

A növényi védekezőképesség fokozása egy természetes eredetű vegyülettel

Oláh Csilla*, Rácz Ilona és Rudnóy Szabolcs

*Ötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris
Növénybiológia Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter Sétány 1/C*

*e-mail: olahcsilla5@gmail.com

Összefoglalás

Trópusi eredetéből kifolyólag, a kukorica különösen érzékeny a hidegstressz által okozott károsodásra, amely képes csökkenteni a terméshozamot. Természetes eredetű vegyületek használata növelheti a hideggel és más stresszorokkal szembeni toleranciát. Ilyen fontos stresszvédő vegyületek az S-metilmethionin (SMM) és a szalicilsav (SA). A két hatóanyagot kombináltuk 1:1 arányban, remélve, hogy az új vegyület, az S-metilmethionin-szalicilát (MMS) ötvözi a kiindulási komponensek tulajdonságait. Az MMS hatását hidegstressznek kitett kukorica csíranövényeken vizsgáltuk. A változásokat több szinten detektáltuk: fiziológiai szinten a PSII kvantumhatékonyosságát és antioxidáns enzimek aktivitását; génexpressziós szinten a fenilpropanoid útvonalon jelenlévő enzimek kifejeződését; metabolit szinten a fenilpropanoid útvonalon keletkező, stresszvédelemben jelentős szerepet betöltő fenoloidok és antociánok mennyiségét.

Kulcsszavak: hidegstressz, kukorica, S-metilmethionin-szalicilát, stresszkivédés, tolerancia

Abstract

Maize, due to its tropical origin, is sensitive to cold temperatures. Chilling stress can damage metabolic processes and limit the productivity. Naturally occurring compounds are able to increase the tolerance against cold and other stresses. Such important stress protective compounds are S-methylmethionine (SMM) and salicylic acid (SA). We combined the active agents in 1:1 ratio, hoping the new compound; the S-methylmethionine-salicylate (MMS) is even more effective. We examined the protective effect of MMS in cold-stressed maize. We detected the changes at multiple levels: at physiological level we monitored the PSII functionality and

activity of antioxidant enzymes; at the level of gene expression we followed the changes in gene expression of the enzymes of phenylpropanoid pathway; at metabolic level we measured the amount of phenolic compounds and anthocyanins.

Keywords: cold stress, maize, S-methylmethionine-salicylate, stress protection, tolerance

Bevezetés

A stresszorok megjelenése gátolhatja a növények fejlődését, szaporodását és alapvető életfolyamatait. A stressztényezőket csoportosíthatjuk abiotikus (pl. hőmérsékleti, szárazság, só, tápanyaghiány stb.) és biotikus (elsősorban patogének) mivoltuk alapján. A hidegstressz komoly károkat okozhat a növények fiziológiájában, lecsökkentve ezzel a terméshozamot. Természetes eredetű vegyületek használatával növelhető a tolerancia a hideg és más stresszorok károsító hatásai ellen. Az S-metilmetionin (SMM) egy nem-proteinogén aminosav, melynek pozitív hatását bizonyították már, éppen hidegstressz fellépésekor (Rácz és mtsai, 2008; Páldi és mtsai, 2014), ezenfelül vírusfertőzés esetén is csökkent károsodást mértek a vegyülettel előkezelt növényekben (Ludmerszki és mtsai, 2011). A másik alapkomponeus a szalicilsav (SA), ami egy növényi hormonszerű anyag; fontos szignalizációs molekula, amelynek jelentőségét először a biotikus stresszek esetén mutatták ki, majd abiotikus stresszek fellépésekor is, például alacsony hőmérsékleti stressz megjelenésekor. Az exogén módon adott SA serkentette a fenilpropanoid bioszintézis útvonalát és az antioxidáns védőenzimek aktivitását (Horváth és mtsai, 2007). Ezen eredmények tudatában kombináltuk a két komponenst 1:1 arányban, remélve, hogy az új szintetizált vegyület (S-metilmetionin-szalicilát - MMS) még fokozottabban képes növelni a növények védekezőképességét hidegstresszel szemben.

