BÚZA CSIRANÖVÉNYEK K/^{86}Rb/-FELVÉTELE ÉS -TRANSZLOKÁCIÓJA A K ELLÁTÁS FÜGGVÉNYÉBEN

Egyetemi doktori értekezés

OLÁH ZOLTÁN

TÉMAVEZETŐ: ERDEI LÁSZLÓ tudományos munkatárs

MTA Szegedi Biológiai Központ,
Biofizikai Intézet
SZEGED

1983

B 2324
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS 1
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 3
II. ANYAG ÉS MÓDSZER 12
II. 1 Növénynevelés 12
II. 2 Az elemtartalmak meghatározása 15
II. 3 Excizált buzagyökerek K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból.. 15
II. 4 Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból.. 16
II. 5 Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/-felvétele és transzlokációja a tápoldatból 17
II. 6 Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ leadása 17
II. 7 K transzportra ható gátlószerek alkalmazása .. 18
II. 8 A kisérletek reprodukálhatósága és statisztikus hibája 18
III. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK 19
III. 1 Excizált buzagyökerek K/^{86}Rb/ felvétele 19
III. 2 A kation tartalmak változásai a K/^{86}Rb/ felvétel során 20
III. 3 Intakt buzanövények K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból. 23
III. 4 Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/-felvétele és-transzlokációja a tápoldatból 34
IV. MEGVITATÁS 43
V. RÖVIDITÉSEK 49
VI. KÖSZÖNETNYILVÁNITÁS 50
VII. IRODALOM 51

BEVEZETÉS

A nagy tömegben termesztett szántóföldi növények anyag- és energiatakarékos tápanyagellátása égető problémája az egyre intenzivebb müvelési technológiával dolgozó mezőgazdaságnak. Szinte egyidőben a fellépő igényekkel, szükségessé válnak olyan alapkutatási eredmények, amelyek tisztázzák a fő tápelemek felvételi mechanizmusát, valamint azokat a transzport folyamatokat, amelyek meghatározzák a felvett anyagok sorsát a növényen belül.

Tápanyag gazdálkodási kisérleteket már régóta folytatnak mind szabadföldön, mind növényházi méretekben, de igazán szisztematikus, csak a növény táplálkozási sajátosságaira koncentráló kutatás a vizkulturás kisérleti rendszerek térhóditásával kezdődött meg. A talaj önmagában is komplex viselkedésével szemben a tápoldatos kulturák jól ellenőrizhető koncentráció viszonyai mellett lehetővé válik a növények harmonikus tápanyagigényének felmérése.

A kálium /K/ a talajból felvehető makrotápelemek: nitrogén /N/, foszfor /P/, kén /S/, kalcium /Ca/, magnézium /Mg/ egyike. A gyökerek ionos formában veszik fel a külső közegből. Ezt az állapotát felvevődve, a növényen belüli transzportja /transzlokációja/ során is

József Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

megtartja. Az N,P és S ezzel szemben a legváltozatosabb kovalens kötésü vegyületek felépitésében vesz részt, a Ca és Mg pedig számos stabilis komplex alkotója.

A K a szárazanyag 3-6%-át teszi ki; sulyának megfelelően közremüködik a citoplazma turgorának, elasztikus tásának fenntartásában. A sejtben lejátszódó életfontosságu biokémiai reakciók megkivánják a meghatározott ionmiliő fenntartását /ill. kontrollját és szabályozását/. Egyes enzimrendszerek a K koncentráció egy bizonyos értékénél kezdenek müködni, mások egy határozott K szintnél szüntetik be aktivitásukat. Ezért érthető, hogy minden sejt képes K tartalmának szabályozására. A kérdés ezek után az, hogy hogyan, milyen molekuláris mechanizmusok igénybevételével valósul meg ez? Mi a rendszer szignálja a müködés meginditásához, mi állitja le az apparátust a kivánt K tartalom elérésekor? Ha ezekre a kérdésekre választ kapnánk, közelebb kerülhetnénk az optimális tápanyag ellátás megvalósitásához, az optimális mütrágya felhasználás mellett biztositaná a növények fejlődéséhez szükséges és elegendő K utánpótlást és összhangban állna a növényi sejtek önszabályozó K transzport rendszerével is.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A növények optimális elemellátásának megvalósitására tett erőfeszitések nem ujkeletüek az irodalomban. A mult század végétől kezdődően Liebig, Sachs majd Hoagland munkái jelentős törvényszerüségek felfedezéséhez vezettek a növények táplálkozása terén, azonban a növény szerveződési szintjén tett megfigyelések molekuláris biológiai tudásunkkal való összeegyeztetése csak az utóbbi évtizedekben vált lehetségessé.

A K-nak, mint az egyik makro tápelemnek jellemző tulajdonsága az, hogy a sejtek belsejében képes felhalmozódni és egy fiziológiás koncentráció tartományon belül mozogva biztositja a növekedés és K felvétel között fennálló dinamikus egyensulyt. Már Hoagland felveti a kérdést: Hogyan képesek a növények akár koncentráció gradiens ellenében is felvenni a K-ot és meghatározott koncentráció értékek között tartani azt a növények fejlődése során? A felvetett kérdésre adandó válaszban /Hoagland 1944/ körvonalazódott egy pumpa mechanizmus léte, mely képes a K-nak a sejt anyagcserétől függő "aktiv transzportjára".

Epstein és Hagen /1952/ és Epstein /1953/ - az enzimológiában alkalmazott terminológiát felhasználva - ugy kezelik a K transzportot, mint egy fehérje katalikus reakcióját, melynek sebességére érvényes a Michaelis-

Menten összefüggés:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [K]_o}{K_m + [K]_o}$$

ahol V_{max} a K transzport maximális sebessége, $[K]_o$ a K koncentrációja a tápoldatban, a K_m a Michaelis állandó, ami a maximális sebesség felének eléréséhez szükséges $[K]_o$-val egyezik meg. A K_m-et itt úgy is értelmezhetjük, mint a K transzport rendszer különböző ionokkal szemben mutatott affinitásának mértékét.

Hogyan bizonyitható, hogy valóban jogos a K transzportot analóg kapcsolatba hozni az enzimreakciókkal? Ennek kapcsán szólnunk kell a kisérleti technika fejlődéséről is, ami szorosan kapcsolható az izotóp jelölési módszerek elterjedéséhez. A K felvételi sebesség $[K]_o$-tól való függésének meghatározására fiatal /6 napos/, általában 0.5 mmól dm^{-3} $CaSO_4$-oldatban, sötétben nevelt csiranövények levágott /excizált/ gyökereit használták, melyet rádióaktiv K-mal /vagy ^{86}Rb-mal/ megjelölt K koncentráció soron vizsgáltak. A felvételi sebesség a külső K koncentráció függvényében 1 mmól dm^{-3}-ig egy, e fölött több telitési szakasszal jellemezhető /bi- és multifázisos/ izotermát eredményezett. Ennek értelmezésére modell rendszerek jöttek létre.

A bifázisos izotermát Epstein /1966/, Welch és Epstein /1968/ egy nagy és egy kis affinitásu K transzport rend-

szer feltételezésével magyarázza, amelyek a plazmamembránban helyezkednének el. Alacsony /$[K]_o$<1 mmól dm^{-3}/ koncentrációkon az 1-es nagy affinitásu, kis kapacitásu rendszer, mig magas /$[K]_o$>1 mmól dm^{-3}/ koncentrációju tartományban a II-es kis affinitásu, nagy kapacitásu felvételi apparátus müködik.

Epstein "párhuzamos" modelljével szemben Torri és Laties /1966/ - a sejt belső tereit is figyelembe vevő - egy "soros" mechanizmust javasol, amely térben különválasztva képzeli el a fentiekben vázolt I-es és II-es rendszert. Az I-est továbbra is a sejthártyában, mig a II-est ettől eltérően a vakuolum membránban /tonoplasztban/ lokalizálják.

Nissen /1973/ a $[K]_o$ széles tartományát átfogó modellt vet föl. A többszörös telitési szakaszt tartalmazó izotermát egyetlen K hordozó rendszernek a $[K]_o$ változására bekövetkező "minden vagy semmi" tipusu állapotváltozásaira vezeti vissza.

Mivel a $[K]_o$-ok pontosan beállithatók, a vizsgálatok kezdetben csak a $[K]_o$ hatásának megismerésére irányultak, bár már Broyer és Hoagland /1943/ korai megfigyeléseiben rámutat a K felvételi sebességnek a növény K tartalmától /ion állapotától $[K]_i$/ való függésére, amely szerint alacsony K tartalmu növények magas, magas K tartalmu növények alacsony K felvételi sebességet mutatnak. A $[K]_i$-

től való függés feltárásához olyan növényekre volt szükség, melyek jól definiált K tartalommal rendelkeznek.

Glass /1976/ kidolgozott egy sajátos kisérleti rendszert különböző $[K]_i$-ju excizált gyökerekre. Sötétben, 0,5 mmól/dm³ $CaSO_4$ oldatban nevelt 6 napos csiranövények gyökereit meritette 50 mmól/dm³ K-ot tartalmazó oldatba különböző időre. Az idő függvényében a kezdetben alacsony K ion állapotu /low salt/ gyökerekből fokozatosan magas K tartalmu /high salt/ gyökerek váltak, melyeket 0.02-0.16 mmól/dm³ között változó $[K]_o$-on vizsgált, 10 perces K felvételeket mérve. A kapott K influx értékeket a gyökerek K tartalmának $[K]_i$ függvényében ábrázolva a sebességek szigmoid lefutást mutatnak. Világossá vált, hogy erre az esetre nem alkalmazható a Michaelis-Menten kinetika, ugyanakkor az is kézenfekvőnek tünt, hogy a Hill egyenlet megfelelő interpretációban alkalmas az eredményként kapott szigmoid közelitésére.

A Hill-féle ábrázolást ugyancsak az enzimológiában használják, abban az esetben, ha egy enzimrendszer több alegységből épül fel. Lineáris alakba transzformálva az egyenletet:

$$\log K' = \frac{\log V_{max} - V}{V} + n \log [K]_i$$

Ahol az n paraméter adja meg az alloszterikus szabályozásban résztvevő alegységek számát, illetve más értelmezésben az alegységek között létesülő együttmüködés

/kooperativitás/ fokát/a V_{max} és V hasonlóan értelmezhető, mint a Michaelis-Menten kinetika esetén; a $K' = [K]_i^n$ koncentrációval, ha $V = \frac{V_{max}}{2}$/. Az n paramétert ezután több növényfajra is megmérve /Glass 1976, 1977/ 2-4 allosztérikus K kötőhelyet talált.

Jensén és Pettersson /1978/ a különböző $[K]_i$-t olyan módon állitották be, hogy a teljes tápoldatban nevelt csiranövényeket a növénynevelő oldatban tartva egyre hosszabb ideig tartó K megvonást alkalmaztak. A K influx méréseket Glasstól eltérően 2 h időtartamura választották, valamint a K adszorpció kiküszöbölésére a gyökereket 10 percig gondosan mosták izotóp mentes, a tápoldattal megegyező felvételi oldatban. Talán az eltérő kisérleti technika és növénynevelési körülmény a fő oka annak, hogy az n-re 16-os értéket kaptak - irja Glass /1977/.

Eltekintve az n paraméter becslésében mutatkozó nagy ingadozástól, az irodalomban elfogadottá vált a K transzport allosztérikus negativ feedback szabályozásának elmélete. Összevetve a $[K]_i$ és $[K]_o$ szabályozó szerepéről kapott eredményeket, az alábbi következtetések vonhatók le a K hordozó molekuláris természetére vonatkozóan:

a./ rendelkezik egy allosztérikusan szabályzódó enzim minden sajátságával,

b./ irányitottan helyezkedik el a plazma és/vagy tonoplaszt membránban,

c./ a külvilág felé egy kötőhely néz, a sejt belseje felé több, allosztérikusan gátolható alegység tekint,

d./ a K felvételi rendszer működésének sebessége függ mind a $[K]_o$ mind a $[K]_i$-tól,

e./ a $[K]_i$ alloszterikus negativ feedback gátlással hat vissza a K felvétel sebességére, ha a $[K]_i$ növekszik.

