

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A fenolos peroxidáz enzimek szerepe a növények ultraibolya
sugárzáshoz történő alkalmazkodásában**

Ph.D. értekezés

Rác Arnold

PÉCS, 2021

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A fenolos peroxidáz enzimek szerepe a növények ultraibolya sugárzáshoz történő alkalmazkodásában

Ph.D. értekezés

Rácz Arnold

Témavezető:

Dr. Hideg Éva

egyetemi tanár

Témavezető aláírása

Iskolavezető aláírása

PÉCS, 2021

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2.
Rövidítések jegyzéke.....	4.
1. Bevezetés.....	6.
2. Irodalmi áttekintés	8.
2.1. A látható fény és az UV-B sugárzás hatásai a növényi életfolyamatokra.....	8.
2.2. Az UV-B sugárzás által keltett reaktív oxigén származékok a növényekben	8.
2.3. Az UV-B akklimációban részt vevő enzimatisz védelmi útvonalak.....	12.
2.4. Az UV-B akklimációban részt vevő nem enzimatisz védelmi útvonalak.....	13.
2.5. Az UV-B akklimáció szabályozása	14.
2.6. Az UV-B akklimációs folyamatok ismeretének fontossága.....	16.
3. Célkitűzések	18.
4. Anyagok és módszerek.....	20.
4.1. Növénynevelési körülmények és kezelések	20.
4.2. Fotoszintetikus elektron transzport mérések	22.
4.3. Pigmenttartalom meghatározása.....	22.
4.4. Mintaelőkészítés	23.
4.5. Fenolos vegyületek vizsgálata	24.
4.6. Enzimaktivitások meghatározása	24.
4.7. Natív protein gélelektroforézis	26.
4.8. Hidrogén-peroxid tartalom meghatározás	27.
4.9. Nem enzimatisz H ₂ O ₂ semlegesítés mérés.....	27.
4.10. Nem enzimatisz O ₂ ^{•-} semlegesítés mérés	27.

4.11. Statisztikai adatelemzés.....	28.
5. Eredmények és megvitatásuk	29.
5.1. Dohánylevelek UV-B-hez történő alkalmazkodásának életkor függése	29.
5.2.1. Az UV-B indukálta POD válasz mérése természetes és mesterséges szubsztrátokkal.....	31.
5.2.2. Az UV-B indukálta POD izoformák eltérő szubsztrát-preferenciája	35.
5.3. A fenolos vegyületek és a POD izoformák szerepe az UV-B válaszban.....	37.
5.3.1. A fenolos vegyületek változása az UV-B-hez történő alkalmazkodásban	39.
5.3.2. A fenolos vegyületek közvetlen antioxidáns funkciója	41.
5.3.3. A fenolos POD-ok szerepe az UV-B-hez történő alkalmazkodásban.....	44.
5.4. Mi váltja ki az UV-B-hez történő alkalmazkodást elősegítő antioxidáns válaszokat?.....	48.
5.5. Az UV-B besugárzás és a H ₂ O ₂ kezelés különböző antioxidáns válaszokat váltanak ki.....	50.
5.6. A monokromatikus (311 nm-es) UV sugárzás hatásainak vizsgálata.....	57.
6. Összefoglalás.....	69.
7. Summary	70.
8. Irodalomjegyzék.....	73.
9. Publikációs lista.....	86.
9.1. A dolgozat témájához kapcsolódó, bírált folyóirat-közlemények	86.
9.2. Egyéb bíralt folyóirat-közlemények	87.
9.3. Konferenciaközlemények a dolgozat témájában	87.
Köszönetnyilvánítás	88.

Rövidítések jegyzéke

$^1\text{O}_2$	szinglet oxigén
ABTS	2,2'-azino-bisz(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav) diammoniumsó
ABTS-POD	ABTS szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
APX	aszorbát-peroxidáz
ASC	aszorbát
CAA	kávésav
CAA-POD	kávésav szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
CAT	kataláz
CGA	klorogénsav
CGA-POD	klorogénsav szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
F_0	sötétadaptált minták minimális fluoreszcenciája nyitott PSII reakciócentrumok mellett
F_m	sötétadaptált minták maximális fluoreszcenciája zárt PSII reakciócentrumok mellett (közvetlenül a telítő fényimpulzus után)
F'_m	megvilágított minták maximális fluoreszcenciája zárt PSII reakciócentrumok mellett (közvetlenül a telítő fényimpulzus után)
F_v	sötétadaptált levél változó fluoreszcenciája, $F_m - F_0$
GPX	glutation-peroxidáz
GSH	glutation (redukált forma)
GUA	guaiacol
GUA-POD	GUA szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
H_2O_2	hidrogén-peroxid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált forma)

NBT	nitrokék-tetrazólium
O ₂ ^{•-}	szuperoxidgyök-anion
[•] OH	hidroxilgyök
OPD	o-feniléndiamin
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAM	impulzus amplitúdó módszer
PAR	fotoszintetikusán aktív sugárzás (400 – 700 nm)
POD	hármastípusú peroxidázok osztályába tartozó enzim (Class III peroxidases)
PSII	kettes fotokémiai rendszer
QUE	quercetin
QUE-POD	quercetin szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
RUT	quercetin-3- <i>O</i> -rutinozid
RUT-POD	RUT szubsztráttal mért peroxidáz enzim aktivitás
ROS	reaktív oxigénszármazék
SOD	szuperoxid-dizmutáz
UV	ultraibolya sugárzás
UV-A	ultraibolya-A sugárzás (315 – 400 nm)
UV-B	ultraibolya-B sugárzás (280 – 315 nm)
UV-C	ultraibolya-C sugárzás (100 – 280 nm)
UVR8	ULTRAVIOLET RESISTANCE LOCUS 8
Y(II)	fényadaptált effektív PSII kvantumhatásfok
Y(NO)	PSII nem szabályozott nem fotokémiai kioltási útvonal kvantumhatásfoka
Y(NPQ)	PSII szabályozott nem fotokémiai kioltási útvonal kvantumhatásfoka

1. Bevezetés

A Föld felszínét érő napsugárzás spektrális tartományának a legalacsonyabb hullámhosszúságú és egyben a legnagyobb energiájú részét az ultraibolya-B (UV-B, 280-315 nm) sugárzás teszi ki. Annak ellenére, hogy az ózonréteg a sugárzás jelentős részét elnyeli, a Föld felszínét elérő UV-B fotonok elegendő energiával (~4 eV) rendelkeznek ahhoz, hogy megváltoztassák az ezeket abszorbeáló molekulák közötti kötéseket. Számos elmélet szerint az UV-B sugárzás ezáltal fontos szerepet töltött be a földi életformák kialakulása során. A környezeti UV-B sugárzás múlt század utolsó harmadában tapasztalt növekedése hívta fel a figyelmet a növényekre és a növényi ökoszisztémákra gyakorolt káros hatások lehetőségére, azonban az UV sugárzás, különösen az UV-B növényélettani hatásainak kutatása napjainkban is időszerű. Érdekesség, hogy bár az élővilág mindhárom fő doménjében alakultak ki különböző felépítésű UV-A fotoreceptorok, UV-B fotoreceptort azonban eddig csak növényekben írtak le.

A szesszilis életmódot folytató növények számára nélkülözhetetlen az UV sugárzás mennyiségének és spektrális (energetikai) detektálása. A XXI. századi növénybiológiai kutatások rámutattak arra, hogy potenciális károsító hatása mellett az UV-B sugárzás számos életfolyamathoz is köthető mint szabályozó faktor. Részt vesz többek között a növényi egyedfejlődés és szaporodás, az árnyékos élőhelyek elkerülésének és a növényi gázcsereenyílások működésének szabályozásában is. Az UV-B ezen kettősége miatt, a növényekben többféle alkalmazkodási mechanizmus is kialakult, melyek segítik az UV-B káros hatásait csökkenteni. A levelekbe behatoló UV-B sugárzás mennyiségét különféle epidermális UV elnyelő pigmentek szintézise, illetve különböző anatómiai változások képesek csökkenteni. Az ezek ellenére a belső szövetekbe jutó UV-B sugárzás negatív hatásainak elkerülése érdekében pedig kialakult egy érzékeny egyensúlyi rendszer, melynek egyik oldalán antioxidáns molekulák és enzimek, a másikon pedig a közvetve vagy közvetlenül az UV-B által keltett reaktív oxigén formák (reactive oxygen species, ROS) találhatóak.

A fotoszintézist folytató növényi sejtekben az UV-B képes többféle ROS molekula képzésére is. A ROS-ok, az UV-B sugárzáshoz hasonlóan, kettős szerepet töltenek be a növények stresszválaszaiban. Alacsony koncentrációban szignálmolekulaként funkcionálhatnak, nagyobb mennyiségben viszont károsító hatásuk a molekulák szintjétől egészen a sejtek apoptotikus folyamatáig terjedhet. A különböző ROS formák eltérő reaktivitása és sejten belüli lokalizációja alapján eltérő lehet a károsító hatásuk mértéke is a

növényeket érő oxidatív stressz során. A ROS-ok sokszínűsége és a stresszválaszokban általánosan elismert kettős szerepe miatt a növények több szinten szabályozzák ezen molekulák kialakulását és mennyiségét különféle antioxidáns rendszerek segítségével. A PTE TTK Növénybiológiai Tanszék korábbi UV-B sugárzással kapcsolatos kutatásai azonban rámutattak az egyik ROS, a hidrogén-peroxid (H_2O_2) különleges, más oxidatív stressz hatásoktól eltérő szerepére, ezért a dolgozatomban elsősorban a H_2O_2 koncentrációját szabályozó enzimekkel foglalkoztam.

PhD munkám során növények UV-B-hez történő alkalmazkodási folyamatait vizsgáltuk, szabályozott körülmények között. A növénynevelő kamrákban végzett kísérletekben a nevelőfényt UV sugárzással egészítettük ki. Kísérleteink során dohányt (*Nicotiana tabacum* L.) használtuk modellnövényként, és olyan besugárzási körülményeket alkalmaztunk, melyek nem okoztak jelentős mértékű károsodást a levelek fotokémiai hatékonyságában. Az alkalmazkodási válaszok közül a levelek H_2O_2 tartalmát befolyásoló enzimikus és nem enzimikus tényezők változásait vizsgáltuk. Összehasonlítottuk az UV-B hatására a levelekben képződő endogén H_2O_2 és az exogén H_2O_2 védelmi utakra gyakorolt hatásait; és megvizsgáltuk egy, a szakirodalomban az utóbbi időben kiemelt figyelmet kapott UV-B hullámhossz, a 311 nm sugárzás által kiváltott válaszokat is.

