

NÉHÁNY VÉDEKEZŐ MECHANIZMUS KUKORICA NÖVÉNYBEN SÓSTRESSZ SORÁN

SZALAI GABRIELLA ÉS JANDA TIBOR

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

A szalicilsav (SA) szintézist vizsgáltuk párhuzamosan az antioxidáns enzimek aktivitásának változásával sóstressz során fiatal kukorica növényekben. Kéthetes, tápoldatban nevelt növényeket kezeltünk 50 és 100 mM NaCl-dal 7 napig. Az antioxidáns enzimek aktivitását, a SA és az orto-hidroxi-fahéjsav (oHCA) mennyiségét a 3. és 7. napon, valamint 4 nap helyreállítás után mértük. 3 nap után a glutation-reduktáz enzim aktivitása mind a levelekben, mind a gyökerekben megnőtt a 100 mM kezelésnél. Az aszkorbát-peroxidáz aktivitása csak a levelekben, míg a gvajakol-peroxidáz aktivitása csak a gyökerekben növekedett meg 7 nap kezelés után. A szabad SA szintje mind a levelekben, mind a gyökerekben csak a helyreállítás során emelkedett meg. A 100mM NaCl-dal kezelt növények levelében a szabad oHCA szintje már a 3. naptól kis mértékben emelkedni kezdett, és a helyreállítás során nagymértékű növekedést tapasztaltunk, míg a gyökerekben csak a helyreállítás alatt növekedett meg a mennyisége.

Kulcsszavak: antioxidáns enzimek, orto-hidroxi-fahéjsav, szalicilsav, sóstressz, *Zea mays*

PROTECTIVE MECHANISMS IN MAIZE PLANTS DURING SALT STRESS

G. SZALAI, T. JANDA

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

The effect of salt stress on salicylic acid (SA) synthesis was investigated parallel with the induction of antioxidant enzymes in young maize plants. Two-week-old maize plants grown in hydroponic solution were treated with 50 or 100 mM NaCl for seven days. Antioxidant enzyme activities, and the SA and o-hydroxy-cinnamic acid (oHCA) levels were measured on the 3rd and 7th day of treatment and after four days of recovery. Glutathione reductase activity increased both in the leaves and in the roots after the 3rd day of 100 mM NaCl treatment. Ascorbate peroxidase activity increased in the leaves, but changes in guaiacol peroxidase activity could only be detected in the roots after 7 days. Free SA only increased during recovery in the leaves and roots. In the leaves of plants treated with 100 mM NaCl a slight increase was observed in the free oHCA level, which rose dramatically after recovery, while in the roots an increase could only be seen after recovery.

Key words: antioxidant enzymes, maize, ortho-hydroxy-cinnamic acid, salicylic acid, salt stress

Bevezetés

A sóstressz, ezen belül is a NaCl által okozott stressz, világszerte az egyik legjelentősebb stresszféleség, mely csökkenti a gabonafélék termésmennyiségét. A növények rezisztenciáját általában a túlélési százalékkal és/vagy a sóstressz-körülmények közötti növekedéssel jellemzik, habár ez komplex folyamat, mely magába foglal élettani és biokémiai folyamatokat, valamint morfológiai és fejlődési változásokat is (*Yildiz és Kasap* 2007). A kukorica (*Zea mays* L.) mérsékelten sótűrő növény (*Maas és Hoffmann* 1977). A növényi válasz összetettsége a sóstresszre azzal magyarázható, hogy a sóstressz ion- és ozmotikus stressz is egyben, mely membrándestrukciót és anyagcserezavarokat okozhat, valamint reaktív oxigénfajták képződéséhez vezet, mely folyamat oxidatív stresszt okoz.