Anyag és módszer

Növénynevelés: A kísérlethez MV350 fajtájú takarmány kukoricát (*Zea mays*, cv. Mv350) használtunk. A nevelés körülményei: 23°C-os állandó hőmérséklet, 14 óra megvilágítási periódussal ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ~75% relatív páratartalom. A növényeket normál ¼-es Hoagland tápoldaton neveltük. A csíranövényeket 9 napos korukban kezeltük MMS-sel. A vegyületet a kukoricák tápoldatához adtuk 0,05 mM koncentrációban. 24 óra elteltével ¼-es Hoaglandra cseréltük a tápoldatot, ezután a növényeket 4, ill. 24 órás, 6 °C-os hidegstressznek tettük ki, ezt követően vizsgáltuk az alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező károsodások mértékét.

Fluoreszcencia indukció mérése: A fotoszintetikus aktivitás mérésére PAM-101-102-103 fluorométert (Walz, Effeltrich, Németország) használtunk, amellyel képet kaphatunk a PSII kvantumhatékonyságáról, ill. a stresszorok hatását csökkentő védekezőmechanizmusokról.

Antioxidáns enzimek aktivitásmérése: a reaktív oxigénformák hatástalanításában fontos szerepet játszik az aszkorbát-peroxidáz (APX) és a glutation-reduktáz (GR). Az izolálás során 0,5 g növényi anyagot dörzsöltünk el 2,5 ml jéghideg 0,5 mM TRIS pufferben (pH 7,4), 3 mM $MgCl_2$ és 1 mM EDTA jelenlétében, dörzsmozsárban. A homogenátumot 20 percig centrifugáltuk 15000 g-val (Szalai 2009 alapján). Az enzimek aktivitásváltozását fotomertrián mérjük, az APX esetében 270 nm-en, a GR mérésekor pedig 412 nm-en.

Génexpresszió-változás: a fenilpropanoid útvonalon számos, a stresszvédelemben jelentős vegyület szintetizálódik. Az útvonal fontos enzimei közül a fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H) és a kalkon-szintáz (CHS) génjének expressziós változását mértük Real-time PCR-rel egy kezeletlen kontroll csoporthoz képest, a *C4H* expresszióját levélben, míg a *CHS* kifejeződését szárban. A reakcióhoz 0,1 g növényi mintából indultunk ki, amiből összes RNS-t nyertünk ki a MagJet Plant RNA Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) használatával, majd cDNS-t szintetizáltunk 500 ng RNS-ből kiindulva reverz transzkriptáz (*RevertAid*TM (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)) segítségével. A keletkezett cDNS-ekből vizsgáltuk az enzimek génjeinek relatív expressziós változását Real-time PCR módszerrel, SybrGreen-alapú detektálással (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Fenoloidtartalom-vizsgálat: A növények összes fenoloid- és antocián-tartalmát metanolos extraktumból vizsgáltuk. A mintavétel 0,5 g növényi mintából történt, amelyet 5 ml metanol:víz:sósav 79:20:1 arányú keverékében dörzsöltünk el. (Páldi és mtsai, 2014). A fenoloidtartalom esetében a minták abszorpcióját spektrofotométerrel 254, 270, 290, 300 és 330 nm-en mértük, amit μM galluszsav ekvivalensben (GAE) adtuk meg. A növények antocián-tartalmának változásait 530 nm-en mértük és μM cianidin-3-glikozidra (C3GE) vonatkoztatva adtuk meg.

Eredmények

A kutatás során arra kerestük a választ, hogy az MMS valóban képes-e csökkenteni a hidegstressz esetén fellépő károsodást?

A PSII aktuális kvantumhatékonyságát már a 4 óras hideg is jelentősen csökkentette (a $\Delta F/F_m'$ értéke $0,727 \pm 0,041$ -ről $0,588 \pm 0,0264$ -ra változott), majd a további hidegstressz még inkább visszavetette a fotoszintetikus aktivitást ($0,384 \pm 0,004$). Mindkét esetben azt kaptuk

