

Zárójelentés

A szalicilsavfüggő védekezési mechanizmusok kapcsolata egyéb jelátviteli utakkal kalászos gabonafélékben (PD OTKA 83840)

Jelen pályázat célja a gazdaságilag jelentős gabonafélék stressz körülmények között adott válaszreakcióinak jobb megismerése. Munkánk során kapcsolatot kerestünk a búza genotípusok stressztűrő képessége és egyes védő vegyületek mennyisége között, különös tekintettel a szalicilsavra.

A munkaterv a következő volt:

1. év

Növénynevelés, mintagyűjtés nagyszámú gabona genotípusból (fajták, kromoszóma szubsztitúciós és addíciós vonalak), melyek eltérő stressztoleranciával rendelkeznek (biotikus ágensek, hideg- és szárazságtűrés). Szalicilsav- (SA) és poliamintartalom (PA) meghatározása. Magas és alacsony SA és PA-tartalommal rendelkező genotípusok válogatása a további kísérletek számára.

2. év

A magas illetve alacsony SA/PA tartalom hatásának vizsgálata gabonafélék stressztűrőképességére és más, a stresszelleni védelemben szerepet játszó anyagok mennyiségének alakulására. 1. A kiválasztott genotípusokat különböző stresszeknek tesszük ki (alacsony hőmérséklet, szárazság és az első évi eredmények függvényében biotikus stressz). A növények állapotának követéséhez különböző fotoszintetikus paramétereket (gázcsere, klorofill-a fluoreszcencia indukció) is mérünk. 2. Különböző anti-stressz anyagok (SA, PA, aszkorbinsav, prolin, glutation metabolizmus komponensei, antioxidáns enzimek, stb) meghatározása. Az SA szintézis és a különböző genotípusok stressztűrőképessége közti korreláció tanulmányozásához vizsgáljuk a korizmát- és izokorizmát-szintáz génjeinek expresszióját RT-PCR-ral. Publikációk írása.

3. év

A kiválasztott genotípusok stressztűrés-mechanizmusainak további tanulmányozásához vizsgáljuk a lipidösszetétel változásait, hogy további információkat kapjunk az alkalmazkodási folyamatok és a lipidkompozícióban történt változások között. A növényi

hormonok mennyiségében bekövetkezett változásokat is vizsgálni kívánjuk. További ellenőrző kísérletek végzése, publikációk írása.

Eredmények

Az **első évben** szántóföldi körülmények között neveltünk ismert stressztűrő képességű gabona genotípusokat. Ezek között nagyszámba szerepeltek közel izogén Thatcher búza vonalak, valamint martonvásári őszi és tavaszi árpa, őszi búza, őszi durum és tritikálé, továbbá tavaszi zab fajták. Valamennyi esetén meghatároztuk a SA (szabad és kötött formában) és poliamin (PA) (putreszcin, cadaverin, spermidin és spermin) tartalmat, valamint antioxidáns enzimek aktivitását (aszorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz, glutation-S-transzferáz, guaiacol-peroxidáz, kataláz). Megállapítottuk, hogy mind a SA, mind a PA tartalmat illetően a különböző fajokat felölelő 42 genotípus változatos képet mutat, de a különbségek nem fajfüggőek a SA és PA esetében. Figyelemre méltó különbségeket találtunk azonban az antioxidáns enzimeknél a fajok között, azon belül is a gvajakol-peroxidáz (G-POD) esetében. Az őszi árpa, tavaszi árpa, tavaszi zab, őszi tritikálé és őszi durum fajok jóval alacsonyabb G-POD aktivitással rendelkeztek az őszi búza valamint tavaszi búza fajokhoz képest.

