Plant Science* című folyóiratban publikáltuk.

Az eredményekből látható volt, hogy a különböző SA kezelések nem ugyanazt a hatást váltják ki. A SA használatánál problematikus, hogy vízben nehezen oldódik, de Na sója, a nátrium-szalicilát (NaSA) vízben könnyen oldódik, tehát a használata sokkal kényelmesebb lenne. Viszont előtte tisztázni kellett, hogy ugyanúgy hat-e a növényekre, mint maga a SA. A kísérlethez kukoricát (Norma hibrid) neveltünk tápoldatban és a növényeket 7 napos korban a tápoldathoz adagolt 0,5 mM SA-val és NaSA-val kezeltük 1 napig. Ezt követően a növényeket 1 napos Cd stressznek tettük ki, valamint voltak olyan növények, melyek a Cd-ot együtt kapták a SA-val és az NaSA-val. Mértük a Cd tartalmat, életképességet, és az MDA mennyiségét is. A levélben relatív kevés Cd jutott fel, s a kezelés még csökkentette ezt a mennyiséget. A gyökérben a Cd-mal együtt adott NaSA kezelés után ugyanannyi Cd volt, mint a kezeletlen gyökérben, míg a többi kezelés csökkentette a felvett Cd mennyiségét. Az MDA, mint oxidatív stresszmarker, jól mutatja, hogy az előkezelés nem okozott oxidatív stresszt levélben. Az SA kezelések csökkentették az oxidatív stresszt a levélben, míg a NaSA kezelésnek nem volt hatása. A gyökerekben nem tapasztaltunk változást Cd hatására. Mértük az életképességet is: levélben az előkezelések nem okoztak változást. A SA kezelt növények leveleinek életképessége ugyanúgy csökkent, mint a csak Cd kezelt növényeké, viszont amikor a Cd-mal együtt NaSA-t is adtunk, akkor kisebb mértékű életképesség csökkenés volt megfigyelhető, míg a NaSA-val előkezelt növények hasonló értékeket mutattak, mint a kontroll. A gyökerek életképességét a SA előkezelés kicsit csökkentette, de a NaSA-nak nem volt ilyen hatása. A NaSA kezelt gyökerek életképesség ugyan csökkent a Cd kezelés után, de kevésbé, mint a csak Cd-mal ill. SA kezelt gyökerek életképessége. Mivel mind a Cd, mind az MDA tartalomban, illetve az életképességi értékekben különböző hatást tapasztaltunk a SA és NaSA esetén,

ezért a következő évben vizsgáltuk ennek élettani hátterét. Mértük az antioxidáns enzimek aktivitását, vizsgáltuk a fitokelatinok (védővegyületek) szintézisét, s ehhez kapcsolódóan a glutationt és prekursorait, mivel ezek a fitokelatinok szintézisének kiinduló vegyületei, s emellett antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. A gyökerekben a NaSA kezelések emelték meg a PC szintet, míg a levélben a SA kezeléseknek volt hasonló hatása Cd kezelés után. Ami érdekes volt, hogy az SApreCd növényekben a PC szintáz aktivitása a gyökérben növekedett, a levélben nem, viszont csak a levélben nőtt meg a PC szint, tehát valószínűleg a gyökérből került fel transzporttal, míg az SA+Cd növényeknél a levélben mértünk nagy PC szintáz aktivitást, tehát a kétféle SA kezelés más-más mechanizmussal növelte a levél PC szintjét. A glutation mennyisége NaSApre növényekben volt a legmagasabb, tehát már maga a kezelés felhalmozódáshoz vezetett a gyökerekben, míg Cd kezelés hatására ez nem volt megfigyelhető, viszont PC felhalmozódás igen. A levelekben az NaSA+Cd növényekben detektáltuk a legmagasabb GSH szintet. A glutation szintézisben résztvevő enzimek (gamma-glutamil-cisztein-szintáz, glutation-szintáz) aktivitása a NaSA kezelések hatására növekedett meg a gyökerekben. A glutationhoz kapcsolódó antioxidáns enzimek (glutacion redukáz, glutacion-S-transzferáz) aktivitása főleg a gyökerekben nőtt meg NaSA kezelések hatására, míg az aszkorbát-peroxidáz aktivitását az SA kezelés növelte meg. Az aszkorbát-tartalom a levelekben nem változott, míg a gyökerekben Cd és SA kezelések hatására lecsökkent, míg az NaSA kezelés hatására nem vagy csak kismértékű csökkenést tapasztaltunk. Tehát a NaSA és SA különböző élettani hatásokat indukál a növényekben. Az eredményeket a PlosOne folyóiratban publikáltuk.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy munkánk során feltártuk a különböző módú SA kezelések hatását, valamint a SA sav és só formái közötti védőhatás különbségét Cd stressz során. Ezek a különbségek arra is felhívják a figyelmet, hogy megfelelő módon csak úgy lehet interpretálni a SA hatásának vizsgálatát növényeken, ha odafigyelünk a kezeléshez használt vegyület pontos összetételére, valamint a kezelés módjára, mert mint látható, más mechanizmus szerint hat, ha más formában vagy más módon adagolják a SA-t.