eredményül, hogy MMS-előkezelés esetén kisebb volt ez a visszaesés (4 óra után $0,630 \pm 0,027$; 24 órás hidegkezelés után $0,525 \pm 0,098$ a $\Delta F/F_m'$ értéke). A PSII reakciócentrumok hatékonyságának esetében ugyancsak azt tapasztaltuk, hogy az MMS-előkezelt növényeknél kisebb volt a károsodás mértéke. A nem-fotokémiai kioltás három paraméterből tevődik össze: a ΔpH és xantofill-függő nem-fotokémiai kioltásból, a state-tranzíció függő nem-fotokémiai kioltásból és a fotoinhibíció-függő nem-fotokémiai kioltásból (D'Ambrosio és mtsai, 2008). Ezek a mechanizmusok fontos szerepet játszanak a PSII védelmében. Eredményeinkben láthatjuk, hogyan csökken a kioltás mértéke a hidegkezelések hatására, noha szignifikáns csökkenést csak a 24 órás hidegstressz esetében mértünk (az NPQ paramétere $0,132 \pm 0,068$ -ról 4 órás hideg után $0,049 \pm 0,056$ -re; 24 órás hideg után $0,023 \pm 0,03$ -ra esett vissza). Maga az MMS-kezelés nincs káros hatással növényekre, sőt a 24 órás hidegkezelésnél az előkezelt növényeknél magasabb mértékű volt a nem-fotokémiai kioltás mértéke (ekkor $0,035 \pm 0,011$ volt a nem-fotokémiai kioltások értéke). A fluoreszcens alapú és konstitutív hődisszipáció mértékéből szintén következtethetünk a hideg hatására bekövetkező károsodás mértékére. Minél magasabb ez a paraméter, annál kevésbé fordítódik az energia az elektrontranszportlánc működésére. A hidegkezelések hatására számottevően megnőtt a hődisszipáció ($0,211 \pm 0,029$ -ről 4 óra után $0,295 \pm 0,005$ -re; az MMS-sel előkezelt egyedek esetében $0,289 \pm 0,015$ -re). 24 óra elteltével az MMS-előkezelés stresszvédő hatása már megmutatkozik (a csak hidegkezelt növényeknél a hődisszipáció paramétere $0,334 \pm 0,003$; míg az MMS-előkezeltéknél $0,311 \pm 0,039$ volt). Az inaktíválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációja szintén a károsodás mértékét szemlélteti, ekkor is szignifikánsan nőtt a kibocsátás mértéke a hideg hatására, és ebben az esetben is megmutatkozik az MMS jótékony hatása a 24 órás hidegkezelés esetén (24 óra utáni hidegkezeltéknél az inaktíválódott PSII reakciócentrumok energia disszipációja $0,122 \pm 0,02$ -ről 4-szeresére változott; míg a vegyülettel előkezelt növényeknél csak 3-szorosára).

Az antioxidáns enzimek aktivitásának mérésekor gyökérben a GR-nál hidegstressz hatására nem tapasztaltunk számottevő változást, APX esetében kismértékű csökkenést észleltünk az aktivitásban. Az MMS-előkezelt növényeknél ezzel ellentétben emelkedést tapasztaltunk, 24 órás hidegkezelésnél pedig az MMS-előkezelt növények értékei jelentősen magasabbak voltak, mint MMS nélkül (GR esetében 6-szoros; APX esetén pedig duplája volt az abszorpciós változás/perc/g/ml fehérje mértéke). Levelekben nem kaptunk jelentős változást (1. diagram).

A fahéjsav-4-hidroziláz a fenilpropanoid útvonal kezdeti szakaszán működő enzim. A 4 órás hidegkezelés hatására emelkedett az enzim génjének expressziója (10-szeres volt az expressziós változás), viszont a 24 órás hidegstressz hatására csökkenést tapasztaltunk (alacsonyabb értéket kaptunk, mint a kiindulási expressziós szint), ezzel szemben az MMS-előkezelt növényeknél a 24

