

A β -INDOLIL-ECETSAV OXIDÁZ ÉLETTANI JELENTŐSÉGE
AZ ŐSZI BUZÁK FAGYÁLLÓSÁGÁBAN

Egyetemi doktori értekezés

Készítette: Kovács Ilona

Magyar Tudományos Akadémia
Mezőgazdasági Kutató Intézete
Martonvásár
1976

B 1315



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Az IES-oxidáz megoszlása	3
2.2. Az IES-oxidáz jellege	4
2.3. Az enzim aktivitását befolyásoló tényezők	9
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	14
3.1. A kísérletekhez felhasznált növény- anyag	14
3.2. A növények előkészítése	14
3.3. Nyers enzinkivonat készítése	15
3.4. A nyers enzinkivonat frakciókra bontása ammonszulfátos lecsapással	15
3.5. Az IES-oxidáz aktivitásának meghatá- rozása kolorimetrián	16
3.6. Oldható fehérje meghatározása ultra- viola abszorpció alapján	17
3.7. Oldható fehérje meghatározása kolo- rimetrián	18
3.8. Sejtmegnyulás intenzitásának megha- tározása	18

	Oldal
4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	19
4.1. A megnyúlásos növekedés intenzitásának kapcsolata a fagyállósággal	19
4.2. Az IES-oxidaz aktivitásának hőmérsékleti függősége	21
4.3. Az IES-oxidaz aktivitás változás indukciója alacsony hőmérséklettel	23
5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	26
6. ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK	32
7. IRODALOM	34

1. BEVEZETÉS

A növényteni kutatások elsőrendű feladata a termés hozam fokozása. A munka azonban nemcsak eredményeket ígérő eljárások és módszerek kidolgozására irányul, hanem a gyakorlatban esetleg csak a későbbiekben hasznosítható, elvontabb területekre is. A növény termésének tetszés szerinti befolyásolására, a növénytermesztés "iparosítására" csak akkor gondolhatunk, ha a termést befolyásoló tényezők mindegyikét részleteiben ismerjük. A gyakorlat számára tehát minden, a növények termését közvetlenül, vagy közvetve befolyásoló folyamat kutatása fontos.

Kontinentális éghajlatu hazánkban az őszi buza termésének kialakításában a fajták őszi sége, fagy és télállóképessége meghatározó szerepet játszik.

Az MTA Mezőgazdasági Kutató Intézetében Martonvásáron 1958 óta folyik a buza fagyállóságának élettani alapjai tisztázását célul tűző kutatómunka Dr. Dévay Márta vezetésével. A kutatások eredményei azt mutatták, hogy az őszi buzafajták télállósága az alacsony hőmérsékleten lezajló fotoszintézis intenzitásával, az asszimiláták szállítási irányával és a fajtákra jellemző növekedési reakciókkal kapcsolatos. Általában azok a fajták mutatkoznak jó fagyállóaknak, amelyeknél a fotoszintézis minimum hőmérséklete 0°C ,

vagy az alatt van, az asszimiláták raktározási helye a gyökér és a sejtosztódás intenzitása 5 C° alatti hőmérsékleten jelentősen lelassul, illetve fagypont körüli hőmérsékleten gyakorlatilag leáll /DÉVAY 1962, DÉVAY 1965, DÉVAY-RAJKI 1972, FEHÉR-DÉVAY 1975, DÉVAY-FEHÉR 1975/.

Bekapcsolódva a már folyamatban lévő kutatómunkába a csökkenő hőmérséklet indukálta növekedési redukció biokémiai mechanizmusát vizsgáltam. Tekintettel arra, hogy a növények növekedését elsősorban auxin szintjük szabja meg, a vizsgálatokat az endogén auxin szintet befolyásoló egyik enzim, a β -indolil ecetsav oxidáz aktivitás változásainak analizisével kezdtem.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mióta a sejt megnyulásának IES koncentrációtól való függősége ismert, azóta foglalkoztatta a fiziológusokat az IES koncentrációját befolyásoló enzim rendszer, amely aktivitásának mértéke egyben a növekedés helyi regulátora is minden sejtben, szövetben és szervben /GALSTON-DALBERG 1954/.

Tang és Bonner /1947/, valamint Wagenknecht és Burris /1950/ olyan enzimet figyeltek meg a növényi kivonatokban, amely az auxint fiziológiailag inaktív, ismeretlen vegyületté alakította át. Az enzimet auxin-oxidáznak nevezték el. Megjelölésére jelenleg β -indolil ecetsav oxidáz vagy IES-oxidáz nevet használják inkább.

2.1. Az IES-oxidáz megoszlása.

A növényi szervezeten belüli megoszlást tekintve az enzim jelentéktelen mértékben mutatható ki a fiatal szövetekben, az öregedés folyamán azonban mennyisége adaptíve emelkedik az auxin mennyiségének függvényében /GALSTON 1947, McRAE-BONNER 1953, GALSTON-DALBERG 1954, STOINER-YONEDA 1967/.

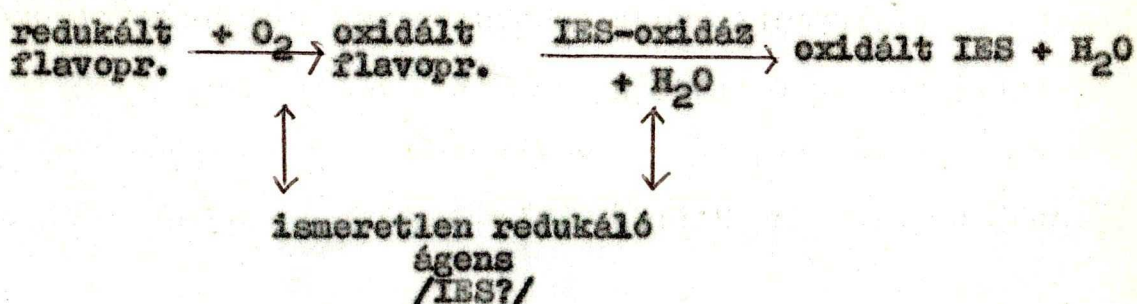
Az intracelluláris eloszlást illetően a rendelkezésünkre álló viszonylag kevés adatból egységes kép nem

alakítható ki. A borsó gyökerek IES-oxidázai membránhoz kötöttek, de KCl kezeléssel reverzibilisen eltávolíthatók /VAN DER MAST 1970/. Izawa /1961/ szerint az IES-oxidáz babban a mitokondriumokban található, Gordon /1958/ viszont az oldható frakcióban mutatta ki. Sági /1970/ a Lupinus albus hipokotiljában végzett vizsgálatai alapján jelentős mennyiségű enzimet talált az oldható frakcióban, de valószínűnek tartja a falhoz való kötődést és nem zárja ki a mitokondriumokban és riboszomákban lévő enzim lehetőségét sem.

2.2. Az IES-oxidáz jellege.

Az auxin oxidáz rendszer lényegében egy fényaktiválható flavoprotein, mely H_2O_2 -n keresztül nehézfém tartalmu enzimhez, peroxidázhoz kapcsolódik, s ez az utóbbi enzim végzi el a tényleges IES destrukciót /GOLDBERG 1957/. Az enzimrendszer működésére vonatkozóan Galston et al. /1952/ a következő sémát közölte:

fényaktiválható rész



A flavoprotein jelenlétét a fényaktivációra adott jellegzetes abszorpciós spektrum alapján bizonyította. A H_2O_2 intermedierként való részvételét a katalázzal és Mn-val való gátlás lehetősége igazolta, valamint az a tény, hogy az IES sötétben lejátszódó destrukcióját a H_2O_2 fokozta. A kataláz gátló hatása fénnel részlegesen megfordítható volt. A peroxidáz részvételére pedig a CN-dal végzett gátlási kísérletek eredményei utalnak.

Tekintettel arra, hogy az IES oxidálásában résztvevő enzim lényegében egy peroxidáz, lényeges kérdés volt annak eldöntése, hogy az IES-oxidáz külön enzimnek tekinthető-e, vagy maga a peroxidáz végzi az IES destrukcióját.

A vizsgálatok alapján több elképzelés is született:

A/ Két külön enzim létezik, az IES-oxidáz és a peroxidáz.

B/ Kétféle aktivitás tartozik egy enzimhez, a peroxidázhoz, melynek két aktív centruma van.

C/ Peroxidáz enzim család egyik tagjának az IES-oxidáz aktivitás az elsődleges formája.

A két külön enzim típusról szóló elgondolást Sequiera és Mineo /1966/ írták le, azon tapasztalatuk alapján, mely szerint a gyökérből készült friss enzinkivonat néhány hetes raktározás után elvesztette IES-oxidáz aktivitását, ugyanakkor peroxidáz aktivitása nem változott. A két

enzim hőmérsékleti inaktivációs pontja és pH optimuma szintén eltérő. Gelinas /1973/ szerint viszont egyetlen a dohányból izolálható enzim kivételével az IES-oxidázok peroxidáz enzimek.

Az egy enzimhez tartozó kétféle aktivitás elméletének fő bizonyítéka az a megállapítás, mely szerint a különféle tisztítási eljárások során a két típusu aktivitás együtt marad /RAY 1960, STUTZ 1958/, s hogy a hőmérsékleti inaktiváció mindkét esetben ugyanaz volt /RAY 1960/.

Siegel és Galston /1967/ szerint a peroxidázok kettős katalitikus funkciója az enzim két aktív centrumának eredménye. Megfigyelésüket arra alapozták, hogy mikor az apoenzimet vas prosztetikus csoportjától elválasztották, az apoenzim egymaga oxidálta az IES-t, de peroxidáz aktivitása nem volt. Ha viszont az apoenzimet és a prosztetikus csoportot újra egyesítették, a peroxidáz aktivitás részben visszaállt. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy az apoenzim az IES-oxidáz, amely aktivitásához vas protein jelenléte szükséges.

Hoyle /1972/ hasonló eredményre jutott tormaperoxidázból kivont apoenzim vizsgálatakor. Ku et al. /1970/ munkáiban viszont a savas butanollal apoenzimre és vas proteinre bontott tormaperoxidáz csaknem IES-oxidáz aktivitás mentes volt. Ennek a kérdésnek az eldöntésére Darbyshire /1973/ is végzett vizsgálatokat. Kísérleteiben a glikozilált

és nem-glikozilált enzim frakciókat hasonlította össze. Arra a következtetésre jutott, hogy az IES-oxidáz és peroxidáz aktivitásokat nem lehet külön választani.

A peroxidázok glukoprotein természetét már korábban is bizonyították /SAUNDERS et al. 1964, MORITA et al. 1962/, de ezt a peroxidáz frakciók megkülönböztetésére nem használták fel. Darbyshire /1973/ mutatta ki először, hogy a fejlődés korai szakaszában a nem-glikozilált enzim frakció van jelen nagyobb mértékben. Az elsődleges IES-oxidáz aktivitással rendelkező glikozilált frakció mennyisége csak a későbbiekben emelkedik.

Az elektroforetikus szétválasztás alkalmazása izoenzimekből összetevődő enzim családok létezését igazolta, amelyek közül mindig a körülményeknek legmegfelelőbb enzim működik. Shannon et al. /1966/ tornagyökérrel végzett vizsgálataiban hét peroxidáz izoenzimet különböztetett meg kromatográfiás viselkedésük, elektroforetikus vándorlásuk, spektrofotometriás sajátásaik, valamint aminosav és szénhidrát összetételük alapján. Bár az enzimek IES-oxidáz aktivitását párhuzamosan nem vizsgálta, a munka mégis e területen is figyelemreméltó a peroxidáz fizikokémiai jellemzőire vonatkozó adatainak uttörő jellege miatt.

Az IES-oxidáz izoenzim jelenlétét számos munka igazolta. MacNicol /1966/ négy izoenzimet mutatott ki elektroforézis segítségével, amelyek mindegyike katalizálhatja a

guajakol, illetve az IES-oxidációt, de az egyik katodikusan vándorló enzim IES-oxidáz:peroxidáz aránya kiemelkedően magas volt. Frenkel /1972/ peroxidáz izoenzimeket vizsgált körtében, paradicsomban és áfonyában. Az enzim kivonatban az IES-oxidáz:peroxidáz arány körtében 3:2, paradicsomban 1:1, áfonyában 5:1 volt. Stafford és Bravinder-Bree /1972/ cirokból izolált öt peroxidáz izoenzimet /három anodikus és két katodikus jellegűt/, melyek közül négynek IES-oxidáz aktivitása is volt, s az IES-oxidáz:peroxidáz arány 2, 5, 3 és 2 volt.

Nanda et al. /1973/ *Populus nigra*-val végzett gyökereztetési vizsgálataiban azt tapasztalta, hogy a gyökérművelet kialakulása az IES-oxidáz izoenzimekben bekövetkezett változással van összefüggésben.

Garay /1967/ tisztította az auxin oxidázt és azt egy peroxidáz izoenzimmel azonosította. Schneider és Wightman /1974/ szerint vannak tipikus peroxidáz enzimek, melyek a peroxidációs reakciókban igen aktívak, s az IES-t oxidálják, de csak igen kis mértékben. Más enzimek magas peroxidáz és magas IES-oxidáz aktivitással rendelkeznek és végül léteznek olyan IES-oxidázok, melyek peroxidáz aktivitással nem bírnak, vagy peroxidázok IES-oxidáz aktivitás nélkül. Mint az itt felsorolt eredményekből kitűnik, az enzimekre vonatkozó adatok igen sokrétűek és szerteágazók, egy azonban valószínűnek tekinthető - minden IES-oxidáz peroxidáz, de nem minden peroxidáz rendelkezik IES-oxidáz aktivitással.

2.3. Az enzim aktivitását befolyásoló tényezők.

Az IES-oxidáz működését számos belső és külső tényező befolyásolja. A belső szabályozó faktorok lehetnek maguk a hormonok vagy egyéb kémiai anyagok, külső tényezőként pedig elsősorban a fény és hőmérséklet vehető számításba.

A kémiai anyagok közül a fenol vegyületek, mint az IES-oxidáz modifikátorai említhetők. A monofenolok általában kofaktorok, a polifenolok inhibitorok az IES-oxidáz tekintetében /PILET 1964, 1966, GARAY 1967, GELINAS és POSTLETHWAIT 1969, RUNCOVA 1972/. Psenak et al. /1970/ fenolok és fenolglikozidok hatását vizsgálva megállapította, hogy a fenol serkentő, az eugenol és kinol gátló hatású volt. A szkopoletin és a kumársav koncentrációtól függően hatott az IES-oxidáz aktivitására, alacsony koncentrációban serkentette, magas koncentrációban gátolta /GARAY 1967, SCHAFER et al. 1971, SIROIS és MILLER 1972/. A Mn^{++} a vizsgálatok nagy részében pozitívan befolyásolta az enzim aktivitását /MORGAN et al. 1966, GALSTON és HILIMAN 1961, TAYLOR et al. 1968/.

