

**Antioxidánsok szerepe a levelek akklimációjában – rövidtávú
alkalmazkodás változó megvilágításhoz**

Ph.D. értekezés tézisei

Majer Petra

Témavezető: Dr. Hideg Éva

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

Szeged

2013

BEVEZETÉS

A növényi szervezetek akklimációs folyamatok révén nagy mértékben képesek alkalmazkodni a változó fényviszonyokhoz. Ez magában foglalja mind a napfény nagy intenzitású fotoszintetikusán aktív komponensének (PAR, 400-700 nm), mind pedig az ultraibolya (UV) sugárzás Földre eljutó részének (290-400 nm) lehetséges káros hatásai elleni védelmet. Bár mindkét napfény komponens szükséges vagy hasznos a növények fejlődéséhez és életéhez mint energiaforrás (PAR) és információhordozó (PAR és UV), oxidatív stresszorként is megjelenhetnek. Az akklimációs folyamatok egyik fontos eleme ennek elkerülése, melyben fontos szerephez jut a prooxidáns-antioxidáns egyensúly fenntartása.

A növények alkalmazkodása a változó környezeti viszonyokhoz elsősorban a fotoszintetikus kapacitásuk megőrzésén alapul, mivel az energiaátalakítási folyamatok telítődése esetén a feldolgozatlan fényenergia káros lehet. A fotoszintetikusán aktív fénynek a fotoszintézis feldolgozóképeségét meghaladóan magas intenzitása annak fény általi gátlásához, fotoinhibícióhoz vezethet, amely során különböző mechanizmusok hatására a növényi sejtekben megnő a reaktív oxigén származékok (ROS-ok) koncentrációja. A ROS-ok a molekuláris oxigénből keletkező nagy reaktivitású, a sejtalkotókra nézve potenciálisan veszélyes molekulák. A fotoinhibíció során a kloroplasztisz tilakoidmembránjában az oxigénből a fotoszintetikus elektrontranszport komponenseiről elektronátadással szuperoxidgyök-anion ($O_2^{\cdot-}$), ebből pedig hidrogénperoxid (H_2O_2) és hidroxilgyök ($\cdot OH$) keletkezhet. Más úton, a triplétt gerjesztett állapotú klorofillról az oxigénre történő energiaátadással szinglett oxigén jöhet létre (1O_2). A ROS-ok láncreakciószerű terjedésükkel további gyökös, vagy nem gyökös természetű reaktív formákat képezhetnek a sejtben (prooxidánsok), melyek a fotokémia rendszer, a proteinek és a sejtalkotók károsításához, lipidperoxidációhoz, és az oxidatív stresszen keresztül végül a sejt pusztulásához vezethetnek.

A növényekben hatékony mechanizmusok működnek a változó napfényviszonyok által okozott oxidatív stressz megelőzésére, illetve a ROS-ok semlegesítésére. Az előbbi, preventív jellegű védekezés főképpen a többlet abszorbeált energia alternatív energiadisszipációs utakon való elvezetésén keresztül valósul meg. A keletkező ROS-ok semlegesítése az antioxidáns rendszer működésén keresztül történik, amelyet enzimek és nemenzimatis vegyületek többszintű, együttműködő hálózata alkot. Míg a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 mennyiségét elsősorban enzimek szabályozzák (szuperoxid-dismutázok, illetőleg

peroxidázok), addig a többi ROS-t nem célozzák specializált enzimek, ezek semlegesítéséért több antioxidáns vegyület együttesen felelős. A legfontosabb ilyen vegyületek a glutation, az aszkorbát, a karotenoidok, a tokoferolok (E-vitaminok), a B6-vitaminok és a fenolos vegyületek széles csoportja, ahová a flavonoidok is tartoznak. A prooxidánsok és antioxidánsok viszonya a sejtben egy egyensúlyi rendszert alkot, a redox homeosztázist, amely folyamatos szabályozás alatt tartja a sejt anyagcsere- és fejlődési folyamatait és a változó környezeti feltételekhez történő alkalmazkodás kulcsa. A környezeti jelek közvetett utakon, illetve a ROS-ok fokozott termelődésének kiváltásával indukálhatják az antioxidáns védelmet, így segíthetnek egy új egyensúly beállításában, ami a megváltozott környezeti feltételekhez, fényviszonyokhoz való akklimációhoz vezet.