órás hidegkezelés hatására nőtt meg leginkább az expresszió (14-szeres volt a génexpresszió). A kalkon-szintáz kulcsenzim a flavonoidok, majd az abból kialakuló antociánok szintézisének útvonalán is. Az MMS-előkezelte növényeknél már a 4 órás hideg hatására is szignifikáns különbséget kaptunk (közel 150-szeres emelkedés), a csak hidegkezelést kapott növényekhez képest. A tovább fennálló hidegstresszt követően ez a különbség még látványosabb volt (540-szeresére emelkedett a CHS expressziója). A fenilpropanoid útvonalon képződő metabolitok vizsgálatának eredménye alátámasztotta a génexpressziós eredményeket, miszerint a fenoloidtartalom vizsgálatánál csak a 24 órás hidegkezelés hatására kaptunk magasabb eredményt az MMS-sel előkezelte növényeknél (10 μ M-rel magasabb volt a fenoloidtartalom, 1. táblázat). Az antocián-tartalom mérése esetében pedig mind a 4 és 24 órás hidegstresszt követően is jelentősen magasabb értékeket kaptunk a vegyülettel előkezelte növényeknél (mindkét esetben közel a dupláját mértük, 1. táblázat).

Megvitatás

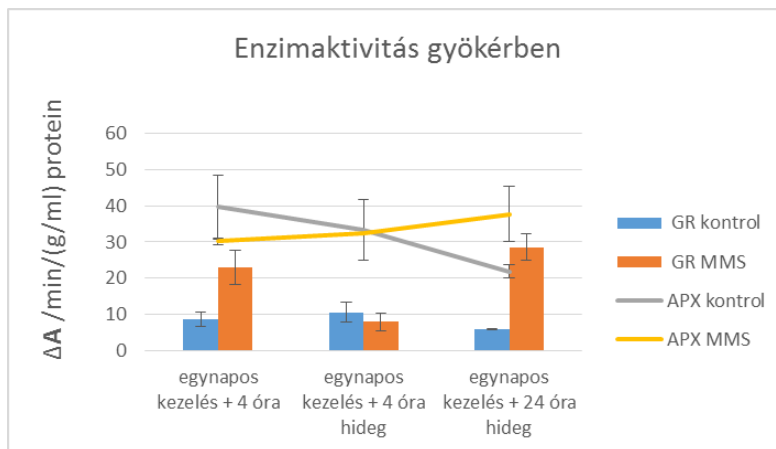
Kutatásunk korábbi vizsgálatok eredményeire épül, ahol bizonyították két, természetes eredetű vegyület pozitív hatását stresszorok fellépése esetén. Ez a két vegyület: az S-metilmetionin és a szalicilsav. Kombináltuk a két vegyületet 1:1 arányban, abból a célból, hogy létrehozzunk egy még hatékonyabb stresszvédő komponenst. A hidegstressz gátolja a fotoszintetikus aktivitást, azáltal, hogy redukálja az energiahasznosítás kapacitását (Teocharis és mtsai, 2012). Eredményeink alátámasztották, hogy alacsony hőmérséklet hatására csökkent a PSII aktuális kvantumhatékonysága, ill. a nem-fotokémiai kioltás mértéke, és nőtt a PSII inaktív reakciócentrumainak az energiadisszpációja, emellett emelkedett a hődisszipáció mértéke. Az MMS-előkezelte növényeknél kimutatható volt a vegyület pozitív hatása, ugyanis kisebb volt a csökkenés a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működési hatékonyságában. Másodlagos stresszként gyakran lép fel oxidatív stressz, mely tovább károsítja a növények életfolyamatait. Hideg stressz esetén nő az antioxidáns enzimek aktivitása, emellett Foyer magasabb fehérje tartalmat is tapasztalt (Foyer és mtsai, 2002). Az aszkorbát-peroxidáz és a glutation-reduktáz részt vesznek a hidrogén-peroxid vízzé való alakításában, megakadályozva, hogy a még reaktívabb hidroxil-gyökké alakuljon (Parvaiz, 2014). Ezzel szemben egynapos hidegkezelés hatására csak az MMS-előkezelte növények esetében tapasztaltunk enzimaktivitás-növekedést gyökér esetén. Kósa és munkatársai (2009) szintén nem mértek jelentős emelkedést rövidtávú hidegkezelés esetén levélben, viszont szintén magasabb abszorpciós értékeket kaptak, a kiindulási vegyülettel, S-metilmetionnal előkezelte növények esetében. A fenilpropanoid

útvonalon számos vegyület képződik, amelyek részt vesznek a stresszorok esetén a tolerancia növelésében (Vogt, 2010). Génexpresszió és metabolit szinten is tapasztaltuk, hogy az MMS serkentette ezen útvonalon jelenlévő enzimek génjeinek expresszióját, a fahéjsav-4-hidroxiláz és a kalkon-szintáz, illetve az enzimek működését, hiszen az MMS és a hideg kombinált hatására magasabb metabolitszintet mértünk. A mérések során igazoltuk, hogy az MMS szintén képes csökkenteni a hidegstressz negatív hatásait.