Yoneda és Stoiner /1967/ Pharbitis nil-ből egy IES-oxidáz aktivitását gátló anyagot vont ki, amelyet I., II. és A-val jelölt, de nem azonosította. Mennyiségük a csucs-tól a bazális rész felé csökkent. A vegyületek feltehetően az internodiumok megnyulásának és a szövetek érésének szabályozásában játszanak szerepet.

Az IES-oxidáz aktivitását az auxinok endogén szintje is befolyásolja. Ezt a lehetőséget a külsőleg adagolt hormonokkal is sikerült alátámasztani. Whitmore /1971/ megállapította, hogy a külsőleg adagolt IES egyes peroxidáz izoenzimek aktivitását csökkentette. Az IES-re reagáló enzimek közül kettőnek IES-oxidáz aktivitása is volt. Hidroxiprolin és az IES egyidejű alkalmazásakor az IES hatástalanná vált.

Bireczka et al. /1973/ a sebzés, az IES adagolás és az etilén hatását vizsgálta az izoenzimek aktivitására dohány-bél és burgonya gyökér szövetekben. A sebzés indukálta peroxidáz aktivitás emelkedés a burgonyában kettő, a dohányban hét izoperoxidáz aktivitás emelkedésének az eredménye. Az exogén IES burgonyában csak gyenge gátlást fejtett ki az egyik sérülés indukálta izoperoxidázra, dohányban viszont mind az induktív, mind a konstitutív izoenzimek aktivitását gátolta.

A 2,4-D, 2,4-T és a kintin adagolás szintén befolyásolta az IES-oxidáz aktivitását. Az IES koncentrációjától függően - más izoenzim képződését serkentette. A 2,4-D és 2,4-T hasonló hatással bírt. A kintin koncentrációjának növelésekor a hatás gyengült, majd megszűnt /LEE 1971, 1972/. A kintin néhány katódikus és két anódikus izoenzim működését serkentette. Az IES szintén stimuláló hatású volt ezekre az enzimekre /GASPAR et al. 1973/. Bolduc /1970/ megállapította, hogy őszi búzában IES-oxidáz specifikus aktivitása a buza

csiranövények hajtásaiban tízszeresére növekszik a kontrolhoz képest, GA kezelés hatására.

A külső faktorok IES-oxidáz aktivitására kifejtett hatásával számos szerző foglalkozik. A fény stimuláló hatással rendelkezik az enzim szintézisére /GALSTON és BAKER 1951, BRAUNER 1953, GARAY 1967/. A növények növekvő vízhiányával az IES-oxidáz aktivitása csökken, s ilyen esetben nagyobb enzimaktivitást az idősebb szövetekben sem lehet kimutatni /DARBYSHIRE 1971/.

A hőmérséklet és az IES-oxidáz aktivitás közötti kapcsolattal foglalkozó munkák az alacsony hőmérsékleti hatásokat analizálják elsősorban a peroxidáz izoenzimek összetételében bekövetkező változások tükrében.

Gerloff et al. /1967/ az oldható fehérjék és peroxidáz aktivitás változásokat figyelte meg fagy- és nem fagyálló lucerna fajtákban. Az oldható fehérje tartalom növekedett a hidegkezelés során, s az izoperoxidáz összetételben is változás következett be. A fagyálló fajtákban két izoenzim megjelenését sikerült kimutatni. A peroxidáz enzimek aktivációs energiája alacsonyabb volt 6 C⁰-on, mint 20 C⁰-on búzában, s az izoperoxidázok összetételében hideg hatására kvantitatív változás lép fel /ROBERTS 1967 b, 1969/. McCown et al. /1969/ szegfűféléknél mutatja ki, hogy a fagyálló fajtákban hideg hatására újabb peroxidáz izoenzimek szintetizálódnak.

Krasnuk et al. /1975/ az oldható fehérje, a peroxidáz, IES-oxidáz és polifenoloxidáz valamint a fagyállóság közötti összefüggést vizsgálta lucernában. Azt tapasztalta, hogy az oldható fehérje tartalom, s az enzimek aktivitása nő hidegkezeléskor, ami összhangban van Roberts /1967 b és 1969/ megállapításával. Az izoenzim garnitúrában észlelhető csekély változás a fajtától, környezeti hatástól, az extrakcióhoz használt oldószertől és az alkalmazott szubsztráttól függött. Hall et al. /1970/ szerint a peroxidáz mint degradáló rendszer lehet jelentős az edződés folyamán.

Kacperska és Palacz /1974/ vizsgálta a peroxidázok hideg indukálta változásait répában. Megállapította, hogy az enzim aktivitás változások a télállósággal kapcsolatosak. Az oldható frakcióban jelenlévő peroxidázok aktivitása tízszer magasabb a fagyálló, mint a nem fagyálló fajtákban. A megnövekedett aktivitás az oldható peroxidáz tartalom növekedésének és a csökkent aktivációs energiának tulajdonítható. Vizsgálatai alátámasztották Roberts /1967 b, 1969/ aktivációs energiára és Bolduc /1970/ megnövekedett aktivitásra vonatkozó észrevételét.

Az IES-oxidáz aktivitást befolyásoló tényezők közül a hideg hatással kapcsolatban irodalmi adattal alig rendelkezünk. Bolduc et al. /1970/ a gibberellinsav IES-oxidáz aktivitására kifejtett hatásának vizsgálatakor beszámol arról, hogy a buza növényi kivonatok IES-oxidáz aktivitása

hideghatásra tízszeresére emelkedett a kontrolhoz képest. Szerző vizsgálataiban azonban az enzimaktivitásokat a szokásos szobahőmérsékleten mérte. A vernalizáció, illetve az edzés hőmérséklete pedig 0°C körül van. Ebben a folyamatban csak azok az enzimek vehetnek részt, amelyek ezen a hőmérsékleten is aktívak. Ezért a szobahőmérsékleten végzett aktivitás mérések nem utalnak arra, hogy az alacsony hőmérsékleten lezajló anyagcserében ténylegesen milyen változás következett be.

Feladatunkul tűztük ki tehát, hogy az IES-oxidáz aktivitás, hideghatás és a növekedés redukció kapcsolatát tanulmányozzuk, szem előtt tartva az alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkező izoenzimek képződésének lehetőségét.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletekhez felhasznált növényanyag.

A vizsgálatokhoz különböző fagyállóságu őszi búzát használtunk fel. A felhasznált anyag azonos volt a KGST együttműködés "A fagyállóság genetikai és biokémiai alapjai" c. témájának kísérleti anyagával, amelyet Oikov /General - Toshevo/ bocsátott rendelkezésünkre. A Fertődi 293, a Bánkúti 1201, továbbá a Martonvásári 2 fajták Balla L. /Martonvásár/ szaporításából származtak.

KGST együttműködés keretében vizsgált fajták: Triumph, Kasticka, Ruszalka, Sonore 64, Luna, Orlando, Grana, Odesszkaja 51, Minhardi, Mironovszkaja 808, Odesszkaja 16 és Beosztaja 1 fajták voltak. A magyar fajtákat a Fertődi 293, a Bánkúti 1201 és a Martonvásári 2 képviselte.

3.2. A növényanyag előkészítése.

Csiráztatáshoz a magokat 0,3 %-os brómos vízzel fertőtlenítettük, majd 12 órán keresztül szobahőmérsékleten duzzasztottuk, s végül ugyanezen a hőmérsékleten 24 óráig csiráztattuk. A csiranövények hidegkezelését hűtőszekrényben $0 \pm 0,5$ °C-on végeztük. Ezen a hőmérsékleten a jarovi-

záció normális ütemben folyik, a sejtesztódás gyakorlatilag leáll /DÉVAY 1962/. A jarovizációhoz szükséges oxigénről gyakori szellőztetéssel gondoskodtunk.

Azokban a kísérletekben, ahol kloramfenikolt /CAP/ mint fehérjeszintézis gátlót alkalmaztunk, az anyagot a már kicsírázott buzaszemekre finom permet alakjában vittük fel, 50 g szárazsúlyra 50 ml 500 ppm-es oldatot használva. A permetezés után néhány óráig hagytuk az anyagot felszívódni és ezután kezdtük meg a hidegkezelést.

3.3. Nyers enzinkivonat készítése.

Az izolált csirákat /30 csirát 3 ml pufferban felvéve/ lehűtött mozsárban kevés analitikai kvarchomokkal homogenizáltuk, 0 C°-os McIlvain pufferral pH = 5,0. A homogenizátumot teljesen tisztára centrifugáltuk 5000 rpm/20 perc.

3.4. A nyers enzinkivonat frakciókra bontása ammóniumszulfátes lecsapással.

500 buza-csirát hideg, lehűtött mozsárban kevés analitikai kvarchomokkal, 60 ml McIlvain pH = 5,0 pufferral, amely puffer 0,1 telítési %-nak megfelelő mennyiségű ammóniumszulfátot is tartalmaz, homogenizáltuk. A homogenizátu-

mot éjszakára állni hagytuk hűtőszekrényben $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd lecentrifugáltuk 5000 rpm/20 percig. A felülusztót leöntöttük és ugyanolyan összetételű pufferral, mint a homogenizáláshoz használtunk, 100 ml-re töltöttük fel. A homogenizátumot 0,1 - 1,0 telítési % között 0,1-es léptékekben ammóniumsulfát hozzáadásával frakcionáltuk. Minden lépés között 2-2 órás állási időt hagyva. A centrifugálás 5000 rpm/20 perc történt. A csapadékot frakciónként 5-5 ml McIlvaine $\text{pH} = 5,0$ pufferba vettük fel.

3.5. Az IES-oxidáz aktivitásának meghatározása kolorimetrián /GORDON és WEBER 1951/.

A reakcióelegy 3 ml enzinkivonatot $2,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ IES-t, 10^{-4}M DCP-t, 10^{-4}M MgCl_2 -t tartalmazott, valamint annyi puffert, hogy a végső térfogat 10 ml legyen.

Vakpróba: ugyanilyen reakcióelegy IES nélkül.

Kontrol: a reakcióelegy összetétele ugyanez, de az enzinkivonatot felfőztük.

A reakcióelegyet 30 percig sötét termosztátban $0, 5, 10, 15, 20, 25$ és $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, majd mértük az elegy oxidálatlan IES tartalmát. E célból 5 ml reakcióelegyhez 10 ml Gordon-Weber /1 ml $0,5\text{ M FeCl}_3$ + 50 ml 40 %-os perklorsav/ reagenst adtunk, s 30 percre sötét termosztátba tettük. Az IES-re jellemző vörös színreakció a 20. percben

éri el maximumát és utána egy óráig állandó. Az optikai denzitást Beckman spektrofotométerben 510 mμ hullámhosszúságnál mértük, vakpróba ellenében. Az enzimaktivitást az elbomlott IES μg/mg fehérje/30 perc értékben fejeztük ki.

Az enzim aktivációs energiájának értékelésére az enzimaktivitások Arrhenius görbéjét használtuk fel. Az aktivációs energia számolása az alábbi képlet alapján történt:

$$E = \frac{\ln \cdot k}{\cdot T} \cdot RT^2 \text{ kcal/mol}$$

ahol E az aktivációs energia, k sebességi állandó, R egyetemes gázállandó, T abszolút hőmérséklet.

3.6. Oldható fehérje meghatározása ultraviola abszorpció alapján /COLOWICK - CAPLAN 1957/.

Az ammoniumsulfátos lecsepások után az oldható fehérjék mennyiségét 280/260 mμ-nál mért abszorpciójuk hányadosa alapján számítottuk, az alábbi képlet alapján:

$$\text{fehérjetartalom ng/ml} = F \times l/d \times D_{280}$$

ahol F faktor, d a kuvetta vastagsága cm-ben kifejezve, D_{280} pedig a 280 mμ-nál mért abszorpciós érték.



3.7. Oldható fehérje meghatározása kolorimetrián

/LOWRY et al. 1951/.

Nyers enzinkivonatot 1:1 arányban 20 %-os triklórecetsavval /TCA/ kevertük össze. 20 percig 90 C°-on történő precipitáció után 20 percig 5000 rpm-mel centrifugáltunk. A supernatant elöntöttük, a csapadékot 5 %-os TCA-val átmostuk és centrifugáltuk, majd 0,1 N NaOH-ban oldottuk, s tisztára centrifugáltuk. 10 perces állás után 0,5 ml Folin reagenst adtunk az oldathoz és 30 perc múlva 750 mμ hullámhosszuságnál mértük a kapott szint. Kalibrációs görbét 50-250 μg/ml albuminoldattal készítettünk.

3.8. Sejtmegnyulás intenzitásának meghatározása.

A buza szemeket 12 óráig duzzasztottuk, majd 24 óráig előcsiráztattuk. Az előcsiráztatott anyagot műanyag dobozba perlitba vetve 20 C°-on, fénymentes körülmények között neveltük tovább mindaddig, míg a koleoptilok el nem érték a 20 mm hosszúságot. Ezután a koleoptilból 5 mm-es darabokat vágunk ki a csucstól 2 mm távolságra, s a kis szegmentekből 10-10 darabot McIlvain puffert /pH = 6,0/ és 1 % nádcukrot tartalmazó fiolában helyeztünk el 24, 48, illetve 72 órás időtartamra, 5 és 25 C°-ra.

Az inkubálás után mértük a koleoptil darabok megnyulását, s a növekedés mértékét kiindulási koleoptil hosszúság %-ban fejeztük ki.

4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

A fagypont körüli hőmérsékleteken lezajló sejtosztódás intenzitása és a fagyállóság közötti összefüggések ismertek /DÉVAY 1962/, az auxin irányította sejtmegnyulás és a fagyállóság közötti kapcsolatokra utaló irodalmi adattal viszont nem rendelkezünk. Az auxin anyagcsere és fagyállóság vonatkozásában az első feladatunk tehát a megnyulásos növekedés és a fajták fagyállósága közötti korreláció vizsgálata volt.

4.1. A megnyulásos növekedés intenzitásának kapcsolata a fagyállósággal.

A vizsgálatokat 15, fagyállóságukban különböző buzafajtán végeztük el. A megnyulásos növekedés intenzitásának meghatározására az osztódó sejtet nem tartalmazó koleoptilokat használtuk fel. A fajták fagyállóságára vonatkozó adatokat Koch /1975/ és Balla /1975/ azonos anyagon végzett mérései alapján állítottuk össze /1. táblázat/.

