



**A NÖVÉNYI ANTIOXIDÁNS VÉDEKEZŐRENDSZER
ENZIMATIKUS ELEMEINEK VÁLTOZÁSA SÓ (NaCl)
STRESSZ HATÁSÁRA**

Rios-Gonzalez Krisztina

Doktori (Ph.D.) értekezésének tézisei

Témavezető
Dr. Erdei László
a biológia tudományok doktora
Dr. Veisz Ottó
az MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia

Mezőgazdasági Kutatóintézet, Martonvásár
2002

BEVEZETÉS

Napjainkban a növényélettani kutatásoknak jelentős részét a stresszkutatások teszik ki. Ez magyarázható egyrészt a bioszférában bekövetkező változásokkal:

- globális klímaváltozás,
- ózonlyuk kialakulásával az UV-B sugárzás növekedése,
- a szikes, sós talajok kialakulása,
- arid (sivatagos) területek kiterjedése;

másrészt azzal, hogy a növények válaszmechanizmusai, illetve az, hogy hogyan alkalmazkodnak a különböző stresszkörülményekhez, még nem teljesen ismert. A vizsgálatok intenzív és széleskörű elterjedéséhez gazdasági tényezők is hozzájárulnak, hiszen a kedvezőtlen körülmények a haszonnövényeknél tetemes minőségi és mennyiségi veszteséget okoznak évente, és ez az élelmiszerellátásban gondokhoz vezethet.

A környezetben bekövetkezett változásokat nyomon követve megállapíthatjuk, hogy bizonyos folyamatok már visszafordíthatatlanul elindultak. Ilyen esetekben nem tehetünk mást, mint hogy megpróbálunk alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. Mindez a növényvilágra is érvényes, így a növénynemesítőknek ezt szem előtt kell tartaniuk. Mindezeket figyelembevéve a kísérletek távolabbi célja az lehet, hogy a védekezőmechanizmusok vizsgálata során kapott eredményeket felhasználva, bizonyos fajok kedvező tulajdonságait kiemelve, a növénynemesítők új, nagyobb ellenállóképességgel rendelkező fajtákat állítsanak elő, és ezért vizsgálatainkat mezőgazdasági növényekkel (búza, kukorica és napraforgó) végeztük.

Minden stresszhatásnak van oxidatív komponense, így a növények az őket érő külső hatásokon keresztül egyfajta oxidatív stressznek is ki vannak téve. Ez szabad gyökök és aktivált oxigénformák koncentrációjának

növekedésében nyilvánul meg. E hatások kivédésére egy összetett, enzimatikus és nem enzimatikus elemekből álló antioxidáns rendszer épült ki. A külső környezet változásainak hatása jól mérhető ezen rendszer enzimatikus elemeinek aktivitásán keresztül.

KUTATÁSI CÉLOK

Munkánk kezdetén már ismert volt az a tény, hogy a növényi szervezetekben külső tényezők hatására megnő a szabad gyökök és reaktív oxigéntartalmú molekulák koncentrációja. Ezek káros hatásai ellen kiépült egy hatékony antioxidatív védekezőrendszer, mely enzimatikus elemeinek aktivitása változást mutat külső stressztényezők hatására. Így ezek nyomonkövetésével feltárható a növény érzékenysége adott stresszfaktorra, illetve annak növényre gyakorolt hatása. Mivel a sókezelést (NaCl) követően szintén megnő az aktív oxigénszármazékok koncentrációja (Hernández és mtsai, 1993), lehetőségünk van a sóstressz hatásának vizsgálatára az antioxidáns védekezőrendszer enzimatikus elemein keresztül.

- Több élettani folyamat az élő szervezetekben napi ritmus szerinti változást mutat. A glutation reduktáz enzim aktivitásán keresztül vizsgáltuk, jelen van-e ez a ritmus az enzimatikus védekezőrendszerben.

- Kísérleteinkben arra is a választ kerestünk, hogyha ez a ritmus jelen van az enzim aktivitásában, a különböző mértékű NaCl kezelés megváltoztatja-e a jellemzőit.