A napfény másik komponense, az UV-sugárzás is hatással van a növények fotoszintézisére, morfológiai jellemzőire és anyagcseréjére. A magas (és főképp a PAR háttér nélkül alkalmazott) UV-B (290-315 nm) dózisek közvetlenül ROS-keletkezéshez ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) és oxidatív stresszhez vezethetnek. Az alacsonyabb dózisu, látható fényt kiegészítő UV-sugárzás azonban feltehetően alacsony koncentrációjú ROS közvetítette jelátviteli utakon keresztül, vagy az antioxidáns rendszer indukciójával részt vehet akklimációs válaszok elindításában

Amikor a növények súlyos stresszhatás alatt állnak, a pro- és antioxidáns viszonyaik egyértelműen felborulnak, és az oxidatív stressz folyamata, a szabad gyökök toxikus túltermelődése jól követhető az oxidált molekulák azonosítására alkalmas módszerekkel, illetve maguk az elsődlegesen kialakuló ROS molekulák is detektálhatóak közvetlenül. Amennyiben akklimációs folyamatról van szó, vagyis amikor az antioxidánsok mennyiségi vagy aktivitásbeli növekedése lépést tart a ROS-produkcióval maguknak az antioxidánsoknak a vizsgálata adhat tájékoztatást a rendszer állapotáról.

Kísérleteinkben ennek az antioxidáns rendszernek a növények változó fényviszonyokhoz történő akklimációjában játszott szerepét vizsgáltuk üvegházi, mesterségesen megválasztott, illetve természetes fényviszonyok között. Az antioxidánsokat a teljes antioxidáns kapacitások (TAC) mérésével jellemeztük, amelyek egy kivonat általános gyökkioltó- vagy redukálóképességét jellemzik. Ilyen a Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás próba (TEAC), a vasion-redukáló képesség, (ferric reducing antioxidant power, FRAP) és a teljes fenolosvegyület-tartalom (TFT) meghatározása. Az egyes ROS-okra irányuló specifikus antioxidáns kapacitásokat (SAC) is elemeztük, hogy teljesebb körű tájékoztatást kapjunk az antioxidáns rendszer változásairól. Ehhez a széles körben használt szuperoxidgyök-kioltási próbát alkalmaztuk,

ahol a gyököt egy mesterséges rendszerben, kémiai úton keltik, majd a hozzáadott kivonat gyökkioltóképességét egy ROS-indukált festék-kifakításos reakció gátlásán keresztül határozzák meg. Ezzel analóg módon alkalmaztuk a laborunkban növényi mintákra adaptált illetve fejlesztett hidroxilgyök- és szinglett oxigén kioltó antioxidáns kapacitás próbákat is. Elemeztük továbbá az akklimációban az irodalomban UV-B abszorbeáló pigmentekként ismert vegyületcsoport illetve a karotenoidok szerepét.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során üvegházban mesterségesen megválasztott, vagy szabadföldi fényviszonyok közt nevelkedett növények antioxidánsait térképeztük fel, hogy megvizsgáljuk ezek szerepét a változó fényviszonyokhoz történő akklimációban. Elsősorban az alacsony, természeteshez közeli dózisu (PAR-háttérrel kiegészített) UV-sugárzásához történő akklimációs folyamatokat vizsgáltuk a levelek antioxidáns viszonyainak tükrében. A vizsgálatokat különböző növényeken (szőlő, dohány, hárs) és meglehetősen eltérő kísérleti beállításokon (üvegházi, szabadföldi) keresztül végeztük, hogy átfogóbb képet nyerhessünk az antioxidáns változások és a környezeti alkalmazkodás összetett viszonyáról.