A dolgozatban bemutatásra kerülő eredmények alapján további kísérleteket is végzünk. Ezek egyrészt a természetes napfény UV-B hatásait vizsgálják, másrészt a mesterséges UV-B források növénytermesztésben történő felhasználását célozzák.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A látható fény és az UV-B sugárzás hatásai a növényi életfolyamatokra

A növényi élet elengedhetetlen részét képezi a fény, mint energia- és információforrás. A fotoszintetikusan aktív sugárzás (photosynthetically active radiation, PAR) azonban nem fedi le a növényeket érő napsugárzás teljes spektrumát. A fotoszintetikus folyamatokhoz felhasznált hullámhosszúsági tartományba (400-700 nm) eső fotonok mellett, mind a magasabb hullámhosszúságú távoli vörös (far red, FR), mind az alacsonyabb hullámhosszúságú ultraibolya (ultraviolet, UV) fotonok is fontos környezeti paraméterként hatnak a növényi életfolyamatokra. Mindhárom spektrumrész detektálásához alakultak ki növényi fotoreceptorok, melyek közül már több ismert és részletesen tanulmányozott. A FR sugárzás fontos szerepet játszik a fitokrómok működésében (Anders és Essen 2015), és a legújabb kutatások szerint a fotoszintetikus működéshez is hozzájárul (Zhen és van Irsel 2017). A Föld felszínét elérő UV sugárzás két tartományra osztható: az alacsonyabb hullámhosszúságú, így magasabb energiájú UV-B (280-315 nm) és a kisebb energiájú UV-A (315-400 nm). Növényekben az UV-A fotonok detektálására több fotoreceptor család is képes: a kriptokrómok, a fototropinok, illetve a fitokrómok (Heijde és Ulm 2012). Az UV-B detektálását végző UVR8 fotoreceptor az élővilágban egyedülállóan nem tartalmaz elkülönült kromofórt, és csak a növényekben van jelen (Rizzini és mtsai. 2011). A növények szinte minden életfolyamatára, a morfológiájától kezdve a biokémiai folyamatokig, hatással van az UV-B, mely az UVR8 dimerizációján keresztül egy sor génexpressziós változást indíthat el (Schreiner és mtsai. 2012). A jelenlegi ismereteink szerint azonban nem minden UV-B válasz az UVR8 által szabályozott (Jenkins 2017), felmerültek fotoreceptor független bioszintézis utak és a közelmúltban egy az UVR8-tól eltérő fotoreceptor jelenlétének lehetősége is (O'Hara és mtsai. 2019).

2.2. Az UV-B sugárzás által keltett reaktív oxigén származékok a növényekben

A növényi életfolyamatokban résztvevő molekuláris oxigén természetes forrása a ROS-oknak. Az alapállapotú oxigén két párosítatlan elektronnal rendelkező természetes

triplet ($^3\text{O}_2$). Ez lehetővé teszi elektronok felvételét, ami a ROS kialakulásának egyik lehetséges módja. Elektronátadással képződik a szuperoxidgyök-anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), további elektron és proton felvételével pedig a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök ($\cdot\text{OH}$). A másik ROS képződési út során energiaátadás megy végbe, így képződik alapállapotú triplet oxigénből ($^3\text{O}_2$) szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) az élőlényekben (Halliwell és Gutteridge 2015). A természetesnél sokkal nagyobb intenzitású, rövid idejű (10-30 perces) UV kezelést használva, laboratóriumi kísérletekben megmutatták, hogy az UV-B a besugárzott levelekben az elektron-átadásos ROS keltő utat erősíti, és a szinglet oxigén csak kis mennyiségben keletkezik (Barta és mtsai. 2004). A természeteshez közelebbi UV dózisos alkalmazásával végzett kísérletek várhatóan a fenti munkában leírtaknál sokkal kisebb mennyiségű szöveti ROS-t eredményeznek. Egyrészt az alkalmazott alacsonyabb fotonáram sűrűség miatt kisebb mennyiségű ROS keletkezés várható, másrészt a hosszabb (több napos) UV kezelések az antioxidánsokat is aktiválják. A dolgozatban bemutatott kísérletekben a H_2O_2 szint változásait vizsgáltuk, így a továbbiakban ezt jellemzem részletesebben.

Az H_2O_2 szint szöveti változását számos más abiotikus stressz mellett az UV-B sugárzás is kiváltja (Czégény és mtsai. 2014), amit a dolgozatban bemutatásra kerülő eredményeink is megerősítettek (Rácz és mtsai. 2020). A H_2O_2 a növényekben többféle metabolikus és stressz-indukálható úton termelődhet (Petrov és Van Breusegem 2012). Elsődleges forrása a $\text{O}_2^{\cdot-}$, melynek átalakulása H_2O_2 -á spontán is végbemegy (Khorobrykh és mtsai. 2020), de a folyamat hatékonyságát jelentősen megnöveli a szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD). A növényekben a különböző SOD formák kloroplasztisz és mitokondrium elektrontranszport folyamatai során keletkező, illetve peroxiszóma és plazmamembrán lokalizált oxidázok által termelt $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ot alakítják át H_2O_2 -á (Foyer és Noctor 2003; Asada 2006; Ślesak és mtsai. 2007). Az élő szervezetekben a H_2O_2 a legstabilabb ROS, féléletideje milliszekundumtól szekundumig terjedhet (Smirnof és Arnaud 2019). Stabilitásának köszönhetően, amellett, hogy nagy koncentrációban károsító oxidálószer (Mittler 2002), funkcionálhat szekunder jelátviteli molekulaként vagy enzim szubsztrátként is (Apel és Hirt 2004; Ślesak és mtsai. 2007; Smirnof és Arnaud 2019). Kimutatták, hogy a kórokozók és a különféle abiotikus faktorok is növelik a H_2O_2 termelést, bár a kiváltott stresszválaszok általában különféle H_2O_2 semlegesítő enzimek aktiválódását is magukban foglalják. Megemelkedett H_2O_2 tartalmat figyeltek meg levelekben UV-B besugárzás (Czégény és mtsai. 2014), fotoinhibíciót kiváltó PAR (Mullineaux és mtsai. 2006), magas

hőmérséklet (Okuda és mtsai. 1991; Liu és Shono 1999; Königshofer és mtsai. 2008), szárazság (Moran és mtsai. 1994) és nehézfém stressz hatására is (Cho és Seo 2005). Az UV-kezelt levelekben a többlet H_2O_2 lehetséges forrása megegyezhet a más abiotikus stresszek esetében tapasztaltakkal: származhat elektrontranszport eredetű $O_2^{\cdot-}$ -ből, vagy termelődhet a peroxiszómában. Mindkét mechanizmust valószínűsíti az UV-B szén-dioxid megkötést gátló hatása, a sztómazáródás vagy a fotoszintézis sötétreakcióinak gátlása révén (összefoglaló munka: Hideg és Strid 2017). Korábbi, nagy dózisú UV-B megvilágítással végzett és nagy mértékű fotoszintézis gátlást okozó kísérletekben felmerült annak a lehetősége is, hogy a kloroplasztisz vízbontó komplexének UV-B okozta sérülése is eredményezhet ROS keletkezést (Hideg és Vass 1996). Megnövelve az egyébként stressz hiányában a komplexben kis mennyiségben keletkező H_2O_2 intermedier mennyiségét (Wydrzynski és mtsai. 1989), ez a mechanizmus azonban nem nyert megerősítést természetben jelen lévő UV dózisok esetében.

Felmerült a fotoszintézis változásaitól független UV-B-indukált H_2O_2 keletkezés lehetősége is. Tossi és mtsai. (2009, 2012) szerint az UV-B kezelt növényekben is létrejön a más stresszhatások (magas sókoncentráció, alacsony hőmérséklet) esetében már leírt abszcizinsav indukált válaszut, melyben az abszcizinsav a NADPH-oxidáz indukciója útján növeli meg a H_2O_2 és a nitrogén-monoxid (NO^{\cdot}) szabad gyökök mennyiségét és okoz ezáltal sztóma záródást. Vad típusú és fotoreceptor mutáns *Arabidopsis* növényeket viszonylag nagy dózisú, háromórás UV-B kezelésnek kitéve azt is megállapították, hogy a folyamat szabályozásában az UVR8 fotoreceptor is részt vesz (Tossi és mtsai. 2014). Ezekben a kísérletekben nem vizsgálták sem a levelek fotoszintézisét, sem pedig az oxidatív károsodását.

A H_2O_2 sejteken belüli koncentrációját nagyban befolyásolja, hogy képes membránokon átdiffundálódni (Møller 2007), valamint az intracelluláris sejtalkotók, illetve a sejtek közötti transzportját akvaporinok is elősegítik (Bienert és mtsai. 2007). A H_2O_2 a ROS formák között egyedülálló mobilitása megkönnyíti a jelátviteli funkcióját, de megköveteli a keletkezés helyektől távolabb eső lokális koncentrációk antioxidáns szabályozását is. UV-B kezelt levelekben H_2O_2 képződhet az oxigénfejlesztő-komplex vízbontásban résztvevő két Mn-ionjának károsítása által (Szilárd és mtsai. 2007). Az UV-B által létrehozott H_2O_2 koncentrációjának megemelkedése az alkalmazkodási folyamat egyik legfontosabb része, melyet a növények enzimatikus és nem enzimatikus útvonalakon keresztül képesek szabályozni.

2.3. Az UV-B akklimációban részt vevő enzimatisz védelmi útvonalak

A ROS semlegesítése valamennyi stresszvázasz fontos része, azonban az UV sugárzásnak kitett növényeknek több szempontból is szükségük van egy hatékony H₂O₂ szint szabályozó rendszerre (Jansen és mtsai. 2001; Majer és mtsai. 2014; Czégény és mtsai. 2016a 2016b; Rác és mtsai. 2018; Czégény és mtsai. 2019). Más stresszvázaszokhoz hasonlóan, ebben az esetben is szükséges egy olyan H₂O₂ koncentráció fenntartása, amely nem elég magas ahhoz, hogy károsító hatással legyen, de elegendő ahhoz, hogy hírvívó molekulaként működjön. Ugyanakkor az UV-B sugárzás más stressz tényezőktől eltérő, egyedi tulajdonsága, hogy nem csak megemeli a szöveti H₂O₂ szintet, de a levelekben közvetlenül képes fotokonvertálni a H₂O₂-ot még károsabb [•]OH-é (Czégény és mtsai. 2014).

Ennek megfelelően, míg más abiotikus stressz hatására az akklimatizáció során a H₂O₂ keltő SOD és a H₂O₂ semlegesítő peroxidázok aktivitásának párhuzamos növekedését tapasztalták, az UV-B vázás során az utóbbi vázás erősödése nagyobb mértékű volt (Czégény és mtsai. 2016). A tanszékünkön végzett korábbi kutatások során használt biológiaiilag aktív UV-B dózistól és modellnövény fajától függően ez kétféle módon valósult meg: a H₂O₂ szintet emelő SOD aktivitáshoz képest egy erősebb semlegesítő POD aktivációval (Majer és mtsai. 2014, Czégény és mtsai. 2016a) vagy a POD aktivitás növekedéssel a SOD változása nélkül (Czégény és mtsai. 2019). A további alkalmazkodás része a nem enzimatisz hidroxilgyök semlegesítő kapacitás növekedése is (Czégény és mtsai. 2019).

Az UV-B sugárzáshoz sikeresen alkalmazkodott növények leveleiben a H₂O₂ szabályozás hatékonyságáért elsősorban a hármás típusú peroxidáz enzimek (POD) felelősek, melyet növénynevelő kamrában végzett dohány (Czégény és mtsai. 2016) és *Lemna minor* növényekkel végzett kísérletek (Jansen és mtsai. 2001), valamint napfényben nevelkedett szőlőlevelek vizsgálatával is bizonyították (Martínez-Lüscher és mtsai. 2013).