A növényi sejtekben számos védekező mechanizmus létezik, melyek normál körülmények között minimálisra csökkentik az oxidatív stressz káros hatásait. Ilyenek például a reaktív oxigénformákat közömbösítő enzimek (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, peroxidázok), vagy az antioxidánsok regenerációját elősegítő enzimszerek. A szalicilsav (SA) már az abiotikus stresszfolyamatok során is jól ismert jelátvivő molekula. A külsőleg alkalmazott SA számos abiotikus stressz esetében, mint például a nehézfém, vagy a magas- és alacsony hőmérsékleti stressz, védelmet nyújthat a növényeknek. Sólstressz alatt a szalicilsav hatása nem egyértelmű: *Arabidopsis* növényekben azt találták, hogy a szalicilsav fokozta a sóstressz károsító hatását (*Borsani et al.* 2001), míg árpamagokat 1 mM SA-ba áztatva védőhatást tapasztaltak (*El-Tayeb* 2005).

Jelen munkában az endogén SA, valamint egyik prekursorának, az orto-hidroxi-fahéjsav szintjének változásait, valamint az antioxidáns enzimek működését tanulmányoztuk sóstressz során.

Anyag és módszer

Kísérleteinkhez 2 hetes tápoldatban (módosított Hoagland-oldat, *Pál et al.* 2005) nevelt kukoricánövényeket (Norma hibrid) használtunk. A növénynevelés az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének fitotronjában Conviron PGR-15 növénynevelő kamrákban történt az alábbi körülmények között: A növények 22/20 °C-on nőttek, 16/8 óra fény/sötét periódussal, a fényintenzitás $340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a relatív páratartalom 75% volt. A 2 hetes növények 50 illetve 100 mM NaCl-dal voltak kezelve 7 napig. A leveleket és a gyökereket a kezelés 3. és 7. napján, valamint 4 nap helyreállítás után gyűjtöttük be SA- illetve enzimmérésekhez.

Az enzimmérésekhez 0,5 g növényi anyagot dörzsöltünk el 12,5 ml jéghideg 0,5 M Trisz-HCl (pH 7,5) pufferben, mely 3 mM MgCl_2 -ot és 1 mM EDTA-t tartalmazott. A kataláz (KAT) és aszkorbát-peroxidáz (APX) mérés a Janda és munkatársai (1999) által leírtak szerint történt. A gvajakol-peroxidáz (GPX) Ádám és munkatársai (1995), a glutation-reduktáz (GR) Smith és munkatársai (1988), a glutation-S-transzferáz (GST) pedig Kocsy és munkatársai (2005) szerint volt mérve.

Az oHCA és SA mérésekhez 1,5 g növényi részt használtunk, a mintaelőkészítés és mérés Pál és munkatársai (2005) alapján történt.

A statisztikai analízishez kétmintás t-próbát használtunk.

Eredmények és következtetések

A kísérleteinkben alkalmazott 50 illetve 100 mM koncentrációjú NaCl mérsékelt stresszt okoz. Korábban 150 és 200 mM oldatokkal is folytattunk előkísérleteket, de a növények pár nap után elpusztultak. Az 50 és 100 mM NaCl stressz mind a gyökér, mind pedig a hajtás friss- és száraztömegét szignifikánsan csökkentette.

A KAT és GST enzimek aktivitása sem a stressz, sem a helyreállítás során nem változott (az adatok nincsenek feltüntetve). Az antioxidáns enzimek közül a GR aktivitása mind a levélben, mind a gyökérben megnőtt (1. táblázat). A levélben a 100 mM kezelés esetében már 3 nap után látható volt a növekedés, míg 7 nap után már az 50 mM sókoncentrációnál is. A helyreállítás során az enzim aktivitása csökkent, de a 100 mM kezelés esetében még mindig magasabb volt a kontroll növényekben mértéknél. A gyökerekben már az 50 mM kezelésnél is látható volt a növekedés 3 nap után, és az aktivitásértékek még a helyreállítás időtartama alatt is hasonló szinten maradtak.