Siddiqi és Glass /1982/ Glass régebbi modelljét továbbfejlesztve a következő egyenletekben fejezi ki a fenti állitásokat: Mivel negativ exponenciális összefüggés érvényes a V_{max} és a $[K]_i$ között, ezért:

$$V_{max\,[K]_i} = \text{Max } V_{max} \cdot e^{-b\,[K]_i}$$

Ahol $V_{max\,[K]_i}$ - a maximum influx /V_{max}/ adott $[K]_i$-nél;

Max V_{max} - a maximum V_{max}, mikor a V_{max} értékét változó $[K]_i$-nél határozzák meg; b - annak a görbének a meredeksége, mely kifejezi a V_{max}-nak $[K]_i$-től való függését.

Hasonlóan:

$$K_{m\,[K]_i} = \text{Min } K_m \cdot e^{b'[K]_i}$$

Ahol $K_{m\,[K]_i}$ - a K_m egy adott $[K]_i$-on;

Min K_m - a K_m-ek minimuma, mikor a K_m-et különböző $[K]_i$-nél határozzák meg,

b' - annak a görbének a meredeksége, mely kifejezi a K_m függését $[K]_i$-tól.

Behelyettesitve a fenti két kifejezést a Michaelis-Menten egyenletbe, megkapjuk a K felvételi sebességet leiró egyenletet adott $[K]_i$-nál:

$$V_{[K]_i} = \frac{\text{Max } V_{max} \cdot e^{-b\,[K]_i} \cdot [K]_o}{\text{Min } K_m \cdot e^{b'[K]_i} + [K]_o}$$

A K hordozó sejtszintü vizsgálatához a membrán modellek ugrásszerü fejlődése adta meg a kezdő lökést, mely a 60-as 70-es évek fordulóján bontakozott ki. Erre az időre már tisztázódott, hogy először a plazma membránt vagy a tonoplasztot kellene tisztán kinyerni, majd ebben keresni tovább az enzim természetü K hordozót. A teljes megismeréshez azonban a K transzport rendszert rekonstruálni kellene. A hordozónak megfelelő lipid környezetbe való beépitése és az ATP-től függő K transzport megnyilvánulása megfelelő kisérleti rendszert biztositana a K transzport molekuláris szintü tanulmányozásához.

Az a gondolat, hogy az adenozin-trifoszfatázok szerepet játszanak a növények K felvételhez szükséges energiaátvitelben, a bakteriális illetve az állati /K - Na/-ATP-ázok vizsgálatából ered /Skou, 1965, Hokin és Dahl 1972/. Ma már meggyőzőek azok a bizonyitékok, amelyek az ATP-ázok energia közvetitő szerepét bizonyitják a K-nak a membránokon való keresztülhaladásában.

Növényi sejtek ATP-áz tartalmának kimutatásában uttörő jelentőségüek Poux /1967/, Hall /1971/, Leonard és mtsai /1973/ munkái. A növényi plazma membrán ATP-áz létére Hodges és mtsai /1972/,valamint Williamson és Wyn Jones /1972/ szolgáltattak kisérleti bizonyitékot. Runige és Wiscichnek /1973/, Balke és mtsai-nak /1974/ viszont a várakozással ellentétben a tonoplaszt membránban, összhangban a legujabb eredményekkel, csak anion

érzékeny ATP-ázt sikerült detektálniuk.

A növényi sejtmembránok csaknem mindegyike tartalmaz valamilyen ATP-ázt /Leonard és mtsai 1973/, ami problémát okoz a megfelelő membránfrakció /tonoplaszt, plazma membrán/ kinyerésében illetve a kapott membrán azonositásában. Igy az ATP-áz meghatározás mindig néhány különböző tipusu ATP-áz együttes aktivitásának mérését jelenti /Hodges, 1976/. A növényi K transzport ATP-ázok azonositását megnehezíti, hogy nem ismeretes olyan specifikus gátlószer, mint az állati /K-Na/-ATP-ázok esetében az ouabain /Skou, 1957/, mely nem hat a sejt energia átalakitásában szerepet játszó más /mitokondriális és egyéb/ ATP-ázokra. A számos technikai akadály ellenére azonban már 1970-ben Fisher és mtsai beszámoltak arról, hogy az ATP-áz aktivitások és a K influxok között szoros korreláció lehet.

Viets 1944-ben Ca és más többértékü kationok alacsony sóállapotu árpagyökerek ionfelvételére gyakorolt serkentő hatását tapasztalta. Kylin és Kähr /1973/ buzából izolált ATP-ázoknál bivalens katonok /Mg^{2+}; Ca^{2+}/ stimuláló hatását figyelte meg, ami K-mal tovább aktiválhatónak bizonyult. Jelenleg ugy gondoljuk, hogy az ATP-ázoknak valójában Me^{2+}-ATP az igazi szubsztrátja /Shikama, 1971; Szabóné-Nagy és Erdei, 1981/. A különböző kation aktiválta ATP-áz formákat illetően azonban nagy bizonytalanság mutatkozik az irodalomban. Jelenlegi ismereteink

alapján nem dönthető el teljes bizonyossággal, hogy a mért ATP-áz aktivitások milyen elkülönült transzport rendszerekhez /K - Mg -; Ca-pumpa/ kapcsolhatók /Caldwell és Haug, 1980; Williamson, 1981/.

A bivalens kationokon kivül más kationok is kölcsönhatásba léphetnek a K transzporttal. A gyökerek K felvételt kisérő H^+ leadását összefüggésbe hozták a Mitchell-i protonpumpa elmélettel. Ennek szellemében feltételezik /Ratner és Jacoby, 1976; Kozlov és Skulachev 1977; Erdei és Kuiper 1980/, hogy a K felvétele kapcsolatban állhat egy - a plazmalemmában lokalizálódó - ATP-ázzal, amely protonokat választ ki a citoplazmából a sejtmembrán felületére. Az igy kialakuló protongrádiens szolgáltatná a K felvételhez szükséges energiát.

Szólnunk kell még a K^+-Na^+ ATP-ázról is, noha mindeddig növényeknél elterjedt előfordulásáról nem számoltak be. Valószinüleg csak egyes sótürő növények rendelkeznek az állati rendszerekkel analóg K^+-Na^+ transzport rendszerrel /Karlsson-Kylin, 1974; Erdei és Kuiper, 1979/, mig más növények esetében a K a tömeghatás törvényének megfelelően a sejt belső tereiből egyszerüen kiszoritja a Na-ot /Jeschke, 1977, 1980; Hooymans, 1981; Jeschke és Nassery, 1981/.

/

II. ANYAG ÉS MÓDSZER

II.1. Növénynevelés

Kisérleteink során különböző koru buza-csiranövényeket használtunk /Triticum aestivum L. cv. Martonvásári 8/. A magvakat 24 órán át 3-szor desztillált - a továbbiakban desztillált - vizben csiráztattuk sötétben, szobahőmérsékleten. A különböző $[K]_o$-ot a tápoldatban 1. és 2. táblázatban megadott elemösszetételek mellett állitottuk elő. Az 1. táblázatban feltüntettük a vetőmag elemtartalmait is.

A csiráztatást követően 48 h-ig sötétben, majd ezt követően természetes fény-sötét ritmusban neveltük a növényeket 20 °C-os növényházban ill. fitotronban /Conviron PGW 36/ 17 °C nappali és 10 °C éjszakai hőmérséklet mellett. A fényellátást a fitotronban Sylvania FR 96 T 12-CW-VAO-235-1 fénycsövek biztositották 80 Watt/m² intenzitásban. A napi ritmus 11 h fény és 13 h sötét volt. A relativ páratartalom minden esetben állandó szint /60±10%/ körül mozgott.

A tápoldat-cserét harmadnaponként végeztük, a párologtatás okozta vizveszteséget naponta pótoltuk desztillált vizzel.

A növények a csirázás megindulásától számitott 11. napon a 2 leveles, a 17. napon a 3 leveles fejlődési stádiumot érték el.

1.táblázat A növényházban alkalmazott búzanevelő tápoldat és a vetőmag elemösszetétele.

Vegyületek	búzanevelő tápoldat elem koncentráció mmól/dm³		vetőmag elem-összetétele µmól/g sz.s.
KCl	K	0-10+	130
	Cl	0-10+	n.m.
$Ca(NO_3)_2$	Ca	1	8,12
	N	2	1430
$MgSO_4$	Mg	0,4	40,4
	S	0,4	n.m.
Na_2HPO_4	Na	0,8	150
	P	0,4	55,2
		/ppm/	
Fe-EDTA	Fe	1	1,08
H_3BO_3	B	0,1	n.m.
$MnCl_2$	Mn	0,1	0,533
Na_2MoO_4	Mo	0,01	n.m.
$ZnSO_4$	Zn	0,01	0,198
$CuSO_4$	Cu	0,004	0,169

+ A koncentrációk: 0, 0,05 0,1 0,2 0,5 1, 2, 5 és 10mmól/dm³

n.m. : nem mértük

2.táblázat A fitotronban alkalmazott búzanevelő tápoldat összetétele.

Minden tápoldathoz egyaránt hozzáadott összetevők /mmól/dm³/: 1 $MgSO_4$; 1 $Ca(NO_3)_2$; 0,5 $NaNO_3$; 0,5 NaCl; $1{,}8.10^{-2}$ Fe-EDTA; $9{,}2.10^{-3}$ H_3BO_3; $1{,}8.10^{-3}$ $MnCl_2$; 10^{-4} $NaMoO_4$; $1{,}5.10^{-4}$ $ZnSO_4$; $6{,}2.10^{-5}$ $CuSO_4$.

$\frac{[K]_o}{mmól/dm^3}$	KH_2PO_4	K_2HPO_4	NaH_2PO_4	KCl	KNO_3
0,02	-	0,01	0,1875	-	-
0,05	-	0,025	0,175	-	-
0,1	-	0,05	0,15	-	-
0,2	0,1	0,05	0,05	-	-
0,4	0,1	0,1	-	-	0,1
0,7	0,1	0,1	-	-	0,4
1,0	0,1	0,1	-	0,4	0,4
2,0	0,1	0,1	-	1,3	0,4
5,0	0,1	0,1	-	4,4	0,4
10,0	0,1	0,1	-	9,4	0,4

II.2. Az elemtartalmak meghatározása

A növények elemtartalmát Bérczi és mtsai /1982/ szerint atomabszorpciós /Ca és Mg/ ill. atomemissziós módszerrel /K, Na/ határoztuk meg AAS-1-N atomabszorpciós spektrofotométeren. Az N és P tartalom mérése specifikus szinreakcióval, fotométerrel történt.

II.3. Excizált buzagyökerek K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból

A K/^{86}Rb/ felvételi kisérleteket különböző $[K]_o$-on nevelt 11 napos buza csiranövények levágott gyökerein végeztük. A K nyomonkövetésére ^{86}Rb izotóp-jelöléses technikát alkalmaztunk /Cseh, 1979/. A K/^{86}Rb/ felvétele előtt a levágott /200-300 mg friss-sulyu/ gyökereket 5 percig desztillált vizzel mostuk /a felületre tapadt ionok eltávolitása érdekében/, majd 50 cm^3 1 mmól/dm^3 KCl-ot ill. 1 mmól/dm^3 $CaCl_2$-ot tartalmazó felvételi oldatokba helyeztük. A felvételi oldat ^{86}Rb aktivitása 2-4 MBq/dm^3, azaz 2-4 kBq/µmól K volt. A felvétel 23±2 °C-on, 1 h időtartamig történt, majd a mintákat 100 cm^3 tridesztillált vizzel 1 percig öblitettük. A felvett izotóp mennyiségét szilárd kristályos számlálóval /Gamma NK-350 tipus/ mértük meg. A minták ion-tartalmát a K-felvétel előtt és után az előzőekben leirtak szerint AAS-1-N atomabszorpciós spektrofotométerrel határoztuk meg.