A mérések arra a kérdésre kívántak választ adni, hogy létezik-e korreláció és ha igen, milyen fokon az őszi buza fajták megnyulásos növekedésének 5 C°-on mérhető intenzitása és a fajták fagyállóságának mértéke között. A sejt-

1. táblázat

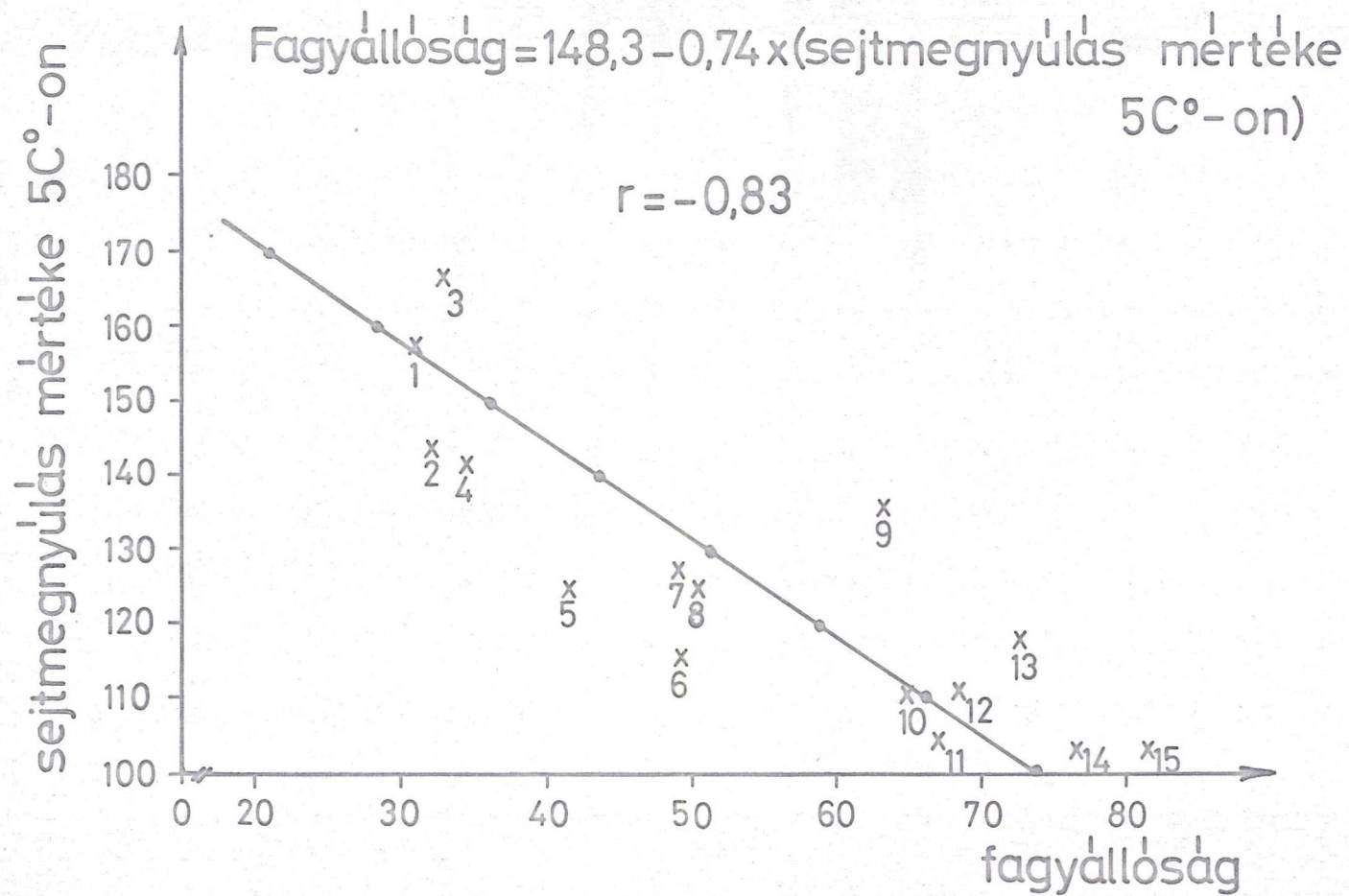
A különböző buzafajták fagyállósága

/KOCH 1975, BALLA 1975/

Fajta	Fagyállóság mértéke ^x
Trumpf	30,5
Kasticka	31,5
Ruszelka	32,1
Sonore 64	34,9
Luna	41,3
Orlando	48,7
Grana	49,3
Fertődi 293	50,0
Odesszkaja 51	63,3
Bánkúti 1201	65,0
Minhardi	67,0
Mironovszkaja 808	67,9
Odesszkaja 16	72,5
Martonvásári 2	77,2
Bezosztaja 1	81,6

^xA fagyállóság mértéke: a -14 C° hőmérsékleti kezelésnek alávetett buzanövény túlélési százaléka.

1. ábra. Koreláció a megnyúlásos növekedés intenzitása és a buzafajták fagyállósága között. Vizsgálati anyag: buza hipokotil. Fajták: Trumpf /1/, Kasticka /2/, Ruzsalka /3/, Sonore /4/, Luna /5/, Orlando /6/, Grana /7/, Fertődi 293 /8/, Odesszkaja 51 /9/, Bánkúti 1201 /10/, Minhardi /11/, Mironovszkaja 808 /12/, Odesszkaja 16 /13/, Martonvásári 2 /14/, Bezostaja 1 /15/. Fagyállóság: a -14°C hőmérsékleti kezelésnek alávetett buzanövények életbenmaradási %-a.



megnyulás intenzitása és a fagyállóság mértéke között fennálló összefüggéseket az 1. ábra szemlélteti. A növekedési intenzitást bemutató adatok az 5 °C-on mért növekedést adják meg 72 órás inkubációs idő után a kiindulási hosszúság %-ában.

Az ábra adataiból világosan látható, hogy szoros korreláció áll fenn a sejtmegnyulás intenzitása és a fajták fagyállósága között. A regresszió $-0,83$. A kapott összefüggések lényegében alátámasztják a sejtosztódás és a fagyállóság kapcsolatáról közölt adatokat /DÉVAY 1962/. Nemcsak az intenzívebb sejtosztódás, de az alacsonyabb hőmérsékleten lezajló intenzívebb sejtmegnyulás is alacsonyabb fagyállósággal kapcsolódik, és fordítva a gyengébb növekedési intenzitás a fajták jobb hidegtűrésével együtt jelenik meg.

Ismeretes, hogy a sejtmegnyulás intenzitásának elsődleges szabályozója az auxin szinten keresztül az IES-oxidáz tevékenysége. A növények fagyállóságával kapcsolatos növekedési intenzitás csökkenés, az alacsony hőmérsékleten lezajló folyamat eredménye. Arra viszont, hogy az IES-oxidáz enzim e hőmérsékleten egyáltalán aktív-e, irodalmi adattal nem rendelkezünk. A továbbiakban tehát vizsgáltuk a buza csírák IES-oxidáz aktivitásának változását az inkubációs hőmérséklet függvényében.

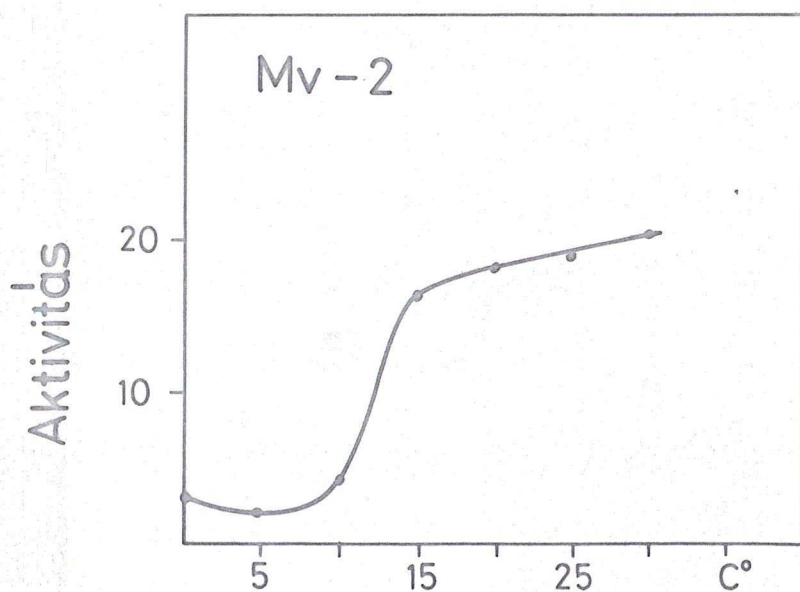
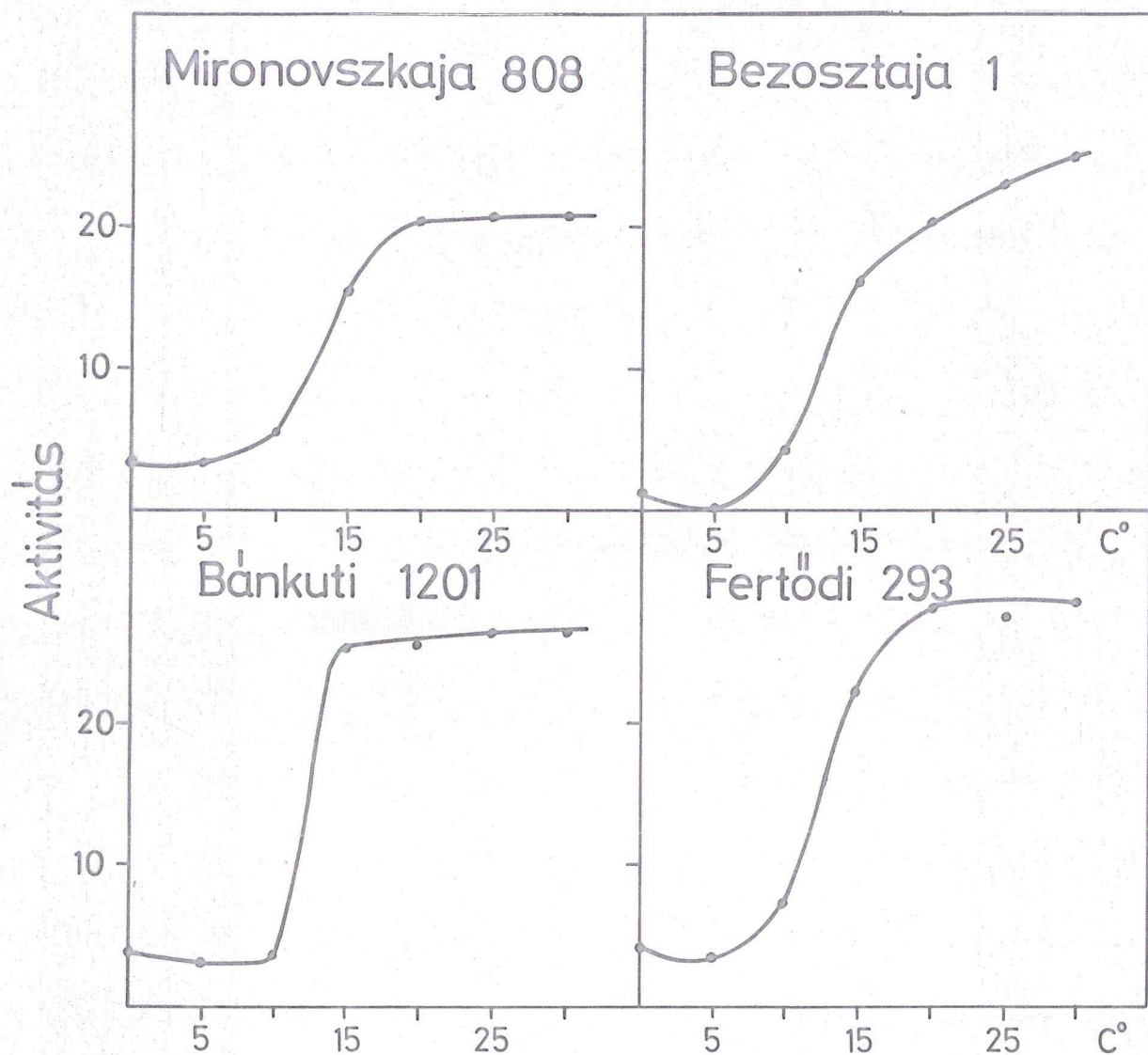
4.2. Az IES-oxidáz aktivitásának hőmérsékleti függősége.

A csiranövényekből extrahált IES-oxidáz aktivitásának hőmérsékleti függőségét 0-30 °C hőmérsékleti tartományban vizsgáltuk. Az enzim specifikus aktivitását a lebontott IES µg/mg fehérje/30 perc viszonylatában adtuk meg. A különböző hőmérsékleteken mért aktivitásokat a 2. ábra szemlélteti.

