

**NÖVÉNYEK ANTIOXIDÁNS  
VÉDEKEZŐMECHANIZMUSAI KÖRNYEZETI  
STRESSZFELTÉTELEK MELLETT**

**Szegletes Zsolt**

*Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar*  
környezeti biokémia és biotechnológiai doktor (Ph.D.) program



*Témavezető:*

*Dr. Erdei László tanszékvezető egyetemi tanár*  
*Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar*  
*Növényélettani Tanszék*

**Szeged**

**2000.**

## BEVEZETÉS

A stressz, mint fogalom meghatározására ma is Selye János definícióját használjuk, amely szerint "az élő szervezetek valamennyi adaptációs reakciójának a stressz a foglalat, azaz a stressz egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, mely magában foglal minden nem-fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül" (Selye, 1956). Ezeknek a változásoknak a vizsgálatát növényi szervezetekben Levitt kezdte meg az 1970-es évek elején. Napjainkban a Selye-féle általános stresszelméletet többen is igazolták. Ezek alapján elmondható, hogy stressz hatására az élő szervezet anyagcseréjében, így a növényekben is bizonyos reakció utak felgyorsulnak vagy gátlódnak, ami olyan köztes- és végtermékek felhalmozódását, esetleg megjelenését eredményezi, amelyek az ismert biokémiai reakció utakat valamelyik irányba eltolhatják. Ezek közül a biokémiai folyamatok közül az oxidációs-redukciós állapot változások az egyik leggyorsabban lezajló molekuláris szintű változások a szervezetben, amit összefoglalóan az oxidatív stressz hatásának nevezünk. Az oxidatív stressz fő okozói az aktív oxigén tartalmú vegyületek, de általánosan elmondható, hogy minden stressznek van oxidatív komponense is, amely indukálja az antioxidatív védőrendszer működését.

A növényeket sokféle környezeti stresszhatás éri, többek között extrém hőmérsékleti viszonyok, előntés indukálta hipoxia, túl erős napsugárzás és ozmotikus stressz. Ezek közül a szárazság és a só stressz okozta ozmotikus hatás a legfontosabb környezeti tényező, amely limitálja a növények növekedését, illetve a termés mennyiségét.

Az aerob élő szervezetek kialakulását és tartós fennmaradását a reaktív, oxigén tartalmú vegyületek, gyökök, gerjesztett molekulák elleni detoxifikáló rendszer kialakulása tette lehetővé. Ennek a védekező rendszernek vannak enzimikus és nem enzimikus elemei .

## CÉLKITŪZÉSEK

Vizsgálatainkkal a növények antioxidatív védőreakcióit követtük nyomon különböző stresszkörülmények között. Arra kerestük a választ, hogy az

ozmotikus és só stressz, illetve az UV-B stressz hatására milyen antioxidatív válaszreakciókat adnak a kiválasztott növények, és a stressz kiváltó oka hogyan befolyásolja ezeket a védőreakciókat.

Kísérleteink során egy halofita növény, az *Aster tripolium* alacsony só stressz (a fiziológiás sókoncentrációnál alacsonyabb NaCl koncentráció), továbbá négy glükofita növény, a kétszikű napraforgó (*Helianthus annuus* L.) és az egyszikű búza (*Triticum aestivum* L.), kukorica (*Zea mays* L.) és az étkezési gabonacirok (*Sorghum bicolor* L.) só, szárazság és UV-B stressz hatására bekövetkező stresszválaszait követtük nyomon. A szárazság stresszt polietilén-glikol (PEG 6000), mint ozmotikum adagolásával szimuláltuk. Arra a kérdésre igyekeztünk választ kapni, hogy a leggyakoribb környezeti stresszkörülmények milyen hatást váltanak ki különböző növényekben a kezelés ideje alatt. Elsősorban a fiatal növények egyedfejlődésének hajtásnövekedési periódusát vizsgáltuk.

Célunk megvalósításához először olyan analitikai módszert kellett kifejleszteni, illetve az adott körülményekhez adaptálni, amellyel nyomon követhetők a különféle környezeti stresszhatások (ozmotikus, só és UV-B stressz) okozta változások a kísérleti haszonnövények védőrendszerében.