- Külső környezeti hatások közül a só mellett a különböző nitrogénforrások (nitrát, ammónium) hatását tanulmányoztuk a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, kataláz és glutation-S-

transzferáz enzimeken keresztül. Arra kerestünk választ, hogy miként hatnak ezek a tényezők a védekezőrendszer aktivitására, illetve egymásra. Erősítik, vagy gyengítik egymás hatását. Ezek megválaszolásához vizsgáltuk az enzimek aktivitásának változását, illetve izoenzimeik jelenlétét különböző körülmények között nevelt növényekben.

- Az aldehid oxidáz enzim, bár nem antioxidáns, az utóbbi években bekerült a stresszhatásokkal foglalkozó tanulmányok körébe. Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy napjainkban mind több, stresszválaszhoz köthető funkcióját tárták fel. Mivel folyamatosan újabb és újabb információk jelennek meg az enzimmel kapcsolatban, sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk, annak reményében, hogy sikerül az enzimet azonosítanunk kukorica gyökér mitokondriumban vagy peroxiszómában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növénynevelés

A kísérletek során növényeinket folyadékkultúrában neveltük, amely megkönnyítette a különböző kezelések (50, 100, 150 mM NaCl), illetve az eltérő nitrogénforrások (NO_3^- , NH_4NO_3 , NH_4^+), hatásának vizsgálatát. Vizsgálatainkban a mezőgazdasági termelés szempontjából fontos növényeket - búza, kukorica és napraforgó - használtunk kísérleti objektumként. A növényeknek mind a levelét, mind pedig a gyökerét használtuk kísérleteink során.

Enzimaktivitás meghatározása

Kataláz (EC 1.11.1.6) aktivitásának meghatározásához a H_2O_2 bomlását követtük nyomon 240 nm-en (1 EU = 1 μmol lebomlott H_2O_2 1 perc alatt) (Upadhyaya és mtsai, 1985).

Guajakol peroxidáz (EC 1.11.1.7) aktivitásának meghatározásakor a guajakol oxidációjából származó abszorbancia növekedést követtük nyomon 470 nm-en (EU = 1 μmol oxidált guajakol 1 perc alatt) (Upadhyaya és mtsai, 1985).

Glutation reduktáz (EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározására Smith és munkatársai (1988) által kidolgozott módszert használtuk. A DTNB redukcióját követtük nyomon 412 nm-en, amit a GSSG-ből az enzimaktivitásnak köszönhetően keletkezett GSH okozott. 1 EU az az enzimmennyiség, amely 1 μ mol oxidált glutationt redukál egy perc alatt.

Szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1) aktivitás meghatározása Beauchamp és Fridovich (1971) módszerével történt. A reakció a NBT redukció gátlásán alapul riboflavin jelenlétében, megvilágításkor. 1 egység az az enzimmennyiség, amely a redukció 50%-os gátlásához szükséges. A kontrollt sötétben tartottuk, míg a többi mintát megvilágítottuk 15 percig világítóasztalon. A minták fényelnyelését 560 nm-en mértük.

Glutation-S-transferáz (EC 2.5.1.18) aktivitásának meghatározásához 340 nm-en követtük az abszorbancia változását. 1 EU egyenlő azzal az enzimmennyiséggel, amely katalizálja 1 μ mol S-2,4-dinitrofenilglutation képződését 1 perc alatt (Mannervik és Guthenberg, 1981).

Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A minták elválasztását nem denaturáló (natív) PAGE-n végeztük. A gyűjtőgél zsebeibe az egyes futtatásoknál a különböző mintákból azonos fehérjemennyiséget (45 μ g) vittünk fel. Nem folyamatos pufferrendszerrel dolgoztunk. A gélek 20 mA/gél folyamatos áramerősség mellett kb. 5 óra hosszat futottak a GR, SOD, Kat és AO enzimek esetében, míg a GPx enzim esetében 16 órát. A futtatás során állandó hőmérsékletet (5 °C) tartottunk.