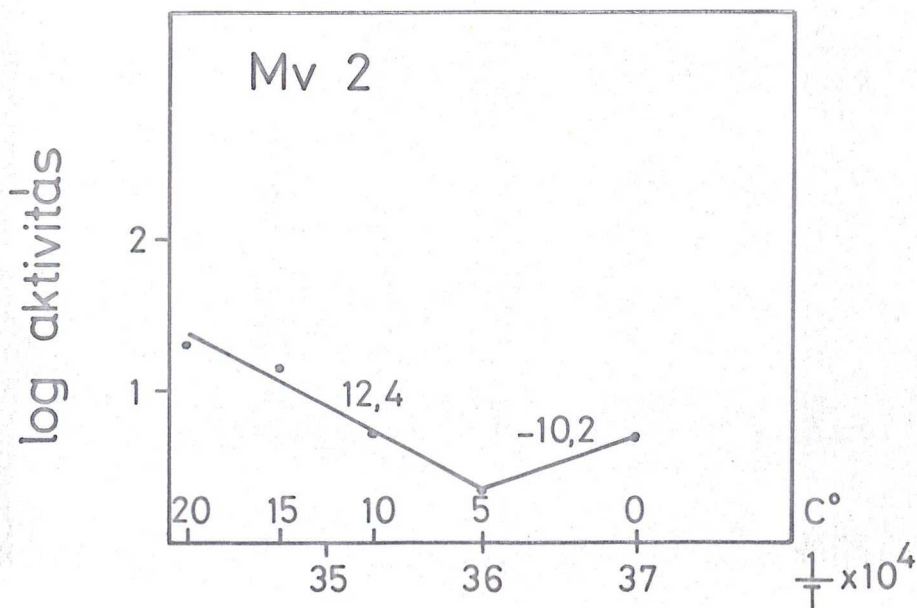
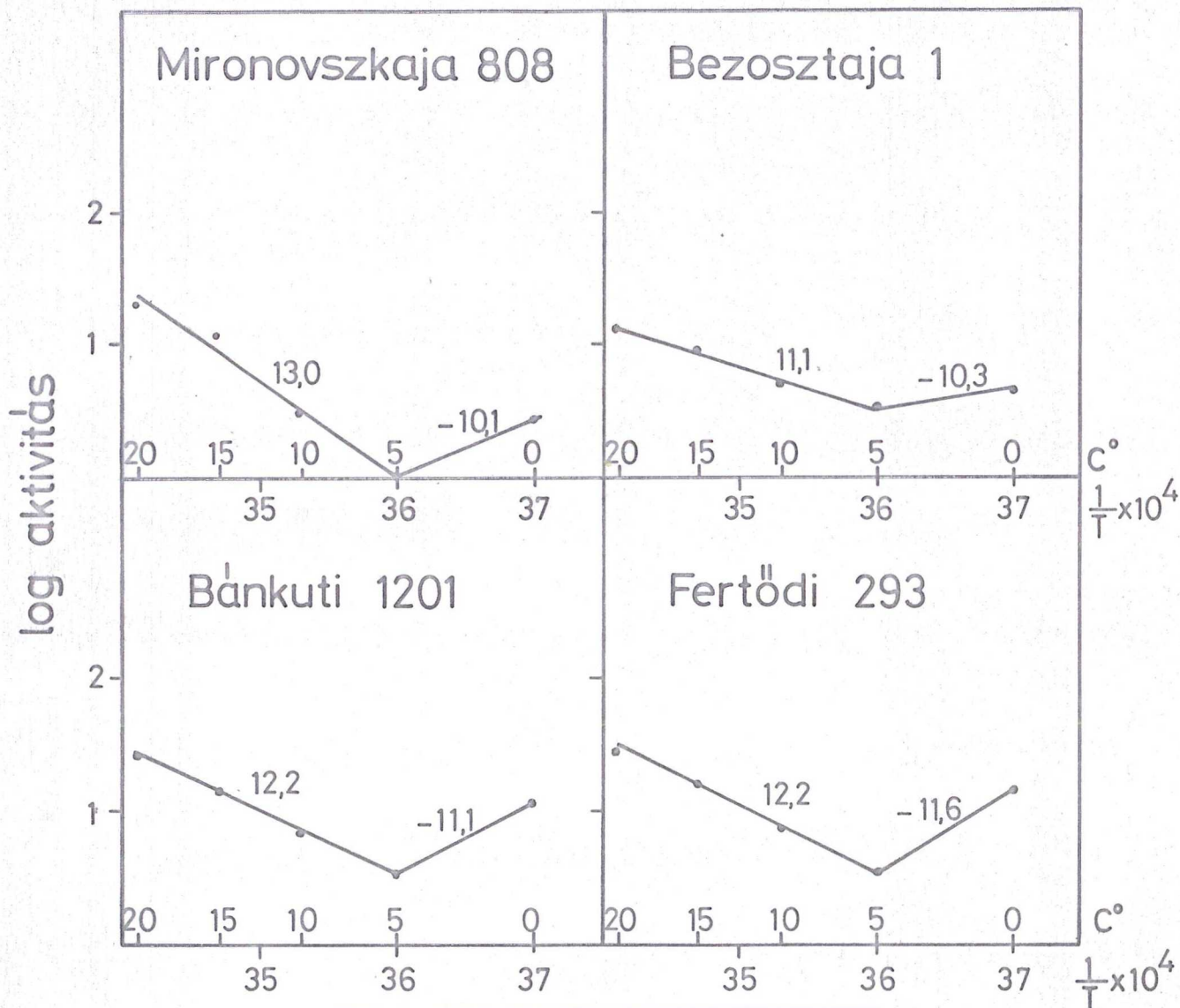
Az enzim aktivitásának hőmérsékleti függősége az egyes fajtákban eltérő. A Bánkúti 1201 és a Martonvásári 2 fajtánál az aktivitás általában 10 és 15 °C között exponenciálisan emelkedik a hőmérséklet emelkedésével. Ez az exponenciális szakasz a többi fajtánál 5 és 20 °C közé tehető. Mindegyik fajtánál megfigyelhető viszont, hogy az IES-oxidáz a 0-5 °C-os hőmérsékleti tartományban is jelentős aktivitással rendelkezik, sőt a hőmérséklet csökkenésével, ha kis mértékben is, az aktivitás emelkedik.

Az IES-oxidáz aktivitás hőmérsékleti függőségére vonatkozóan az enzim aktivitás Arrhenius egyenleteinek analizálásával juthatunk közelebb. Ha az aktivitás logaritmusát ábrázoljuk az abszolút hőmérséklet reciprokanak függvényében, megfigyelhető hogy a görbe két szakaszra oszlik /3. ábra/. Az első szakasz az 5 °C fölötti hőmérsékleti tartományokra jellemző. Az Arrhenius görbe 5 °C-nál megtörik és a két szakasz enzimeire jellemző aktivációs energia eltérő. Az 5 °C alatti hőmérsékleti tartományban az érték alacsonyabb, mint 5 °C fö-

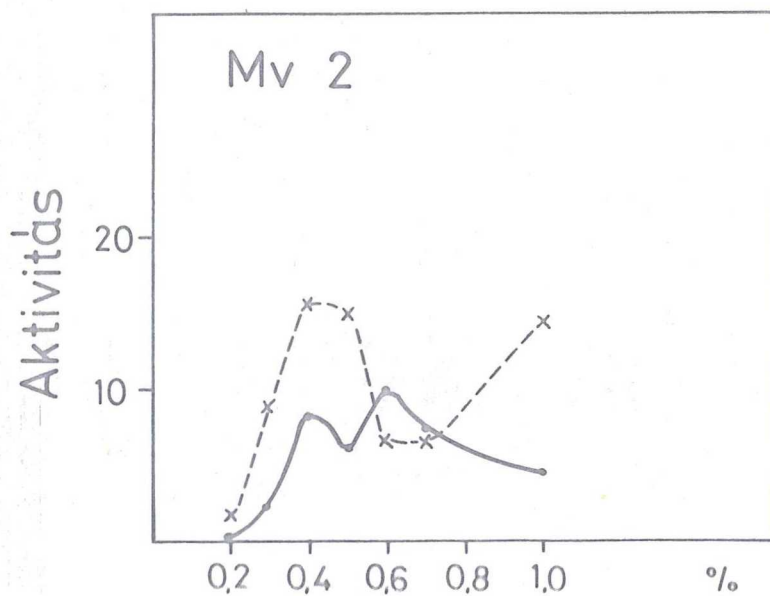
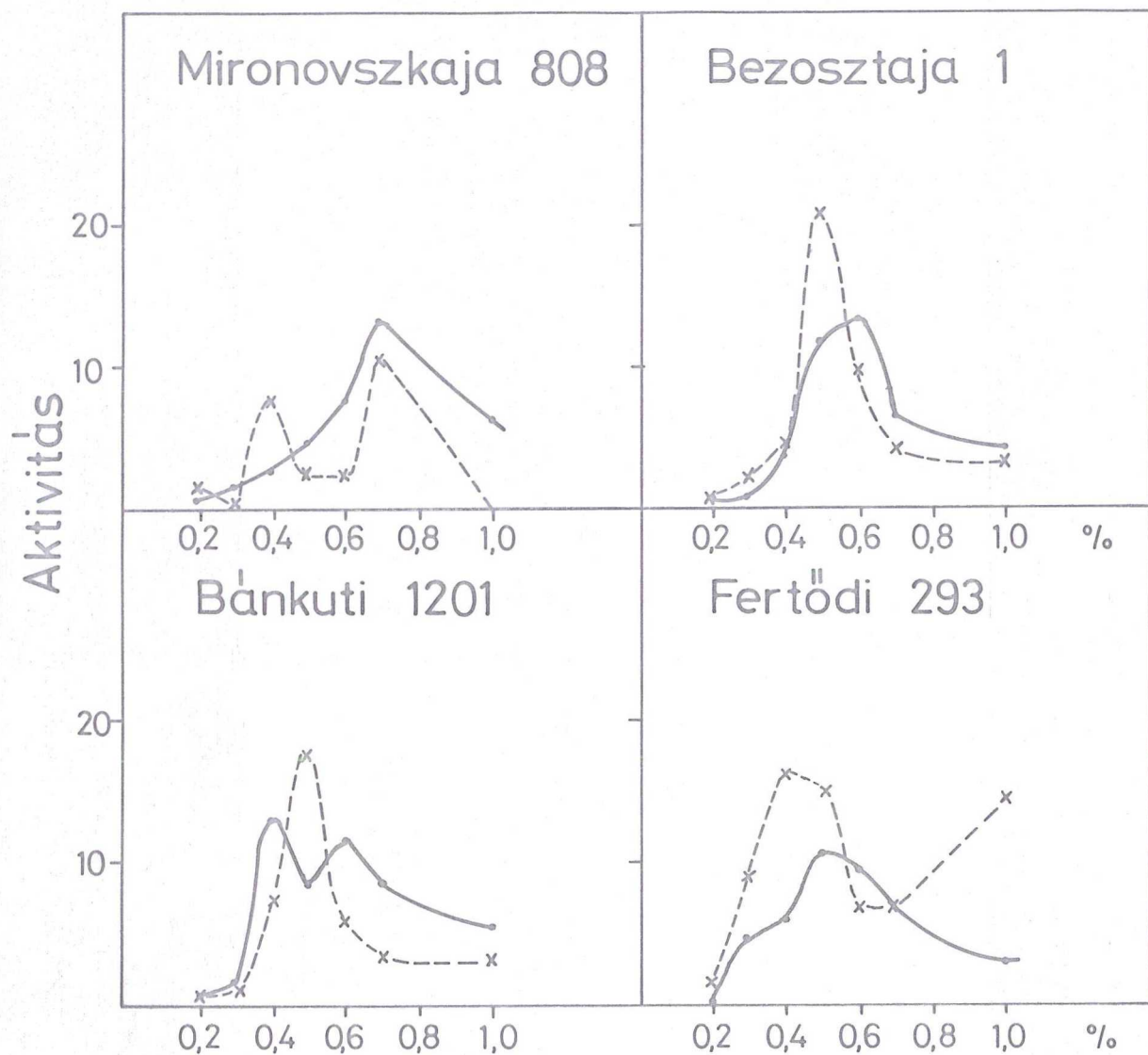
2. ábra. Az IES-oxidáz aktivitásának hőmérsékleti függősége buza csiranövényekben. Vizsgálati anyag: buza csiranövények nyers enzimkivonata. Kivonás McIlvain pufferrel, pH 5. Enzimaktivitás meghatározása: 0, 5, 10, 15, 20, 25 és 30 C° inkubációs hőmérsékleten. Aktivitás: oxidált IES $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje/30 perc.



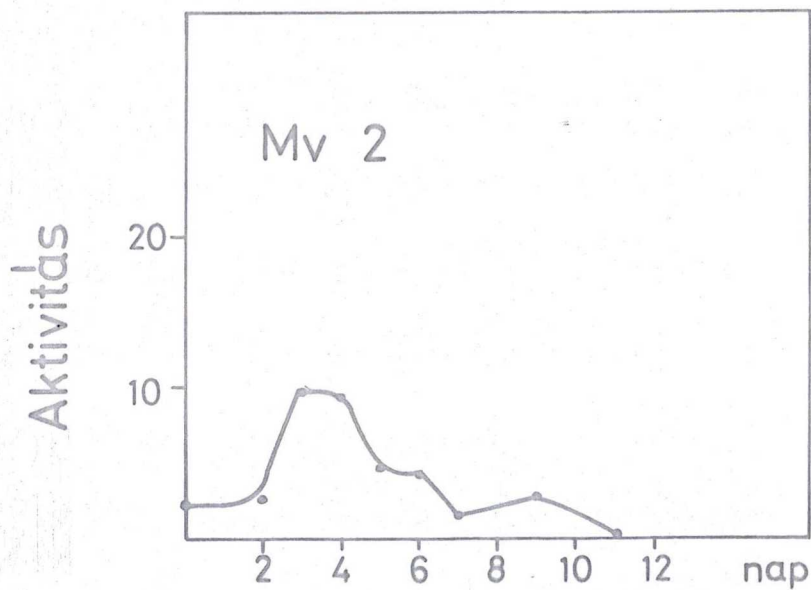
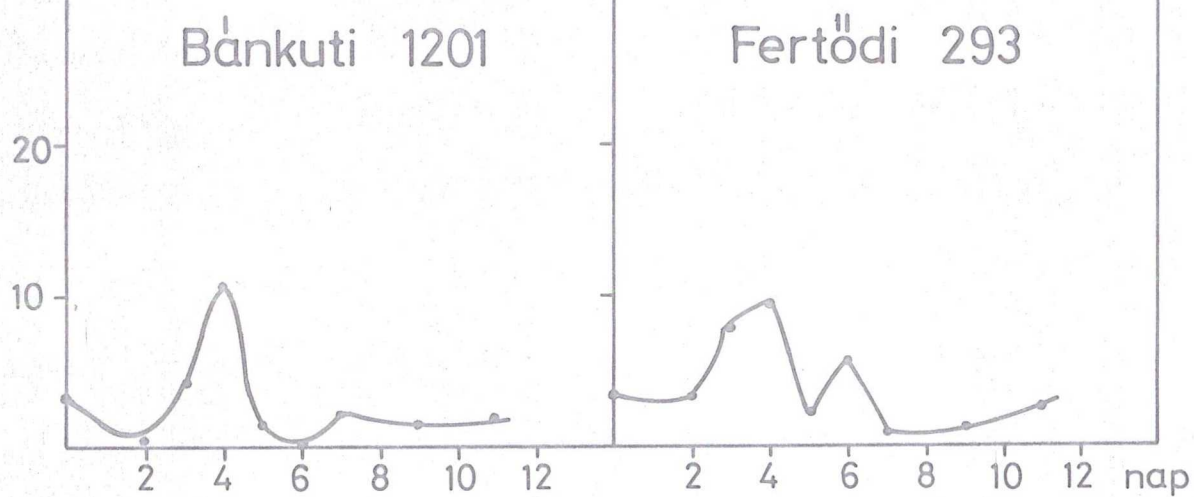
3. ábra. Az IES-oxidáz aktivitás változás Arrhenius görbéi.
Vizsgálati anyag: buza csiranövények nyers enzim-
kivonata. Az enzimaktivitás meghatározva: 0, 5, 10,
15, 20 C° hőmérsékleten.
Aktivitás: oxidált IES $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje/30 perc.