Kutatásaink fő célja annak elemzése volt, mennyire jellemzi a teljes és ROS-specifikus antioxidáns kapacitás paraméterekkel mérhető antioxidáns-tartalom a növények fényakklimációját. Ennek során a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. Mennyire reagálnak érzékenyen a különböző TAC és SAC próbák a levelek eltérő fiziológiai állapotát kísérő antioxidáns változásokra?
2. Milyen összefüggések vannak a levelek TAC és SAC értékei és természetes (szeneszcencia, kor) illetve mesterséges (a nevelési fényhez képest magasabb fényintenzitás, UV-sugárzás) hatásokra megváltozó fiziológiai állapota között?
Ezt a kérdést két megközelítésben is vizsgáltuk, egyrészt hogy
a) eltérnek-e a levelek válasza az üvegházi körülmények között alkalmazott kiegészítő UV-sugárzásra korukból eredő antioxidáns-tartalombeli különbségeinek függvényében,
b) másrészt hogy javítható-e a növények UV akklimációs válasza az antioxidáns-tartalom előzetes (magas fény előkezeléssel történő) megváltoztatásával?

3. A természetes napfényhez való alkalmazkodásban milyen szerepe van a ROS-kioltásnak illetve az UV-B abszorbeáló pigmentek egy csoportjának, a flavonoidoknak?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Kísérleteinkben üvegházi körülmények közt nevelkedett dohányt (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana), illetve szőlőt (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) használtunk. A szenescenciához kapcsolódó hatásokat stresszmentes körülmények között nevelkedett dohány növényeken vizsgáltuk. Az UV-kezelések során alkalmazott biológiailag effektív UV dózis napi $8,95 \text{ kJ m}^{-2}$ volt, amelynek jelentős része ($8,04 \text{ kJ m}^{-2}$) az UV-B tartományba esett; ezt a szőlő esetében 4 napig, a dohánynál 6 napig alkalmaztuk. A magas fény előkezeléshez a dohányokat a nevelési fényhez képest ötször magasabb fényintenzitáson tartottuk 6 napon át. A természetes fényhez való akklimáció vizsgálatához szabadföldön nőtt (Szeged) nagylevelű hársfa (*Tilia platyphyllos* Scop.) fény- és árnyékleveleit használtuk.

Fiziológiai szempontból a növények fényakklimációját fotoszintézisük alapján jellemeztük a CO_2 -megkötés mérésével (LI-6400 hordozható gázcsere-analizátor). A fotoszintetikus elektrontranszportot és az energia disszipáló utakat a változó klorofill fluoreszcencia mérése alapján jellemeztük (Imaging-PAM műszer segítségével).

A pigmentek meghatározását spektrofotometriás módon végeztük. A karotenoidtartalom méréséhez a pigmenteket acetonos oldatban vontuk ki, az UV-B abszorbeáló pigmentek (280-315 nm hullámhosszon történő abszorpció) méréséhez pedig savas metanolos kivonás után mértük a felülúszó abszorbanciáját.

Az akklimáció vizsgálatához a levelek antioxidáns-tartalmát teljes és egyes ROS-ra specifikus antioxidáns kapacitásuk mérésével jellemeztük. A TAC próbákhoz a levélkorongok vizes kivonatait használtuk fel. A teljes fenolosvegyület-tartalom meghatározása a Folin-Ciocalteu reagenssel történt. A Trolox ekvivalens antioxidáns kapacitást egy mesterséges gyökkel (2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav, ABTS^{•+}) szembeni semlegesítőképeség alapján jellemeztük. A vasion-redukáló képességet a Fe(II)-TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) komplex alacsony pH-n történő redukciójának mérésével jellemeztük.