A POD különböző formái jelen vannak minden növényben és sokgének enzimcsaládjuk, például az *Arabidopsis thaliana* 73 POD kódoló génje, ismert szekvenciaszinten (Cosio és Dunand 2009). Elterjedésük nem csak filogenetikai szinten sokszínű, de a növényi sejteken belül is megtalálhatóak több kompartmentben, elsősorban a vakuólumokban és sejtfalhoz kötötten (Passardi és mtsai. 2005), de a kloroplasztiszban is

előfordulnak (Aiamla-or és mtsai. 2014). A fotoszintézis során több ponton képződhetnek ROS-ok, az elektrontranszportlánc (ETR) (Raha és Robinson 2000) vagy a fotorespiráció (del Río és mtsai. 2006) folyamatai során. Működésük során a POD által katalizált oxidatív reakciókban az enzim H_2O_2 -t alakít át vízzé, miközben egy elektron donor, szubsztrát molekulát oxidál (Hiner és mtsai. 2002). A POD-ok egyik sajátossága, hogy az általuk szubsztrátként felhasznált molekulák skálája igen széles, ami lehetővé teszi mesterséges kromofórok használatát. Ez az alacsony szubsztrát specificitás azonban nem jelent egyenlő mértékű oxidációs rátát minden szubsztrát esetében, ebben nagymértékű eltérések lehetnek az egyes POD izoformák között. A POD aktivitás általános növekedését, mint általános növényi stresszválaszt már több tanulmányban is leírták, például sóstressz hatására *Brassica* fajokban (Stevens és mtsai. 1978), magas hőmérséklet hatására *Fragaria* palántákban (Gulen és Eris 2004), alacsony hőmérséklet hatására *Arabidopsis*-ban (Kim és mtsai. 2012) vagy UV-B hatására dohányban (Majer és mtsai. 2014). A POD izoformák eltérő mértékű aktivitás növekedést mutathatnak, a stresszortól függően. Ranier és mtsai. (2001) vashiány hatására csökkenő POD aktivitást tapasztaltak napraforgó levelek egyes izoformái esetében. Sreenivasulu és mtsai. (1999) azonosítottak egy olyan 27 kDa-os POD izoformát olasz muharban (*Setaria italic* L.), aminek expressziós szintje szelektíven emelkedett sóstressz során. A különböző POD izoformák extrém magas UV dózisa adott emelkedő aktivitását már többen is megfigyelték, mint például napraforgó sziklevelek (Yannarelli és mtsai. 2006) vagy hajdina (*Fagopyrum esculentum* L.) palánták rövid idejű besugárzását követően. Alacsonyabb, a természeteshez közeli dózisa, a növényeket nem károsító, alkalmazkodást kiváló UV kezeléseket esetén azonban eddig még nem tanulmányozták a POD izoformák aktivitás változásait.

A POD mellett más antioxidáns enzimek is részt vesznek az alkalmazkodási folyamatok során képződő H_2O_2 semlegesítésében. Az aszkorbát peroxidáz enzim (APX) egy speciális szubsztrát molekulát, az aszkorbátot használja elektron donorként a H_2O_2 vízzé redukálásában (Asada 1999). A glutation-peroxidáz enzim (GPX) nevéből adódóan glutation oxidálása során képes semlegesíteni a H_2O_2 mellett szerves hidroperoxidokat is (Deponte 2017). A kataláz enzim (CAT) működése során a H_2O_2 koncentrációjától függ az, hogy mit használ elektrondonorként (Aebi 1984). Magas koncentráció esetén a CAT magát a H_2O_2 -ot használja fel donorként, így egyszerre két H_2O_2 molekulát semlegesít víz és O_2 keletkezése során. Alacsony koncentrációnál a különböző peroxidázokhoz hasonlóan CAT is egyéb szubsztrát molekulát használ fel reakció katalizálásához (Deisseroth és

Dounce 1970). Az antioxidáns enzimek és ROS-ok egyensúlyának UV-B hatására történő megváltozását Jansen és mtsai. (2008) és Hideg és mtsai. (2013) munkái foglalják össze.

2.4. Az UV-B akklimációban részt vevő nem enzimatisz védelmi útvonalak

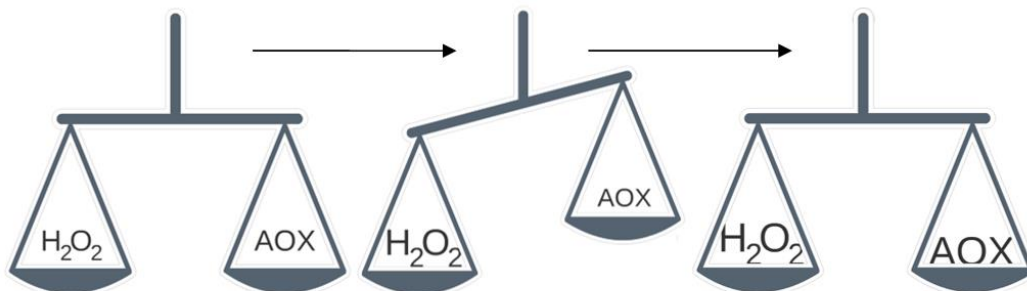
Az UV sugárzás hatására megjelenő enzimatisz válaszokkal párhuzamosan a növényi speciális anyagcsereutak szabályozása is módosul. Egyik jelentős UV-B akklimációs válasz a levelekben a fenolos savak és flavonoidok mennyiségének megemelkedése (Shirley 1996; Schreiner és mtsai. 2014). Ezek a speciális metabolitok a fenilalaninból szintetizálódnak (Truetter 2006), és bár minden növényben jelen vannak, az egyes vegyületek jelenléte és a vegyületcsoportok mennyiségi arányai növényfajonként eltérőek (Berhow és Vaughn 1999). Az UV-B a szőlőlevelekben a kaftársav és a különböző quercetin származékok mennyiségét növeli (Castagna és mtsai. 2017). UV-B-hez alkalmazkodott növények UPCL vizsgálata során *Arabidopsis* mintákban azt tapasztalták, hogy a kaempferol és quercetin származékok mennyiségének emelkedése mellett ezen vegyületek glikolizáltsága is fokozódik, és a fenolos vegyületek 7-O-rhamnozilációja az UV-B alkalmazkodás egyik jellegzetes folyamata (Hectors és mtsai. 2014). Több tanulmány foglalkozott már UV-B kezelt növények polifenol tartalmának változásaival, eredményeik összefoglalásaként megállapíthatjuk, hogy az UV-B által indukált fenolos bioszintézisutak növényfajonként és genotípusonként is eltérőek lehetnek (Hoffmann és mtsai. 2000; Holub és mtsai. 2019).

Az UV-indukált fenolos vegyületek több szinten is hozzájárulnak az UV-B akklimáció kialakulásához. A szerkezetüktől függően különböző mértékben képesek az UV sugárzás abszorpciójára. Anouar és mtsai. (2012) megállapították, hogy többek között a hidroxil csoportok elhelyezkedése is befolyásolja a UV abszorbeáló tulajdonságaikat. Az epidermiszben termelődő polifenolok elnyelik az UV sugárzás egy részét, ezzel védve a levél mélyebb szöveti rétegeit (Kolb és mtsai. 2001). Az UV-B indukált fenolos vegyületek bioszintézise az UVR8 UV-B fotoreceptor szabályozása alatt áll (Brown és mtsai. 2005), de más környezeti hatások is fokozhatják képződésüket. A bioszintézis indukcióját kiválthatja az alacsony hőmérséklet (Bilger és mtsai. 2007) vagy egyéb környezeti tényezők (Alam és mtsai. 2016) Ez arra utal, hogy az UV-B szűrő funkció mellett a fenolos vegyületek antioxidáns tulajdonságaikkal is hozzájárulhatnak az oxidatív

stressz hatásainak mérsékléséhez (Lu és mtsai. 2017). Az UV-kezelt levelekben kiemelt fontosságú H_2O_2 mennyiségének szabályozásában közvetett módon, POD szubsztrátként vagy közvetlen ROS semlegesítő molekulaként is részt vehetnek. Ez utóbbi funkciójuk a növényi szövetekben annak alapján feltételezett, hogy számos fenolos vegyület mutat nagy reaktivitást a H_2O_2 -ra *in vitro* (Csepregi és Hideg 2018). A polifenolos vegyületek POD szubsztrátként való alkalmazása régóta ismert, ezen alapul például a guaiacol elterjedt használata POD aktivitásmérésekben (Fielding és Hall 1978), de quercetint is használtak már tormaperoxidáz enzim (HRP) vizsgálatokhoz (Takahama 1997). Az UV-B hatására megnövekedett mennyiségben képződő polifenolos vegyületeket POD szubsztrát tulajdonságairól azonban a munka megkezdésekor csak kevés ismeretünk volt.

2.5. Az UV-B akklimáció szabályozása

A növényi stressztolerancia kulcsfontosságú pontja, hogy a sejtek ROS tartalmukat alacsony szinten tartsák fenn. Ha egy stresszor fokozza a már működésben lévő ROS képző folyamatokat vagy újabb útvonalakat aktivál, az oxidatív károsodás antioxidánsok termelésének serkentésével kerülhető el (Mittler 2002). A két oldal kiegyensúlyozottságának a fenntartása a növényi akklimáció legfontosabb motívuma. Eszerint a stressz hatására emelkedő ROS szintet emelkedő antioxidáns szint követi, ami az alkalmazkodási folyamat végén egy új egyensúlyi állapotot eredményez (1. ábra).



1. ábra A H_2O_2 -antioxidáns egyensúly kialakulását szemléltető mérlegábra.

Az AOX rövidítés az enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokra együttesen utal. A H_2O_2 és az AOX betűméreteinek növekedése jelzi a mennyiségük emelkedését. Az első mérleg a stressz előtti, a második a stressz alatti, a harmadik pedig a stressz utáni állapotot jelzi.

A növénynevelő kamrában végzett modell kísérletek lehetővé teszik, hogy UV hiányában nevelt növények többnapos UV-B megvilágításhoz történő alkalmazkodását vizsgálhassuk. Ez a vizsgálat ugyan a természetes napfényben tartalmazottnál magasabb UV : PAR arány mellett történik, azonban lehetőséget biztosít az UV-B hatásainak elkülönített vizsgálatára. A mesterséges UV forrásokkal végzett kísérletek vezethetnek erős, a fotoszintézist és az alkalmazkodási reakciókat is jelentősen gátló, irreverzibilis szöveti károsodást okozó hatásokhoz, és ezért nem alkalmasak az alkalmazkodási folyamatok tanulmányozására (Aphalo és mtsai. 2012). A dolgozatban bemutatott kísérletekben a növények fotokémiai aktivitása a viszonylag magas UV : PAR arány ellenére is fenntartható maradt. Szélessávú, 313 nm-en maximális emissziójú UV fénycsővet használva a fotoszintetikus funkció elvesztésének vagy romlásának elkerülése szempontjából a hatékony H₂O₂ szabályozó rendszer fenntartása bizonyult elengedhetetlennek (Majer és mtsai. 2014; Czégény és mtsai. 2016; Rácz és mtsai. 2018, 2020).