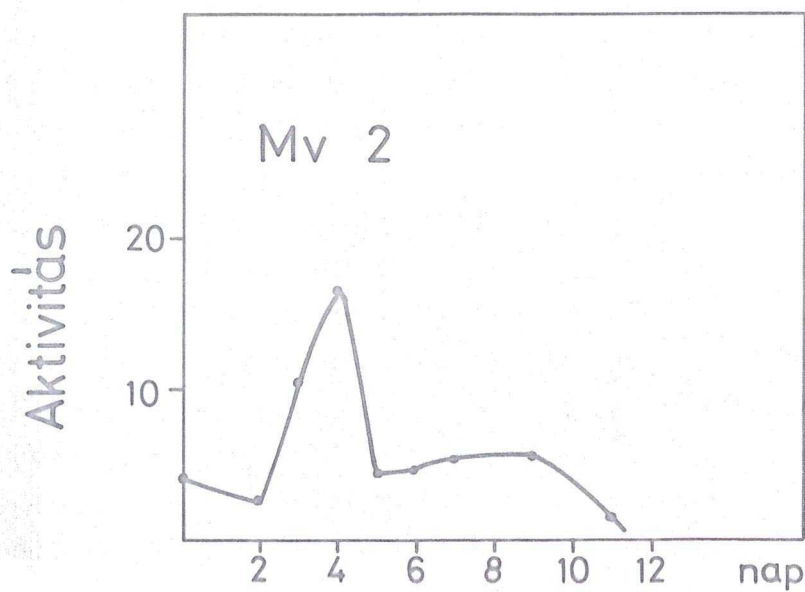
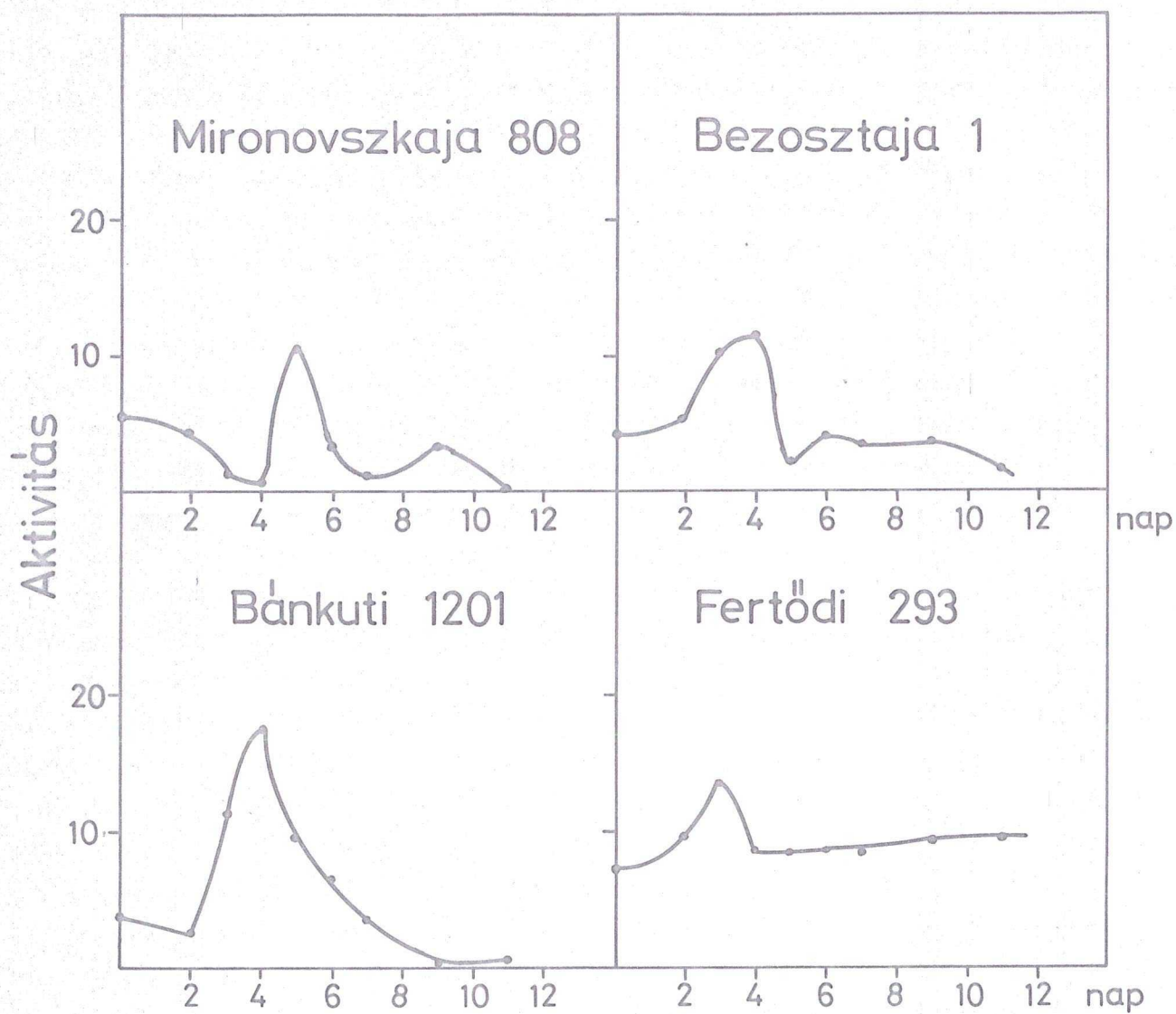
4. ábra. Az IES oxidáz frakciókra bontása ammoniumszulfátos lecsapással. Vizsgálati anyag: buza csiranövények nyers enzimkivonata. Frakcionálás: különböző telítettségű ammoniumszulfát oldattal, 0,1 - 1,0 telítettségi százalék között, 0,1 léptékben. Az egyes frakciók visszaoldása: McIlvain pufferrel, pH 5. Aktivitás meghatározva: 5 C° /-----/ és 25 C° /———/ inkubációs hőmérsékleten.
Aktivitás: oxidált IES µg/mg fehérje/30 perc.



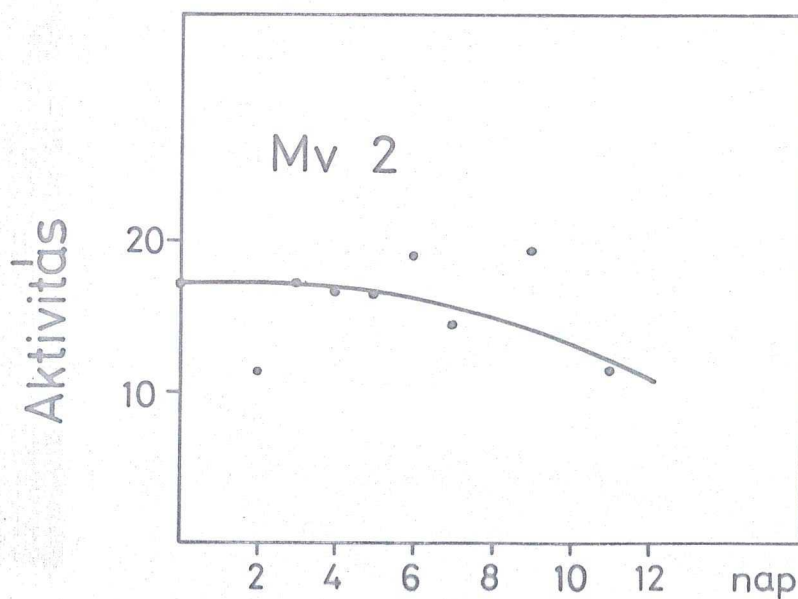
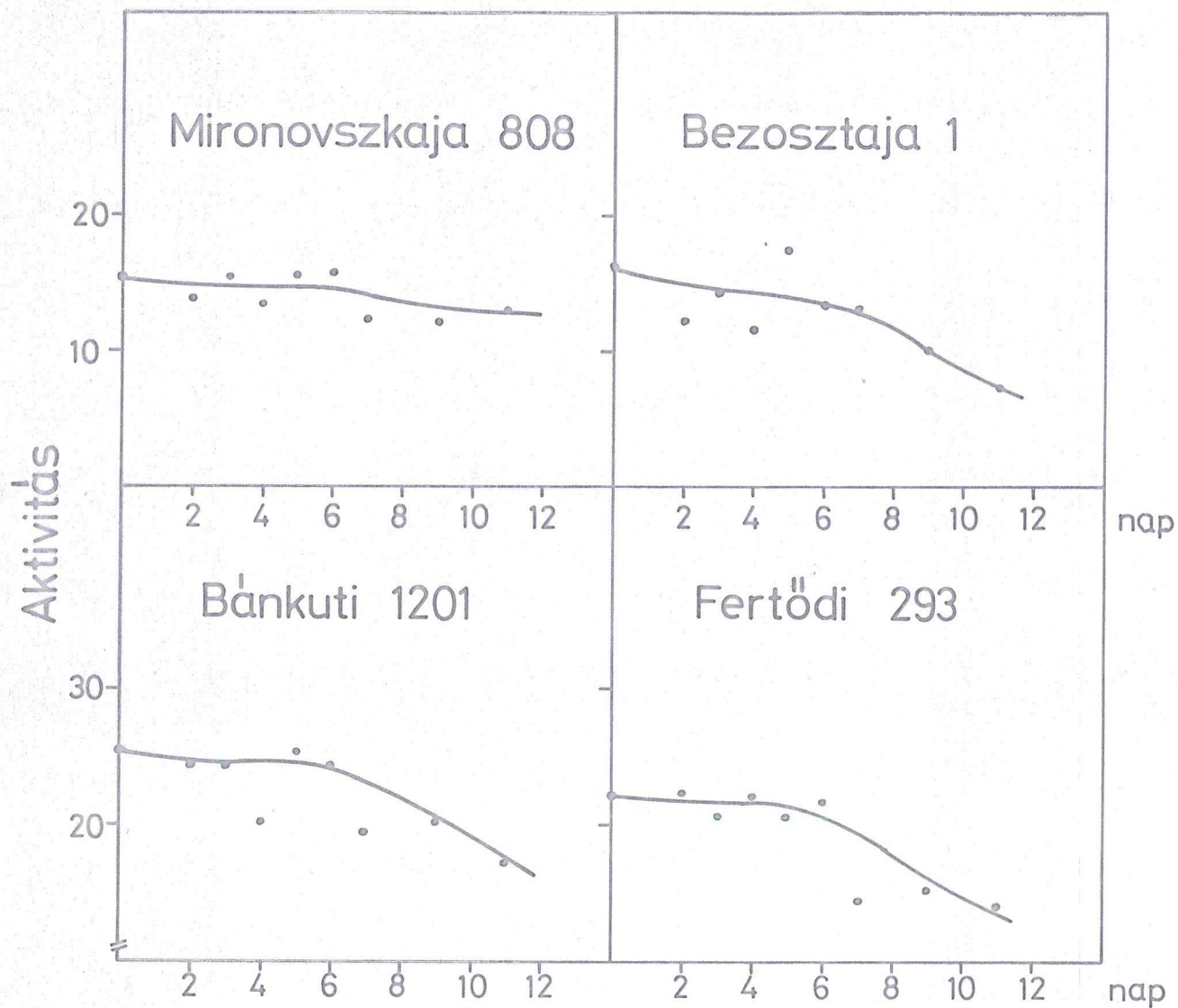
5. ábra. Az edzés hatása a buza csiranövények 5 C° inkubációs hőmérsékleten mérhető IES-oxidáz aktivitására. Vizsgálati anyag: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 és 12 napig 0 C° hőmérsékleten edzett buza csiranövények nyers enzinkivonata. Aktivitás meghatározva: 5 C° inkubációs hőmérsékleten. Aktivitás: oxidált IES µg/mg fehérje/30 perc.



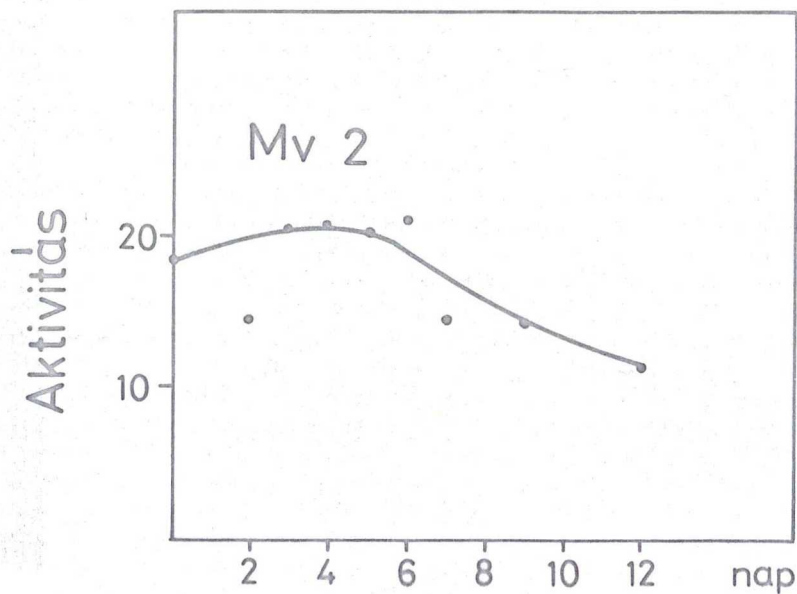
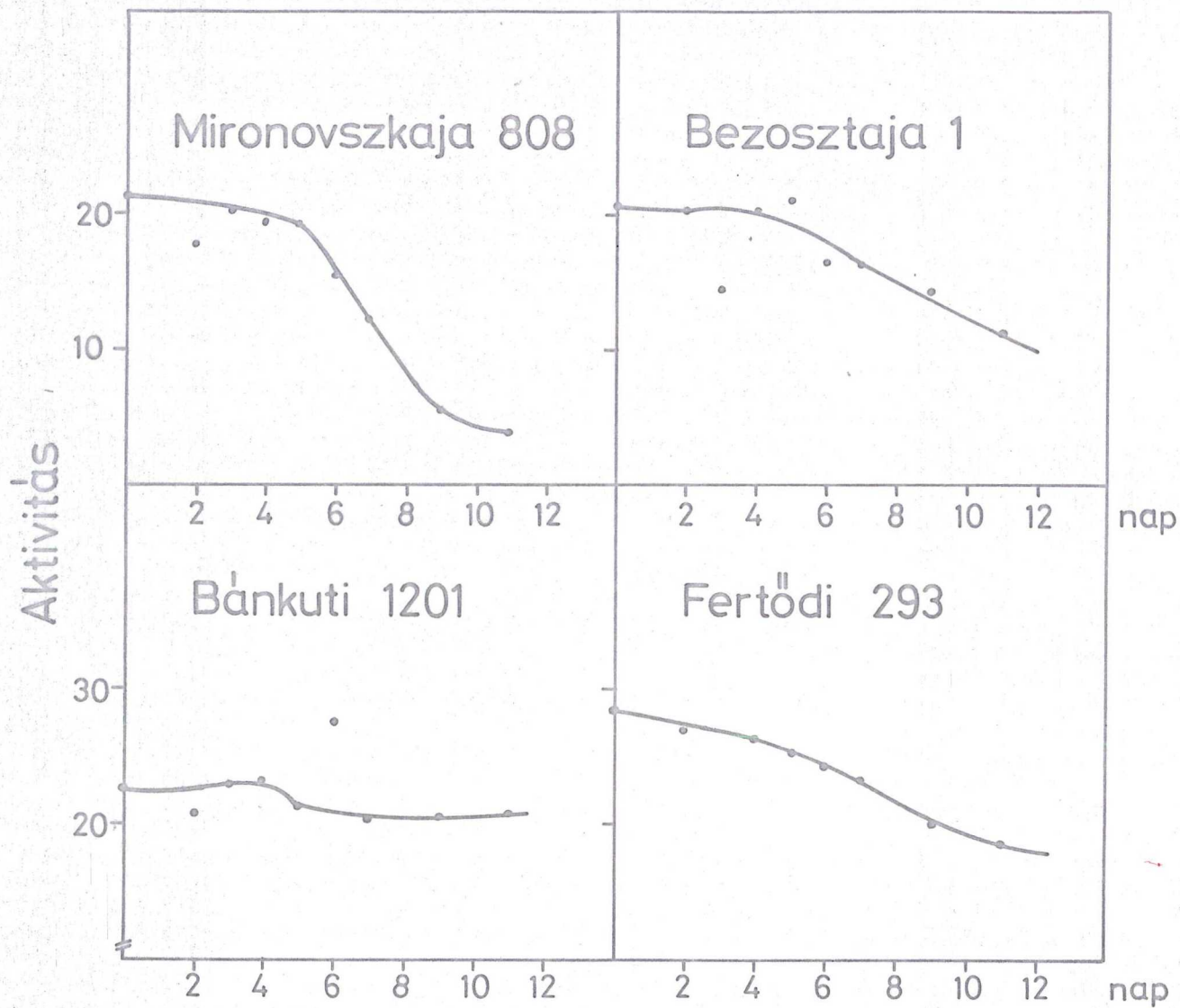
6. ábra. Az edzés hatása a buza csiranövények 10 C° inkubációs hőmérsékleten mérhető IES-oxidáz aktivitására. Vizsgálati anyag: mint 5. ábrán. Aktivitás meghatározva: 10 C° inkubációs hőmérsékleten.
Aktivitás: oxidált IES µg/mg fehérje/30 perc.