Sejtalkotók preparálása

A sejtalkotók elválasztása megfelelően feltárt kukorica gyökér mintákból 25-57%-os lineáris szacharóz gradiens oszlop segítségével történt. A peroxiszómák azonosításához a kataláz, míg a mitokondrium frakciók elkülönítéséhez citokróm-oxidáz enzim aktivitását használtuk. Az AO enzim aktivitásának meghatározása poliakrilamid gélben történt.

Matematikai analízis

A különböző periódusok kiszámításához Fourier transzformációt használtunk a MATLAB 4.0 programozási környezetbe ágyazott radix-2 fast Fourier transzformációs algoritmus segítségével.

A szignifikáns különbségek meghatározásához Student félé kétmintás t-próbát használtunk. Mintaszám 3-6 kísérlettől függően. A statisztikai elemzéseket a STATISTICA 5.0 program segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az általunk elvégzett vizsgálatok a következő eredményekre vezettek:

- A glutation reduktáz enzim aktivitása napi ritmus szerint változik, melynek periódusideje 15 és 20 óra között van. A napiritmus mellett rövidebb periódusidejű, úgynevezett ultradián ritmust tudunk azonosítani. Megfigyeléseink szerint a GR aktivitásában megfigyelt ritmus közvetlenül nem fény által szabályozott, mivel a változások mind levélben, mind pedig gyökérben már a sötét periódus vége előtt elindultak.

- Sókezelés (NaCl) hatására megnőtt a glutation reduktáz enzim aktivitása. A sókezelés nem érintette a ritmus periódusidejét, csak az amplitúdóját. Ez azt sugallja, hogy a sóstressz a feltételezett ritmusképző kimeneti oldalán fejti ki hatását. Az általunk azonosított ultradián ritmus a sókezelésre érzékenynek mutatkozott.

- A sókezelésen kívül a különböző nitrogénforrások milyensége is hatással van az antioxidatív védekezőrendszer enzimikus elemeire. Változásokat tapasztaltunk a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, kataláz, és glutation-S-transzferáz enzimek aktivitásában, mind pedig a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, izoenzim összetételében. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az ammónium ion stressz-szignálként szolgálhat, amely néhány – a korai stressz-adaptációs folyamatokért felelős – enzimek aktivációját indukálja.

A különböző gyökérrégiók vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a különböző nitrogénforrás antioxidáns enzimekre gyakorolt hatása eltér a gyökér csúcsi régiójában a teljes gyökérben tapasztaltaktól. Mindez arra utal, hogy az élő szervezetekben zajló folyamatok érzékenysége eltérő.

- Az aldehid oxidáz enzim sejten belüli lokalizációjának vizsgálatának eredményeiből megállapítható, hogy az enzim kukoricában is a citoszolban található.

A munkánk során kapott eredmények további részletekkel egészítik ki az antioxidáns védekezőrendszerrel kapcsolatos ismereteket. Mindezek hozzájárulnak a növényi védekező mechanizmusok működésének jobb megértéséhez. Az ezirányú kutatások távolabbi célja az, hogy a nemesítők számára olyan információkkal szolgáljon, melyek segítségükre lehetnek a jobb stressz rezisztenciával rendelkező fajták előállításához szükséges nemesítési stratégiák kidolgozásához.

IDÉZETT IRODALOM

- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Hernández, J. A., Corpas, F. J., Gómez, M., del Río, L. A. and Sevilla F. (1993): Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species. *Physiol. Plant.* 89: 103-110.
- Mannervik, B. and Guthenberg, C. (1981): Glutathione transferase (Human placenta). *Methods in Enzymol.* 77: 231-235.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smith, B. N. (1985): Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *J. Plant Physiol.* 121: 453-461.

TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

(* -gal jelölt publikációk a dolgozat témájához kapcsolódnak)

*L. Erdei, Zs. Szegletes, N. K. Barabás, A. Pestenác, **K. Fülöp**, L. Kalmár, A. Kovács, B. Tóth and A. Dér (1998): Environmental stress and the biological clock in plants: changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J. of Plant Physiol.* 152: 265-271.

N. K. Barabás, Zs. Szegletes, A. Pestenác, **K. Fülöp** and L. Erdei (1998): Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defense mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. of Plant Physiol.* 153: 146-153.