1. táblázat. Glutation-reduktáz aktivitásának változása (ΔA_{412} /perc) NaCl stressz során (*:p<0,05; **:p<0,01 szinten szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva)

| | Levél | | | Gyökér | | |
|----------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| | 3 nap | 7 nap | 4 nap helyreállítás | 3 nap | 7 nap | 4 nap helyreállítás |
| Kontroll | 0,030±0,004 | 0,025±0,004 | 0,030±0,009 | 0,041±0,012 | 0,055±0,003 | 0,055±0,010 |
| 50 mM | 0,032±0,007 | 0,041±0,009 ** | 0,035±0,007 | 0,071±0,019 * | 0,082±0,010 ** | 0,069±0,005 |
| 100 mM | 0,040±0,006 ** | 0,064±0,024 * | 0,052±0,013 ** | 0,090±0,020 ** | 0,082±0,007 ** | 0,078±0,007 ** |

Az APX aktivitása csak a 7. napon nőtt meg a levelekben, és hasonló szinten maradt a helyreállítás idején is. A gyökerekben APX esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A GPX esetében viszont csak a gyökerekben növekedett meg az aktivitás, de már a 3. naptól, és a helyreállítás végéig ugyanazon a szinten maradt. Irodalmi adatokból ismert, hogy halofita növényekben sóstressz hatására megnő az APX aktivitása (Ben Amor et al. 2006). Transzgenikus dohány növényekben, melyek megemelkedett GR aktivitást mutattak, emelkedett a redukált glutation szintje, és toleránsabbak voltak oxidatív stresszel szemben (Broadbent et al. 1995). Esetünkben is megnőtt mindkét enzim aktivitása a sónak kitett növényekben, s a mérsékelt sóstressz alkalmazása, valamint az enzimaktivitásokban tapasztalt változásokból arra következtethetünk, hogy ez az adaptációs folyamatok része lehet. Az is ismert, hogy számos károsodási tünet nem a stressz idején, hanem az azt követő helyreállítás alatt jelentkezik (Szalai et al. 1996). A reaktív oxigénformák mennyisége a stresszt követően is megemelkedhet, s ezért fontos, hogy a növények az ún. *poszt-stressz* periódusban is megfelelő antioxidáns kapacitással rendelkezzenek. Esetünkben is azt tapasztaltuk, hogy a helyreállítás során az APX, GPX és GR enzimek aktivitása magasabb volt az előzőleg NaCl-dal kezelt

növényekben a kontrollhoz viszonyítva.

A szabad SA szint a levelekben csak a 100 mM sókezelés hatására, és csak a helyreállítás alatt emelkedett meg (2. táblázat). A gyökerekben hasonló koncentrációjú NaCl-nál már a 7. napon növekedést tapasztaltunk, és a helyreállítás folyamán mind az 50, mind pedig a 100 mM-lal kezelt növényeknél magasabb volt a SA szint a kontrollhoz képest. Számos közlemény számol be a SA védő hatásáról a sóstressz időtartama alatt. A SA előkezelés megnövelte a túlélési százalékot, kevésbé csökkent a hajtásnövekedés és a fotoszintézis árpa és paradicsom növényekben az előkezelés hatására (*El-Tayeb* 2005). Kevesebb publikációban olvashatunk az endogén SA hatásairól stressz körülmények között. Azt találták, hogy a megemelkedett endogén SA fokozta a reaktív oxigénformák hatását (*Borsani et al* 2001), valamint a benzoészav-2-hidroxiláz enzim gátlása, mely az SA bioszintézisben vesz részt, védte a rizs növényeket sóstressz folyamán (*Sawada et al* 2006). Esetünkben a sóstressz során nem tapasztaltunk endogén SA emelkedést, valószínűleg ez a mértékű stressz inkább az adaptációs folyamatokat indítja be, és nem annyira a károsodási tüneteket látjuk.