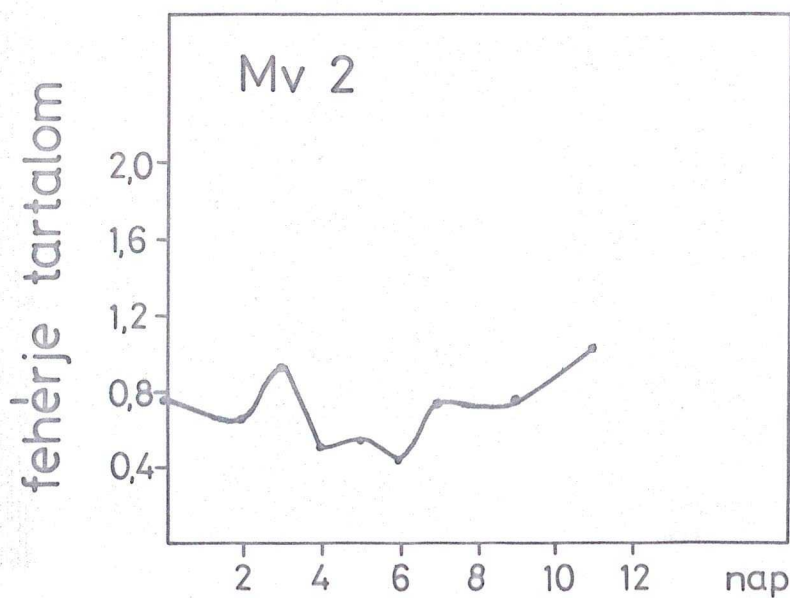
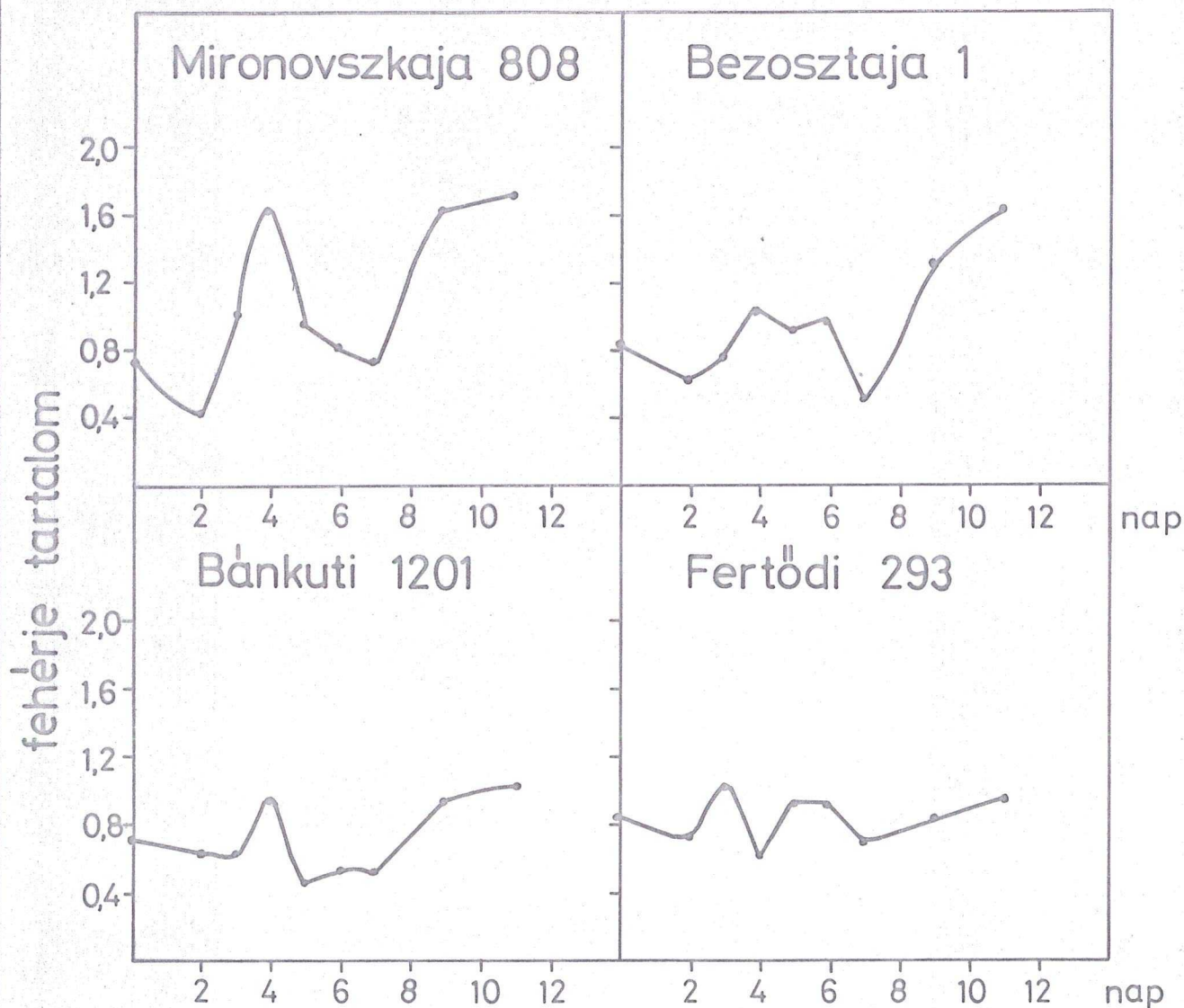
7. ábra. Az edzés hatása a buza csiranövények 15 C° inkubációs hőmérsékleten mérhető IES-oxidáz aktivitására. Vizsgálati anyag: mint 5. ábrán. Aktivitás meghatározva: 15 C° inkubációs hőmérsékleten.
Aktivitás: oxidált IES µg/mg fehérje/30 perc.



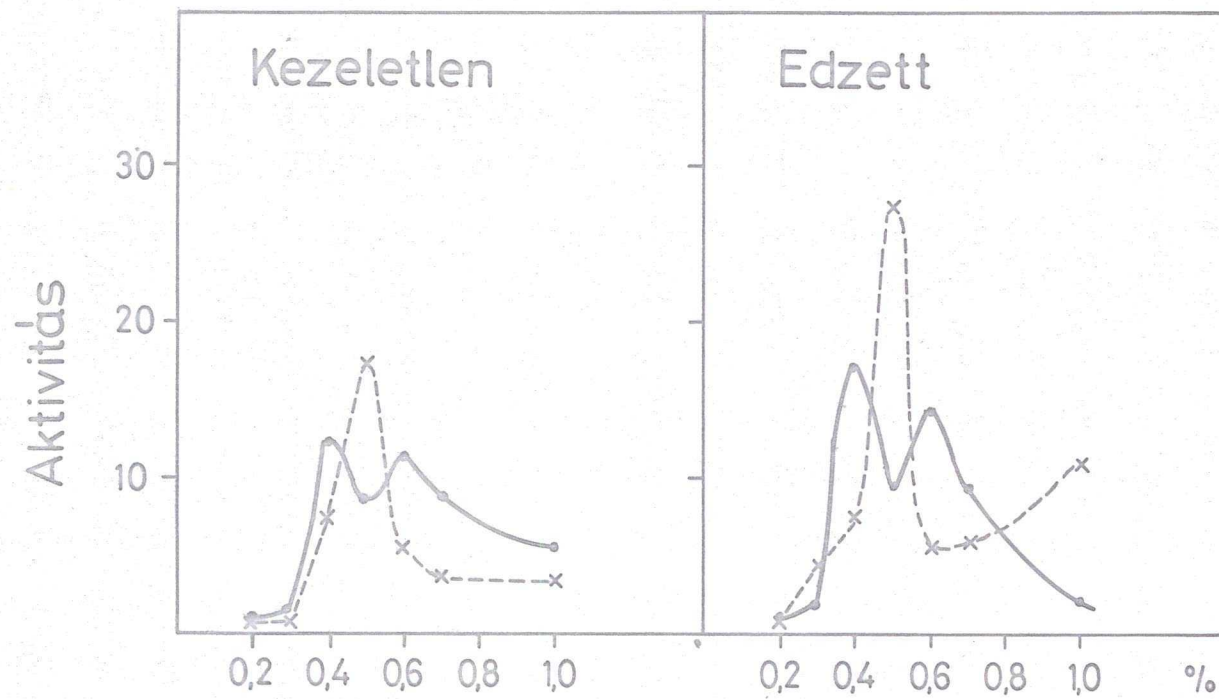
8. ábra. Az edzés hatása a buza csiranövények 20 C° inkubációs hőmérsékleten mérhető IES-oxidáz aktivitására. Vizsgálati anyag: mint 5. ábrán. Aktivitás meghatározva: 20 C° inkubációs hőmérsékleten.
Aktivitás: oxidált IES $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje/30 perc.



9. ábra. Az edzés hatása a buza csíranövények oldható fehérjetartalmára. Vizsgálati anyag: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 és 12 napig 0 C° hőmérsékleten edzett buza csíranövények kivonata. Kivonás: McIlvain pufferrel, pH 5. Fehérjetartalom meghatározása: LOWRY et al. /1951/ módszerével. Fehérjetartalom: mg/10 csíranövény.



10. ábra. Az edzés hatása a különböző ammonsulfát telítettségi szinteken lecsapódó IES-oxidáz aktivitására. Vizsgálati anyag: edzetlen és 5 napig 0 C° hőmérsékleten edzett Bánkúti 1201 őszi buza csíranövények nyers enzimkivonata. Frakcionálás: mint 4. ábrán. Aktivitás meghatározva: 5 C° /-----/ és 25 C° /-----/ inkubációs hőmérsékleten. Aktivitás: oxidált IES $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje/30 perc.



lött. Az aktiválási energia ilyen csökkenése alátámasztja és egyben magyarázza az 5°C hőmérsékleti határ alatt a csökkenő hőmérséklet függvényében emelkedő enzimaktivitást s utal esetleges izoenzim csoport meglétére is.

Ez utóbbi lehetőséget támogatják az ammonium-szulfátos frakcionálás segítségével végzett vizsgálatok eredményei is. Ammoniumszulfátos lecsapással az enzim kivonatot frakcióira bontottuk 0,1-1,0 telítési %-nak megfelelően 0,1-es léptékekben, majd mértük az egyes frakciók specifikus enzimaktivitását 5°C és 25°C inkubációs hőmérsékleten. Az alacsony és magas inkubációs hőmérsékleten mért aktivitások az egyes frakcióknál eltérőek voltak. A Mironovszkaja 808 magas hőmérsékleten a 0,7-es, alacsonyan a 0,4 és 0,7-es telítési szinteken leválló frakciókban mutatott IES-oxidáz aktivitást. Az alacsony és magas hőmérsékleten mérhető aktivitás maximuma az ammoniumszulfátos lecsapással legalábbis részben szétválasztható volt. Az alacsony inkubációs hőmérsékleten mérhető aktivitás maximuma általában a 0,4-es telítési szinten leválló csapadékban, magas inkubációs hőmérsékleten mérhető aktivitás csúcsa viszont a 0,6-es telítési szinten leválló csapadékban mutatkozott.

Adataink egységesen arra utalnak, hogy fagypont körüli hőmérsékleten aktív IES-oxidáz jelenlétével számolhatunk a buza csirában. A fagyállóság kialakulásában az egyes fajtáknál az edzés periodusa meghatározó szerepet játszik. Az

2. táblázat

Az edzés hatása az IES-oxidáz 5 C° inkubációs hőmérsékleten mérhető aktivitására

Fajta	Oxidált IES µg/mg fehérje/30 perc		Aktivitás emelkedés mértéke kezeletlen=100
	Edzetlen	Edzett	
Bezostaja 1	1,00	11,60	1160
Martonvásári 2	2,11	9,76	488
Mironovszkaja 808	3,38	13,19	439
Bánkúti 1201	3,82	10,74	281
Fertődi 293	3,40	9,15	304

Vizsgálat anyaga: 0 és 5 napig 0 C° hőmérsékleten edzett buza csiranövény nyers enzinkivonata. Aktivitás meghatározva 5 C° inkubációs hőmérsékleten.

3. táblázat

CAP hatása az IES-oxidáz hidegindukálta aktivitás
emelkedésére

Fajta	Oxidált IES $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje/30 perc		
	Edzetlen	Edzett	
		Kontrol	CAP
Bezosztaja 1	1,00	12,0	1,5
Martonvásári 2	2,11	9,8	1,1
Mironovszkaja 808	3,38	13,5	1,3
Bánkúti 1201	3,82	9,0	1,5
Fertődi 293	3,40	9,5	1,2

Vizsgálat anyaga: 0 és 5 napig $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten edzett
buza csiranövény nyers enzimkivonata. Aktivitás meghatá-
rozva $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubációs hőmérsékleten. CAP adagolás: 500 ppm
CAP finom permet alakjában az edzés megkezdése előtt.

edzés optimális hőmérséklete 0°C , $+5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleti tartomány. Az edzési periodusnak egyik lényeges folyamata annak az élettani mechanizmusnak a kialakítása, amely a növények növekedését alacsony hőmérsékleten jelentősen lelassítja, vagy esetleg teljesen meg is szünteti. Ezért a továbbiakban vizsgáltuk az enzim aktivitás indukálhatóságát alacsony hőmérsékleten.

4.3. Az IES-oxidáz aktivitás változás indukciója alacsony hőmérséklettel.

Kísérleteinket izolált csiranövényekkel végeztük, amelyeknek IES-oxidáz aktivitását 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, illetve 12 napos hidegkezelés után határoztuk meg. Az Arrhenius plotokban előrejelzett esetleges izoenzim változások nyomonkövetésére az enzim aktivitását több inkubációs hőmérsékleten, így 5°C , 10°C , 15°C és 20°C -on is meghatároztuk. A kísérletek eredményeit az 5-8. ábrák szemléltetik.