E. Zdunek, O. Falik, **K. Fülöp**, M. Gersani and S. H. Lips (2000): Interchange of shoot and root signals during competition and limiting nitrogen. In: Nitrogen in a sustainable ecosystem: from the cell to the plant. M. A. Martins-Loução and S. H. Lips (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 205-210 ISBN 90-5782-063-3.

***K. Rios-Gonzalez**, L. Erdei and S. H. Lips (2002): The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen source. *Plant Science* (in press).

Rios-Gonzalez K. és Veisz O. (2002): Abiotikus stressz hatására bekövetkező változások a növények antioxidáns enzimrendszerében. *Botanikai Közlemények* (in press).

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

N. K. Barabás, Zs. Szegletes, **K. Fülöp** and L. Erdei (1996): UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). The 10th FESPP Congress, Florence, Italy, Special issue to Plant Physiology and Biochemistry, p: 231. (előadás)

Zs. Szegletes, N. K. Barabás, A. Pestenác, **K. Fülöp**, A. Kovács, B. Tóth, L. Kalmár and L. Erdei (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)

- L. Erdei, Zs. Szegletes, N. K. Barabás, A. Pestenác, **K. Fülöp**, L. Kalmár, A. Kovács, and B. Tóth (1997): Environmental stress and the circadian rhythm in plants. Abstract of the XXVIIth Conference of Membrane Transport Phenomenon, Sümeg, Hungary, p. 61. (poszter)
- L. Erdei, Zs. Szegletes, N. K. Barabás, A. Pestenác, **K. Fülöp**, L. Kalmár, A. Kovács, B. Tóth and A. Dér(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)
- K. Fülöp**, N. K. Barabás, Zs. Szegletes, F. Horváth and L. Erdei (1997): Effects of salinity on the antioxidant system in wheat. Abstracts of 'Stress of Life. Stress and adaptation from molecules to man' Congress, Budapest, Hungary, p.101. (lecture)
- L. Erdei, Zs. Szegletes, N. K. Barabás, A. Pestenác, **K. Fülöp**, L. Kalmár, A. Kovács, and B. Tóth (1997): Environmental stresses and the circadian rhythm in plants. Abstracts of 'Stress of Life. Stress and adaptation from molecules to man' Congress, Budapest, Hungary, p.100. (lecture)
- Zs. Szegletes, **K. Fülöp**, N. K. Barabás, F. Hováth and L. Erdei (1997): Diurnal changes of the glutathione levels under salt stress conditions in wheat. Abstracts of 'Stress of Life. Stress and adaptation from molecules to man' Congress, Budapest, Hungary, p. 91. (poster)
- E. Zdunek, O. Falik, **K. Fülöp**, M. Gersani and S. H. Lips (1998): Shoot and root signals in response to limiting nitrogen. 5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation, Luso Portugal.
- K. Fülöp**, N. K. Barabás, R. T. Omarov, L. Erdei and S. H. Lips (1998): Distribution of antioxidant and Mo-enzymes in maize nodal roots as effected by salinity and inorganic nitrogen ions. Gordon Research Conference: Cellular Basis of Adaptation to Salt and Water Stress in Plants, Oxford, UK. (poster)
- Zs. Szegletes, **K. Fülöp**, N. K. Barabás and L. Erdei (1998): Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. 4th International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease, Antwerp, Belgium. (poster)

N. K. Barabás, **K. Fülöp**, R. T. Omarov, L. Erdei and S. H. Lips (1998): Salinity, nitrogen source and the distribution of glutathione reductase, superoxide dismutase and guaiacol peroxidase in maize nodal roots. Book of abstracts, XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary. (poster)

Rios-Gonzalez Krisztina, Bencze Szilvia, Janda Tibor, Veisz Ottó, Bedő Zoltán (2001): Antioxidáns enzimek aktivitásának változása stresszkörülmények között különböző gabonafajtákban. VII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Hungary. (előadás)

Rios-Gonzalez K. és Veisz O. (2002): Abiotikus stressz hatására bekövetkező változások a növények antioxidáns enzimrendszerében. Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztály 1380. szakülés, Budapest, 2002. április 15.