Annak érdekében, hogy a kezdeti SA és PA tartalmak mellett stressz hatásra bekövetkező változásokat is vizsgáljuk, 24 búza genotípus esetében lisztharmatfertőzést [*Blumeria graminis* (DC.) Speer f.sp. *tritici* Ém. Marchal] követően is gyűjtöttünk mintát a növényekről. Az eredményeket annak tükrében értékeltük, hogy a fertőzés után felvételeztük a fertőzöttség mértékét. A SA és PA tartalom a fertőzés hatására megemelkedett szinte valamennyi, vizsgált genotípus esetén, továbbá az antioxidáns enzim aktivitásokban bekövetkező változások is hasonló mintázatot mutattak a különböző fajtákban. A védővegyületek kezdeti szintjei és a fertőzés hatására bekövetkező változásai, valamint a lisztharmattal szembeni rezisztenciafok között összefüggést nem tudtunk kimutatni.

Szántóföldi körülmények között azonban számos előre nem látható stresszfaktor jelentkezhethet (egyéb biotikus stressz pl. levélrozsda, vagy szárazság, stb), melyeket nem tudunk befolyásolni, és eredményeinket módosíthatják. Ezért a szántóföldi eredmények alapján kiválasztott genotípusokkal üvegházi, kontrollált körülmények között beállított kísérlettel kívántuk kiegészíteni vizsgálatainkat. A felnőttkori rezisztencia vizsgálathoz 4 búza genotípust választottunk ki, melyek különböző SA illetve PA tartalommal rendelkeztek a korábbi szántóföldi adatok szerint (TC 19 és TC 33 magas, TC 9 és TC 26 alacsony SA

tartalommal). A növényeket cserépben neveltünk és felnőttkori (GS45) fertőzést végeztünk. A fertőzést követően 3 és 7 nap elteltével végeztük a mintavételt, a kontroll és fertőzött növényekből. Meghatároztuk a SA és PA tartalmat, illetve az antioxidáns enzim aktivitásokat. A 4 vizsgált genotípus eltérő mértékű rezisztenciát mutatott a liztharmatfertőzéssel szemben. Két genotípus érzékenynek (TC26 és TC33), kettő pedig viszonylag toleránsnak mutatkozott (TC9 és TC19). A hetedik napon, az érzékeny genotípusok egész felületen megjelentek a liztharmat micéliumok és konídiumok, míg a toleránsabb genotípusoknál csak az alsóbb leveleken, közel a szárhoz. Habár PSII kvantum hatásfokát jellemző $\Delta F/F_m'$ klorofill fluoreszcencia indukció paraméter a fertőzést követő hetedik napon sem csökkent, kimutatható élettani változások indultak meg a levélben. A TC9 és TC26 genotípusokban mind a szabad mind a kötött SA-tartalom fele annyi volt, mint a TC19 és TC33 fajtákban, a kontroll növények esetében. A SA-tartalom kezdeti szintjei, eltérőek voltak, habár a SA-tartalom fertőzésre bekövetkező változása nem. A poliaminok közül a szabad kadaverin (CAD), szabad és konjugált spermidin (SPD), és konjugált spermin (SPN) mennyisége fertőzés hatására felnőttkorban megemelkedett. Az antioxidáns enzimek aktivitása különösen az aszkorbát peroxidáz (APX) és G-POD esetében a fertőzés hatására megemelkedett. A felnőttkori kísérlet során a G-POD izoenzimek gél elektroforetikus vizsgálata során megállapítottuk, hogy a 4 genotípus eltérő mintázatot mutatott, továbbá kimutattunk egy a liztharmat fertőzés hatására specifikusan indukálódó sávot, mely kisebb intenzitással csak TC26 genotípusban volt jelen a fertőzés előtt. Annak érdekében, hogy a vizsgált paraméterek közötti kapcsolatokat felfedjük korreláció analízis végeztünk. Megállapítottuk, habár a SA- és PA-tartalom változása továbbá az antioxidáns enzimek aktivitása bizonyos esetekben szoros, pozitív, lineáris kapcsolatban van egymással, ezeket az összefüggéseket számos faktor befolyásolja, mint például az öregedés, vagy a fertőzés. A mért paraméterek, valamint a vizsgált genotípusok rezisztenciafoka között összefüggést nem tudtunk megállapítani.