II.4. Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból

Az excizált gyökerekkel végzett kisérletekkel párhuzamosan intakt növényekkel is dolgoztunk. Igy lehetőség nyilt az excizált és intakt növényi gyökerek K felvételének összehasonlitására, valamint a felvett K hajtásba való transzportjának /transzlokációjának/ vizsgálatára. A K/^{86}Rb/ felvétel és transzlokáció 100 cm^3 1 mmól/dm^3 KCl oldatból történt ^{86}RbCl izotóp jelölés mellett, melynek aktivitása 37 MBq/dm^3 volt. Három növényt használtunk fel a K ellátási sorozat minden egyes tagjából. A kisérleteket 8-12 férőhelyes mintatartókban végeztük annak megfelelően, hogy hány tagu volt a K koncentráció sor. A K felvétel igy azonos oldatból történt, kiküszöbölve az izotóphigitásból adódó hibákat. A K felvételi és transzlokációs kisérleteket kontrollált körülmények között, steril fülke alatt /laminar air flow box/ végeztük. A hőmérséklet 25 ^{o}C, a levegő relativ nedvességtartalma 45$\pm$5%, a megvilágitás 10 Wm^{-2} volt a kontroll növények esetében. A levegő 100%-os páratartalmát üvegbura alatt állitottuk elő nagy felületről történő viz elpárologtatásával. A hőmérséklet, valamint a relativ páratartalom értékét a kisérlet ideje alatt folyamatosan mértük. A K/^{86}Rb/ felvétel és transzlokáció időtartama 5 h volt. A kisérlet elinditása előtt 5 percig háromszor cserélt desztilláltvizes mosást alkalmaztunk, majd a K

felvétel végén 1 percig hasonló módon öblitettünk. A gyökereket ezt követően elválasztottuk a hajtástól, és külön-külön mértük a felvett ^{86}Rb mennyiségét γ-spektrométerrel.

II.5. Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ felvétele és transzlokációja a tápoldatból

A növényeket fitotronban neveltük 3 leveles állapotig a 2. táblázatban megadott tápoldat összetétel mellett. A K/^{86}Rb/ felvételi és transzlokációs kisérleteket ugyanazon környezeti feltételek mellett bonyolitottuk le, mint azt a II.4. pontban leirtuk. A különböző $[K]_o$-on nevelt növények megegyező $[K]_o$-on nőtt egyedeiből 4x2-es csoportokat helyeztünk egy mintatartóba. Az igy képzett csoportok a saját tápoldatukkal megegyező /ld. 2. táblázat/, de ^{86}Rb-mal megjelölt felvételi oldatba kerültek. A ^{86}Rb jelölés specifikus aktivitása a $[K]_o$ soron állandó /20 KBq/µmól/ volt. A mintákat a K felvétel meginditását követő 1. és 5. órában vettük 2x2-es bontásban. A gyökerek mosását és a felvett rádioaktiv izotóp mérését a II.4. pontban leirtaknak megfelelően végeztük el.

II.6. Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ leadása

A K/^{86}Rb/ felvételi kisérletet megelőző napon a növényeket a saját - ^{86}Rb-mal egyforma specifikus aktivitásban /20 KBq/µmól/ megjelölt - tápoldatukba helyeztük.

Az izotópos előinkubálás 20 h-án át tartott, majd a K/^{86}Rb/ felvételi kisérlettel egyidőben minden növény a saját izotópmentes tápoldatába került. Az áthelyezés előtt az izotópot 3x váltott tápoldatos mosással távolitottuk el a gyökerek felületéről. A leadott K/^{86}Rb/-ot az inditást követő 5., 30., 60., 120., 180., 240., 300., 360. percben vett 1 cm^3-es mintákból határoztuk meg γ-spektrométerben. Az igy kapott mérési pontokra illesztett egyenesek 300. percre adott értékét tekintettük az 5 h K leadás mértékének. A kisérlet befejeztével meghatároztuk a növények szárazsulyát és az eredményeket a standard felvételi oldatok specifikus aktivitásának ismeretében μmól K.g^{-1} egységekben adtuk meg.

II.7. K transzportra ható gátlószerek alkalmazása

A specifikus gátlószereket megfelelő kontroll mellett - a 2.4 DNP kivételével - alkoholos törzsoldatban adtuk a felvételi oldathoz az alábbi végső koncentrációban /mól/dm^3/: oligomicin 10^{-5}; 2.4-DNP 10^{-5}; DSPD 10^{-5}; DES 10^{-5} és 10^{-4}; kolchicin 10^{-5}. Az oldódás megkönnyitésére használt etanol koncentrációja a 0.02%-ot nem haladta meg.

II.8. A kisérletek reprodukálhatósága és statisztikus hibája

Elvégezve a kisérleteket legalább három független ismétlésben hasonló eredményeket kaptunk. A legnagyobb eltérés nem haladta meg az 50%-ot. Az elem meghatározásoknál adódott közepes standard deviációk /SD/ a követ-

kezők voltak /µmól/g szárazsuly egységben/: ± 29 K-ra, ± 32 Na-ra, ± 5,5 Mg-ra és ± 6,1 Ca-ra.

Az egy órás K/^{86}Rb/ felvételek esetében átlagosan /µmól K/g egységben /: ± 10 ±7 %, az 5 h K/^{86}Rb/ felvételnél: ± 9 ± 8 % és a transzlokáció során 17 ± 13 % .

Az excizált buzagyökerekre vonatkozó K/^{86}Rb/ felvételi méréseket GK Szeged és GK Tiszatáj fajták esetében is elvégeztük. A GK Szeged és a Martonvásári 8-as mérési hibán belül azonos eredményt adott. A GK Tiszatáj, bár jellegében hasonlóan viselkedett, kvantitative különbözött az előbbi kettőtől. Ezek alapján ugy gondoljuk, hogy a felvételi technika alkalmassá tehető a K transzport hatékonyságában különböző fajták kvantitativ alapokon nyugvó szelekciójára.

A K transzportra ható gátlószerek megválasztásánál az állati rendszereknél már ismert ill. a növényélettan más területén /fotoszintézis, sejtgenetika/ már alkalmazott anyagokat vettük alapul. Lehetőség szerint ugyanazon helyen ható, de eltérő kémiai felépitésü vegyületeket is kipróbáltunk. Ezek az anyagok kisérleti hibán belül megegyező eredményt adtak, igy mindig a legkarakterisztikusabb hatások adatait mutatjuk be.

III. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

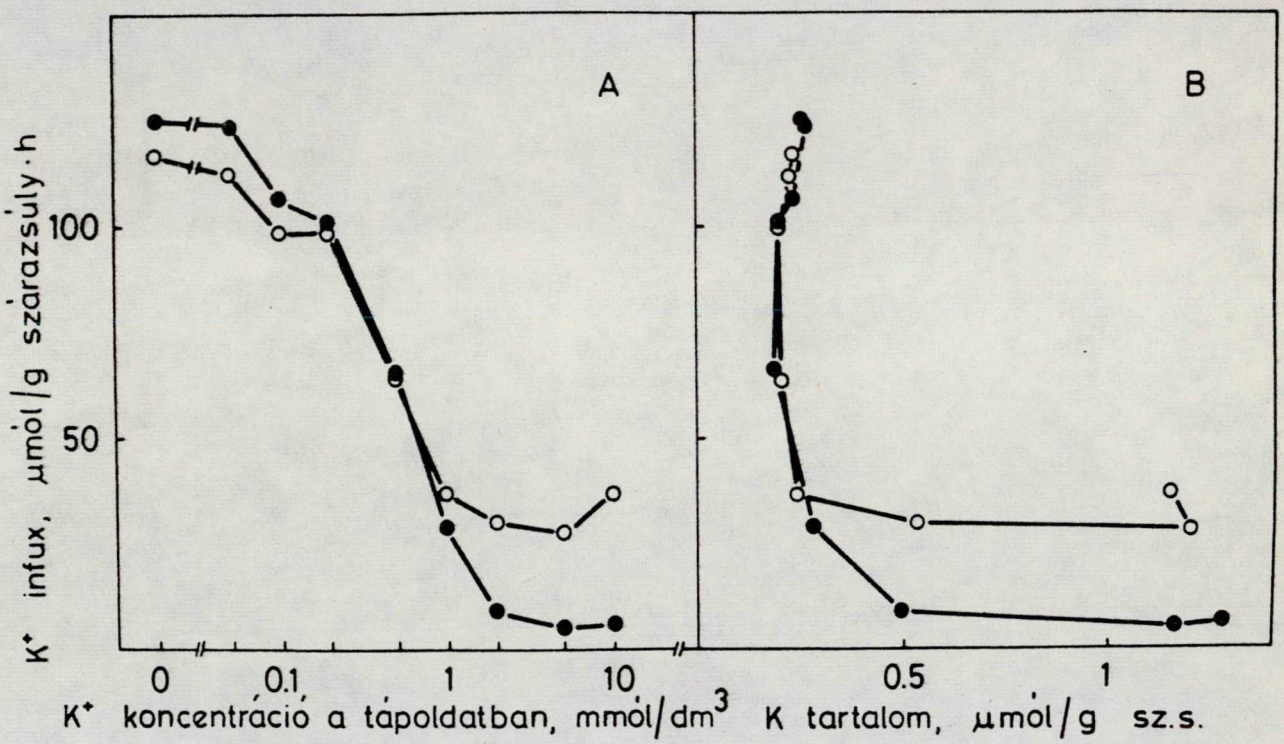
III. 1. Excizált buzagyökerek K/^{86}Rb/ felvétele

Az excizált gyökerek K-felvételének /influxának/ vizsgálata jelentette az első lépést a K-felvételi mechanizmus

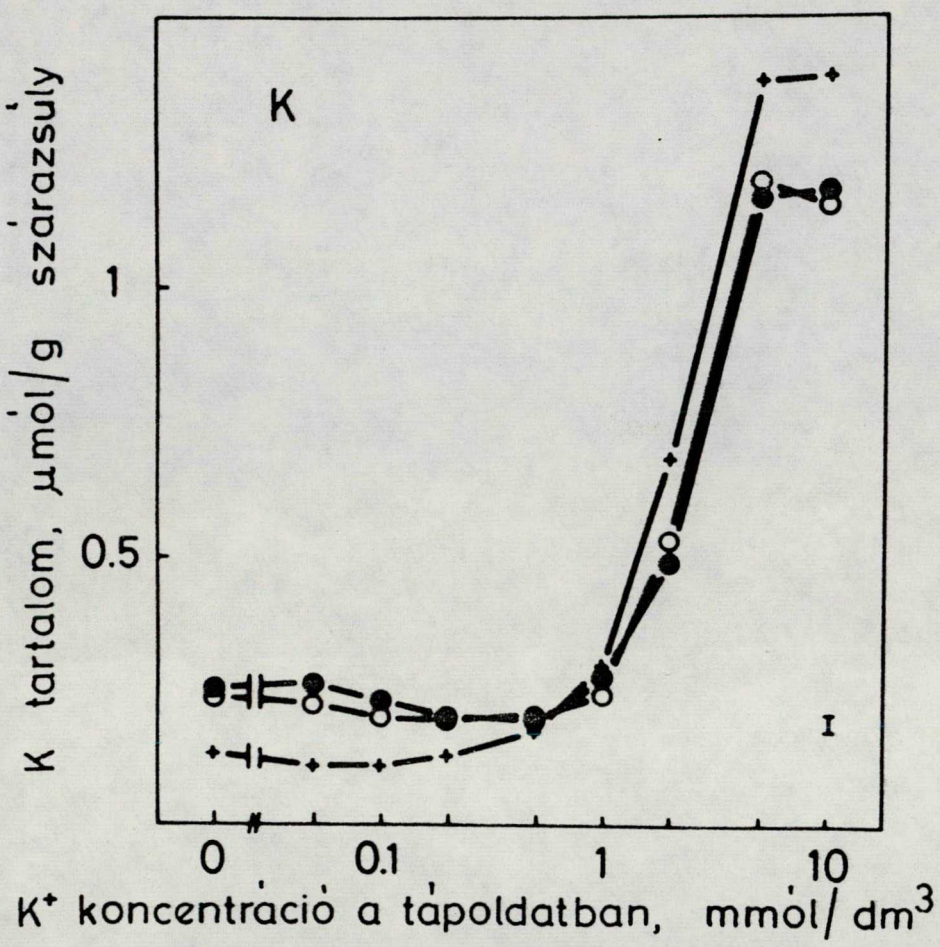
tanulmányozásában. A különböző K-koncentrációju teljes tápoldatban nőtt növények excizált gyökereinek K-felvételét mutatjuk be az 1.A. ábrán. Az alacsony K-koncentrációju tápoldatban nőtt növények esetében a K-influx magas és a Ca jelenléte megközelitően 10% serkentést mutat. A K-mal jól ellátott növények gyökerének K-felvétele alacsony és a Ca jelenléte további K-felvétel csökkenést okoz. Ha az influxokat a gyökerek K-tartalmának függvényében ábrázoljuk /1.B. ábra/, világosan látható, hogy az 1 mmól/dm³-nél magasabb K koncentrációju táplda tban nőtt növények influxa a K-tartalomtól független értéket mutat, mind a Ca jelenlétében, mind a Ca hiányában. Az 1 mmól/dm³ K-koncentrációnál alacsonyabb K-ellátás mellett nőtt növények esetében a gyökerek belső K-tartalma közel állandó /kb. 250 μmól/g szárazsuly/, s az influx sebességek a nevelő tápoldat K-koncentrációjának csökkenésével nőnek.