Irodalmi adatok alapján a következő vegyületcsoportokat és enzimeket vizsgáltuk, és dolgozatomat is ezen csoportosítás alapján tagoltam:

- Kationok ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ )
- Szervetlen anionok ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ )
- Poliaminok (putreszcin, spermidin és spermin) és prolin.
- Glutacion redukált és oxidált formája (GSH és GSSG).
- Glutacion redukáz (GSSG redukáz, GR, EC 1.6.4.2) és glutacion S-transzferáz (GST, EC 2.5.1.18)

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során glükofita és halofita növényeket tanulmányoztunk. Vizsgáltuk kation és anion összetételüket, poliamin és prolin szintjüket és a GSH/GSSG arányukat, valamint ehhez kapcsolódóan a glutacion redukáz és a glutacion S-transzferáz aktivitás napi ritmusának változását ozmotikus és só

stresszkörülmények között. Az anionok, a poliaminok, a prolin és a glutation méréséhez nagy hatékonyságú folyadék kromatográfián (HPLC) alapuló módszereket dolgoztunk ki.

### **Módszerfejlesztés a stresszfolyamatok válaszreakcióinak a követésére**

A szervetlen anionokat ion kromatográfias módszerrel, anion cserélő oszlopon választottuk el. Az anionokat vezetőképesség mérő detektorral mértük. Az elválasztásra használt analitikai oszlop érzékenysége miatt olyan mintaelőkészítési eljárást kellett kidolgoznunk, amely a komplex növényi extraktumok estében is lehetővé teszi a mérendő szervetlen anionok meghatározását. Erre a célra az ún. "clean up" technikát használtuk, és szilárd fázisú extrakcióval,  $C_{18}$  oszlopon tisztítottuk meg a mintáinkat. Az így kapott oldatok alkalmasak voltak arra, hogy a növényi minták anion tartalmát megmérjük.

A membránok és a nukleinsavak integritásának megőrzésében fontos szerepet játszó poliaminokat savas kioldással nyertük ki a növényi mintákból, benzoilezett származékot készítettünk belőlük, majd az elkészült származékokat fordított fázisú kromatográfias oszlopon elválasztottuk, és UV detektort használtunk a komponensek mérésére. Ennek a származék képzési technikának az előnye, hogy viszonylag egyszerűen megvalósítható, és stabil, hosszabb ideig tárolható vegyületet eredményez. A benzoilezett poliaminok UV detektorral, 254 nm-en kellő érzékenységgel vizsgálhatóak, a módszer alkalmas növényi minták vizsgálatára. Amennyiben a minta prolin, ami az egyik legnagyobb koncentrációban előforduló szerves ozmotikum, és mennyiségére is szükségünk volt, egy másik származék képzési reakciót kellett alkalmaznunk. Erre a célra FMOC-Cl-ot használtuk, és az elválasztást egy nem porózus, fordított fázisú kromatográfias oszlopon valósítottuk meg. A nem porózus oszlop előnye, hogy nagyon gyors elválasztást tesz lehetővé, így egy mérésen belül el tudtuk választani a poliaminokat és a prolint is (Szegetes *et al.*, 1996, 2000).

A glutation redukált és oxidált formájának a meghatározására két módszert is kipróbáltunk. A mintákat savval extraháltuk, majd az extraktumokból kétféle származékot készítettünk. Az összes glutation szint

mérésénél az oxidált tiolokat redukáltuk, és mBBR-nal készítettünk belőlük származékot. A kész származékot fordított fázisú oszlopon kromatografáltuk, és fluoreszcenciásan detektáltuk. Ez a módszer rendkívül érzékeny, pmol anyagmennyiség detektálását tette lehetővé. Mivel az oxidatív stressz mértéke az oxidált glutation-diszulfid mennyiségével arányos inkább, és nem az összes glutationéval, viszont a GSH/GSSG arány meghatározása megduplázza a mintaszámot, mindez nagyon megnehezíti a glutation napi ritmusának a vizsgálatát. Ezért egy másik, szintén folyadék kromatográfias elválasztáson alapuló módszert is kipróbáltunk. Ennek a módszernek a segítségével közvetlenül meg tudtuk határozni a redukált/oxidált glutation arányt. A redukált/oxidált glutation arány meghatározásánál a szabad tiol csoportokat karboximetileztük. Származék képzésre DNFB-t használtunk, amely a primer amino csoportokkal reagálva UV detektorral jól mérhető vegyületet ad. A DNP származékot Amino-5S oszlopon választottuk el.