A **második évben** az előző évi eredmények alapján kiválasztott 4 búza genotípust; két őszi búzát (Mv Hombár és Mv 8), illetve két tavaszi Thatcher búza vonalat (TC19 és TC33) különböző abiotikus stresszeknek (alacsony hőmérséklet, szárazság valamint nehézfém) tettük ki. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen kapcsolat van a különböző védővegyületek mennyisége és az abiotikus stressztűrő képesség között.

A 9 napig tartó, 5 °C-on történő edzés hatására a SA tartalom, a poliaminok közül a SPD és SPN mennyisége az edzés során megemelkedett a kezelés kezdetén mért értékhez képest valamennyi genotípusban. Azonban ezen védővegyületek kezdeti szintjei illetve a kezelés

hatására történt változások és az 1 napos $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztási teszt után tapasztalt túlélési arány között összefüggést nem tapasztaltunk a különböző genotípusokban. Az antioxidáns enzimek közül csak az APX aktivitása volt eltérő, így az őszi búzáknak csökkent, míg a tavaszi búzáknak nem változott a hideg kezelés során a kezdeti szinthez képest.

A nehézfém stressz vizsgálatához kadmium kezelést végeztünk háromféle beállításban. $0,5\text{ mM}$ Cd kezelés a SA, valamint a poliaminok közül a putreszcin (PUT) és SPD tartalmat megemelte valamennyi genotípusban. Ez a koncentráció olyan nagymértékű stressz volt, hogy különbséget nem találtunk a tolerancia fokában. Ezt követően a növények egyik részét $0,05\text{ mM}$ Cd koncentráción neveltük 17 napig, míg másik részük 17 naponan kapta ezt a kezelést egy héten át. Mindkét beállításban, a mért stressz markerek (hajtás és gyökér hossz, hajtás és friss tömeg, lipid peroxidáció, $\Delta F/F_m'$: fluoreszcencia indukciós paraméter) alapján, az Mv Hombár bizonyult a legtoleránsabbnak. A következőkben az egy hétes $0,05\text{ mM}$ Cd kezelés hatásait összegeztük. Bár a négy vizsgált genotípus kezdeti endogén SA tartalma TC19 búza vonalban bizonyult a legmagasabbnak, a kadmium kezelés valamennyi genotípusban megemelte mind a szabad, mind a kötött SA tartalmat. A legnagyobb SA akkumulációt a TC19-ben tapasztaltuk. Az antioxidáns enzimek vizsgálata során megállapítottuk, hogy kontroll körülmények között a glutation-reduktáz (GR) aktivitása az Mv Hombár levelében a legnagyobb, míg a kataláz (KAT) aktivitás ugyanezen genotípus gyökerében a legalacsonyabb. Az Mv Hombár genotípusban a kezelés hatására a GR, a KAT és a glutation-S-transzferáz (GST) aktivitása a kevésbé toleráns genotípusokétól eltérő változásokat mutat. Továbbá az aszkorbát tartalom meghatározása során kontroll körülmények között legnagyobb mennyiséget mind a levél, mind a gyökér esetén az Mv Hombárban mértünk, mely $0,05\text{ mM}$ Cd stressz hatására ezen genotípus gyökerében emelkedett meg leginkább. A glutation és prekursorainak valamint a fitokelatinok (PC) mennyiségi analízise során kimutattuk, hogy a glutation (GSH), PC_2 és PC_3 szint a martonvásári fajták gyökerében annak ellenére, hogy kezdeti szintjük alacsonyabb volt a TC vonalokhoz képest, Cd kezelés hatására jelentősen megemelkedett. A fitokelatin szintáz (PCS) aktivitása az Mv Hombár levelében volt a legalacsonyabb a 4 genotípus közül, mely a Cd kezelés hatására szintén megemelkedett, míg a gyökérben a PCS aktivitása csak az őszi búza fajtákban emelkedett meg. A korreláció analízis a SA és prekursorainak, valamint az antioxidáns és nehézfém detoxifikáló rendszer tagjai között számos szoros összefüggést mutatott ki. Így megállapítható, hogy habár a SA kezdeti szintje illetve Cd kezelés hatására bekövetkező felhalmozódás mértéke és a Cd tolerancia mértéke között nincs összefüggés, a SA jelátvitel a tolerancia mértékét sokkal inkább meghatározó antioxidáns vegyületekkel