III. 2. A kation kartalmak változásai a K/^{86}Rb/ felvétel során

A K-tartalmak alakulását a K/^{86}Rb/ felvételi kisérlet előtt és után a 2. ábrán láthatjuk. Az 1 mmól-nál nagyobb K koncentrációju tápoldaton nőtt növények gyökerei alacsonyabb, az 1 mmól alattiak magasabb K-tartalmat állitottak be az 1 h kisérleti időtartam alatt. Az előzőleg 1 mmól-t meghaladó K koncentrációhoz adaptálódott növények K-fel-



1. ábra A búza csiranövények excizált gyökereinek K/^{86}Rb/ felvételi sebessége /influxa/ a K-ellátás függvényében /A/ ill. a felvételi kisérlet után mért K-tartalom függvényében /B/; ● - a Ca jelenlétében ill. o - a Ca elhagyásával mért felvételi sebességek.



2.ábra A búza csiranövények excizált gyökereinek K-tartalma a K/^{86}Rb/ felvételi kisérlet előtt /+/ ill. a Ca jelenlétében /•/ és a Ca elhagyásával /o/ végzett egyórás K/^{86}Rb/ felvételi kisérlet után, a tápoldat K koncentrációjának függvényében.

vételi sebességét a leadás sebessége /efflux/ meghaladta, ami gyakorlatilag netto K-leadást /K-vesztést/ eredményezett.

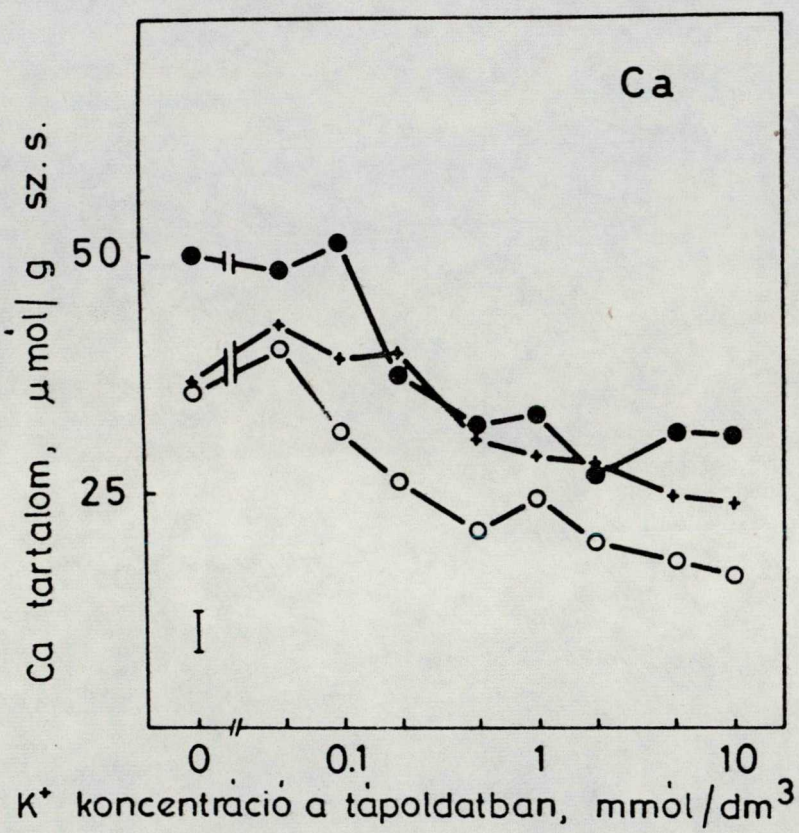
A 3. ábrán a Ca-tartalmakat mutatjuk be. A Ca-ot nem tartalmazó felvételi oldat esetén a gyökerek Ca-ot veszítettek, mig Ca jelenlétében Ca effluxot nem tapasztaltunk, sőt magasabb K-koncentráción nőtt növények esetében Ca felvételt figyeltünk meg.

III. 3. Intakt buzanövények K/^{86}Rb/ felvétele 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatból

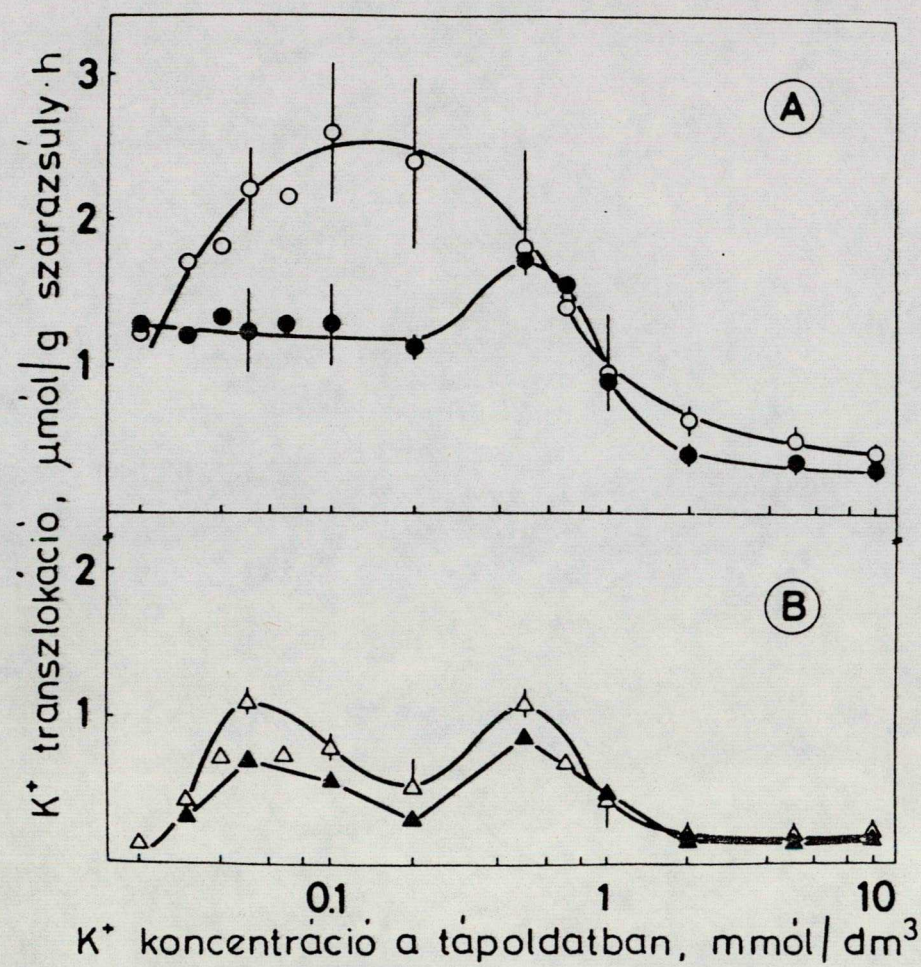
A különböző K ellátás mellett nevelt intakt növények K influxa nagyon hasonló volt az excizált gyökerek esetében kapott képhez. A levegő alacsony vagy magas páratartalma alig, a fény illetve sötét csak kevéssé befolyásolta az excizált gyökereknél már megismert képet. Ezzel ellentétben a transzlokáció már sokkal változatosabb reakciót mutatott környezeti hatásokra /4. ábra/.

A levegő alacsony relativ páratartalma mellett /4.A. ábra/ fényben kapjuk a legmagasabb transzlokációs értékeket. Ha a tápoldat K koncentrációja 5.10^{-4} mól/dm^3-nél kisebb, az igy kapott növények transzlokációja fény-sötét függést mutat, mig e fölött a gyökérből a hajtásba irányuló K transzport fényben és sötétben megegyezővé válik. A levegő 100%-os páratartalama esetén a transzlokáció se-

József Attila Tudományegyetem Növénytani Intézete SZEGED



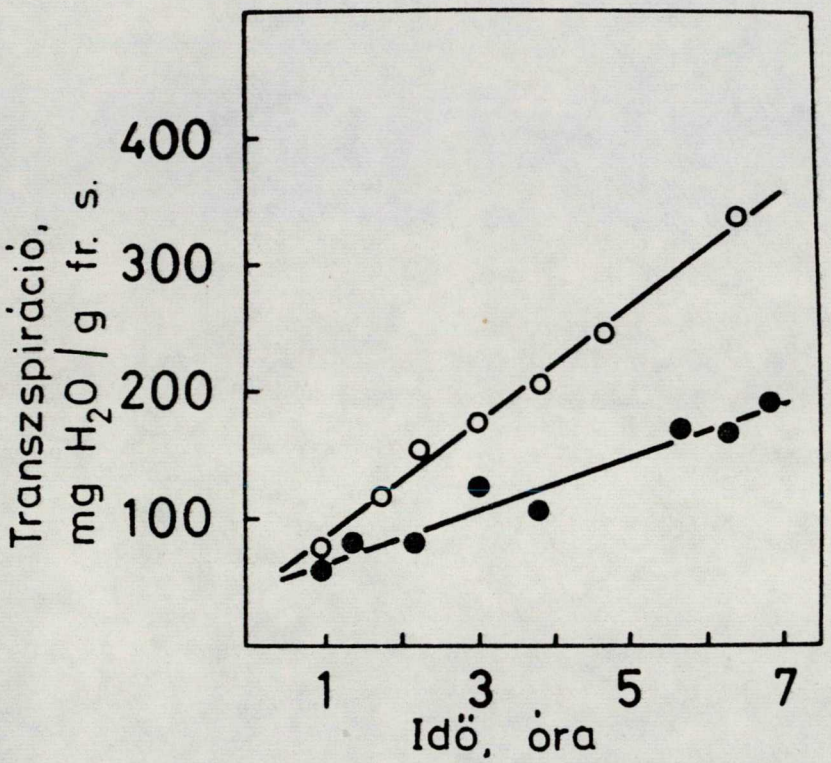
3. ábra A búza csiranövények excizált gyökereinek Ca-tartalma a K/^{86}Rb/ felvételi kisérlet előtt /+/ ill. a Ca jelenlétében /•/ és a Ca elhagyásával /o/ végzett egyórás K/^{86}Rb/ felvételi kisérlet után, a tápoldat K koncentrációjának függvényében.



4. ábra A gyökérből a hajtásba történő K/^{86}Rb/ transzlokáció intakt buza csiranövény esetében, 11 nappal a csirázás megindítása után a buzanevelő tápoldat K koncentrációjának függvényében; fényben /o,Δ/ és sötétben /●,▲/, 45 % /A/, valamint 100 % /B/ relativ levegő nedvességtartalom mellett végzett 5 órás transzlokációk. Az eredmények 4 független kisérletsorozat eredményeinek átlagai, feltüntetve a megfelelő ± S.D. értékeket.

bessége közel felére-harmadára csökken /4.B. ábra/, a fény és a sötét a megfigyelhető két relativ maximumot nem befolyásolja. Az 5.10^{-5} mól/dm³-nél kapott maximum és az azt követő minimum a belső K koncentrációnak a transzport helyek számára kifejtett redukáló hatásával, illetve az ezzel együtt csökkenő vizfelvétellel magyarázható. Ezt a nézetet támasztják alá Pettersson korábbi munkái is /1966a,b/, aki szoros korrelációt talált a transzspirációs vizáram sebessége és a szulfát felvételi helyek képződése között. Az 5.10^{-4} mól/dm³-es transzlokációs csucs a lecsökkent viztranszport ellensulyozásának következménye, mig az ereszkedő szakasz visszacsatolásos gátlás hatásából eredhet /Bérczi és mtsai 1982/. Jensén és Kylin /1980/ buza, zab és uborka gyökerek K leadását vizsgálva egy hasonló mechanizmussal müködő, a levegő páratartalmára érzékeny - a hajtásból a gyökérbe irányuló - jelzőrendszer létezését tételezték fel.