Az 5°C -on mérhető enzim aktivitás a vizsgált fajtákban a csiranövények hidegkezelésének hatására emelkedik és általában a hidegkezelés negyedik napján éri el a maximumot. Hasonló tendencia figyelhető meg a 10°C -on mérhető aktivitás változásában is. A 15°C , illetve 20°C -os inkubációs hőmérsékleten az enzim aktivitás egységesen a hidegkezelés 8-10. napján csökkenni kezd. A különböző inkubációs hőmérsékleteken mérhe-

tősen eltérő aktivitás változás jellege arra utal, hogy az alacsony hőmérséklet hatására a csiranövényekben valószínűleg egy alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkező IES-oxidáz forma aktivitása változik. A magasabb hőmérsékleteken mérhető aktivitás kevéssé módosul hidegkezelés hatására. Ez arra enged következtetni, hogy a magasabb hőmérsékleten aktív enzimet az alacsony hőmérséklet nem befolyásolja lényegesen.

Összehasonlítva a hidegkezelést nem kapott és az 5 napig hidegkezelt csiranövények IES-oxidáz aktivitását, megfigyelhető, hogy az a hidegkezelés hatására emelkedik /2. táblázat/. Az emelkedés mértéke a kiindulási aktivitás többszöröse. Általában a csökkenő hőmérsékletre nagyobb mértékű növekedési redukciónal válaszoló fajtáknál az alacsony hőmérséklet indukálta aktivitás emelkedés nagyobb mértékű volt, mint a jobban növekvőekben.

Az eddigi adataink egyöntetűen egy alacsony hőmérsékleten aktív IES-oxidáz meglétére utalnak. További vizsgálatok célja annak eldöntése volt, hogy ez az alacsony hőmérséklettel indukálható enzim aktivitás emelkedése "de novo" szintézis eredménye-e. A kérdés eldöntésére a hidegindukció kezdetén adagolt 500 ppm kloramfenikol /CAP/ hatását vizsgáltuk. A gátló anyagot a már kicsirázott buzára vittük fel finom permet formájában.

A CAP jelenléte a hidegindukció alatt az enzim aktivitás emelkedést gátolta /3. táblázat/. Ezek az adatok arra

utalnak, hogy a hidegindukálta aktivitás emelkedés valószínűen "de novo" fehérje szintézis eredménye. Ezt támasztja alá a különböző buzafajták oldható fehérje tartalmának analízise is.

Az oldható fehérjéket 5 pH-ju McIlvain pufferral extraháltuk. Az eredményeket a 9. ábra mutatja be. Az adatokból megállapítható, hogy a buza csiranövényekben az oldható fehérje tartalom a hidegkezelés hatására emelkedik.

Érdekes kiegészítő adatokat szolgáltatott a hidegkezelés nélküli és hidegkezelt - edzett - buza csiranövények fehérjeinek ammoniumsulfátos frakcionálása /10. ábra/. A kezletlen csiranövényekből extrahált fehérjékben az ammoniumsulfátos frakcionálás után magas inkubációs hőmérsékleten kettős aktivitás csucs kialakulása volt megfigyelhető. Alacsony hőmérsékleten viszont csak egyetlen aktivitás maximum mérhető. A hidegkezelés hatására az alacsony hőmérsékleten aktív enzim mennyisége emelkedik intenzívebben, bár gyenge emelkedés a magas hőmérsékleten mérhető enzim aktivitásoknál is megfigyelhető.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az őszi búzában a tavasziaktól eltérően az őszi és téli időszak folyamán a növekedési folyamatok a minimumra csökkennek, s ez a tulajdonságuk vezet hideg ellenállóságuk kialakulásához, megedződésükhöz /FEDOROV 1969, NIKOLOV - SALCHEVA 1969/.

Tekintettel arra, hogy a növények növekedése két alapfolyamatból, a sejtosztódásból és sejtmegnyulásból tevődik össze, szükséges ezek szétválasztása. A sejtosztódás intenzitása és a fagyállóság között lazább kapcsolat létezik. E tekintetben inkább arról van szó, hogy a sejtosztódás hőmérsékleti quociense magas, vagyis a csökkenő hőmérsékletre a sejtosztódási ciklus lelassulás a jellemző a fagytűrő fajtánál /DEVAY 1962/.

A sejtmegnyulás és a fagyállóság között létező korrelációról a dolgozat adatai szolgálnak felvilágosítással. Az 5 °C-on mérhető sejtmegnyulás intenzitása és a fagyállóság között fennálló korrelációs kapcsolat alapján feltételezhetjük, hogy a növekedés redukcióban elsősorban a megnyulásos növekedés visszamaradása a mérvadó, bár részt vesz benne a sejtosztódás lelassulása is.

Az auxin szint irányította megnyulásos növekedés jelentős korrelációja a növények fagytűrő képességével, a

növényi növekedésben realizálódó hormon háztartás és a fagyállóság kapcsolatára utal.

A fagytűrés és hormon háztartás közötti szoros összefüggést támasztják alá a hormonok hatásával és gátló anyagaival végzett vizsgálatok. A gibberellinnel, a CCC-vel, az auxinnal és bioszintézisének blokkolásában jelentős B-9 vegyülettel folytatott vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a növekedés redukció a hormon szint redukálásán keresztül minden esetben a fagytűrés növelésében nyilvánul meg /MAYR 1968, PETR et al. 1968, KACPERSKA-PALACZ et al. 1969, PRUSZAKOVA 1969, ŠČSERBAKOV-MASTAKOV 1969, CSAJLAHJAN-IVANOVA 1970, WUNSCHER 1969/.

A fagytűrés és növekedés redukció kapcsolata lényegében bizonyítottnak tekinthető. Kérdés, hogy az alacsony hőmérséklet hatására a növekedési anyagok mennyiségében bekövetkező változás milyen folyamatok eredménye. A megoldásra két lehetőség kínálkozik; a szintézis útjában bekövetkező változás analízise vagy a lebontási rendszer mechanizmusának tanulmányozása. A két lehetőség közül kezdő lépésként a megnyúlásos növekedést irányító auxin szintjének meghatározásában résztvevő IES-oxidáz enzim aktivitás változásainak vizsgálatát kezdtük meg.

Számbavéve azt, hogy a fagyállóság kialakulása - az edződés - lényegében alacsony hőmérsékleten 0°C , $+5^{\circ}\text{C}$ között optimális, feltehető, hogy a folyamatban csak olyan enzimek

vesznek részt, amelyek e hőmérsékleti tartományban aktívak. Az első feladatunk tehát annak eldöntése volt, hogy számolhatunk-e a buza csiranövényben ezen a hőmérsékleten aktív IES-oxidázzal. A disszertáció adatai erre a kérdésre egyértelműen igennel felelnek. Az őszi buzában minden valószínűség szerint az IES-oxidáz több izoenzime működik, amelyeknek egyike az alacsony hőmérsékleten is aktív forma.

Az IES oxidálásában résztvevő enzim általában nem egyetlen tagból álló egységként működik, hanem mint izoenzim csoport, amelyek közül mindig a körülményeknek legmegfelelőbb izoenzim az aktív. Az izoenzimek létezését számos munka bizonyítja /MACNICOL 1966, FRENKEL 1972, NANDA et al. 1973, KRASNIK et al. 1975/. A vizsgálatok általában csak az izoenzimek számának meghatározására szorítkoznak és nem közlik az egyes izoenzimek jelleg differenciáit. A disszertáció adatai szerint a buzában alacsony hőmérsékleten működő IES-oxidáz elsősorban aktiválási energiájában tér el a magasabb hőmérsékleten működő párjától. Az Arrhenius görbék alapján nemcsak az izoenzimek meglétére következtethetünk, hanem egyben arra is, hogy ezek az alacsony hőmérsékleten aktív izoenzimek általában kisebb aktivációs energiával rendelkeznek, ami feltehetően lehetővé teszi, hogy maga az enzim a fagyponthoz közeli hőmérsékleteken aktív legyen.

A hidegkezelés hatására a peroxidáz aktivációs energiájának csökkenéséről számol be Roberts /1967 b, 1969/

szegfűféléknél és Kacperska-Palacz /1974/ répánál. Ezek a munkák azonban nem foglalkoznak a peroxidázok esetleges IES-oxidáz aktivitásával. Arról sem számolnak be, hogy az aktivációs energia csökkenés visszavezethető-e az izoenzim spektrum esetleges változásaira.

Különböző hőmérsékleti optimummal rendelkező izoenzimok létezésére utalnak a buza csiranövények ammoniumsulfátos frakcionálásával kapott eredmények is.

Az alacsony és magas inkubációs hőmérsékleten mért aktivitás maximumának szétválása legalább két izoenzim, vagy izoenzim csoport jelenlétét igazolja, amelyek közül az egyik csoport tagjai magas, a másik csoport tagjai pedig alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkeznek. Tehát feltételezhető az, hogy a buza csiranövények auxin szintjét az edződés folyamán egy alacsony hőmérsékleten aktív IES-oxidáz izoenzim szabályozhatja. Arra vonatkozóan viszont, hogy az egyes izoenzimok aktiválási energiája milyen mértékben térhet el egymástól, a disszertáció nem szolgáltat adatokat. Az ilyen irányú vizsgálatok csak az enzim izolálása és tisztítása után végezhetők el. A munka jelenleg folyamatban van.

További feladatunkat képezte annak a kérdésnek az eldöntése, hogy az alacsony hőmérséklet befolyásolja-e az alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkező IES-oxidáz aktivitását. A hidegkezeletlen és a különböző ideig hidegkezelt csiranövények alacsony hőmérsékleten aktív IES-oxidázainak össze-

hasonlítása alapján megállapítható, hogy az alacsony hőmérsékleti kezelés az enzim aktivitását növeli. A fajták fagyállóságának mértéke valószínűen befolyásolja az enzim specifikus aktivitásának növekedését. A legfagyállóbbnak mutató Bezostaja 1 fajta csiranevényeiben a hidegkezelés hatására az enzim aktivitása 11,6-szorosára, míg a legkevésbé fagyálló Fertődi 293-nál 2,7-szeresére nőtt. A vizsgált öt fajta alapján végleges következtetést nem vonhatunk le, de az előzetes számítások arra mutatnak, hogy a hidegindukálta aktivitás emelkedés logaritmusában van korrelációban a növekedés redukciójával.

A hidegkezelés hatására emelkedő enzim aktivitásról más enzimek vonatkozásában több szerző is beszámolt. Gerloff /1967/ a peroxidáz aktivitás szignifikáns különbségeit észlelte lucerna fajtákban. Az izoenzim garnitúra vizsgálatkor két új izoenzim megjelenését igazolja a fagyállóbb fajtákban. McCown et al. /1969/ szegfűféléknél igazolta új peroxidáz izoenzimek szintézisét a hidegkezelés hatására. Kacperska-Palacz /1974/ a répánál állapítja meg a peroxidáz aktivitás emelkedését. A búzánál Roberts /1969/ a peroxidázok aktivitás változásait regisztrálja a hidegkezelés hatására. Az alacsony hőmérséklettel indukálható enzim szintézisről a búzánál Dévay /1965 a, b, 1966, 1967/ számol be ribonukleáz, aszkorbin oxidáz vonatkozásában.

Az IES-oxidáz aktivitás emelkedés alacsony hőmérsékleti indukciója valószínű "de novo" fehérje szintézis ered-

ménye. Ezt a lehetőséget igazolják az ammoniumsulfátos frakcionálás, a CAP-os gátlás és az oldható fehérje szint meghatározásának adatai. Valószínűnek látszik az is, hogy a hideg indukálta enzim szintézis az IES-oxidáz izoenzimek közül elsősorban az alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkező formára terjedhet ki. Eerre utalnak a disszertációban bemutatott, a hidegkezeletlen és hidegkezelt csiranövények fehérjéinek ammoniumsulfátos frakcionálásával kapott eredmények.

Az eddigiekből tehát arra következtethetünk, hogy az őszi buza csiranövények alacsony hőmérsékleten megfigyelhető növekedés redukciójában egy, az adott hőmérsékleten aktív IES-oxidáz forma vesz részt, amelynek aktivitása az edződés alatt "de novo" szintézis eredményeképpen emelkedik. Az enzim feltehetően alacsonyabb aktivációs energiával rendelkezik, mint magas hőmérsékleti optimummal bíró formája. Az alacsony hőmérsékleten is igen aktív enzim az őszi buzák auxin szintjét szabályozva redukálja a növekedést a csökkenő hőmérséklet függvényében. Az enzim indukciójának mechanizmusa további vizsgálatok tárgyát képezik.

6. ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK

Különböző fagyállóságu őszi buzafajtákban vizsgáltuk a csökkenő hőmérséklet indukálta növekedési redukció biokémiai mechanizmusát.

Kísérleteink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1/ Szoros korreláció áll fenn a sejtmegnyulás intenzitása és a fajták fagyállósága között. A regresszió $-0,83$. Az alacsony hőmérsékleten lezajló intenzívebb sejtmegnyulás alacsonyabb fagyállósággal kapcsolódik, a gyengébb növekedési intenzitás viszont a fajták jobb hidegtűrésével együtt jelenik meg.

2/ Az auxin szintet befolyásoló IES-oxidáz aktivitásának hőmérsékleti függősége az egyes fajtákban eltérő, de mindegyik esetben a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleti tartományban még jelentős aktivitással rendelkezik.

3/ Az inkubációs hőmérséklet csökkenésével a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleti tartományban a hőmérséklet csökkenésével az aktivitás emelkedik.

4/ A hőmérséklet csökkenésével az IES-oxidáz aktivációs energiája csökken.

5/ Az enzim aktivitás Arrhenius egyenletei alapján számítva a buza csiranövényekben legalább két, aktivációs energiájában és hőmérsékleti optimumában egymástól különböző izoenzim jelenlétével kell számolnunk.

6/ Az edzési periódusban az alacsony hőmérsékleti optimummal rendelkező IES-oxidáz izoenzim alacsony hőmérséklet indukálta aktivitás növekedése figyelhető meg.

7/ Az alacsony hőmérséklet indukálta aktivitás emelkedés "de novo" fehérjeszintézis eredménye.

8/ Az alacsony hőmérsékleten is aktív enzim az őszi búzák auxin szintjét szabályozva redukálja a növekedést a csökkenő hőmérséklet függvényében.

Ezuten szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik disszertációm elkészítésében segítségemre voltak. Így köszönöm Dr. Rajki Sándornak, a biológiai tudományok doktorának, az intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való munkát. Köszönöm Dr. Dévay Mártának, a biológiai tudományok doktorának, hogy munkámat irányította, köszönöm hasznos tanácsait és a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Gáspár László kandidátusnak, hogy osztályán biztosította számomra a megfelelő munkakörülményeket. Köszönöm Dr. Sirokmánné Köves Erzsébet docensnek hasznos szakmai tanácsait. Köszönöm Pusztai Jánosnénak a dolgozat gépelésében, s a kísérleti munka elvégzésében nyújtott segítségét. Köszönöm Stefkovics Lajosnénak a kísérletek elvégzésében adott segítségét.