(GSH, C-vitamin) és nehézfém detoxifikáló komponensekkel (PC) kapcsolatban van. A fenilalanin-ammónia liáz (PAL), a SA szintézis kulcs enzimének, aktivitását és a SA prekursorainak (benzoésav és *ortho*-hidroxí-cinnamic acid) mennyiségében bekövetkező változásokat, valamint a kloroplasztiszban jelenlévő másik útvonal két enzime, izokorizimát- és izokorizimát-szintáz, génexpressziós szintjének tanulmányozását is elvégeztük. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a PAL szintézis útvonal, illetve a SA prekursorainak a gyökérből levélbe történő transzportja sokkal inkább szerepet játszik a Cd hatására indukáló SA akkumulációban, mint a korizimát útvonal.

Szárazság stressz kiváltására 15%-os PEG kezelést alkalmaztunk 5 napon keresztül. A négy vizsgált genotípus között (TC 19, TC 33, Mv 8 és Mv Hombár), eltérő kezdeti SA tartalma ellenére, a $\Delta F/F_m'$ klorofill-*a* fluoreszcencia indukációs paraméter nem mutatott különbséget a kezelés hatására, bár a kezelés indukálta prolin felhalmozódás a TC 33 genotípus levelében volt a legnagyobb mértékű. Az antioxidáns enzimek vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az Mv Hombár genotípusban a GR, APX és KAT aktivitása a kezelés hatására eltérő változást mutatott a többi genotípushoz képest. A GSH metabolizmus komponenseinek (cisztein, γ -glutamil-cisztein, hidroximetil-glutation, glutation) mennyisége azonban valamennyi genotípus gyökerében megemelkedett a kezelés hatására.

Ezek után kíváncsiak voltuk, hogy vajon a szintén gabonák közé tartozó rizsben, mely köztudottan magas SA tartalommal rendelkezik, a búzával ellentétben, van-e összefüggés a SA tartalom és a rezisztencia fok között. 6 rizs genotípusban határoztuk meg a kontroll SA szintet, majd kiválasztottunk négyet, 2 alacsony és kettő magas SA tartalommal rendelkező genotípust a további vizsgálatokhoz. A szárazság stressz során az egyik magas SA tartalommal rendelkező genotípus érzékenyebbnek, míg a másik három genotípus, mind alacsony, mind magas SA tartalommal rendelkezők toleránsabbnak bizonyultak. Azonban sem a 15%-os PEG, sem a 10 °C-os hideg kezelés nem okozott változást a SA tartalomban még 6 nap elteltével sem. Az RT-PCR mérések eredményei azt mutatták, hogy sem a korizimát- sem az izokorizimát-szintáz géneinek expressziójában nem állt be változás a hideg és szárazság kezelés hatására. A PA tartalomra mindkét stressz hatással volt, bár eltérően befolyásolta, azonban a kezdeti illetve a stressz hatásra bekövetkező változások és a tolerancia fok között a rizs esetében sem tudtunk összefüggést megállapítani.

Természetes körülmények között a növények számtalan egyidejű stressz hatásnak vannak kitéve. Több abiotikus stressz faktor szimultán hatására különböző stressz válasz útvonalak együttesen aktiválódnak, melyek egymást erősíthetik, illetve gátolhatják. A