A fény-sötét, alacsony és magas páratartalom egyik lehetséges támadáspontja a K transzlokációval kölcsönhatásban lévő transzspirációs vizmozgás /Russel és Barber 1960/ lehet. Annak érdekében, hogy tisztázzuk a K transzlokáció és a transzspiráció viszonyát hasonló környezeti feltételek között, viztranszport méréseket végeztünk. A sorozatból kiragadva / $[K^+]_o$ = 0,4 mmól/dm³ a tápoldatban/ az 5. ábrán bemutatunk egy tipikus mérési eredményt.

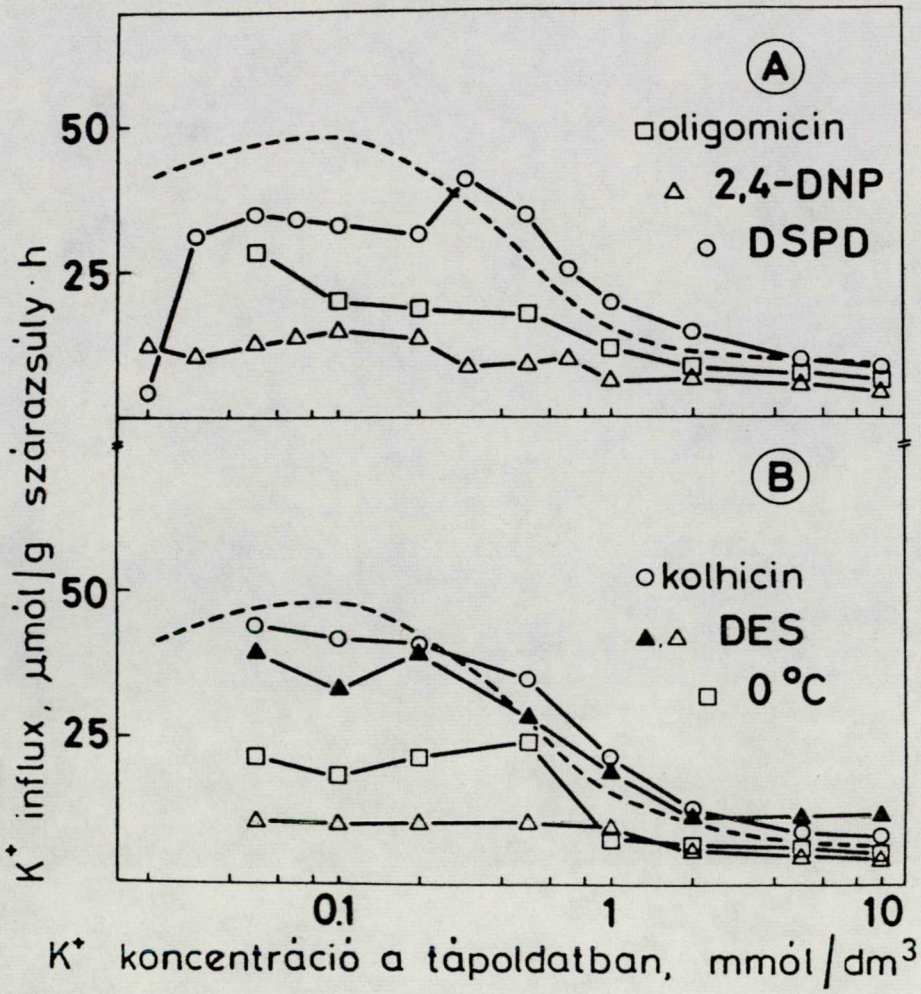


5. ábra Intakt buza csiranövények transzspirációja fényben /o/ és sötétben /•/ az idő függvényében ábrázolva. A növények 0.4 mmól/dm³ K-ot tartalmazó buzanevelő tápoldatban fejlődtek a csirázástól számitott 11. napig. A transzspirációs kisérlet ugyanolyan környezeti feltételek között történt, mint azt a K transzlokáció esetében leirtuk. fr.s. = friss suly.

50% relativ páratartalom mellett a fényhez képest a sötét mintegy 45-50%-kal csökkentette a transzspirációt. A sorozat minden tagjára elvégezve a mérést, általában 35-50% csökkenést kaptunk a sötétben végzett transzspirációra. Azonban 100%-os levegőnedvesség-tartalom mellett a transzspiráció mérési hibán belül 0-nak adódott, bár a kisérlet során a levelek guttációját figyeltük meg.
A transzspirációs és K transzlokációs méréseket összevetve megállapithatjuk, hogy a növényen keresztül haladó viztranszport fontos szerepet tölt be a K-nak a hajtásba való szállitásában. Alacsony K ellátás mellett nevelt növények esetében a viztranszport és a K transzlokáció szorosan csatolt. Ha változás áll be a transzspirációban, az maga után vonja a K transzport ugyanolyan irányu változását /pozitiv feedback/. Mivel a növények vizháztartásának regulációjában a sztómák játsszák a főszerepet, a K transzlokáció fény-sötét függésének kialakitásában részben a sztóma-mozgásokat lehet okolni. Fényben nagyobb, sötétben kisebb felületet nyujtva a párologtatáshoz /Hess 1979/ gyorsitja illetve lassitja a vizmozgást a növényben és ezzel együtt a K transzlokációját K-mal gyengén ellátott növények esetében. Ezzel ellentétben a K-mal jól ellátott növények /$[K]_o$= 0.5-1 mmól/dm³/ K transzlokációja a transzspirációtól függetlenül szabályozódik, ami a K transzportnak biztositja a környezet fluktuáló hatásaival szembeni védettséget. Ezt a növény valószinüleg sejtszintü

regulációval, belső energiaforrásokra támaszkodó specifikus K transzport enzimek segitségével éri el.

A továbbiakban ezért a K transzport és a növény energia állapotának kölcsönhatását vizsgáltuk meg anyagcseregátlók felhasználásával. Ezek hatását mutatja be a 6.A. ábra a gyökér K felvételére, illetve a 7.A. ábra a gyökérből a hajtásba történő K transzlokációra. A 2,4-DNP mind az influxra, mind a transzlokációra olyan hatást gyakorolt, hogy a felvett K/^{86}Rb/ mennyisége a magas K koncentráción nőtt növények szintjére süllyedt, ami viceversa megerősiti előző feltevésünket, miszerint magas K koncentrációkon /$[K]_o > 1$ mmól/dm^3/ passziv transzporttal jut a K a növénybe. Összhangban már szerzőkkel /Jensén 1981/ elmondhatjuk, hogy a 2,4-DNP lehetőséget nyujt arra, hogy különbséget tegyünk az anyagcseréhez szorosan kapcsolt és az attól független folyamatok között. A 2,4-DNP hatása nagyon jó egyezést mutat a K-H-ATP-ázokról elmondottakkal /Bérczi és mtsai 1982/. A 2,4-DNP protonhordozó tulajdonságánál fogva az ATP-áz által kipumpált H^+-okat visszajuttatja a citoplazmatikus térbe. A mi kisérleti körülményeink között hasonlóan a fenti mechanizmushoz, a K-H-ATP-áz által a plazmamembrán külső és belső oldala között létrehozott proton grádiens kiegyenlitéséről lehet szó. A hajtóerő megszünése lehetetlenné teszi a K aktiv transzportját, igy a K kicserélődése a környezettel a passziv szintre korlátozódik.

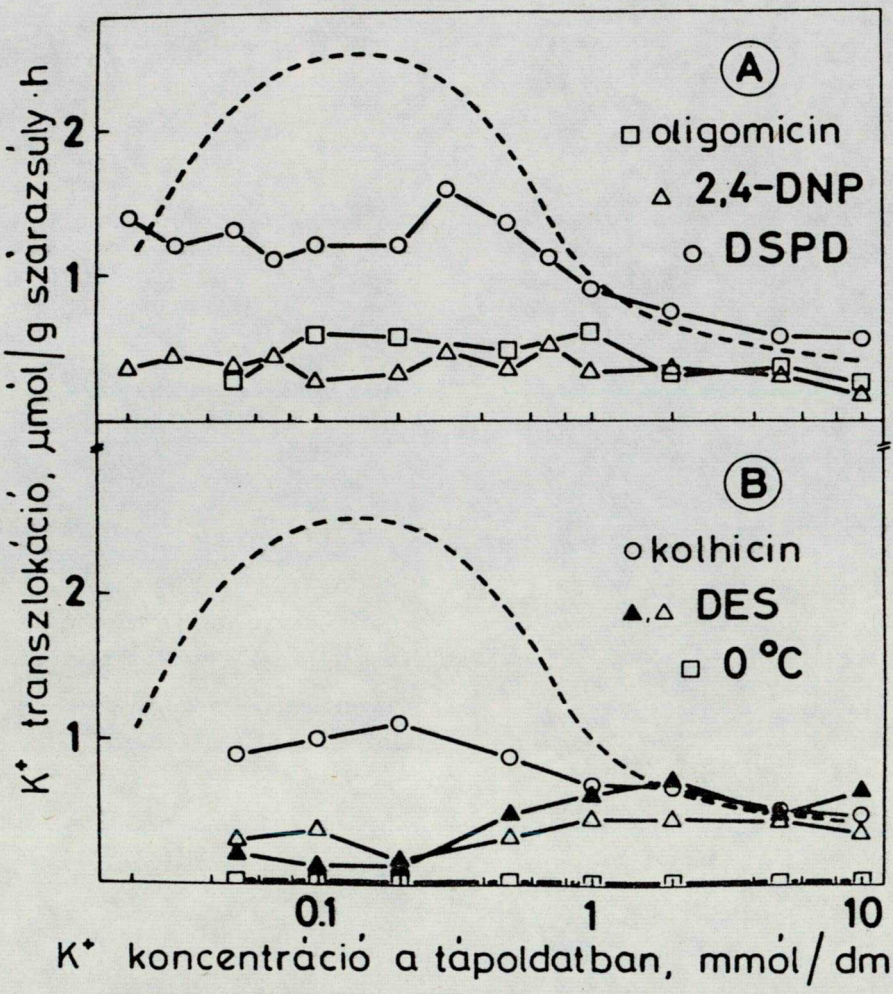


6. ábra Anyagcsere /A/ és transzport /B/ gátlók hatása intakt buza csiranövények gyökerének K/^{86}Rb/ felvételére a buzanevelő tápoldat K koncentrációjának függvényében ábrázolva. A DES-t 10^{-5} mól/dm³ /▲/ és 10^{-4} mól/dm³ /△/ koncentrációban alkalmaztuk a felvételi oldatban, míg a többi gátlószer koncentrációja 10^{-5} mól/dm³ volt. A 0 °C-os kisérletet hidegszobában végeztük. Kontrollként a gyökerek - a kezelés körülményeinek megfelelő környezeti feltételek mellett kapott - K/^{86}Rb/ influx értékeit tüntettük fel szaggatott vonallal.

Az oligomicin hatása nagyon hasonló a 2,4-DNP-vel kapott gátláshoz. Az oligomicin a mitokondriumokban az oxidativ foszforilációt gátolva az ATP ellátás megszüntetése révén függesztheti fel a K-H-ATP-áz müködését.

A DSPD hatása az előbb emlitett gátlószerekétől eltér. A transzlokációs görbe nagy hasonlóságot mutat a sötétben kapott képhez. A DSPD mint fotoszintetikus gátlószer közismert. A ferredoxinon hatva gátolja a NADP redukcióját /Droppa és mtsai 1981/. A fotoszintetikus cukorképződés megakadályozása idézheti elő a sötét hatással mutatkozó nagyfoku egyezést. A primer asszimilátáknak a K felvételben betöltött funkcióját Crapo és Ketellapper /1981/ munkája is megerősiti, miszerint a hajtásból a gyökérbe irányuló szénhidrát transzport - mint energiaforrás - szükséges mind a K felvételéhez, mind a hajtásba való transzlokációjához. Ebben a tekintetben a folyamatosan képződő asszimiláták sokkal hatékonyabban hasznosulnak, mint a raktározott poliszacharidokból hidrolizissel képződő vizoldékony cukrok /Vakhmistrov 1973/.