A specifikus antioxidáns kapacitás próbákhoz a levelek vizes (dohány, szőlő), illetve metanolos (hárs) kivonatait használtuk fel. A szuperoxid-kioltó képesség

meghatározása a levélkivonatok antioxidánsainak azon képessége alapján történt, hogy megakadályozzák az NBT festék $O_2^{\cdot-}$ -indukálta formazánná való átalakulását. Az eljárás során a $O_2^{\cdot-}$ -képzés xantinból enzimes úton, xantin-oxidáz hatására történt. A specifikus hidroxilgyök-kioltó képesség mérésének alapelve a levélkivonatok antioxidánsainak azon képessége, hogy megakadályozzák a tereftálsav és az $\cdot OH$ reakciójából keletkező 2-hidroxitereftalát képződését. A $\cdot OH$ képzése a Fenton reakció alapján történt. A szinglett oxigén kioltóképesség méréséhez a 1O_2 -t fényérzékenyített reakcióban állítottuk elő, a metilkék festék megvilágításának hatására. A fenti reakcióban előállított 1O_2 keletkezésének gátlását egy indikátorvegyület (*p*-nitrozo-dimetilanilin vagy 1,3-difenil-izobenzofurán) színváltozása alapján mértük. Mindhárom SAC mérésnél az antioxidáns-tartalmú növényi kivonat specifikus ROS-kioltó képességét optikai úton, a festékkifakításos, illetve fluoreszcencianövekedéssel járó reakció gátlása alapján határoztuk meg.

A hárslevelekből vizes-metanolos kivonás után mértük a 280-500 nm tartománybeli abszorpciót. A flavonoid vegyületeket (kvercetin, kempferol, miricetin, kvercetin-3- β -D-glükozid és kempferol-3-glükozid) 50%-os metil-alkoholban oldottuk és szűrtük. A felülúszók abszorpciók spektrumát spektrofotométer segítségével határoztuk meg.

A hárslevelek flavonoidtartalmát HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerrel mértük.

EREDMÉNYEK

1. **Eredményeink azt mutatták, hogy az általános, teljes antioxidáns kapacitásokat mérő paraméterek alapvetően érzékenyek és jól követik a természetes folyamatokból, mint a szenescenciából vagy a levelek különböző korából eredő, illetve az akklimációs hatásokra válaszul kialakuló fiziológiai változásokat (Majer és mtsai. 2010).** Bár a szakirodalom a TEAC, a FRAP és a TFT próbát ugyanazon jellemző, vagyis a teljes antioxidáns kapacitás paraméterének tekinti, vizsgálataink azt mutatták, hogy az adott hatástól függően (szenescencia, oxidatív stressz, fényakklimáció) ezek nem egységesen írják le az antioxidáns változásokat. Az antioxidáns kapacitások értelmezésekor is óvatosan kell eljárni: figyelembe véve a finomszabályott redox egyensúlyt, az alacsony antioxidáns kapacitás értékek egyaránt jelezhetnek oxidatív stressz helyzetet (elégtelen antioxidáns védelem), illetve akklimáció során beállt új egyensúlyi állapotot. Ezért ezeket a paramétereket mindig fiziológiai mérésekkel kiegészítve kell

alkalmazni, hogy képet kaphassunk a növény állapotáról. Ugyan többször történt próbálkozás egy általánosan használható, standard módszer kiválasztására minták antioxidáns jellemzésére, a mi eredményeink inkább azt támasztják alá, hogy ne egy ilyen egydimenziós módszerrel, hanem inkább több TAC paraméterrel írjuk le mintáinkat, ezeket specifikus ROS antioxidáns próbákkal kiegészítve.