Az alkalmazott módszereinkről elmondható, hogy alkalmasak a növények stresszválaszainak követésére és felhasználhatóak a növényélettani, növényi biokémiai kutatásban, valamint a környezetvédelmi és környezeti stresszhatás vizsgálatokban is eredményesen alkalmazhatóak.

### **Stresszfolyamatok vizsgálata növényekben**

Az *Aster tripolium* levélben só stresszre a  $\text{Na}^+$  ion akkumuláció emelkedett, ellenben a felvett  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionok szintje már a 10. napra csökkent és a 45. napra igen alacsony szintre esett vissza, különösen a  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  esetében (Erdei *et al.*, 1995). Az anionok közül a  $\text{Cl}^-$  koncentrációja hasonlóan alakul mint a  $\text{Na}^+$  ioné. Alacsony  $\text{Cl}^-$  koncentrációnál  $\text{NO}_3^-$  akkumulálódott a növényekben, de ezt a folyamatot már 10 mM NaCl is visszazorította.

Napraforgóban a  $\text{Na}^+$  ion akkumuláció nőtt NaCl bekezelést követően, arányosan a sókoncentrációval, de a  $\text{Na}^+$  ionok nem vettek részt az ozmotikus szabályozásban a PEG-gel kiváltott szárazság stresszben. A  $\text{Na}^+$  felhalmozódás elsősorban a gyökérben jelentkezett és csak részlegesen transzlokálódott a hajtásban a nátrium ion. A Viki nagyobb hatékonysággal tudta kizárni a nátrium iont a hajtásból mint a Blumix.

Meghatároztuk a különböző stressz hatásokra megváltozó klorid, nitrát, foszfát és szulfát koncentrációt a vizsgált növényekben. A kísérleteink azt mutatták, hogy a bromid- és nitrit tartalom a kimutatási határt nem érte el egyik növényi szervben sem. Só stressz hatására a szervetlen anionok koncentráció változásának nyomon követésével különbséget tudtunk tenni egy glükofita és egy halofita növény között. A különböző növényi szervek ion tartalma alapján következtetni tudtunk a növények ionfelvételi mechanizmusára is. A NaCl kezelések során a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> ion koncentráció együtt változott. A magas Cl<sup>-</sup> koncentráció visszaszorította a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> felhalmozódását.

A szárazság és só stressz hatását a növények vízpotenciáljuk csökkentésével próbálják ellensúlyozni. A só stressz esetén ionos anyagokat akkumulálnak, míg szárazság stressz hatására inkább szerves vegyületeket, többek között prolint, és a membránok integritásának a megőrzésére poliaminokat szintetizálnak és akkumulálnak. Ennek a folyamatnak fontos szerepe van a tolerancia kialakulásában. A növényi minták poliamin szintjeinek vizsgálata során jellemző különbséget találtunk a szárazságtűrő *Sorghum bicolor* és a vízhiányt nehezebben elviselő kukorica között. Búza esetében a putreszcin és a prolin szint együtt változott a különböző fajtákban, de a termesztett búzafajták szárazságtűrése és a virágzás után a zászlólevelekből mérhető poliamin, valamint a prolin szintek között nincs egyértelmű kapcsolat.

Az ozmotikus, só és UV-B stressz hatására bekövetkező glutation szint változást meghatároztuk. A különböző növényekben a glutation és a glutation-diszulfid aránya, illetve a glutation-diszulfid koncentrációja arányos volt az oxidatív stressz mértékével, így annak nyomon követésére jól használható. Megállapítottuk, hogy a glutation koncentrációja napi ritmus szerint változik a növényekben, és ezt a ritmust a környezeti stresszhatások (pl. só stressz) deszinkronizálják. A glutation rendszer napi ritmusának a vizsgálatát kiegészítettük a glutation reduktáz és a glutation S-transzferáz napi ritmusának a vizsgálatával. Ezeket a vizsgálatokat búzán végeztük el. A búza növekedése során a glutation reduktáz aktivitása a napi ritmusát megtartva növekedett.