A 6.B. és 7.B. ábrák a kolchicin és különböző dózisu DES koncentrációk hatását mutatja be. A 0 C^{o}-os kontroll, mint nem specifikus gátlási körülmény az anyagcsere általános lelassitásával demonstrálja, hogy a K transzport igényli a szövetek normális körülmények között lezajló anyagcseréjét. Ugyancsak szöveti szinten hat a kolchicin, mivel a plazmodezmákon támad, melyek a sejtek közötti



7. ábra A metabolikus /A/ és a transzport /B/ inhibitorainak buza csiranövények K/^{86}Rb/ transzlokációra kifejtett hatását ábrázolja a tápoldat K^+ koncentrációjának függvényében. A jelölések és az inhibitor koncentrációk ugyanazok, mint a 3. ábra esetében. A szaggatott vonal az 1 A ábráról a megfelelő kontroll görbe.

anyagtranszportot biztositják. A kolchicin valószinüleg a tubulin monomerek közé épül be, ami a plazmahidak feldarabolódásához vezet /Hart és Sabnis 1973, Sabnis és Hart 1973/. A DES 10^{-5} mól/dm³ koncentrációban hasonlóan viselkedik a kolchicinhez, mig 10^{-4} mól/dm³ alkalmazása esetén a hatás mértéke megközeliti a 2,4-DNP-ét /6.B. és 7.B. ábra/.

Balke és Hodges /1979a,b,c/ vizsgálataiból tudjuk, hogy a DES 10^{-5} mól/dm³ koncentrációban zab gyökér sejtmembrán /mikroszóma frakció/ ATPáz aktivitását gátolta. Ugyanezen növények excizált gyökerein a DES a K felvételét erősen csökkentette. Ha a DES-t magasabb koncentrációban /10^{-4} mól/dm³/ alkalmazták, a hatás irreverzibilissé vált, mivel fellépett az oxidativ foszforiláció gátlása, továbbá membrán károsodásokkal is lehetett számolni. Az általunk alkalmazott 10^{-4} mól/dm³-es DES koncentrációnál a mi kisérleti körülményeink között is erről a hatásról lehet szó. A koncentrációt alacsonyabbra választva /10^{-5} mól/dm³/, a hatás már sokkal specifikusabban nyilvánul meg, hasonlóan a kolchicinhez, a DES a K felvételét alig befolyásolta, /6.B. ábra/, mig a K transzlokációját jelentősen csökkentette /7.B. ábra/. Összegezve a kochicinre és a DES kis koncentrációjára kapott eredményeket, ugy tünik, hogy a plazmodezmák funkciója a K transzportban az, hogy a gyökér kéreg része és az edénynyaláb között huzódó, az ionok mozgását akadályozó réteget /endodermisz/ áthidalja. Ezen strukturák épsége

biztositja a mindkét irányban lebonyolódó anyag- igy a K és cukor-transzportot is. A K transzlokáció másik fontos regulációs lépése az edénynyalábokban található xilém-parenchima sejtek és az élettelen xilém elemek közötti átmenet lehet. A plazmodezmákon aktiv transzporttal /ATP-áz?/ szállitódó K az élénk anyagcserével rendelkező xilém-parenchima sejtekbe kerül, majd innen feltehetően ugyancsak aktiv transzporttal választódik be a hajtásba futó xilém edénynyalábba. Az előzőekben vázolt képnek megfelelően a 10^{-5} mól/dm³-ben adott DES hatását a szekréciós mechanizmusban szerepet játszó ATP-ázok specifikus gátlásában látjuk.

III. 4. Intakt buza csiranövények K/^{86}Rb/ felvétele és transzlokációja a tápoldatból

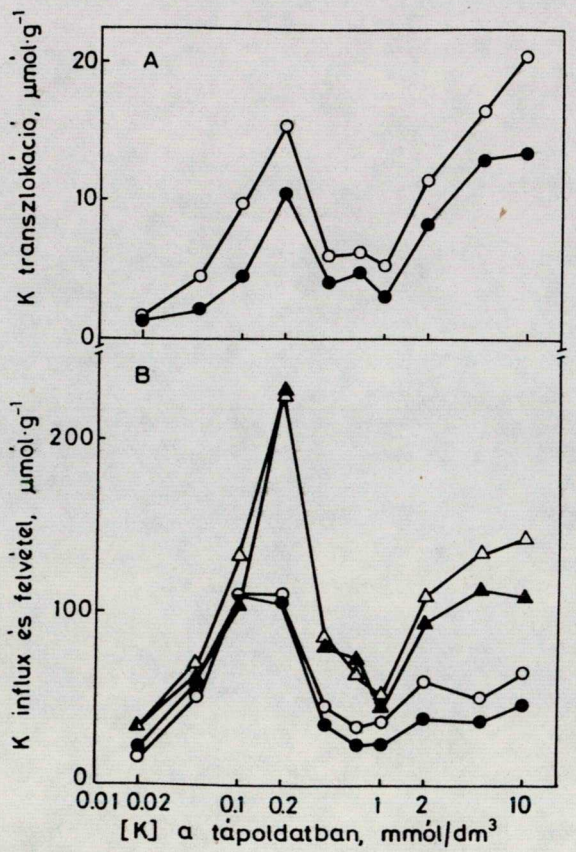
A növénynevelési rendszer tökéletesitése és a fitotron metodika bevezetése lehetővé tette, hogy hosszabb fejlődési periódusokat is tanulmányozhassunk. Itt a jobb összevethetőség kedvéért a /17 napos/ három leveles állapotu buza csiranövényekkel kapott eredményeinket mutatjuk be. A fitotronban az őszi környezeti feltételeket szimuláltuk a növények fejlődése során.

Annak érdekében, hogy a növények nevelési körülményeit jobban tükröző K felvételi rendszert alakitsunk ki, felvételi oldatként azonos specifikus aktivitásu ^{86}Rb-mal megjelölt teljes tápoldatot /2. táblázat/ alkalmaztunk. Az

Az eddigiekben ismertetett kisérletekben a különböző $[K]_o$-on nőtt növények a K/^{86}Rb/ felvétel során 1 mmól/dm^3 KCl-ot tartalmazó oldatból vették fel a K-ot. Ez a növények számára azt jelentette, hogy az addig alacsony K ellátás mellett nevelt növények hirtelen viszonylag magas illetve a magas $[K]_o$-on nőttek alacsony koncentrációju közegbe kerültek.

Meglepetésünkre, amint azt a 8.B. ábra mutatja, a saját tápoldatból történő K felvételi görbék jelentősen eltértek - ugy fényben, mint sötétben - mind az excizált, mind az intakt növények gyökerénél tapasztaltaktól, sőt ugyanilyen irányu változást tapasztaltunk a transzlokációban /8.A. ábra/ is. Az eltérés különösen $[K]_o > 1$ mmól/dm^3-nél látszott jelentősnek, mig $[K]_o \leq 0.2$ mmól/dm^3 esetén a K influx sebességeket /10 µmól/ 100 mg.h, ha figyelembe vesszük, hogy 8 megközelitőleg 10 mg szárazsulyu gyökér merül ugyanabba a felvételi oldatba/ összevetve a 100 cm^3 felvételi oldatba beadott K mennyiségével /10 µmól/ a K forrás 1 h alatt történő kimeritéséről lehet szó /8.B. ábra/.

Ha ezeket az eredményeket az 1 mmól/dm^3 K-ot tartalmazó felvételi oldatnál tapasztaltakkal együtt tekintjük, megállapitható, hogy elegendő mennyiségü K biztositása a felvétel 5 h-ás időtartama alatt lehetővé tenné a maximális /megközelitően 200-250 µmól/g szárazsuly ill. 50 µmól/g h/ sebesség elérését /6. ábra szaggatott vonal/.



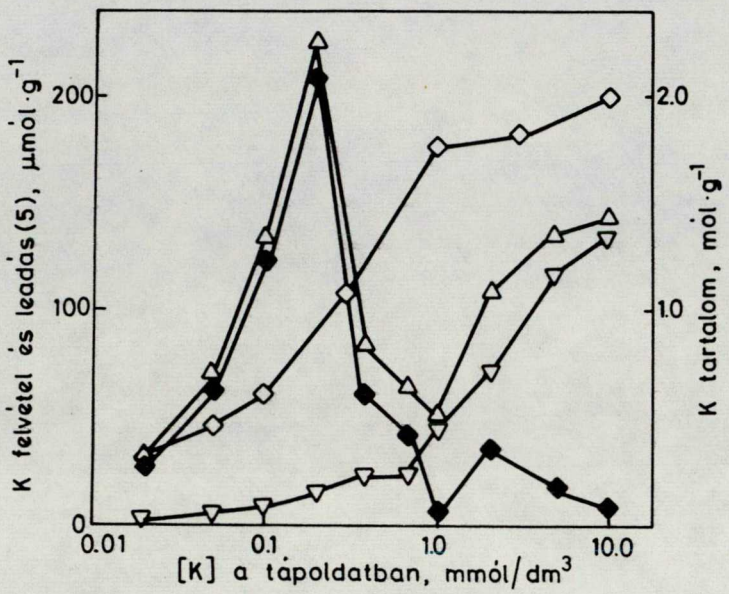
8. ábra A Intakt buza csiranövények tápoldatból történő K/^{86}Rb/ transzlokációja /5 h-ás/ fényben /o/ és sötétben /●/ a tápoldat [K]-jának függvényében.

B Ugyanezen növények gyökerének tápoldatból történő K/^{86}Rb/ influxa /1 h-ás o,●/ és felvétele /5 h-ás Δ,▲/ fényben /o,Δ/ és sötétben /●,▲/ a tápoldat [K]-jának függvényében.

A $[K]_o > 1$ mmól/dm³ K ellátás mellett nevelt növények esetében a K felvételében és a transzlokációjában tapasztalható ismételt emelkedés összeegyeztethetetlennek látszott a K transzport negativ feedback szabályozására /Glass /1976/, Jensén és Pettersson /1978/, Bérczi és mtsai /1982/, Oláh és mtsai /1982/ / tett korábbi megállapitásokkal.

Ha a K felvételi rendszer $[K]_o > 1$ mmól/dm³ esetében gátoltnak tekintjük, mivel magyarázható a sebességek ismételt emelkedése a $[K]_o$ növekedésével? Egy ujabb szabályzó mechanizmus müködése indul be 1 mmól felett? A felvetődő kérdésekre a 9. ábra adhatja meg a választ. A K tartalom és az 5 h K felvételi kisérlet során tapasztalt nettó K felvételt összehasonlitva jól látható, hogy a K felvételi sebesség emelkedése látszólagos, valójában intenziv K kicserélődésről van szó. Glass /1976/, Jensén és Pettersson /1978/ megelőző méréseit ezért kritikusan kell szemlélnünk, hiszen az általuk közölt influx méréseket csak a K tartalommal vetették össze, ami nem tükrözhette $[K]_o > 1$ mmól/dm³ esetén lejátszódó élénk K kicserélődést.

Ugyanakkor, amint azt az 1 mmól/dm³ KCl-ot tartalmazó felvételi oldatnál láttuk /2. ábra/, az influx kisérlet ideje alatt a $[K]_o > 1$ mmól/dm³-en nevelt növények gyökere K-ot veszt, tehát az igy mérhető látszólagos influxok nem tükrözik a növény valódi mechanizmusát. Glass /1976/, valamint Jensén és Pettersson /1978/ kisérleteik során az



9. ábra Intakt buzanövények gyökerének 5 h-ás K/^{86}Rb/ felvétele /Δ/, leadása /▽/, netfluxa /◆/, K felvétel-leadás/ és a gyökerek K tartalma /◇/ a tápoldat [K]-jának függvényében.

előzőleg magas tartalmat elért növényeket alacsony $[K]_o$-t tartalmazó felvételi oldatba helyezik, amely egy látszólagos influx csökkenést okoz: Az általunk alkalmazott kisérleti rendszerben a növények a nevelés során alkalmazott tápoldatból - egyensulyi körülmények között - veszik fel a K-ot. Az igy kapott netto K felvételi görbe nagyon jó egyezésben van a K transzport negativ feedback szabályozásával. Ugy érezzük, hogy csak a K felvétel és leadás, valamint az igy kialakuló tartalmak együttes vizsgálata bizonyithatja kielégitően, hogy a K felvételi rendszer $0.2 < [K]_o \leq 1$ mmól/dm³-nél valóban a sejtekben felhalmozódott K visszacsatolásos gátlása alatt áll.