1. táblázat. Fenoloid és antocián- tartalom változás.. A fenoloidtartalom μM galluszsav ekvivalensben, az antocián-tartalom μM cianidin-3-glikozidra vonatkoztatva. Színessel jelölve, ahol magasabb értékeket kaptunk az MMS előkezelés hatására.

KO:kontrol növények; MMS:S-metilemtionin-szaliciláttal előkezelt növények

kezelés	egynapos kezelés	egynapos kezelés + 4 órás hidegstressz	egynapos kezelés + 24 órás hidegstressz
fenoloid KO	50,377 $\pm$ 6,771	43,180 $\pm$ 9,078	38,738 $\pm$ 11,281
MMS	43,950 $\pm$ 3,955	43,692 $\pm$ 5,125	47,542 $\pm$ 13,153
antocián KO	4,303 $\pm$ 1,041	4,967 $\pm$ 0,761	3,697 $\pm$ 0,961
MMS	4,873 $\pm$ 0,811	7,750 $\pm$ 0,906*	7,138 $\pm$ 0,557*



1. ábra. Glutathion-reduktáz (GR) és aszkorbát-preoxidáz (APX) aktivitás változása gyökérben. A GR esetében 412 nm, az APX-nél 270 nm-en mértük az abszorpciós változást ($\Delta\text{A}/\text{min}/(\text{g}/\text{ml})$ fehérje. KO: kontrol növények; MMS:S-metilmctionin-szaliciláttal előkezelt növények

Köszönetnyilvánítás

A munka megvalósulását a K108834 OTKA pályázat segítette.

Hivatkozások

- D'Ambrosio N., Guadagno C.R. and Virzo de Santo A. 2008. Is qE Always the Major Component of Non-photochemical Quenching? In: Allen F.J., Gantt E., Golbeck H.J., Osmond B. (eds.) Photosynthesis. Energy from the Sun. Springer 1001-1004. ISBN: 978-1-4020-6707-5
- Foyer C.H., Vanacker H., Gomez D.L. and Harbinson J. 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiology Biochemistry* 40, 659–668.
- Horváth, E., Szalai, G. and Janda, T. 2007. Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal Plant Growth Regulation*. 26, 290–300.
- Kósa, E., Szegő, D. and Horváth, E. 2009. Relationship between S-methylmethionine treatment and activities of antioxidant enzymes in maize (*Zea mays* L.) leaves at chilling temperatures. *Acta Agronomica Hungarica*. 57(4) 461–469.
- Ludmerszki, E., Rudnóy, Sz., Almási, A., Szigeti, Z. and Rácz, I. 2011. The beneficial effects of S-methyl-methionine in maize in the case of Maize dwarf mosaic virus infection. *Acta Biologica Szegediensis*. 55 (1), 109-112.
- Páldi, K., Rácz, I., Szigeti, Z. and Rudnóy, S. 2014. S-methylmethionine alleviates the cold stress by protection of the photosynthetic apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Biologia Plantarum* 58 (1), 189-194.
- Parvaiz A. 2014. *Oxidative Damage to Plant Antioxidant Networks and Signaling*. Elsevier ISBN: 978-0-12-799963-0
- Rácz, I., Páldi, E., Szalai, G., Janda T., Pál, M. and Lásztity, D. 2008. S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. *Journal of Plant Physiology*. 165, 1483-1490.
- Szalai, G. 2009. A szalicilsav szerepe gazdasági növények stressztűrő képességében. Akadémia Doktori értekezés
- Theocharis, A., Clement, C. and Barka, E. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235, 1091–1105.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. 3, 2–20.