Búzában a glutation reduktáznak (GR) a napi ritmusa mind a levélben mind a gyökérben jól kimérhető, a glutation S-transzferáz (GST) szintje oszcillál a sejtekben, de ennek a ritmusnak a periódusideje rövidebb a napi ritmusnál. Az

életkor előrehaladásával a GR nőtt búza gyökérben és levélben egyaránt, ugyanakkor a GST csak gyökérben (Szegletes *et al.*(2), 2000).

Kísérleteink során kidolgoztunk olyan nagy hatékonyságú folyadék kromatográfián (HPLC) alapuló módszereket, amelyek alkalmasak arra, hogy növényi mintákból meghatározzuk a szervetlen anionokat, a poliaminokat, a prolint és a glutation redukált és oxidált formáját. A módszereinket alkalmazzuk a biokémiai és fiziológiai kutatásokban. Az irodalmi adatok alapján kiválasztott vegyületek koncentráció változásának a nyomon követésével jellemezni tudtuk a kísérleti növények állapotát és stresszreakcióikat a különböző környezeti stresszhatások mellett. A vizsgált biológiai élő rendszerek túlságosan sok változósak ahhoz, hogy egy-egy kiragadott paraméter egyértelmű választ adjon arra kérdésre, hogy hogyan reagálnak a növények a környezet változására, ezért a vizsgált paraméterek összességét kellett elemezni. Ez alól talán csak a glutation-diszulfid a kivétel, mivel koncentrációjának időleges megnövekedése egyértelműen jelzi az oxidatív stresszhatást (Erdei *et al.*, 1995), de az általunk használt UV-B stresszhatáshoz a kísérleti növények gyorsan adaptálódtak (Erdei *et al.*, 1995; Barabás *et al.*, 1998), így az oxidatív stressz megfelelő jelzéséhez gyakori mintavételekre volt szükség.

Összefoglalva, feltételezzük, hogy a növények stressz folyamataira adaptált Selye-féle koncepciónak megfelelően növényekben a stresszhatásra adott válaszok során a biokémiai és a fiziológiai folyamatok oszcillációjának paraméterei módosulnak, deszinkronizálódnak. Feltételezésünk szerint a növények stresszválaszait előidézhetheti az oszcilláló biokémiai reakciók modulációja, illetve a deszinkronizációja. Ennek a folyamatnak csökkent rezisztencia lehet az eredménye. A stresszor kölcsönhathat a biológia óra beállításában résztvevő szignál transzdukciós kaszkádreakcióval az input oldalon, vagy az output oldalon, a transzláció, vagy végtermék fehérje közvetlen befolyásolásával.

## A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Erdei, L., Pestenác, A., Barabás, K. & Szegletes, Zs.: Adaptive responses of plants under stress conditions. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, **30**: 27-37 (1995). (imp.f.<sub>1995</sub>: 0.050)
2. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. & Pestenác, A.: Responses in polyamines titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, **147**(5): 599-603 (1996). (imp.f.<sub>1996</sub>: 1.142)
3. Barabás, K. N., Szegletes, Zs., Pestenác, A., Fülöp, K. & Erdei, L.: Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, **153**: 146-153 (1998). (imp.f.<sub>1998</sub>: 1.195)
4. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. N., Pestenác, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth B. & Dér, A.: Environmental stress and the biological clock in plants: an integrated approach. *J. Plant Physiol.*, **152**: 265-271 (1998). (imp.f.<sub>1998</sub>: 1.195)
5. Szegletes, Zs., Erdei, L. & Cseuz, L.: Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, **00**: 000-000 (2000). (imp.f.<sub>1998</sub>: 0.173) (*elfogadva*)
6. Szegletes, Zs., Fülöp, K., Oroszi, L., Dér, A. & Erdei, L.: Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. (2000). (*előkészületben*)