2. **Különböző korú szőlő levelek vizsgálatával megállapítottuk, hogy a fiatal levelek jobb UV-akklimációjának alapja antioxidánsaik indukciója, míg az idős leveleket e paraméterek eleve magasabb értékei nem védték meg az UV károsító hatásától (Majer és Hideg 2012a).** A TAC mellett a specifikus ROS-kioltásokat mérő próbák válaszait is különbözőnek találtuk, pl. a szeneszcencia folyamatát egyáltalán nem jellemezte határozott irányú változásuk, viszont segítségükkel kimutatható volt $O_2^{\cdot-}$ és $\cdot OH$, illetve 1O_2 antioxidánsok szerepe az UV-akklimációban. Ezen kísérlet tanulságai alapján azt is megvizsgáltuk, hogy a különböző korú levelek természetes módon eltérő antioxidáns kapacitásai helyett ugyanolyan korú levelek előkezeléssel mesterségesen befolyásolt különbségei is kiválthatnak-e hasonló UV védő hatást.

3. **Megállapítottuk, hogy dohány levelekben a néhány napos magas fény előkezeléssel indukálható magasabb antioxidáns kapacitás elősegítette az ezután alkalmazott kiegészítő UV-kezeléshez történő akklimációt (Majer és Hideg 2012b).** Ez az eredmény jelezte a lehetséges kereszt-tolerancia utak szerepét, ami feltételezi hogy az UV-B fényhez és a nagy intenzitású PAR-hoz történő alkalmazkodásban közös, antioxidáns védelmet indukáló utak játszhatnak szerepet. Ezt a feltételezést erősítette meg az a megfigyelésünk, hogy az UV-B abszorbeáló komponensek magas fény által is indukálhatóaknak bizonyultak. Ezért figyelmünket a flavonoidok, mint e vegyületek legjelentősebb csoportjának akklimációt elősegítő szerepére fordítottuk.

4. **Megfigyeltük, hogy a napfényhez adaptálódott dohánylevelek esetében a preventív, szabályozott energia disszipáló védelmi utak működése mellett is jelentős a 1O_2 specifikus antioxidánsok mennyiségének növekedése (Hideg és Majer 2010).** Mivel a magas fényhez történő rövidtávú, néhány napos alkalmazkodásban is központinak találtuk a 1O_2 -kioltás szerepét, ezért a természetes napfényben fejlődő hárs fény- és árnyékleveleinek flavonoidtartalmát ennek a paraméternek a vizsgálatával összefüggésben elemeztük.

5. **Megállapítottuk, hogy a hárs fény- és árnyéklevelek flavonoidtartalmának nagy mértékű különbségét elsősorban a kvercetin és kempferol arány fénylevelekbeni növekedése, illetve a miricetin fénylevelekbeni jelenléte jellemezte. Ezen flavonoidok antioxidáns kapacitásának és abszorpciós spektrumaik in vitro elemzése azt mutatta, hogy szerepük a fényaklimáció során inkább fotoinhibíció ellen védő antioxidáns, mint UV-szűrő (Majer és mtsai. *kézirat*). Mindez azt mutatja, hogy az együttesen UV-B abszorbeáló pigmentek néven jelzett vegyületcsoport szerepe az alkalmazkodási folyamatokban az eddigiekben feltételezettnél sokrétűbb és felveti annak lehetőségét, hogy a napfényhez történő akklimációban UV-indukálható reakcióutak is segíthetik a látható (PAR) komponens által okozott oxidatív stressz kivédését.**

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz kapcsolódó bírált folyóirat-közlemények:

Majer P, Stoyanova S., Hideg É (2010) Do leaf total antioxidant capacities (TAC) reflect specific antioxidant potentials? - A comparison of TAC and reactive oxygen scavenging in tobacco leaf extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100(1):38-43.

IF: 2,116

Hideg É, Majer P (2010) Factors contributing to the high light tolerance of leaves in vivo – Involvement of photo-protective energy dissipation and singlet oxygen scavenging. *Acta Biologica Hungarica* 61.(Suppl.): 49-60.

IF: 0,793

Majer P, Hideg É (2012a) Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a greenhouse. *Plant Physiology and Biochemistry* 50:15-23.

IF: 2,402

Majer P, Hideg É (2012b) Existing antioxidant levels are more important in acclimation to supplemental UV-B irradiation than inducible ones: Studies with high light pretreated tobacco leaves. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24(6): 598-606.