2. táblázat. SA és oHCA mennyiségének (nmól/g friss tömeg) változása NaCl stressz során (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001 szinten szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva)

| | Levél | | | Gyökér | | |
|-------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------|----------------|---------------------|
| | 3 nap | 7 nap | 4 nap helyreállítás | 3 nap | 7 nap | 4 nap helyreállítás |
| SA | | | | | | |
| Kontroll | 0,36±0,09 | 0,67±0,19 | 0,54±0,14 | 0,53±0,17 | 0,48±0,04 | 0,51±0,09 |
| 50 mM | 0,40±0,07 | 0,48±0,04 | 0,66±0,04 | 0,56±0,11 | 0,57±0,09 | 0,69±0,12 * |
| 100 mM | 0,41±0,07 | 0,60±0,29 | 1,14 ±0,33 ** | 0,45±0,10 | 0,91±0,34 * | 0,91±0,13 *** |
| oHCA | | | | | | |
| Kontroll | 0,59±0,16 | 1,11±0,26 | 1,31±0,24 | 1,38±,21 | 1,52±0,23 | 1,54±0,59 |
| 50 mM | 0,74±0,27 | 0,90±0,20 | 2,22±0,60 ** | 2,14±0,79 | 2,16±1,14 | 2,21±0,73 |
| 100 mM | 1,27±0,22 *** | 2,59±0,46 ** | 5,34±1,84 ** | 1,97±0,88 | 1,79±0,44 | 3,92±1,13 ** |

A szabad oHCA szint már a 3. naptól emelkedett a 100 mM sóval kezelt növények leveleiben (2. táblázat), és ez az érték a helyreállítás alatt a kontrollhoz viszonyítva négyszeres volt. A gyökerekben csak a helyreállítás során tapasztaltunk kisebb mértékű emelkedést. Az oHCA a SA egyik prekursora, de mint fenolsav antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik (*Gallado et al.* 2006). Kimutatták, hogy a hidroxifahéjsavak (melyek a fenolsavak közé tartoznak), s köztük az oHCA is, képesek közömbösíteni a szinglet oxigént, és a SA bioszintézistől függetlenül antioxidánsként is jelen lehetnek a sejtekben (*Foley et al.* 1999). Jelen munkában is az oHCA szintje már a kezdetektől emelkedett a sóstressz során és a helyreállítás alatt még kifejezettebb volt. Ez szintén az adaptációs folyamat része lehet.

Köszönetnyilvánítás

A munkát az NKTH/OTKA (K68158) és az AGRISAFE (203288) pályázat támogatta.

Irodalom

- Ádám, A., Bestwick, C.S., Barna, B., and Mansfield, J.W. (1995): Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolica. *Planta*, **197**, 2410-2419.
- Ben Amor, N., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundquist, M., Sevilla, F., and Abdelly, C. (2006): Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum*, **126**, 446-457.
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A. (2001): Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, **126**, 1024-1030.
- Broadbent, P., Creissen, G.P., Kular, B., Wellburn, A.R., and Mullineaux, P. (1995): Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant Journal*, **8**, 247-255.
- El-Tayeb, M.A. (2005): Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, **45**, 215-224.
- Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D.J., Land, E.J., Truscott, G., and Rice-Evans, C.A. (1999): Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1202-1208.
- Gallardo, C., Jiménez, L., and García-Conesa, M.-T. (2006): Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, **99**, 455-463.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., and Páldi, E. (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, **208**, 175-180.
- Kocsy, G., Laurie, R., Szalai, G., Szilágyi, V., Simon-Sarkadi, L., Galiba, G., and de Ronde, J.A. (2005): Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiologia Plantarum*, **124**, 227-235.
- Maas, E.V., Hoffmann, G.J. (1977): Crop salt - current assessment. *ASCE, Irrig. Drain. Div. ASCE* **103**, 115-134.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., and Szalai, G. (2005): Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants. *Physiologia Plantarum*, **125**, 356-364.
- Sawada, H., Shim, IS, and Usui, K. (2006): Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis - Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Science*, **171**, 263-270.
- 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). *Analytical Biochemistry*, **175**, 408-413.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., and Szigeti, Z. (1996): Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Journal of Plant Physiology*, **148**, 378-383.
- Yildiz, M., Kasap, E. (2007): Comparison of germination responses of cultivated wheat (*Triticum*) and its wild relative (*Aegilops*) species under salinity, temperature and light. *Acta Agronomica Hungarica*, **55**, 407-415.