A H₂O₂ semlegesítő enzimek UV-B válaszait tekintve, eddigi ismereteink szerint csak két esetben azonosítottak olyan géneket, melyek expressziója UV-B indukált és UVR8 szabályozott volt. Az első esetben Velanis és mtsai. (2016) azonosítottak egy GPX kódoló gént (At4g31870), a másodikban pedig egy sejtfa-kötött POD kódoló gént (At3g49120) találtak. Utóbbi azonban nem antioxidáns funkciója, hanem növekedés gátló hatása miatt kapcsolódik az UV-B-hez (Raggi és mtsai. 2015). Mindkét gént *Arabidopsis* levelekben írták le. Jelenlegi tudásunk szerint további UVR8 szabályozott POD géneket még nem sikerült azonosítani, sőt más antioxidáns enzimet kódoló géneket sem. Ennek többféle magyarázata lehet. Lehetséges, hogy egyszerűen a többi gén nem áll közvetlen az UVR8 fotoreceptor szabályozása alatt, és a megfigyelt alkalmazkodási válaszokat nem közvetlenül az UV-B fotonok, hanem az ezek által indukált metabolitok szabályozzák, mint másodlagos jelek. Ezekre, a ROS-ok feltételezett részvétele miatt, szokásos stresszfüggő reakcióutakként is hivatkozni (Kilian és mtsai. 2007, O'Hara és mtsai. 2019), bár eustresszt és nem distresszt okozó UV-hatásokra vonatkoznak (Hideg és mtsai. 2013). Egy másik magyarázat lehetne, hogy az eddigi génexpressziós vizsgálatok során általában rövid idejű és alacsony dóziszú UV kezelést használtak, és ezek a körülmények nem indukálják az antioxidáns válaszokat. Ennek azonban ellentmond, hogy Morales és mtsai. (2013) természetes napfényben nevelt *Arabidopsis* növényekben sem azonosítottak UVR8 indukált és szabályozott POD géneket, csak a GPX kódoló At4g31870 és a megnyúlásos

növekedésben résztvevő At3g49120 gént találta meg ez a munka is. Egy további lehetőségként az utóbbi időben leírtak egy UVR8 és stressz-független UV-B szignalizációs útvonalat (UASI, UVR8 and Stress-Independent), amit egy alacsony dózisu keskenysavú 311 nm-es UV-B megvilágítással aktiváltak (O'Hara és mtsai. 2019). Ez utóbbi kutatás során még nem vizsgálták meg részletesen a teljes génexpressziós mintázatot, de feltételeznek különbségeket az alacsonyabb (290-300 nm) hullámhosszúságú UVR8- és a magasabb (311 nm) hullámhosszúságú UASI-indukált UV-B válaszok között. Egy ennek ellentmondó, különböző fotoreceptor-hiányos *Arabidopsis* mutánsokkal végzett vizsgálat szerint azonban az UVR8 fotoreceptor a korábban feltételezett abszorpciós tartománynál jóval szélesebb spektrum tartományban, akár UV-A fotonokra is aktiválható lehet a természetben (Rai és mtsai. 2020). Bármelyik modell érvényessége is igazolódik a jövőben, az alacsonyabb energiájú (311 nm) UV-B antioxidánsokra gyakorolt hatása is vizsgálatra érdemes, különös tekintettel arra, hogy ezek az UV-B fotonok a nagyobb energiájúakkal ellentétben nem okoznak $H_2O_2 \rightarrow \cdot OH$ fotokonverziót (Czégény és mtsai. 2014).

2.6. Az UV-B akklímációs folyamatok ismeretének fontossága

Földünk változó klímaviszonyai mellett egyre fontosabbá válik az UV sugárzás hatásainak részletes ismerete. Ha továbbra is sikerül betartatni az ózonréteg állapotára vonatkozó környezetvédelmi egyezményeket, a jelenlegi UV-B szint várhatóan nem növekszik jelentősen (Barnes és mtsai. 2019). A további klimatikus paraméterek, mint például a hőmérséklet, a csapadék vagy a légköri CO_2 tartalom azonban dinamikus változásokon mennek keresztül napjainkban. Az átlaghőmérsékletben és a csapadékösszegben bekövetkező fokozatos változásokat gyakran kísérik rövid idejű extrém változások is, amikre a növények nem tudnak sem adaptív sem alkalmazkodási válaszokkal reagálni. Habár a környezeti UV-B önmagában nem számít stresszornak a növények szempontjából, mert képesek alkalmazkodni hozzá, más hatásokkal együtt már felléphet károsító faktorként (Jansen és mtsai 2019). Az UV-B más stresszor jelenlétében felerősítheti a stressz károsító hatását, így más stresszorokkal való interakcióit célzottan kutatják világszerte.

A természetes UV-B és szárazság kölcsönhatásának megismerése kulcsfontosságú lehet a mezőgazdaság számára. Wijewardana és mtsai. (2016) kimutatták, hogy a megemelkedett UV-B és szárazság negatív hatással van a kukorica hibrid tulajdonságaira, viszont a megemelkedett CO₂ kompenzálhatja az aszály és az UV-B stressz káros hatásait. Hayes és mtsai. (2017) azt találták, hogy az UV-B UVR8-on keresztüli érzékelése befolyásolja a hőmérsékletváltozásra adott növényi válaszokat is, melyek az auxin bioszintézishez kapcsolódó PYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 fehérjék gátlásán keresztül mennek végbe. Az UV-B és a környezeti abiotikus faktorok mellett a biotikus faktorokkal való kapcsolatát is tanulmányozzák. Az UV-B indukálta morfogenetikus és speciális anyagcseretermék válaszok például megerősíthetik a herbivór ízeltlábúak elleni konstitutív és indukálható növényvédelmi utakat (Escobar-Bravo és mtsai. 2017).

Az UV-B növényekre gyakorolt hatásának pontosabb ismerete elősegítheti ellenállóbb szabadföldi termesztésű kultúrfajták kiválasztását. A kutatócsoportunkban folyamatban levő csemegepaprika palántákkal végzett kísérletek során megmutattuk, hogy a növénynevelőkamrában végzett UV-B előkezelés fokozza a növények hidegtűrését (Csepregi és mtsai. 2019).

A természetes UV-B hatásainak megértése hozzájárul ahhoz, hogy mesterséges UV-B forrásokat lehessen felhasználni a beltéri (üvegházi, növénynevelő kamrákban végzett) termesztésben. A termékek és levélzöldségek tápértékének növelése, vagy a kertészeti növények stressztűrésének érdekében több tanulmány foglalkozik UV-B kezelésekkkel (Castagna és mtsai. 2017; Neugart és Schreiner 2018; Rodríguez-Calzada és mtsai. 2019; Qian és mtsai. 2019).

3. Célkitűzések

A dolgozatomban bemutatott kutatásaink célja az volt, hogy megvizsgáljam a különböző H₂O₂ semlegesítő utak, különösen a hármastípusú peroxidáz enzimek (POD), hozzájárulását a levelek UV-B toleranciájához. Ehhez dohány (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havanna és cv. Xanthi) növényeket vizsgáltunk növénynevelőkamrában kiegészítő UV sugárzást alkalmazva.

A vizsgálatokhoz először metodikai összehasonlításokat végeztünk, új, és hatékonyabb mérési módszereket keresve a következők alapján:

1. Hogyan befolyásolja a levelek kora az UV-B-indukált válaszokat?
2. Korábban már megállapításra került, hogy az UV-B válasz egy kulcsfontosságú része a POD aktivitásának emelkedése. A leggyakrabban használt enzimaktivitásmérő esszék közül melyik a legalkalmasabb a POD válasz általános jellemzésére?
3. Mutatnak szubsztrát preferenciát az UV-B kezelés által befolyásolt POD válaszok?

A levelekben UV-B-indukált fenolos vegyületek szerepének vizsgálatához kapcsolódóan megvizsgáltuk:

4. Milyen fenolos szubsztrátokat preferálnak az UV-B kezelés hatására megemelkedő aktivitást mutató POD formák?
5. Azonosak ezek a fenolos vegyületek azokkal, amelyek mennyisége növekszik az UV-B kezelt növényekben?
6. A POD szubsztrát funkció mellett milyen más szerepben járulhatnak hozzá az UV-B-indukálta fenolos vegyületek az alkalmazkodáshoz?

Dohány növényekben egyelőre nem állnak rendelkezésre UVR8 mutánsok, a POD génexpressziós szintű vizsgálata pedig az ezeket kódoló géncsalád komplexitása miatt nehézkes. Ezért az UV-B válaszok eredetét, a UVR8 fotoreceptor esetleges részvételét a következő indirekt módon vizsgáltuk meg az alábbi kérdések alapján:

7. Milyen azonosságok és különbségek találhatóak a levelek H₂O₂ tartalmát megemelő UV-B megvilágítás, és a hasonló hatású, exogén H₂O₂ oldattal történő kezelésre adott antioxidánsok válaszok között?

8. Kiválthatók-e a szélessávú UV-B megvilágításra adott alkalmazkodási válaszok egy az UVR8 fotoreceptor jelenleg elfogadott abszorpciós tartományán kívül eső keskeny UV-B hullámhossz tartomány (311 nm) alkalmazásával?

4. Anyagok és módszerek

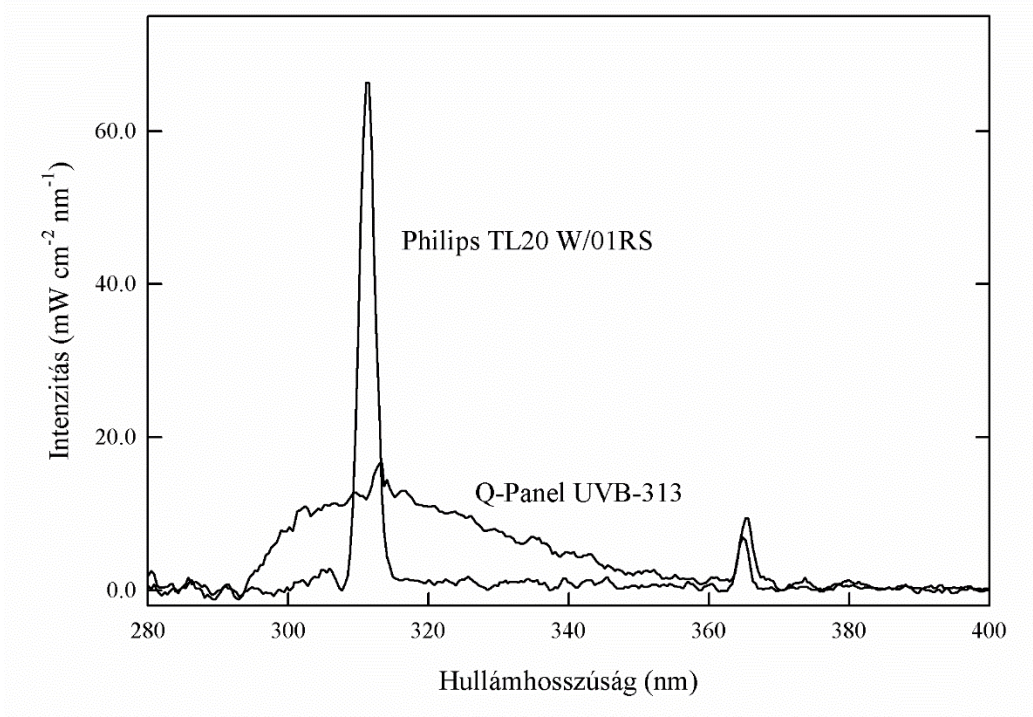
4.1. Növénynevelési körülmények és kezelések

A dolgozat kísérleteihez a dohánynövények (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 és Xanthi) a vetéstől a kísérletek végéig általános virágföldben nőttek, növénynevelő kamrákban (Fitotron, SGC 120 Plant Growth Chamber, Weiss Technik UK, Loughborough, UK; Sanyo MLR-352H-PE, Panasonic Healthcare Co., Ltd., Oizumi, Japán), 65% páratartalom és hosszúnappalos (16 órás napi megvilágítás) körülmények mellett, az 1. táblázatban jelzett fotoszintetikusan aktív sugárzást (PAR) használva. A PAR forrásaként két fénycsőtípust alkalmaztunk egyidejűleg (Philips 36W/830 T8 warm white és Philips 36W/850 T8 cool white). A kísérletekhez 4-5 hetes növényeket használtunk (1. táblázat). A PAR méréshez LI-250A fénymérőt (LI-COR® Biosciences, Lincoln, Nebraska, Egyesült Államok) használtunk.