Majer P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Hideg É (*kézirat*) Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*.

Egyéb bírált folyóirat-közlemények:

Fehér-Juhász E.*, Majer P*, Sass L, Csiszár J, Turóczy Z, Mihály R, Mai A, Horváth VG, Vass I, Dudits D, Pauk J. Phenotyping shows improved physiological traits of wheat plants expressing the alfalfa aldo-keto reductase under drought. *kézirat*

Nagy B, Majer P, Mihály R, Dudits D, Horváth VG (2011) Transient and transgenic approaches for functional testing of candidate genes in barley. *Acta Biologica Szegediensis*. 55(1): 129-133.

Majer P, Sass L., Horváth VG, Hideg É (2010) Leaf hue measurements offer a fast, high-throughput initial screening of photosynthesis in leaves. *Journal of Plant Physiology*, 167(1):74-76.

IF: 2,677

Zok A, Oláh R, Hideg É, Horváth VG, Kós PB, Majer P, Váradi Gy, Szegedi E (2010) Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100(3):339-344

IF: 1,243

Konferencia kivonatok:

Majer P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Hideg É (2012) Acclimation to high light in linden leaves is aided by singlet oxygen neutralizing flavonoids. Abstracts of the Plant Biology Congress, 29 July-3 August 2012, Freiburg, Germany, pp. 370-371.

Hideg É, Majer P, Czégény Gy, Sándor Gy, Poage M, Dix PJ (2012) Consequences of enhanced chloroplast SOD activity on the acclimation of leaves to supplemental UV-B. Abstracts of the Plant Biology Congress, 29 July-3 August 2012, Freiburg, Germany, pp. 337.

Majer P, Hideg É (2012) Preceding high light acclimation promotes toleration of supplemental UV-B radiation via enhancing base antioxidant levels. Abstracts of the COST Action FA0906 WG3 mini-conference „Plant responses to ultraviolet radiation – roles of antioxidants and pro-oxidants” 2-3 February 2012, Copenhagen, Denmark, pp. 12.

Majer P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Hideg É (2011) Living under the sun: singlet oxygen neutralizing by flavonoids in sun and shade linden leaves. Abstracts of the COST Action UV4growth mini-conference „MetabolUV - Interactive effects of UV-B radiation with abiotic and biotic factors” 23-24 November 2011, Cork, Ireland

Majer P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Hideg É (2011) Singlet oxygen scavenging in linden leaves. (International Training Course Alumni Conference „Multidisciplinary Approaches to Biological Problems”, 1-3 September 2011, Szeged, Hungary

Majer P, Hideg É (2011) Age related differences in antioxidant responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to supplemental UV-B radiation. Abstracts of the 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 5-8 July 2011, Budapest, Hungary, pp. 115.

Majer P, Hideg É (2011) Are young ones more vigorous? A comparative study of photosynthesis and antioxidant responses of younger and older *Vitis* leaves under UV-B radiation in a green-house experiment. Abstracts of the 1st Annual Meeting of COST Action FA0906 UV4growth, 7-9 February 2011, Szeged, Hungary, ISBN 978-963-508-606-1, pp. 21.

Majer P, Sass L, Lelley T, Cseuz L, Vass I, Dudits D, Pauk J (2008) Testing drought tolerance of wheat by a complex stress diagnostic system installed in greenhouse. *Acta Biologica Szegediensis* 52(1):97-100.

Jancsó M, Majer P, Lantos C, Simon-Kiss I, Dudits D, Pauk J (2007) Diagnostic system for detection of drought tolerant rice genotypes. Proceedings of the 4th International Temperate Rice Conference, June 25-28, 2007, Novara, Italy, pp. 330-331.

Könyvfejezet:

Sass L, Majer P, Hideg É (2012) Leaf hue measurements: a high-throughput screening of chlorophyll content. In: *Methods in Molecular Biology* vol. 918:61-69. *High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols*. Ed: J. Normanly. Humana Press. ISBN 978-1-61779-994-5