7. IRODALOM

- BALLA, L. /1975/: in "Fagyállóság genetikai és biokémiai alapjai" c. KGST együttműködés jelentése.
- BIRECKA, H. - BRIBER, K.A. - CATALFAMO, J.L. /1973/: Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indolacetic acid and ethylene effects. *Plants Physiol.* 52, 43-49.
- BOLDUC, R.J. - CHERRY, J.H. - BLAIR, B.O. /1970/: Increase in indolacetic acid oxidase activity of winter wheat by cold treatment and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 45, 461-464.
- BRAUNER, L. /1953/: Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. I. *Zeitschrift f. Bot.* 41, 291-341.
- COLOWICK, S.P. - KAPLAN, N.O. /1957/: Protein estimation by ultraviolet absorption. in: *Methods in Enzymology*, III. pp. 451-454.
- CSAJLAHJAN, M.H. - IVANOVNA, J.A. /1970/: Vlijanie gibbellovoj kishloty i retardanta CCC na roszty i razvitye rasztenij v zaviszimoszti ot dliny dnja. *Izv. IFR. /Szofija/* 16, 45-64.
- DARBYSHIRE, B. /1970/: Changes in indolacetic acid oxidase activity associated with plant potencial. *Physiol. Plant.* 25, 80-84.
- DARBYSHIRE, B. /1973/: The glycoprotein nature of Indolacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots. *Physiol. Plant.* 29, 293-297.
- DÉVAY, M. /1962/: Biochemical processes of vernalization. *Symposium on Genetics and Wheat Breeding. Martonvásár, Hungary.* pp. 17-40.

- DÉVAY, M. /1965 a/: The effect of quality of light on the metabolism of spring and winter wheat.
Botanikai Közlemények /Hungary/, 52, 215-219.
- DÉVAY, M. /1965 b/: The Biochemical processes of vernalization. III. The changes of ascorbic acid oxidising capacity in the course of vernalization.
Acta Agr. Hung. 14, 93-97.
- DÉVAY, M. /1965 c/: The biochemical processes of vernalization. IV. The changes of ribonuclease activity in the course of vernalization.
Acta Agr. Hung. 14, 275-287.
- DÉVAY, M. /1966/: The biochemical processes of vernalization. V. Formation and localization of ribonuclease I.
Acta Agr. Hung. 15, 85-94.
- DÉVAY, M. /1967/: A gabonafélék jarovizációjának néhány élettani problémája.
Doktori értekezés. Budapest.
- DÉVAY, M. - T.FEHÉR, M. /1975/: Temperature-induced changes in the pattern of chlorophyll complexes in wheat leaves.
Biochem. Physiol. Pflanzen /BPP/ 168, 561-566.
- DÉVAY, M. - RAJKI, S. /1972/: Some aspects of winter Hardiness from view-point of the metabolism-biochemical concept of heredity.
Proceedings of a Colloquium on the Winter Hardiness of Cereals. Martonvásár /Hungary/. pp. 105-112.
- FEDOROV, A.K. /1969/: Reakcija zimujuscsih rasztenij na szvet i ih zimosztokosztj.
Zs.Obsceseji Biol. 30, 743-750.
- FEHÉR, M. - DÉVAY, M. /1975/: Temperature-induced phase changes on the kinetics of photosynthetic electron transfer in winter and spring wheat chloroplasts.
Biochem. Physiol. Pflanzen /BPP/. 167, 447-450.
- FRENKEL, C. /1972/: Involvement of peroxidase and indol-3-acetic acid oxidase isozymes from pear, tomato and blueberry fruit in ripening.
Plant Physiol. 49, 757-763.

- GALSTON, A.W. /1947/: The effect of 2,3,5 triiodobenzoic acid on the growth and flowering of soyabeans. Amer.J.Bot. 34, 356-360.
- GALSTON, A.W. - BAKER, R.S. /1951/: Studies on the physiology of light action. III. Light activation of flavoprotein anzyme by reversal of naturally occurring inhibition. Amer.J.Bot. 38, 190-195.
- GALSTON, A.W. - BONNER, J. - BAKER, R.S. /1952/: Flavoprotein and peroxidase as components of the indolacetic acid oxidase system of peas. Arch.Biochem.Biophys. 42, 456-470.
- GALSTON, A.W. - DALBERG, L.Y. /1954/: The adaptiv formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. Amer.J.Bot. 41, 373-380.
- GALSTON, A.W. - HILLMAN, W.S. /1961/: in "Handbuch der Pflanzenphysiologie XIV." Springer Verlag. Ed. RUHLAND, W. pp. 647-670.
- GARAY, A. /1967/: A növények növekedésének szabályozása, különös tekintettel az auxin-inaktíváló rendszerre és növekedési mutánsok energiagazdálkodására. Doktori értekezés. Budapest.
- GASPAR, T. - KHAN, A.K. - FRIES, D. /1973/: Hormonal control of isoperoxidases in lentil embryonic axis. Plant Physiol. 51, 146-149.
- GELINAS, D.A. /1973/: Proposed model for the peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid in the presence of the inhibitor ferulic acid. Plant Physiol. 51, 967-972.
- GELINAS, D.A. - POSTLETHWAIT, P. /1969/: IAA oxidase inhibitors from normal and mutant maize plants. Plant Physiol. 44, 1553-1559.
- GERLOFF, E.D. - STAHMANN, M.A. - SMITH, D. /1967/: Soluble proteins in alfalfa roots as related to cold hardiness. Plant Physiol. 42, 895-899.

- GOLDAGRE, P.L. /1951/: Hydrogen peroxide in the enzymic oxidation of heteroauxin.
Austral J. Sci. Res. B. 4, 293-302.
- GORDON, S.A. /1958/: Intracellular localization of the tryptophan indoleacetat enzyme system.
Plant Physiol. 33, 23-27.
- GORDON, S.A. - WEBER, R.P. /1951/: Colorimetric estimation of indoleacetic acid.
Plant Physiol. 26, 192-195.
- HALL, T.C. - McLESTER, R.C. - McCOWN, B.H. - BECK, G.E. /1970/: Enzyme changes during deacclimation of willow stem.
Cryobiology, 7, 130-135.
- HOYLE, M.C. /1972/: Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme?
Plant Physiol. 50, 15-18.
- IZAWA, M. /1961/: Water uptake and indoleacetic acid destruction of cultured bean germoxes.
Bot.Mag. Tokyo. 74, 169-177.
- KACPERSKA-PALATZ, A. - BLAZIAK, A. - WCIBLINSKA, M. /1969/: The effect of growth retardants CCC and B-9 on the certain factors related to cold acclimation of plants.
Bot.Gaz.Chicago. 130, 213-221.
- KACPERSKA-PALATZ, A. - ULIASZ, M. /1974/: Cold induced changes in peroxidase activities in the winter rape leaves.
Physiol. Vég. 12, 561-570.
- KOCH, J. /1975/: in "Fagyállóság genetikai és biokémiai alapjai" c. KGST együttműködés jelentése.
- KRASNUK, M.G. - JUNG, A. - WITHMAN, F.H. /1975/: Electrophoretic studies of the relationship of peroxidases, polyphenol oxidase and indoleacetic acid oxidase to cold tolerance of alfalfa.
Cryobiology, 12, 62-68.
- KU, H.S. - YANG, S.F. - PRATT, H.K. /1970/: Inactivity of apoperoxidases in indoleacetic acid oxidation and in ethylene formation.
Plant Physiol. 45, 358-359.

- LEE, T.T. /1971/: Promotion of indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures by indoleacetic acid.
Plant Physiol. 48, 56-59.
- LEE, T.T. /1972/: Changes in indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco tissues after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Plant Physiol. 49, 957-960.
- LOWRY, O.H. - ROSEBROUGH, N.J. - FARR, A.L. - RANDALL, R.J. /1951/: Protein measurement with the Folin-phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- McNIKOL, P.K. /1966/: Peroxidase of the Alasca pea /*Pisum sativum* L./. Arch. Biochem. Biophys. 117, 347-356.
- MAYR, H.H. /1968/: Anwendung und Bedeutung von Chlorocholinchlorid /CCC/ in der Landwirtschaft.
Landw. Forsch. /Frankfurt/. 213, 195-202.
- McCOWN, B.H. - HALL, T.C. - BECK, G.E. /1969/: Plant leaf and stem proteins. II. Isoenzymes and environmental change.
Plant Physiol. 44, 210-216.
- McRAE, D.H. - FOSTER, R.J. - BONNER, J. /1953/: Kinetics of auxin interaction.
Plant Physiol. 28, 343-355.
- MORGAN, P.W. - JOHAM, H.E. - AMIN, J.V. /1966/: Effect of manganese toxicity on the indoleacetic acid oxidase system of cotton.
Plant Physiol. 41, 718-724.
- MORITA, Y. - KAMEDA, K. - MIZUNO, M. /1962/: Studies on phytoperoxidase. XVI. Aerobic destruction of indole-3-acetic acid catalysed by crystalline japanase-radish peroxidase a and c.
Agr. Biol. Chem. 26, 442.
- NANDA, K.K. - BHATTACHARYA, N.C. - KAUR, N.P. /1973/: Disc electrophoretic studies of IAA oxidase and their relationship with rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*.
Physiol Plant. 29, 442-444.

- NIKOLOV, P. - SALCHEVA, G. /1969/: Effect of the multiple freezing of wheat plants on the content of certain growth substances of an auxin type.
Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Agricolés en Bulgarie 2.
- PETR, I. - DURDIKOVA, I. - FIALA, I. /1968/: Vlijanie szrokov primenenija hlorholinhlorida /CCC/ na razvitiye jacsmenja.
/Sz/h. Biologija /Moszkva/. 3, 443-445.
- PILET, P.E. /1964/: Effect of chlorogenic acid on the auxin catabolism and the auxin content of root tissues.
Phytochem. 2, 617-621.
- PILET, P.E. /1966/: Effect of p-hydroxybenzoic acid on growth, auxin catabolism.
Phytochem. 5, 77-82.
- PRUSZAKOVA, L.D. - DMITRUK, A.P. /1969/: O vlijanii morfaktinov i hlorholinhlorida /CCC/ na roszt szejancev psenicü.
Fiziol.Raszt.Moszkva. 16, 932-934.
- PSENAK, M. - JINDRA, A. - KOVÁCS, P. /1970/: Simple phenolic glycosides as potential regulators of the IAA oxidase system.
Biologia Pl. Praha. 12, 241-245.
- RAY, P.M. /1960/: The destruction of indoleacetic acid. III. Relationship between peroxidase action and indoleacetic acid oxidation.
Arch.Biochem.Biophys. 87, 19-30.
- ROBERTS, D.W.A. /1967/: Peroxidase isozymes in wheat grown at 6°C and 20°C.
Plant Physiol. 42, 15-16.
- ROBERTS, D.W.A. /1969/: A comparison of the peroxidase isozymes of wheat plants grown at 6°C and 20°C.
Canad.J.Bot. 47, 263-265.
- RUNKOVA, L.V. - LIS, E.K. - TOMASEWSZKI, M. - ANTOSZEWski, R. /1972/: Funkcion of phenolic substances in the degradation system of indole-3-acetic acid in strawberries.
Biol.Plant. /Warsawa/. 14, 71-81.

- SÁGI, F. /1970/: Az indilil-3-ecetsav oxidáz sejten belüli lokalizációja a Lupinus albus L. hipokotiljában. I. Frakcionálás vizes közeggel. Bot.Közl. /Hungary/, 57, 251-256.
- SAUNDERS, B.C. - HOLMES-SIEDLE, A.G. - STARK, B.P. /1964/: Peroxidase. Butterworth Scientific Publications London.
- SCSERBAKOV, V.A. - MASTAKOV, Sz.M. /1969/: Posztuplenyie beta-hlorisztogo-2-hloretil-trimetilamonija /CCC/ v rasztenija psenicü. Dokl.AN.BSzSzR. Minszk. 13, 843-846.
- SCHAFER, P. - WENDER, S.H. - SMITH, E.C. /1971/: Effect of scopoletin on two anodic isoperoxidases isolated from tobacco tissue culture W-38. Plant Physiol. 48, 232-233.
- SCHNEIDER, E.A. - WIGHTMAN, F. /1974/: Metabolism of auxin in higher plants. Ann.Rew.Plant.Physiol. 25, 487-513.
- SEQUIERA, L. - MINEO, I. /1966/: Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. Plant Physiol. 41, 1200-1208.
- SHANNON, L.M. - KAY, E. - LEW, J.Y. /1966/: Peroxidase isozymes from horse radish roots. I. Isolation and physical properties. J. of Biol. Chem. 241, 2166-2172.
- SIEGEL, B.Z. - GALSTON, A.W. /1967/: The isoperoxidases of Pisum sativum. Plant Physiol. 42, 221-226.
- SIROIS, J.C. - MILLER, R.W. /1972/: The mechanism of the scopoletin induced inhibition of the peroxidase catalysed degradation of indole-3-acetate. Plant Physiol. 49, 1012-1018.
- STAFFORD, H.A. - BRAVINDER-BREE, S. /1972/: Peroxidase isozymes of first internodes of Sorghum. Plant Physiol. 49, 950-956.

- STOINER, T. - YONEDA, Y. /1967/: Stem internode elongation in the Japanese Morning Glory /Pharbitis nil Choisy/ in relation on an inhibitor system of auxin destruction.
Physiol. Plant. 20, 13-19.
- STUTZ, R.E. /1958/: Enzymatic formation of indole-3-carboxaldehyde from indole-3-acetic acid.
Plant Physiol. 33, 207-212.
- TANG, Y.W. - BONNER, J. /1947/: The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings.
Arch.Biochem. 13, 11-25.
- TAYLOR, D.M. - MORGAN, P.W. - JOHAM, H.E. - AMIN, J.V. /1968/: Influence of substrate and tissue on the IAA-oxidase system in cotton.
Plant Physiol. 43, 243-247.
- Van der MAST, C.A. /1970/: Separation of IAA degrading enzymes from pea roots on columns of polyvinylpyrrolidone. II.
Acta Bot. Neerl. Wageningen. 19, 141-146.
- WAGENKNECHT, A.C. - BURRIS, R.H. /1950/: Indoleacetic acid oxidizing enzymes from bean roots and pea seedlings.
Arch.Biochem. 25, 30-53.
- WITHMORE, F.W. /1971/: Effect of indoleacetic acid and hydroxyproline on isoenzymes of peroxidase in wheat coleoptiles.
Plant Physiol. 47, 169-171.
- WUNSCHEL, U. /1969/: Growth retarding and stimulating effects of CCC on Antirrhinum majus L.
Planta, Berlin. 85, 108-110.
- YONEDA, Y. - STOINER, T. /1967/: Distribution of three auxin protector substances in seeds and shoots of the Japanese Morning Glory /Pharbitis nil/.
Plant Physiol. 42, 1017-1020.