A kiegészítő UV kezelést minden esetben a fényperiódus közepén alkalmaztuk napi 4-5 órán keresztül. A szélessávú UV-B kezelést Q-Panel UVB-313EL fénycsövekkel (Q-Lab Ltd., Bolton, Egyesült Királyság) végeztük, a kezelések $6.9-7.7 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ biológiailag hatékony UV-B napi dózisoknak feleltek meg Flint és Caldwell (2003) modellje szerint. A növénynevelő kamrában alkalmazott mesterséges megvilágítás (PAR + UV) spektrális intenzitáseloszlását a 2. ábra mutatja. Az I. és II. kísérleti elrendezésben minden UV-kezelt növény azonos dózisú kezelést kapott. A keskenysávú, kvázi-monokromatikus UV-B megvilágításhoz Philips TL20 W/01RS fénycsövet (Philips Electronics, Roosendaal, Hollandia) használtunk, amit a növénynevelő kamrában ferdén leeresztve helyeztünk el, ezzel biztosítva, hogy az alatta elhelyezett növények mindegyikét különböző UV-B dózis érje azonos PAR háttér mellett, aszerint, hogy milyen távolságban (5 – 52 cm) voltak az UV forrástól. A fénycső spektrális emisszióját 311.5 nm-en maximális emisszió és 2.5 nm félmaximumokhoz tartozó sáv szélesség jellemezte (2. ábra). A gyártó elnevezését követve erre a fényforrásra mint 311 nm megvilágításra hivatkozom a dolgozatban. Ebben a keskenysávú megvilágítást alkalmazó kísérletsorozatban (III. kísérlet a 2. táblázatban, Függelék 1.) a növényeket érő UV-B fotonfluxus sűrűség $2.9-9.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ volt, ami $4.6-16 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ biológiailag hatékony UV-B napi dózisoknak feleltek meg (Flint és Caldwell 2003).

A 280 nm alatti hullámhosszúságú sugárzás kizárására cellulóz-diacetát fólia szűrőt alkalmaztunk (Courtaulds Chemicals, Derby, Egyesült Királyság) mindkét fényforrás

esetében. A fénycsövek emissziós tulajdonságait spektrométerrel (Flame, Ocean Optics, Largo FL, Egyesült Államok) mértük.



2. ábra A széles- (Q-Panel UV-B-313) és a keskenysávú (Philips TL20 W/01RS) UV források által kibocsátott sugárzás spektruma

A II. és III. kísérlet során felhasznált kifejlett leveleket a növények negyedik nóduszáról gyűjtöttük. Az I. kísérletben a dohányok harmadik (alsó) nóduszáról a legidősebb kifejlett levelet, a negyedikről (középső) és az ötödikről (felső) legfiatalabb kifejlett levelet gyűjtöttük be. Az eltérő korú leveleket azonos UV dózis érte, az egymáshoz való közelségük és az UV sugárzás kamrán belüli szóródásából fakadóan.

A dolgozatban bemutatott eredményeket eltérő növénynevelési és kezelési körülményeken alapuló kísérletekből kaptuk, melyek összefoglalója a 1. táblázatban látható.

1. táblázat

A dolgozatban leírt kísérletek során használt háromféle (I.-III.) kísérleti elrendezés vázlata.

I.	Metodikai kísérlet	
növénynevelő kamra	négy hetes dohány <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR
	Szélessávú UV-B: 7.7 $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ biológiailag effektív dózis, 5 napon át napi 4 - 4 óra	
II.	H ₂ O ₂ kezeléssel kísérlet	
növénynevelő kamra	négy hetes dohány <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR
	Szélessávú UV-B: 6.9 $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ biológiailag effektív napi dózis, 4 napon át napi 4 - 4 óra és / vagy H ₂ O ₂ oldat locsolás: 100 mL 100 μM H ₂ O ₂ -al (kontroll növények 100 mL víz)	
III.	311 nm UV-B kísérlet	
növénynevelő kamra	öt hetes dohány <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Petit Havana SR1	110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR
	UV-B: 311 nm kvázi monokromatikus, (4.6 – 16 $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$) biológiailag effektív napi dózis, 4 napon át napi 4 - 4 óra	

A táblázatban feltüntetett fotoszintetikusan aktív megvilágítás (PAR) értékek a nevelési fényt és az UV-kezelések közben alkalmazott megvilágítást is jelöli.

4.2. Fotoszintetikus elektrontranszport mérések

A növények fotokémiai paramétereinek vizsgálatához klorofill fluoreszcencia méréseket végeztünk Imaging-PAM (Heinz Walz GmbH, Efeltrich, Németország) műszerrel. A 30 perces sötétadaptáció után megmértük a fluoreszcencia hatékonyságot telítő fényimpulzus előtt és után (F_0 és F_m). A PSII maximális kvantumhatásfokát az $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ képlet alapján számítottuk. Ezt követően 5 percen keresztül a nevelési fényhez közeli, 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR-nak megfelelő kék aktinikus megvilágítás végén újból elvégeztük a mérést, meghatározva az F és F'_m értékeket. A megvilágított levelekben

a PSII hatékonyságát $Y(II) = (F'_m - F) / F'_m$, a nem regulált nem-fotokémiai kioltást $Y(NO) = F / F_m$ és a regulált nem-fotokémiai kioltást $Y(NPQ) = F / F'_m - Y(NO)$ Klughammer és Schreiber (2008) alapján számoltuk ki.

4.3. Pigmenttartalom meghatározása

A levelek noninvazív klorofill és flavonoid tartalom mérését Dualex® Scientific készülékkel (ForceA, Orsay, Franciaország) végeztük (Goulas és mtsai. 2004). A műszer a klorofill index meghatározásához a levelek transzmisszióját (T) két hullámhosszon, 650 nm-es vörös és 940 nm-es infravörös fényel határozza meg:

$$\text{klorofill index} = \frac{(T \text{ infravörös} - T \text{ vörös})}{T \text{ vörös}}$$

Az epidermális flavonoidok elnyelik az UV sugárzást, így a flavonoid index meghatározásához a klorofill fluoreszcencia gerjeszthetőségét használjuk. A készülék a klorofill fluoreszcencia intenzitását (F) kétszer, két különböző gerjesztés (375 nm UV és 650 nm vörös) mellett méri, és a két intenzitás (F_{375} és F_{650}) alapján határozza meg a flavonoid indexet a következő képlet alapján:

$$\text{flavonoid index} = \log \frac{F_{650}}{F_{375}}$$

4.4. Mintaelőkészítés

A fenti nem beavatkozó jellegű mérések után a leveleket gyors, cseppfolyós nitrogénben történt fagyasztás után a felhasználásig -60 °C-on tároltuk. A későbbiekben a fagyott leveleket dörzsmozsárral porrá törtük, majd a mintákat a mérés célja szerinti különböző oldatokban homogenizáltuk hidegen tartott dörzsmozsárban. Az enzimatis antioxadáns mérésekhez a porított leveleket 1 mM EDTA tartalmú Na-foszfát pufferben (50 mM, pH 7.0) homogenizáltuk. A levélkivonatokat centrifugáltuk ($24400 \times g$, 30 perc, 4 °C, Hettich Rotina 380 R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Németország) és a felülúszókat használtuk fel az enzimaktivitások meghatározásához. Az APX enzim aktivitások vizsgálatához készített mintákat 0.5 mM aszkorbinsav jelenlétében homogenizáltuk és tároltuk. A levélkivonatokat felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A

fenolos vegyület tartalom mérésekhez (4.5. fejezet) és a H₂O₂ tartalom meghatározáshoz (4.7. fejezet) a fentitől részben eltérő protokollt használtunk.

A minták enzimaktivitási értékelését a fehérje tartalmuk meghatározásával kezdtük, melyet Bradford (1976) alapján határoztuk meg, az aktivitásokat enzim aktivitás (unit, U) egységekben adtuk meg a teljes oldható protein tartalomhoz viszonyítva adtuk meg (U enzim / mg protein). A III. kísérlet enzim aktivitási eredményeit a minták friss tömegéhez viszonyítva adtuk meg (U enzim / mg friss tömeg (FW)).

4.5. Fenolos vegyületek vizsgálata

A levélminták fenolos vegyületeinek noninvazív vizsgálata mellett elvégeztük analitikai elválasztásukat is vékonyréteg kromatográfiával (TLC), amihez szilikagél bevonatú alumínium lemezeket (60 F254, 12 × 20 cm; Merck KGaA, Darmstadt, Németország) használtunk. A leveleket cseppfolyós nitrogénben dörzsmozsárral porrá őröltük, majd 70%-os etil-alkoholban feltártuk. A levélkivonatokat (0.3 mg levél FW mL⁻¹) és a tesztvegyületeket (1 mg mL⁻¹) 5 µL térfogatot vittünk fel a lemezekre, a futtatópuffer 30 mL térfogatú etil-acetát, hangyasav, ecetsav és víz keveréke volt (100:11:11:27, V:V:V:V). A lemezt először szabad levegőn, majd exsikkátorban szárítottuk 20 percig. A fenolos vegyületek vizualizációja a NaturStoff reagens oldattal kezelt lemezen 365 nm-es UV fényforrással (VL215.L, Vilbert Lormat, Franciaország) történt (Hawrył és Waksmundzka-Hajnos 2011).

4.6. Enzimaktivitások meghatározása

A levélkivonatok hármastípusú peroxidáz enzim (POD, EC 1.11.1.7) aktivitásának vizsgálatát 50 mM foszfát-citrát pufferben (pH 5.0) az alábbi hatféle szubsztráttal egyikével végeztük: ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav), guaiacol (2-metoxifenol), kávésav ((E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-2-propénsav), klorogénsav (((1S,3R,4R,5R)-3-(((2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoil)oxi))-1,4,5-trihidroxi-ciklohexán-karboxilsav), rutin (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metil-oxán-2-il)oxi)metil)oxán-

2-il]oxil}-4H-kromén-4-on), illetve quercetin (2-(3,4-dihidroxi-fenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirán-4-on). Az egyes kísérletekben alkalmazott szubsztrátok koncentrációja, abszorpciós hullámhossza és moláris extinkciós koefficiens értékeik a 2. táblázatban láthatóak. Az abszorpcióváltozásokat Shimadzu UV-1800 spektrofotométerrel (Shimadzu Corp., Kyoto, Japán) követtük, jellemzően 3 percig.