Ezzel párhuzamosan több éven át magáztatásos szántóföldi kísérleteket folytattunk. Vetés előtt a magvakat 0,5 mM SA-ba áztattuk egy éjszakán át. A magáztatás pozitív hatásait főleg a korai vetésnél tapasztaltuk. Itt kicsit

emelkedett a termés mennyisége. Az eredményeket a Cereal Research Communications folyóiratban publikáltuk 2016-ban.

Mivel a pályázat célja a különböző SA kezelések összehasonlítása volt, ezért kipróbáltunk egy másik típusú SA kezelést is. Izraeli partnerek metil-jazmonáttal (MeJA) kezelnek növényeket lanolinba emulgeálva, biotikus stresszt figyelve. A MeJA-hoz hasonlóan a metil-szalicilát (MeSA) is illékony, növényben is megtalálható jelátvivő molekula, így egy olyan kezelést csináltunk, ahol lanolinba emulgeáltuk a MeSA-t és utána az 1 hetes búzanövények leveleit kentük be vele. A koncentráció megfelelő megállapításához 0,1 mM, 0,5 mM és 1 mM koncentrációkkal valamint tiszta lanolinnal kezeltük. MDA mennyiségét mértük és úgy találtuk, hogy a 0,5 mM-os koncentráció már mérhető változást okoz, így ezzel a koncentrációval folytattuk a kísérleteket. Külön kezeltük az első levelet és a második-harmadik leveleket mind lanolinnal, mind 0,5 mM-os MeSA-lanolin emulzióval és a kezelés után 24 órával 1 mM kadmios tápoldatot kaptak 24 órán keresztül. Utána külön szedtük mintaként a különböző levélszinteket és a gyökeret is, endogén SA-ra és antioxidáns enzimekre is. A mintákat előkészítettük és megmértük. Az endogén SA mérés alapján az látható, hogy a szabad SA és a metanolban nem oldódó kötött SA frakciók esetén nem volt változás, viszont a metanolban oldódó kötött SA frakciójában a MeSA kezelés hatására és a kadmium hatására is megnőtt az SA szintje. A kezelés hatásának megfelelő megismeréséhez további vizsgálatokat tervezünk, esetlegesen más stresszfaktorok bevonásával is.

Irodalmi adatokból ismert, hogy sokan SA-as permetezést használnak. Ezt a kezelést is kipróbáltuk *Brachypodium* növényeken. A magvak egy részét 0,5 mM SA oldatba áztattuk egy éjszakán át, a többi magot pedig desztillált vízbe. A növényeket földben neveltük kontrollált körülmények között PGR-15 típusú Conviron növénynevelő kamrában. Hat hét után a desztillált vízbe áztatott növények harmadát 0,5 mM SA oldattal permeteztük. Korábbi tapasztalatunk az volt, hogy a SA nem igazán tapad a levelekhez, ezért, hogy a SA megtapadjon a növények felületén, különböző felületaktív anyagokat próbáltunk az oldathoz adni. Egyik kísérletben felületaktív anyagként 1 % Triton-X-et adtunk, s teszteltük csak a Triton-X hatásait is. Már maga a Triton-X látható károsodást okozott a növényen, SA-val kiegészítve pedig ez fokozódott. A következő kísérletben 1% glicerinnel próbálkoztunk, sajnos hasonló eredménnyel. Ezek után csak 0,5 mM

SA-val kezeltük a növényeket, de a SA itt is károsított még stressz nélkül is, így itt még további munkára van szükség a pontos kísérleti körülmények beállításához. A kísérleteket a növények lassú növekedése is késleltette, hisz itt közel 2 hónap volt egy kísérlet időtartama összehasonlítva a búzás illetve kukoricás kb. 3 hetes kísérletekkel.