A K transzport rendszer DNS által vezérelt szintézisének szabályozása és az igy létrejött alkotórészek további szerveződése /összeállás, beépülés a membránba, müködés/ jelenlegi kisérleti rendszerünkben nem különithető el. Analógiák és közvetett bizonyitékok alapján viszont az alábbi szabályzás tételezhető fel:

a./ hiányos K ellátás mellett /$0.05 < [K]_o < 0.2$ mmól/dm³/ a K transzport rendszer a csirázás megindulása után valószinüleg konstitutiv módon - függetlenül attól, hogy a K a gyökér környezetében jelen van-e vagy sem - szabályozódhat /DNS $\longrightarrow_m$ RNS $\longrightarrow$ fehérje/. A K koncentráció függő módon emeli a transzport

sebességét egészen 0.2 mmól/dm³-ig.

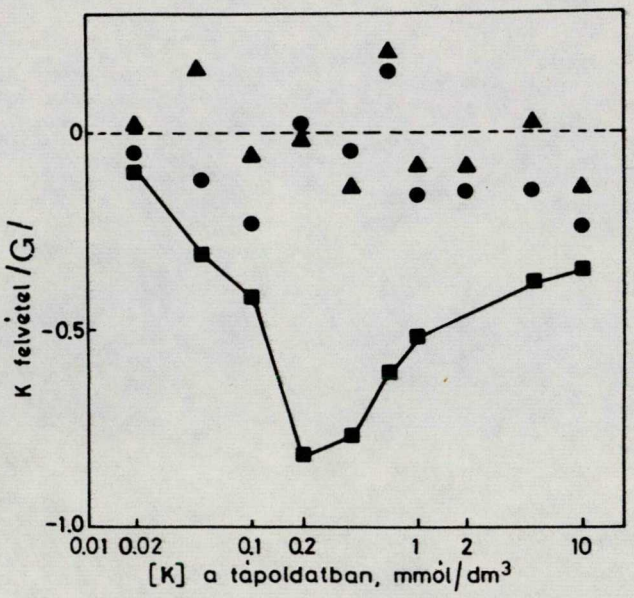
b./ optimális ellátás mellett /$[K]_o \cong 1$ mmól/dm³/ a K transzport minimumot mutat. A növény K-ra nézve telitődött. Érvényesül a visszacsatolásos gátlás, ami a DNS ⟶ K transzport rendszer és/vagy K transzport rendszer (inaktiv) ⟶ K transzport rendszer (aktiv) átmenetek gátlásában egyaránt megnyilvánulhat.

c./ luxus ellátás mellett / $[K]_o > 1$ mmól/dm³/ a K transzport mind genetikai, mind enzimológiai szintü kontrollja megszünik, helyébe a membrán két oldala között lejátszódó - feltételezhetően fiziko-kémiai törvényszerüségekkel leirható - K kicserélődési folyamatok lépnek.

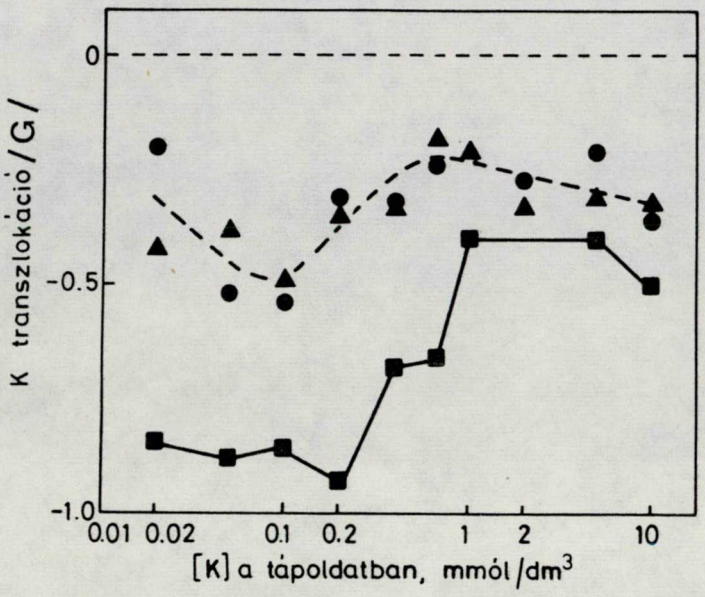
Tovább vizsgálva az egyensulyi felvételi oldatból történő K felvételt, különböző gátlási körülményeket alkalmaztunk. A 10. ábrán a sötét, a kolchicin és a 2,4-DNP-nak a K felvételére kifejtett hatását ábrázoltuk. A gátlás mértékét az alábbi összefüggéssel jellemeztük:

$$G = \frac{I - I_{kontroll}}{I_{kontroll}}$$

Ahol az I jelöli a K felvételét /vagy transzlokációját/ a gátlás esetén, mig az $I_{kontroll}$ a gátlás hatása nélkül mérhető K felvételt /ill. transzlokációt/. A 10. ábrán jól látható, hogy a 2,4-DNP a K felvételi maximumnál



10. ábra Duza csiranövények K felvételének /5 h-ás/ átlása /G; ld. szöve / 2,4 DNP-vel /■/, kolchicinnel /▲/ és sötéttel /●/ - a tápoldatból történő K/^{86}Rb/ felvétel során - a tápoldat [K] -jának fü gvényében.



11. ábra A K/^{86}Rb/ transzlokáció / 5 h-ás/ gátlása /G/ a tápoldat K -jának függvényében.
A jelek magyarázata a 10. ábránál leírtakkal megegyező.

mintegy 80% mértékben gátolja a K felvételét, majd a $[K]_o$-emelkedésével a gátlás csökken. A sötétnek és a kolchicinnek, hasonlóan az 1 mmól/dm³-es felvételi oldatnál leirtakhoz, nincs hatása. Ettől eltérően a K transzlokációjában mindhárom faktor gátol, különösen a $[K]_o < 1$ mmól/dm³ tartományban, ugyanakkor e fölött a gátlás mértéke csökken /11. ábra/.

IV. MEGVITATÁS

A K ^{86}Rb izotóppal való nyomonkövetése széleskörüen elfogadott módszer a K transzport mechanizmus vizsgálatában. Számos szerző bizonyitotta /Läuchli és Epstein 1970, Zsoldos és Karvaly 1978, Erdei 1982/, hogy a növények rövid tartalmu kisérletekben /5-6 h/ csak kismértékü, vagy elhanyagolható preferenciát mutatnak a ^{86}Rb-mal szemben. A K/^{86}Rb/ nyomjelzéses technika alkalmazásával nagymennyiségü adat gyült össze az elmult 30-40 évben.

A legtöbb mérést 0.5 mmól $CaSO_4$-on nőtt növények excizált gyökerein végezték el. Annak ellenére, hogy bizonyos kérdések megválaszolására alkalmasnak tartjuk ezt az objektumot, hangsulyoznunk kell az eredmények óvatosabb megitélésének szükségességét.

A K transzport vizsgálatok megkezdésekor előkisérletképpen összehasonlitottuk desztillált vizben 0.5 mmól/dm³ $CaSO_4$-ban, K mentes teljes tápoldatban és

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtár SZEGED

teljes tápoldatban K-mal hiányosan ellátott növények elemtartalom, K felvételi és növekedési paramétereit. Ezek alapján a $CaSO_4$-on nőtt növények inkább a desztillált, mig a K mentes, de más elemekre teljes tápoldatban nőtt növények inkább a K-mal hiányosan ellátott növények mérési adataival mutattak hasonlóságot. Ezen indokok alapján döntöttünk amellett, hogy a $[K]_o$ hatását más elemekre optimális ellátást biztositó teljes tápoldatban vizsgáljuk.

A $[K]_o$ és $[K]_i$ együttes szerepét a K transzport determinációjában - eltérően más szerzőktől /Glass 1976, Jensén 1981/ - a nevelés során mindvégig, a különböző konstans K koncentrációk tápoldatcserékkel történő fenntartásával biztositottuk. A növények igy az adott K ellátáshoz alkalmazkodva fejlődtek.

Az ily módon nevelt növények excizált gyökerei mutatták a K felvétel és transzlokáció $[K]_i$-től függő visszacsatolásos gátlását /Glass 1976, Jensén és Pettersson 1978, Bérczi és mtsai 1982, Oláh és mtsai 1982/. Több saját és irodalomból vett kisérleti eredmény összevetése alapján azonban azt mondhatjuk, hogy a gátlás pontos mechanizmusára /alloszterikus, kooperativ ill. Michaelis-Menten tipusu voltára/ következtetni a folyamat komplex természete miatt /Lüttge és Higinbotham 1979/ nem lenne jogos. A gátlás paramétereinek

becslésében tapasztalható, nagy eltéréseket mutató irodalmi adatok is erre az okra vezethetők vissza /Glass 1977/.

Figyelmünket ezért a komplexitás feltárására irányitottuk, célul tüzve ki a K traszport részfolyamatokra bontását.

Az egyik ilyen részfolyamatnak a viztranszporttal való kölcsönhatása mutatkozott. Megállapitottuk, hogy intakt növények K felvétele alig, a hajtásba történő transzlokációja annál inkább függ a viztranszport sebességétől. A sztómák vizátbocsájtó kapacitásának fény-sötét függése /Hesse 1976/ közvetlenül is hathat a vizáramhoz kapcsolt K transzportra. A levegő 100%-os relativ nedvességtartalma a viztranszport teljes leállását, ugyanakkor a K transzlokáció mintegy 50%-os csökkenését eredményezi. Az igy előtünő - a K ellátástól függő - két relativ maximummal jellemezhető transzlokációs izoterma uj, aktiv transzportért felelős hordozó helyek szintézisére ill. a környezeti hatásokra érzékeny jelzőrendszer müködésére utalhat.

Ha a $[K]_o < 1$ mmól/dm³, a növények aktiv transzporttal gyüjtik be a K-ot. Az aktiv transzport a H-ATP-áz által létrehozott proton gradiensben tárolt energia felhasználásával játszódhat le. Ezt támasztja alá a K transzport általunk is tapasztalt 2,4-DNP-érzékenysége. Az aktiv transzporton keresztül a K felvétele

és transzlokációja szorosan kapcsolódik a növény energia háztartásához. A DSPD a sötét okozta gátláshoz hasonlóan a fotoszintézis által termelt energiahordozóknak a K transzportban való hasznosulására utal.

A mitokondriális oxidativ foszforiláció leállitásával /oligomicin/ kapott eredmények mutatják, hogy a transzportálódó asszimilátáknem közvetlenül felhasználható formában /ATP/, hanem "csomagoltan" szállitódnak az aktiv transzport helyekhez, ahol szükség van az energia konvertálására /cukor→mitokondrium→ATP/. Az alternativ /raktározott/ poliszacharidok energiahordozó szerepére utal, hogy a fotoszintézis kiesése /sötét, DSPD/ csak részleges, mig a mitokondrium blokkolása az aktiv K transzport teljes leállását vonja maga után.

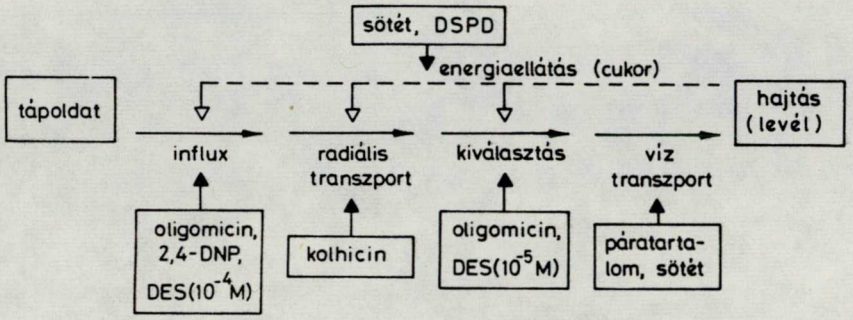
Teljes gátlást okoz a növény 0 C^{o}-ra való hütése is, ami alátámasztja a szövetek normális szintü anyagcseréje és a bennük lezajló aktiv K transzport közötti kapcsolatot.

A növényi szervek strukturális felépitése, szöveti inhomogenitása, a sejtek kompartmentációja is fontos szerepet játszik a felvett K további sorsának alakulásában. A gyökérben történő radiális K transzporhoz nélkülözhetetlen a plazmodezmák épsége, melyek az endodermisz áthidalásával kapcsolatot teremtenek a kéreg

és xilém-parenchima sejtek között. A K transzlokációjának egyik lényeges szabályozási pontja lehet a xilém-parenchima sejtekből az élettelen fa edénynyalábokba való K beválasztódás. Ebben valószinüleg egy DES-érzékeny ATP-áz müködhet közre, mely képes - akár a koncentráció gradiens ellenében is - a xilémbe juttatni a K-ot /Oláh és mtsai 1982/. A fentebb leirt mechanizmusokat a 12. ábrán bemutatott sémában összegezhetjük.