2. Táblázat

A különböző szubsztrátokkal végzett POD mérések adatai

ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav), GUA (guaiacol), CAA (kávésav), CGA (klorogénsav), QUE (quercetin), RUT (quercetin-3-O-rutinozid)

Szubsztrát	Koncentráció (mM)	Abszorpciós hullámhossz (nm)	Moláris extinkciós koefficiens (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Hivatkozás
ABTS	183	765	11.23	Childs és Bardsley 1975
GUA	2	450	5.98	Fielding és Hall 1978
CAA	3	315	0.62	Rácz és mtsai. 2020
CGA	3	325	0.83	Rácz és mtsai. 2020
QUE	3	340	3.87	* Takahama és Oniki 1997
RUT	3	265	0.03	Rácz és mtsai. 2020

*A quercetin-szubsztrát gyors oxidációja következtében a reakciót az oxidált quercetin helyreállításából adódó aszkorbát csökkenésén keresztül követtük 295 nm-en, $\epsilon_{295 \text{ nm}} = 1,47 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ alkalmazásával.

A H_2O_2 semlegesítését végző másik enzimcsalád tagját, az aszkorbát peroxidáz (APX, EC 1.11.1.11) aktivitását Nakano és Asada (1981) alapján határoztuk meg. A mérés során a mintákhoz adott aszkorbát oxidációját követtük nyomon nátrium-foszfát pufferben (50 mM, pH 7.0), mely 1 mM EDTA-t, 0.5 mM aszkorbátot és 1 mM H_2O_2 -ot tartalmazott. A mérési eredményeket korrigáltuk a minták APX-független H_2O_2 reaktivitásával, ami jellemzően kevesebb volt, mint az enzimaktivitás 10% -a. Az enzimaktivitásokat az aszkorbát moláris extinkciós együtthatójának felhasználásával ($\epsilon_{295 \text{ nm}} = 1.47 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) számoltuk mU APX mg^{-1} fehérjeként megadva.

A glutation peroxidáz (GPX, EC 1.11.1.9) szintén képes H_2O_2 és szerves hidroperoxidok semlegesítésére, aktivitásának a NADPH oxidációján keresztül határoztuk meg Lawrence és Burk (1976) alapján. A reakcióelegy 1 mM EDTA-t, 0.2 mM NADPH-t, 1 mM NaN_3 -t, 1 mM redukált glutationt, és 1 U mL^{-1} glutation reduktazt tartalmazott 50 mM kalium-foszfát pufferben (pH 7.0) Szubsztrátként vagy 0.25 mM H_2O_2 -ot vagy 0.25 mM kumén-hidroperoxidot használtunk. A NADPH oxidációját 340 nm-en mértük ($\epsilon = 6.42 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és az enzimaktivitást mU GPX mg^{-1} fehérjeként határoztuk meg.

További H_2O_2 semlegesítő enzimként, a minták kataláz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitását is meghatároztuk Aebi és mtsai. (1984) alapján. A mérés a H_2O_2 koncentráció csökkenés okozta 240 nm-es abszorpció változását követi, mely a következő reakcióelegyben megy végbe: 18.6 mM H_2O_2 -ot és 1 mM EDTA-t tartalmazó nátrium-foszfát puffer (50 mM, pH 7.0). A reakciót 60 μL levélmintával (1.3 – 4.1 μg fehérjét tartalmaz) indítjuk el és a CAT aktivitási értékeket mU mg^{-1} fehérjeként adjuk meg.

A szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitási méréseket Sun és mtsai. (1988) alapján végeztük el. A vizsgálat a nitroblue tetrazolium (NBT, 0.1 mM) szuperoxid gyök általi redukációján alapszik, amit 560 nm-en követtünk. A szuperoxid gyököt a reakcióelegyben xantin – xantin-oxidáz (2 mM és 25 mU) reakciójával állítottuk elő. Az aktivitási értékeket U SOD mg^{-1} fehérjeként adtuk meg.

4.7. Natív protein gélelektroforézis

A peroxidáz izoformák elválasztásához a mintákat natív 12%Tris-Glicin gélen (PAGE® Gold Precast Gels Lonza) szeparáltuk, majd a gélátmostuk desztillált vízben és az enzimaktivitás vizualizálását ABTS-el, GUA-val és OPD-vel végeztük (Anderson és mtsai. 1995). Összehasonlításként HRP enzimet használtunk. Molekulasúly markerként Thermo Scientific™ PageRuler™ előre bejelölt fehérje létrát használtunk, ami 10 és 250 kDa közötti kilenc rekombináns fehérje keveréke. A géltre minden zsebbe 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mintát vittünk fel. Futtató pufferként Tris puffert (pH=8.3) használtunk. A géleket 120 V-on és 130 percen keresztül futtattuk.

4.8. Hidrogén-peroxid tartalom meghatározás

A levélminták H_2O_2 tartalmának fotometriás megbecslését Mátai és Hideg (2017) alapján végeztük el. A módszer a xylenol orange ($125 \mu\text{M}$; 6% (v/v) triklórecetsavban (TCA) oldva) kromofór H_2O_2 indukálta abszorpciós változásán alapszik. A méréshez nem a 4.5 alfejezetben leírt mintákat használtuk, hanem a kezeléseik végén közvetlen a nevelőkamrában levelenként 3 korongot gyűjtöttünk (25 – 56 mg), melyeket azonnal 6%-os TCA oldatban homogenizáltunk dörzsmozsár használatával. A mintákat ezután centrifugáltuk ($15\,000 \times g$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Egyesült Államok) és 30 perces inkubáció (szobahőmérsékleten) után 560 nm-en mértük a felülúszók abszorpciós értékeit. A levelek H_2O_2 tartalmát nmol mg^{-1} friss tömegben adtuk meg, egy 0 – 10 nM skálájú H_2O_2 kalibrációs görbe használatával.

4.9. Nem enzimatis H₂O₂ semlegesítés mérés

A 70% etanolt tartalmazó levélkivonatok nem enzimatis H_2O_2 semlegesítő antioxidáns kapacitás meghatározását Csepregi és Hideg (2016) alapján végeztük el. A mérés a H_2O_2 és a kálium-jodid (KI) reakciója során keletkező jód (I_2) fotometriás detektálásán keresztül történik, melyet csökkentenek a mintában jelen lévő H_2O_2 -reaktív komponensek. A mérőelegy $25 \mu\text{M}$ H_2O_2 -ot, $595 \mu\text{M}$ KI-t, 6% (v/v) etanolt kálium-foszfátot tartalmazó puffer ($\text{pH}=7.0$). Ehhez vagy levélkivonatot ($15 - 20 \mu\text{l}$ $4.5 - 6 \mu\text{g}$ levél friss tömegnek megfelelő mennyiségű) vagy tesztvegyületet ($0.42 - 3.2 \text{ mM}$) adtunk. A mérés során kétszer mértünk 405 nm-es az abszorpciót, azonnal a komponensek összekeverésekor, majd három perc elteltével, melyhez Multiskan FC plate reader-t (Thermo Fischer Scientific, Shanghai, Kína) használtunk. A nem enzimatis H_2O_2 semlegesítési értékeket μM aszkorbát ekvivalensként adtuk meg.

4.10. Nem enzimatis $\text{O}_2^{\cdot-}$ semlegesítés mérés

A szuperoxid gyök $\text{O}_2^{\cdot-}$ semlegesítő antioxidáns kapacitás méréseket az enzimatis aktivitás gátlása érdekében szintén 70%-os etanolt tartalmazó levélkivonatok segítségével végeztük. A módszer az NBT (nitro blue tetrazolium) formazánná való átalakulás gátlásán alapszik. A $200 \mu\text{L}$ reakcióelegy a következőket tartalmazta: 0.3 mM xantin, 0.3 mM EDTA és $5 - 15 \mu\text{L}$ levélkivonat 50 mM K-foszfát pufferben ($\text{pH} = 7.2$) és a reakciót 15 mU xantin-oxidáz hozzáadásával indítjuk el. A formazán képződés

detektálását 540 nm-en detektáltuk az abszorpció emelkedésével. Az eredményeinket as μM Trolox ekvivalens mg^{-1} levél friss tömegként adtuk meg.

4.11. Statisztikai adatelemzés

A kísérletek során kétféle adatértékelési stratégiát alkalmaztunk. Az 5.6. fejezetben bemutatott keskenysávú UV-B kezelés kivételével minden kísérletben az azonos kezelési vagy levélkor csoportba tartozó leveleken mért adatok átlagait hasonlítottuk össze kétmintás t-próba vagy ANOVA módszerrel. Biológiai ismétlésnek különböző növényegyedek azonos kezelésnek kitett, azonos korú leveleit tekintettük ($n=4$). Minden levéből egyenként készítettünk kivonatokat és a spektrofotométeres mérések levelenként három vagy négy technikai ismétlésben történtek.

Az UV-B és H_2O_2 hatásokat vizsgáló kísérletsorozatban (5.4. fejezet) az ANOVA módszert használtuk. A feltételek teljesülését a következő előtesztekkel ellenőriztük: adataink normalitását Shapiro-Wilk W tesztekkel és a varianciák homogenitását Levene-tesztekkel. A mintaátlagok közötti eltéréseket kétutas ANOVA-val meghatározott p értékekkel vizsgáltuk, a különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Tukey HSD teszteket alkalmaztunk post-hoc tesztként, és az ANOVA nullhipotézisek igazolt elutasításait p értékekkel jellemeztük.

A natív protein gél elektroforézis és fenoloid vékonyréteg vizsgálatok eredményeit csak kvalitatívan értékeltük, statisztikai elemzés nélkül.

A keskenysávú UV-B kezelést alkalmazó kísérlet során nem dolgoztunk biológiai ismétlésekkel. Ebben a kísérletben 13 növény esetében növényenként különböző 311 nm dózist használtunk. Az egyes növények 1-1 levelének adataihoz 4 UV-B kezelést nem kapott levél adatait hozzátéve a növekvő dózisu UV-B által keltett hatások trendjét vizsgáltuk. Ehhez minden mért paraméter (fotoszintézis vagy antioxidáns jellemző) esetében regressziós modellt illesztettünk az UV-B adatokat független, a mért értékeket függő változóként kezelve. Amennyiben a lineáris modell nem azonosított szignifikáns trendet, akkor négyzetes polinom függvény illesztését kíséreltük meg. A regressziós eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0.05$ mellett elvethető volt az a nullhipotézis, amely szerint nem áll fenn regressziós kapcsolat; továbbá teljesült a változók és a hibatarok normalitásának feltétele is (Shapiro-Wilk teszt eredménye $p > 0.05$).

A statisztikai vizsgálatok a PAST program segítségével történtek (Hammer és mtsai. 2001).