## A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. Erdei, L., Laszlavik, M., Pestenác, A., Szabó Nagy, A., Szegletes, Zs., Fodor, E. & Barabás, K. (1994) Stressz és adaptáció növényekben [Stress and adaptation in plants, language: Hungarian]. *SZBK Napok*, Szeged, Hungary. (*előadás*)
2. Laszlavik, M., Erdei, L., Szegletes, Zs. & Maróti, Z. (1994) Effects of salinity, osmotic and UV-B stresses on the anion composition in wheat and sunflower. *BioStress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (*poszter*)
3. Laszlavik, M., Maróti, Z., Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Cation and anion composition of *Aster tripolium* L. grown under low and high salt condition. *BioStress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (*poszter*)
4. Laszlavik, M., Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Determination of polyamines levels under salt, osmotic and UV-B stresses in plants by HPLC. *BioStress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (*poszter*)
5. Maróti, Z., Laszlavik, M., Erdei, L. & Szegletes, Zs. (1994) Effects of salinity and osmotic stress on the anion composition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *9<sup>th</sup> FESPP Congress*, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S363. (*poszter*)
6. Szegletes, Zs., Barabás, K., Erdei, L. & Laszlavik, M. (1994) Determination of glutathione reductase activity and levels of reduced and oxidized forms of glutathione by HPLC in wheat. *9<sup>th</sup> FESPP Congress*, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S370. (*poszter*)



7. Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Determination of the changes of the reduced and oxidised glutathione levels by HPLC in *Aster tripolium* L. under UV-B stress. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
8. Barabás, K., Szegletes, Zs., Pál, E. & Erdei, L. (1995) Defence strategies against oxidative stress in plants. XXV. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
9. Szegletes, Zs., Laszlavik, M., Maróti, Z., Ördög, M. & Erdei, L. (1995) A kis sókoncentrációjú tápoldatokban nevelt halofita *Aster tripolium* ionháztartása [Ion composition in the halophytic *Aster tripolium* grown in low salt concentration medium, language: Hungarian]. XXV. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
10. Barabás, K. N., Szegletes, Zs., Fülöp, K. & Erdei, L. (1996) UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). 10<sup>th</sup> FESPP Congress, *From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, Special Issue: 231. (előadás)
11. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K., Pestenác, A., Kovács, A. & Tóth, B. (1996) Effects in environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. 10<sup>th</sup> FESPP Congress, *From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, Special Issue: 267. (poszter)
12. Szegletes, Zs., Barabás, K., Pestenác, A., Fülöp, K., Kovács, A., Tóth, B., Kalmár, L. & Erdei, L. (1996) Szárazság-, só- és UV-B stressz oxidatív komponensei növényekben. [Oxidative components of drought, salt and UV-B stresses in plants; language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)
13. Szegletes, Zs., Erdei, L. & Cseuz, L. (1996) Connection between drought tolerance and the accumulation of polyamines and proline in wheat. 10<sup>th</sup> FESPP Congress, *From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, Special Issue: 280. (poszter)
14. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. N., Pestenác, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A. & Tóth, B. (1997) Environmental stresses and the circadian rhythm in plants. "Stress of Life" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
15. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. N., Pestenác, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B. & Dér, A. (1997) A környezeti stressz és a cirkadián ritmus lehetséges kapcsolata növényekben [The effect of the environmental stresses on the circadian rhythm of plants, language: Hungarian]. VI. *Magyar Növényélettani Kongresszus*, Budapest, Hungary. (előadás)
16. Fülöp, K., Barabás, K. N., Szegletes, Zs., Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Effect of salinity on the antioxidant system in wheat. "Stress of Life" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
17. Szegletes, Zs., Fülöp, K., Barabás, K. N., Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Diurnal changes of the glutathione levels under salt stress conditions in wheat. "Stress of Life" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (poszter)
18. Cseuz, L., Kertész, Z., Matuz, J., Mózsik, L., Szegletes, Zs., Erdei, L. (1998) Wheat breeding system with special attention to abiotic stresses. 9<sup>th</sup> *International Wheat Genetics Symposium*, Saskatoon, Canada. In:

Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium (ed.: Slinkard, A. E.), vol. 4, pp. 13-15 (poszter)

19. Szegletes, Zs., Fülöp, K., Barabás, K. N., & Erdei, L. (1998) Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. 4<sup>th</sup> International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease, Antwerp, Belgium. (poszter)
20. Erdei, L., Csiszár, J., Fediuc, E., Szegletes, Zs. & Tari, I. (1999) A glutation rendszer központi szerepe a növények abiotikus és biotikus stressz válaszában. [The glutathione system on the cross-road in the signalling network in plants, language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)