Amig a $[K]_o < 1$ mmól/dm³, a K felvételét kisérő leadás hibán belül elhanyagolható, e fölött azonban a netto felvétel alacsony szintje mellett mind a K felvétele, mind leadása rohamosan nő. A netto felvétel alacsony /20 µmólK/g/, de pozitiv szintje - összhangban a $[K]_i$-nek a $[K]_o$-tól független, állandó értékével - arra mutat, hogy a felvevődő K a növekedés /sejtosztódás/ során képződő uj sejtterek betöltésére forditódik, miközben a többi sejtben a K felvétel és leadás magas, de közel egyenlő sebességeel /140 µmólK/g/ folyik.

A K kicserélődés legfeljebb 50%-ban gátolható a 2,4-DNP-vel /10^{-5} mól/dm³/. Igy feltehetően egy közel megegyező sebességgel végbemenő aktiv és passziv /"facilitated diffusion" Jensén 1981/ összetevőre bontható, vagyis a K felvételi rendszer részt vehet a metabolizmushoz nem kapcsolódó K felvételben és transzlokációban is.



12. ábra A specifikus gátlóhelyek lokalizációja a K transzport részfolyamataiban.

RÖVIDITÉSEK

2,4-DNP: 2,4-dinitrofenol

DES : dietilsztilbesztrol

DSPD : diszalicilidénpropándiamin

KÖSZÖNETNYILVÁNITÁS

Köszönöm dr. Keszthelyi Lajos igazgató urnak, hogy lehetővé tette az MTA SZBK Biofizikai Intézetében az egyetemi doktori disszertációm elkészitését.

Köszönöm dr. Erdei Lászlónak és dr. Bérczi Alajosnak a kisérletek megtervezéséhez adott értékes tanácsait.

Köszönöm Izsó Gábornénak, Biró Jánosnénak, Nagymihály Kornéliának, Biró Magdolnának a munkák elvégzése során nyujtott segitséget.

IRODALOMJEGYZÉK

Balke, N.E. és Hodges, T.K. : Effect of diethylstibestrol on ion fluxes in oat roots. Plant Physiol. 63:42-47./1979a/

- és Hodges, T.K.: Inhibition of adenosine triphosphatase activity of the plasma membrane fraction of oat roots by diethylstilbestrol. Plant Physiol. 63:48-52. /1979b/.

- és Hodges, T.K.: Comparison of reductions in adenosine triphosphate content, plasma membrane-associated adenosine triphosphatase activity, and potassium absorption in oat roots by diethylstilbestrol. Plant Physiol. 63: 53-56. /1979c/.

Balke, N.E., Sze, H., Leonard, R.T. és Hodges, T.K.: Cation sensitivity of the plasma membrane ATPase of oat roots. In: Membrane transport in plants /U. Zimmermann, J. Dainty eds./. Berlin-Heidelberg-New York: Springer /1974/.

Bérczi, A., Oláh, Z., Fekete, A. és Erdei, L.: Potassium transport in wheat seedlings grown with different potassium supplies. I. Ion contents and potassium influx. Physiol. Plant. 55:371-376. /1982/.

Caldwell, C.R. és Haug, A.: Kinetic characterisation of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} and Mg^{2+} dependent adenosine triphosphatase activities. Physiol. Plant. 50:183-193 /1980/.

Crapo, N.L. és Ketellapper, H.J.: Metabolic priorities with respect to growth and mineral uptake in roots of Hordeum, Triticum and Lycopersicon. Am. J. Bot. 68:10-16. /1981/.

Cseh, E.: A gyökér ionfelvételének és transzlokációjának fontosabb kérdései. MTA Biol. Oszt. Közl. 22:1-19. /1979/.

Droppa, M., Demeter, S., Rózsa, Zs. és Horváth, G.: Reinvestigation of the effects of disalicylidene-propanediamine /DSPD/ and 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide /HQNO/ on photosynthetic electron transport. Z. Naturforsch. 36c:109-114. /1981/.

Epstein, E.: Mechanism of ion absorption by roots. Nature 171:83-84 /1953/.

- Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. Nature 212:1324-1327 /1966/.

- és Hagen, C.E.: A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. Plant Physiol. 27:457-474 /1952/.

Erdei, L.: A K^+ transzport regulációja növényekben. Kandidátusi értekezés /1982/

- és Kuiper, P.J.C.: The effect of salinity on growth, cation content, Na^+-uptake and translocation in salt sensitive and salt tolerant Plantago species. Physiol. Plant. 47:95-99 /1979/.

- és Kuiper, P.J.C.: Substrate-dependent modulation of ATPase activity by Na^+ and K^+ in roots of Plantago species. Physiol. Plant. 49:71-77. /1980/.

Fisher, D.B., Hansen, D. és Hodges, T.K.: Correlation between ion fluxes and ion-stimulated adenosine triphosphatase activity of plant roots. Plant Physiol. 46:812-814 /1970/.

Attila József Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

Glass, A.D.M.: Regulation of potassium absorption in barley roots: an allosteric model. Plant Physiol. 58:33-37 /1976/.

- Regulation of potassium influx into intact roots of barley by internal potassium levels. Can. J. Bot. 56:1759-1764 /1977/.

Hall, J.L.: Cytochemical localisation of ATPase activity in plant root cells. J. Microscopy 93:219-225 /1971/.

Hart, J.W. és Sabnis, D.D.: Colchicine - binding protein from phloem and xylem of a higher plant. Planta 109: 147-152 /1973/.

Hess, D.: Növényélettan, Natura Kiadó /1979/.

Hoagland, D.R.: Lectures on the inorganic nutrition of plants. Waltham: Chronica Botanica /1944/.

Hodges, T.K.:ATPases associated with membranes of plant cells. In: Transport in plants II/A /U. Lüttge, M.G. Pitman eds./ Berlin-Heidelberg-New York Springer, pp. 260-283 /1976/.

- , Leonard, R.T., Bracker, C.E. és Keenon, T.W.: Purification of an anion stimulated adenosine triphophatase from plant roots: Assotiation with plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69:3307-3311 /1972/.

Hokin, L.E. és Dahl, J.L.: The sodium-potassium adenosine-triphosphatase. In: Metabolic pathways, /L.E. Hokin, ed./, vol. 6, p. 269-315 New York: Academic Press /1972/.

Hooymans, J.J.M.: The influence of pretreatment of barley plants with K^+ and Cl^- ions on subsequent upward transport of absorbed Na^+ ions. Z. Pflanzen-Physiol. 102: 157-165 /1981/.

Jensén, P. Separation of metabolic and non-metabolic steps of Rb^+ uptake in spring wheat roots with different K^+ status. Physiol. Plant. 52:437-441. /1981/.

- és Kylin, A. Effects of ionic strenght and relative humidity on the efflux of $K^+/^{86}Rb/$ and $Ca^{2+}/^{45}Ca/$ from roots of intact seedlings of cucumber, oat and wheat. Physiol. Plant. 50:199-207.
- Pettersson, S. Allosteric regulation of potassium uptake in plant roots. Physiol. Plant. 42:207-213 /1978/.

Jeschke, W.D.: K^+-Na^+ selectivity in roots, localisation of selective fluxes and their regulation. In: Regulation of cell membrane activities in plants /Marré, E. és Ciferri, O., eds./, p. 63-78. North-Holland Publ. Co., Amsterdam. ISBN 0-7204-0615-3; /1977/.

- Involvement of proton fluxes in the K^+-Na^+ selectivity at the plasmalemma; K^+ dependent net extrusion of sodium in barley roots and effect of anions and pH on sodium fluxes. Z. Pflanzenphysiol. 98:155-175 /1980/.
- és Nassery, H. K^+-Na^+ selectivity in roots of Triticum, Helianthus and Allium. Physiol. Plant. 52:217-224 /1981/.

Karlsson, J. és Kylin, A.: Properties of Mg^{2+}-stimulated and $/Na^+ + K^+/$-activated adenosine-5-triphosphatase from Sugar beet cotyledons. Physiol. Plant. 32:136-142 /1974/.

Kozlov, I.A. és Skulachev, V.P.: H^+ Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling. Biochem. Biophys. Acta 463:29-89 /1977/.

Kylin, A. és Kähr, M. : The effects of magnesium and calcium ions on adenosine triphosphatases from wheat and oat roots at different pH. Physiol. Plant 28: 452-457.

Läuchli, A. és Epstein, E. Transport of potassium and rubidium in plant roots. Plant Physiol. 45:639-641 /1970/.

Leonard, R.T., Hansen, D. és Hodges, T.K.: Membrane-bound adenosine triphophatase activities of oat roots. Plant Physiol. 51:749-754 /1973/.

Lüttge, U. és Higinbotham, N.: Transport in plants. Berlin-Heidelberg-New York: Springer /1979/.

Nissen, P.: Kinetics of ion uptake in higher plant. Physiol. Plant. 28:113-120 /1973/.

Oláh, Z., Bérczi, A. és Erdei, L.: Potassium transport in wheat seedlings grown with different potassium supplies. II. The effects of metabolic and transport inhibitors on K^+ uptake and translocation. Physiol. Plant. 55: 377-382 /1982/.

Pettersson, S.:Active and passive components of sulfate uptake in sunflower plants. Physiol. Plant. 19:459-492 /1966a/.

- Artificially induced water and sulfate transport through sunflower roots. Physiol. Plant. 19:581-601 /1966b/.

Poux, N.: Localisation d'activites phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme. J. Microscopie 6; 1043-1058 /1967/.

Ratner, A. és Jacoby, B.: Effect of K^+, its counter anion and pH on sodium efflux from barley root tips. J. Exp. Bot. 27:843-852 /1976/.

Runige, J. M. és Wiskich, J.T.: Salt-stimulated adenosine triphosphatase from smooth microsomes of turnip. Plant Physiol. 51:1064-1068 /1973/.

Russel, R.S. és Barber, D.A.: The relationship between salt uptake and the absorption of water by intact plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 11:127-140 /1960/.

Sabnis, D.D. és Hart, J.W.: P-protein in sieve elements I. Ultrastructure after treatment with vinblastine and colchicine. Planta, 109:127-133 /1973/.

Shikama, K.: Standard free energy maps for the hydrolysis of ATP as function of pH, pMg, and pCa. Arch. Biochem. Biophys. 147:311-317 /1971/.

Siddiqi, M.Y. és Glass, A.D.M.: Simultaneus consideration of tissue substrate potassium concentration in K^+ uptake kinetics: a model. Plant Physiol. 69:283-285 /1982/.

Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta 23:394-401 /1957/.

- Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45:596-617 /1965/.

Szabóné Nagy, A. és Erdei, L.: A transzport ATP-áz tulajdonságai gabonafélékben. Bot. Közlem. 68:165-180 /1981/.

Torri, K. és Laties, G.G.: Dual mechanisms of ion uptake in relation to vacuolation in corn roots. Plant Physiol. 41:863-870 /1966/.

Vakhmistrov, D.B. és Ali-Zade, V.M.: Transition processes during liberation of bleeding sap by root system of sunflower. Physiological analysis. Fiziol. Rast. 20: 773-774 /1973/.

Viets, F.G.: Calcium and ather polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by barley roots. Plant Physiol. 19:466-480 /1944/.

Welch, R.M. és Epstein, E.: The dual mechanisms of alkali cation absorption by plant cells: their prallel operation across the plasmalemma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61:447-453 /1968/.

Williamson, R.E.: Free Ca^{2+} concentration in the cytoplasm: a regulator of plant cell function. What's new in Plant Physiology. 12:45-48 /1981/.

- és Wyn Jones, R.G.: On the roll of plasma membrane and tonoplast adenosine triphosphatases in ion uptake. IAEH/FAO Use of isotopes in soil-plant relations 69 Intern. Atomic Energy Agency Wienna /1972/.

Zscldos, F., Karvaly, B.: Effects of Ca^{2+} and temperature on potassium uptake along roots of wheat, rice and cucumber. Physiol. Plant. 43:326-330 /1978/.