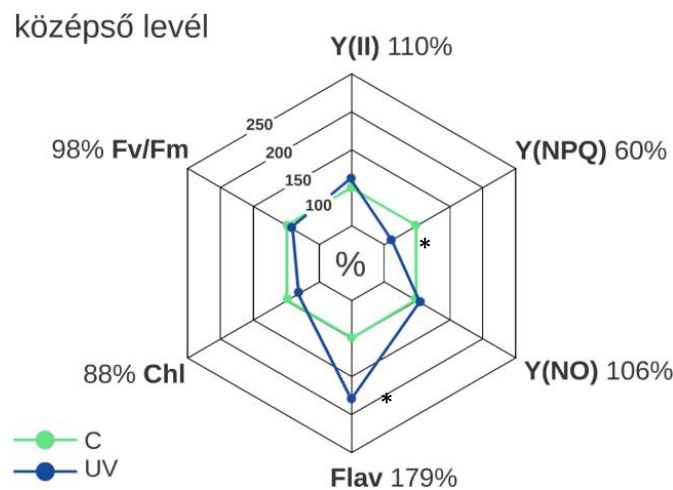
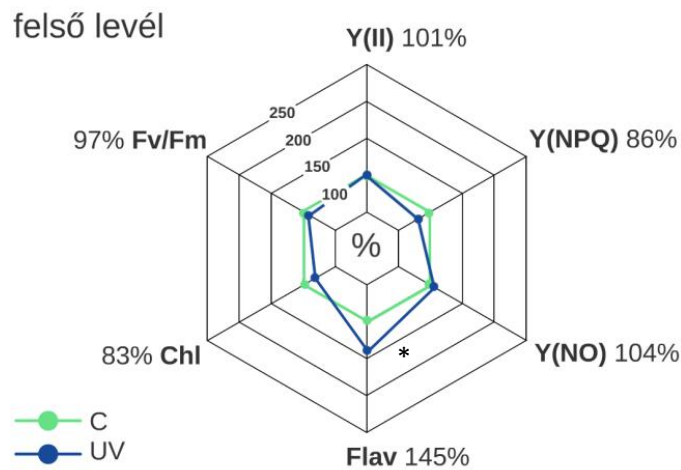
5. Eredmények és megvitatásuk

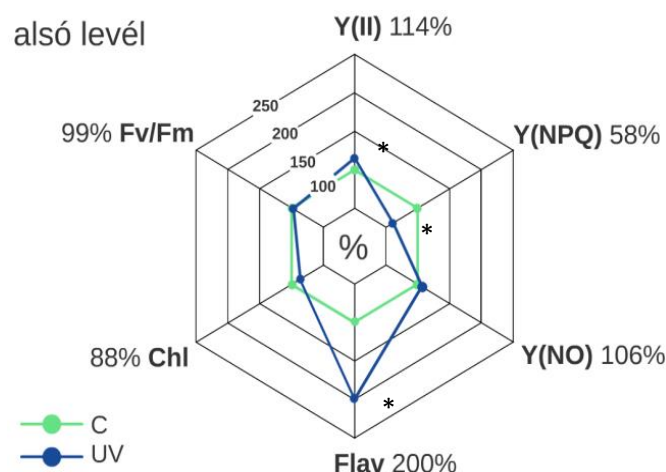
5.1. Dohánylevelek UV-B-hez történő alkalmazkodásának életkor függése

A dolgozatban bemutatásra kerülő UV-válaszokat dohánynövényekben vizsgáltuk. A sikeres alkalmazkodást a fotoszintézis fényreakciójának hatékonyságával (fotokémiai kvantum hatásfok) jellemeztük, és az UV sugárzáshoz jól alkalmazkodott növények leveleiben vizsgáltuk az oxidatív stressz elkerülését lehetővé tevő antioxidáns válaszokat. A levelek fotoszintézisét (Moustaka és mtsai. 2015; Nesterenko és mtsai. 2015) és különböző antioxidánsait (Csepregi és mtsai. 2017) is befolyásolja azok fejlettségi állapota. Amennyiben a levelek antioxidáns tartalma különböző, ez befolyásolhatja a stresszre adott válaszaikat is. Az első kísérlet sorozatban növénynevelő kamrában nevelt 4 hetes, három kifejlett levelet tartalmazó dohány (*N. tabacum*, cv. Xanthi) növényekben, három különböző levél szinten hasonlítottuk össze az UV kezelésre adott hármastípusú peroxidáz enzim (POD) aktivitás válaszokat. Az UV-válaszok más fajokban korábban már megfigyelt heterogenitásának dohány növényekben történő vizsgálata mellett ez a kísérlet sorozat fontos volt annak a levélszintnek a kijelölésére, amit a további kísérletekben tovább tanulmányoztunk. Első lépésként klorofill fluoreszcencia alapján számított élettani paraméterek alapján jellemeztük a különböző korú leveleket és az alkalmazott UV kezelés hatását. A fotokémiai paraméterek változásai jól jellemzik a levelek korának változását, amit már megfigyeltek *Arabidopsis* (Moustaka és mtsai. 2015) és búza (Nesterenko és mtsai. 2015) esetében.

Az I. kísérleti elrendezésben leírt kiegészítő UV-B sugárzásnak kitett növényeket nem érte károsodás a kísérlet során, amit a mért fotokémiai paraméterek alátámasztanak. A stressz indikátorként is használatos nem szabályozott nem fotokémiai kioltás (non-regulated non-photochemical quenching, Y(NO); Klughammer és Schneider 2008) mindegyik vizsgált levélszinten alacsony értékű volt (0.19 – 0.22), és a levelek eltérő kora nem volt rá hatással. Az alsó levelek PSII kvantumhozama (Y(II)) 23 % -al alacsonyabb volt, mint a fiatalabb felső leveleké (0.57 és 0.71). Ezt a különbséget az okozta, hogy a szabályozott, stresszelkerülést jelző nem fotokémiai kioltás (Y(NPQ)) magasabb volt az alsó levelekben. Az UV-B kezelés hatására az Y(II) egyedül az alsó levelek esetén változott, ezekben kis mértékben, de szignifikánsan megemelkedett. Az F_v/F_m és az Y(NO) paraméterek egyik korcsoport esetében sem változtak meg a kezelés hatására (3. ábra). Ez

az eredmény azt mutatja, hogy az alkalmazott UV-B besugárzás nem okozott károsodást a levelekben, alkalmazkodás következett be. A levelek klorofill tartalmát klorofill indexszel jellemeztük. A három levélszinten ezek nem különböztek. Az UV-kezelés hatására egyik csoportban sem volt csökkenés a klorofill tartalomban. Bár az átlag értékekben volt változás (3. ábra), a levelek biológiai variabilitásából adódó különbségek miatt ezek nem voltak szignifikánsak.





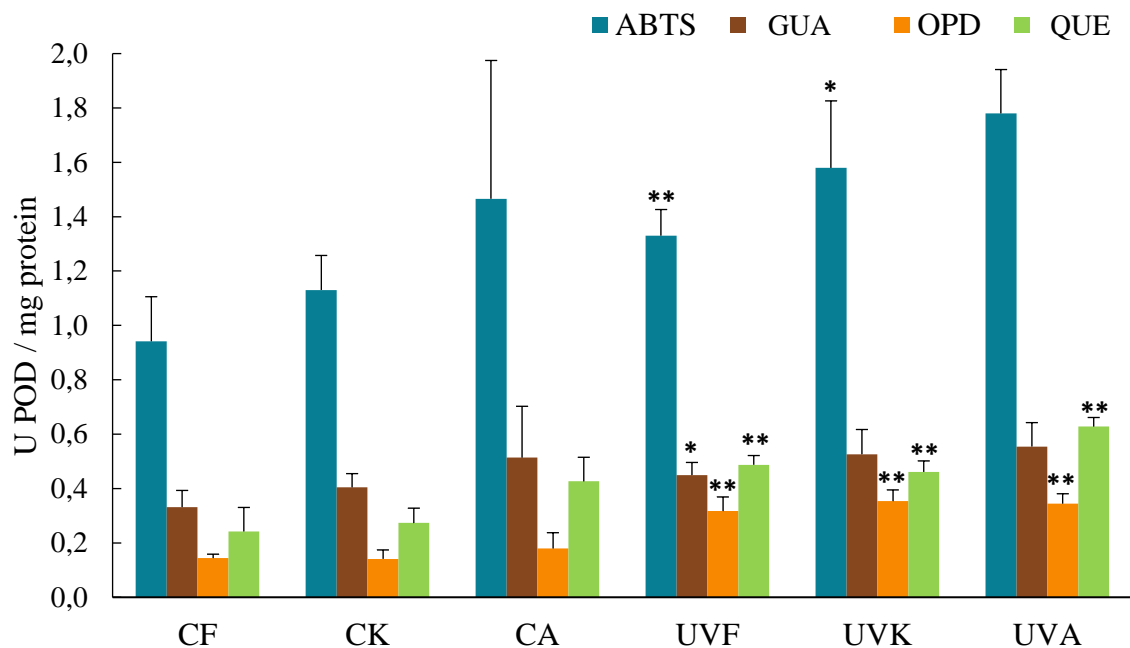
3. ábra A fotokémiai hatékonyságok (Fv/Fm és Y(II)), a nem fotokémiai kioltások (Y(NPQ) és Y(NO)) hatásfokának megoszlása, és a pigment tartalom Chl, klorofill és Flav, flavonoid index) változása eltérőkorú kontroll és UV-kezelt dohány levelekben (C, kontroll; UV, kiegészítő UV megvilágítás; felső levél = legfiatalabb kifejlett levél, alsó levél = legidősebb kifejlett levél). A biológiai ismétlés kezelési csoportonként négy-négy levél volt. A csillagok az egyes levélszinteken az UV okozta szignifikáns ($p < 0.05$) eltéréseket jelzik. Az ábrán szereplő %-os értékek az adott levélszinten az egyes paraméterekben az UV kezelés hatására bekövetkező változásokat jelzik.

Az UV-B-hez történő alkalmazkodás, egyik jellemző hatása a fenolos savak és flavonoidok bioszintézisének serkentése (Schreiner és mtsai. 2012). Ezt kísérletünkben a noninvaszív flavonoid tartalom meghatározás eredménye is igazolta, az UV-kezelt levelek magasabb flavonoid index értékeket mutattak, a felső levelek 1.5-szeres, a középsők és az alsók pedig 2-szeres emelkedést a megfelelő kontrollokhoz viszonyítva (3. ábra). Ezek a vegyületek az epidermisz sejtekben UV elnyelőként csökkenthetik a fotoszintézisben résztvevő mezofill sejteket érő sugárzást (Larson 1988). Az emelkedő fenolos vegyület tartalom további UV-B indukálta védelmi lehetőségeket is biztosít a növények számára, a POD szubsztrátként (Jansen et al. 2004), vagy nem enzimátikus antioxidánsként (Larson 1988). Ezekkel a következő fejezetekben foglalkozom részletesen.

5.2.1. Az UV-B indukálta POD válasz mérése természetes és mesterséges szubsztrátokkal

A fenti mérések alapján megállapítható, hogy az alkalmazott UV-B kezelés a levelekben alkalmazkodási válaszokat váltott ki. A következőkben összehasonlítottuk a POD enzim aktivitásokat és azok UV-indukált változásait a különböző levélszinteken.