harmadik évben munkánk során természetes körülmények között előforduló UV-B sugárzás hatását vizsgáltuk más abiotikus stressz faktorok (nehézfém és szárazság stressz) által kiváltott akklimatizációs folyamatokra. Búzanövények (Mv Emese) egy részét normál fényviszonyok között neveltük, míg a másik részénél a normál fény mellett UV-B sugárzást ($430 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$) alkalmaztunk a nevelési fény háttérében. Ezt követően az előző évi kísérleti beállítások tapasztalata alapján $50 \mu\text{M}$ kadmium és 15%-os PEG kezelést alkalmaztunk. Mértük a SA és annak prekursorának, az *ortho*-hidroxi-fahéjsavnak (*o*HCA) mennyiségét, valamint, a SA szintézis kulcs enzimének, a PAL aktivitását. Mindemellett az antioxidáns enzimek aktivitását illetve a poliamin szintet is vizsgáltunk. Önmagába a szárazság stressz prolin akkumulációt eredményezett a búzanövények gyökerében, míg a kadmium kezelés növekedésgátlást, csökkent klorofill tartalmat, és megemelte a lipid peroxidáció mértékét a levélben. Az UV-B előkezelés szintén hajtásnövekedést eredményezett, emellett a levélben fokozta a lipid peroxidáció mértékét, jelezve az indukálódott oxidatív stresszt. Az UV-B előkezelés meggátolta a szárazság stressz okozta lankadást a búzanövények levelén, és jelentős SA felhalmozódáshoz vezetett, mely védelmet nyújthatott a PEG kezeléssel szemben. Ellenben, a tapasztalt nagymértékű SA felhalmozódást a kadmiummal kezelt növényekben az UV-B előkezelés tovább nem emelte, de kifejezettebb oxidatív stresszt, az antioxidáns enzimek aktiválódását valamint poliamin szintézist indukálta. A kombinált UV-B+Cd kezelés additív hatása a lipid peroxidáció mértékében mutatkozott meg. A fenolos vegyületek mennyiségi változása kapcsolatban volt a PAL aktivitásának változásával a gyökérben, de a levélben nem. A SA és *o*HCA mennyiségi változásában tapasztalt hasonló mintázat azt sugallja, hogy a SA döntő szerepet játszik az *o*HCA-án keresztül. Az eredményeink azt mutatják, hogy az UV-B sugárzásnak lehet pozitív és negatív hatása is azonos körülmények között, a másodlagos stressztől függően. A védő illetve károsító hatás a fenolos vegyületek mennyiségi változásával lehet összefüggésben.

Vizsgáltuk az UV-B sugárzás befolyásoló hatását a szárazság illetve kadmium stressz indukálta lipid összetétel változásra is. A palmitinsav, transz- Δ_3 -hexadekánsav, olajsav, linolsav, és linolénsav arányát határoztuk meg a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalactozil-diacilglicerol (DGDG), foszfátidil-etanolamin (PE) és foszfátidil-glicerol (PG) membrán frakciókban. Megállapítottuk, hogy a PEG, kadmium és UV-B kezelésnek eltérő hatása van a zsírsav összetételre a különböző membrán frakciókban, továbbá bizonyos esetekben eltérő a levél illetve a gyökér esetén. Az UV-B sugárzás önmagában megemelte a kettős kötés indexet (DBI) a levél PE, de csökkentette a levél PG frakcióban. Érdekes módon,

az UV-B sugárzás hatással volt a gyökérre is, csökkentette MGDG és PE, de megemelte a DGDG frakciók telítettség szintjét. A PEG kezelés mind a levélben, mind a gyökérben növelte a telítettség szintet. Kombinált kezelés esetén az UV-B sugárzás DBI csökkentő hatása a levél PG frakcióban erőteljesebb volt a PEG kezelés növelő hatása felett, továbbá a telítettség szint csökkent a levél MGDG frakcióban is, jelezve a fotoszintézisben fontos szerepet játszó membrán frakciók károsodását, míg a gyökérben lényeges változást nem okozott. A kombinált UV-B+Cd kezelés mind a levélben, mind a gyökérben a kadmium kezeléshez képest eltérő hatást eredményezett, a telítettség csökkenése a levél MGDG és PG frakciókban, illetve a gyökér PG és DGDG frakciókban jelezte a két stressz additív károsító hatását. Emellett vizsgáltuk bizonyos flavonoidok szintjét, mint a rutin, miricetin, és kvercetin, mely vegyületek többek közt, mint antioxidánsok gátolják a lipid peroxidációt. Eredményeink szerint, míg a levélben a PEG és UV-B, addig a gyökérben a kadmium és UV-B stressz stimuláló hatása volt domináns, továbbá az UV-B+PEG illetve UV-B+Cd additív hatását mutatták mind a levélben és gyökérben.