Ennek mérésére az irodalomban többféle, különböző kromofór tulajdonságú elektron donor szubsztrátot alkalmazó eljárás ismert. A hagyományosan használt szintetikus (ABTS, OPD) szubsztrátok mellett a több növényfajban is megtalálható fenolos vegyület, a guaiacol (GUA) alkalmazása is elterjedt. A csoportonkénti négy levélminta POD aktivitásának meghatározását négy különböző szubsztráttal végeztük el, a fenti háromhoz egy flavonoid vegyületet, a quercetint (QUE) is hozzávéve, amit a tormaperoxidáz (HRP) enzim esetében alkalmaztak már szubsztrátként (Yamasaki és mtsai. 1997). A POD enzim aktivitásokat az alkalmazott szubsztrát szerint jelöltük ABTS-POD, GUA-POD, OPD-POD és QUE-POD módon. A négyféle mérési eljárás ugyanazon levélmintában is különböző értékeket adott mM oxidált szubsztrát min^{-1} enzim egységekben (enzyme unit, U) kifejezve, ABTS-POD \gg GUA-POD $>$ OPD-POD \approx QUE-POD sorrendben (4. ábra). A POD aktivitást mérő próbák közötti eltérések szemléltetése érdekében az eredményeket minden esetben a százalékos értéként adtuk meg a felső (legfiatalabb) kontroll levélben mérthez (CF) képest. Az eltérő életkorú kontroll levelek POD aktivitásai között csak a QUA-POD esetében kaptunk szignifikáns eltérést. A GUA-POD és OPD-POD mérések eredményei hasonlóak voltak az ABTS-POD-értékekhez: egyik módszer sem mutatott számottevő különbséget a különböző korú kontroll levelek között. Hosszabb ideig nevelt, háromhónapos dohánynövények szélesebb korszpektrumú leveleinek vizsgálatakor Takahama és mtsai. (1999) azt tapasztalták, hogy a szimplasztikus POD aktivitás (ami kísérletükben a teljes POD legalább 80%-ának felelt meg) független volt a levél pozíciójától, így a korától is, azonban az intracelluláris folyadék POD aktivitása alacsonyabb volt a fiatalabb levelekben (kb. 8-10%-al) és megemelkedett az idősebbekben (kb. 20%-kal) (4. ábra). A különbség hiánya a mi kísérletünkben azzal magyarázható, hogy a fiatalabb (egy hónapos) növényeinkben vizsgált három levél közelebb helyezkedett el egymáshoz, így a nevelőkamrában az ezeket ért PAR megvilágításban sem volt jelentős különbség. Ezek a növények tehát jó alanyok voltak annak megvizsgálására, hogy az egymáshoz hasonló alap POD aktivitásaik különböző módon változnak-e az UV-B kezelés hatására.



4. ábra A négy szubsztráttal mért POD aktivitás változásai UV-B kezelés hatására a különböző levelek esetében.

CF/K/A: felső/középső/alsó kontroll levél, UVF/K/A: felső/középső/alsó UV kezelt levél, * és **: $p < 0.05$ és $p < 0.01$ szignifikáns különbség az azonos korú kezeletlen és kezelt levelek között. Az oszlopok és a hibásávok az átlagoknak és szórásoknak felelnek meg ($n = 4$).

Az UV kezelt levelek POD aktivitása mind a négy szubsztrát használatakor emelkedést mutatott a kontrollokéhoz képest, a korábban hasonló körülmények között tanulmányozott dohánynövények ABTS-POD válaszához hasonlóan (Majer és mtsai. 2014, Czégény és mtsai. 2016). Mivel a legmagasabb POD aktivitási értékeket minden minta esetében az ABTS használatával kaptuk, így módszertani konklúzióként ezt a módszert javasoljuk dohánynövények más stresszválaszainak vizsgálatokhoz is.

A sokszempontos analitikai vizsgálatokhoz szükséges nagy kísérleti anyag mennyiség könnyebben elérhető több levél egyetlen mintaelembe gyűjtésével, azonban több közlemény is bemutatta, hogy a stresszválaszok az eltérő korú levelekben különbözőek. A levelek életkora hatással volt a növények UV sugárzásra adott válaszára is, például a nem enzimikus antioxidánsok mennyiségi változásaira szőlő (Majer és Hideg 2012) és *Arabidopsis* (Csepregi és mtsai. 2017) növények esetében. Hasonló eredményt adott az itt bemutatott, három levélszint POD válaszait összehasonlító I. kísérleti elrendezésünk. A kontroll levelek POD aktivitása négy különböző szubsztráttal végzett vizsgálat közül csak az egyik esetben (QUE-POD) volt szignifikánsan különböző az alsó és a felső levelekben;

az UV-kezelés pedig mindkét levél szinten fokozta az aktivitást mind a négy módszer szerint. Az UV kezelt alsó levelekben a POD aktivitásának emelkedését a QUE mellett, az ABTS használatával is ki tudtuk mutatni. Az eredmény egyik magyarázata, hogy az ABTS-el regisztráltuk a legmagasabb aktivitási értékeket, tehát a próba sokkal érzékenyebb a kisebb relatív eltérések érzékelésében, mint a többi szubsztrát. Azonban a nagy érzékenység önmagában nem elegendő az UV indukálta POD válaszok vizsgálatakor. A POD aktivitás mellett fontos, hogy magas szubsztrát affinitással tudjunk detektálni az UV aktiválta POD izoformákat is. Annak ellenére, hogy a QUE használatakor sokkal kisebb aktivitási értékeket kaptunk, mint a többi szubsztrát esetében, ez volt az egyetlen olyan módszer mely képes volt kimutatni a korból adódó különbségeket, kezeletlen és UV-B kezelt levelek esetében is. A különböző POD szubsztrát módszerek közötti eltérések magyarázata így a következő két hipotézis lehet: (i) az UV-kezelt mintákban jelen vannak olyan metabolitok, melyek befolyásolhatják a POD mérés érzékenységét vagy (ii) a POD izoformák eltérő szubsztrát preferenciája. Az első magyarázat potenciális metabolitjai az UV-indukálta fenolos vegyületek, melyek versenghetnek a kromofór szubsztráttal az enzim kötőhelyéhez kapcsolódásakor. A polifenolokban gazdag levélminták esetében ez az enzimaktivitás alul becsléséhez vezethet, ami megmagyarázza mind a négy kromofór oxidáción alapuló próba kis POD aktivitás különbségeket illető érzéketlenségét. Az első hipotézisünket támasztja alá a megemelkedett adaxiális flavonoid index értékek az idős UV-kezelt levelekben a fiatal UV-kezeltéhez képest (+47%) és a QUE szubsztráttal (tehát egy fenolos vegyülettel) mért POD aktivitási értékek párhuzamos emelkedése. Másrésztől, a korból adódó POD aktivitás különbségeket az alacsonyabb polifenol tartalmú kontroll mintákból is sikerült kimutatnunk, bár csak a quercetin használatával. Kétféle, lucfenyőből származó fenolos peroxidáz vagy HRP-t túlexpresszáló dohánynövények összehasonlító vizsgálatok Jansen és mtsai. (2001, 2004) azt tapasztalták, hogy az egyik esetben emelkedett, a másikban viszont csökkent a transzgenikus növények UV-tűrése. Ez arra utalt, hogy csak bizonyos POD izoformák járulnak hozzá az UV elleni védelemhez, ami a második hipotézisünket támasztja alá. Ezért kísérletünkben a dohánylevelekben jelen levő eltérő POD izoformákat és ezek UV-B hatására történő aktiválódását gélelektroforetikus elválasztással vizsgáltuk.

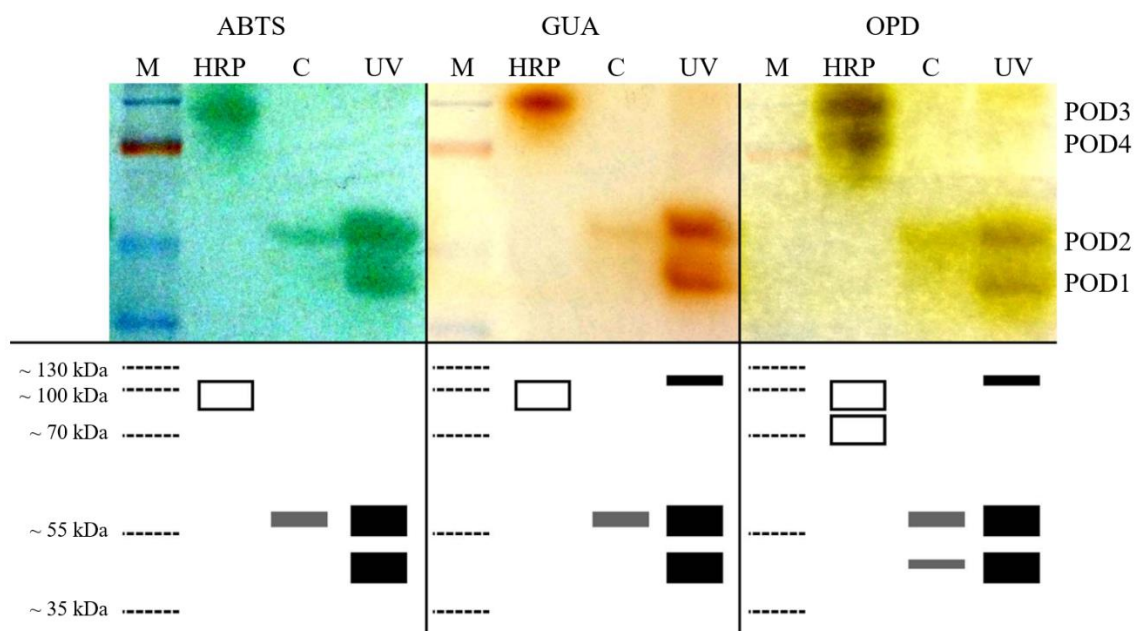
5.2.2. Az UV-B indukálta POD izoformák eltérő szubsztrát-preferenciája

A különböző korú UV kezelt levelek vizsgálata rámutatott a POD enzim válasz összetettségére. Az egyes szubsztrátokat preferáló mutató izoformákat natív gél elektroforézis segítségével különítettük el. Ehhez a felső levelek kivonatait vizsgáltuk, és a fenti kísérletekből három, a látható tartományban abszorpcióváltozást mutató kromofór szubsztrátot (ABTS, GUA, OPD) használtunk az aktivitás festések során.

A spektrofotometriai vizsgálatok eredményeivel ellentétben a natív PAGE nem alkalmas kvantitatív összehasonlításokra (Janknegt és mtsai. 2007), viszont a gélelektroforézis használatával képesek voltunk a sikeres UV-B akklimációért felelős POD izoformák megjelenítésére. Az UV-B-kezelt levelekben három különálló sávot azonosítottunk a dohánylevél kivonatokban és neveztük el Yannarelli és mtsai. (2006) nomenklatúrájának kiterjesztése alapján (POD1, POD2, POD3 az 5. ábrán). Ezek molekulatömege a natív gél alapján nem állapítható meg pontosan, a becsült tömegek a 45, 55 és 95 kDa. A kontroll növények mintáiban ezek közül a POD2 sáv volt detektálható mindhárom festék használatával, illetve OPD-vel halványabban a POD1 sáv is láthatóvá vált. Az UV-B kezelés jelentősen megnövelte a POD2 aktivitást és erős POD1 aktivitást okozott mindhárom szubsztráttal. Továbbá, egy harmadik, nagyobb molekulatömegű és kisebb aktivitást mutató izoforma sávja (POD3) is jelen volt az UV kezelt mintákban, de csak az OPD és guaiacol szubsztrátok használatakor. A POD3 a molekulatömege a tormaperoxidáz enzimet (HRP) alkotó POD izoformáéhoz volt hasonló.

Bár nagy dózisu UV kezelések hatásait vizsgálták már egy másik (naftolos) festési eljárással, a mi kísérletünkben volt az első olyan UV akklimációs levélmintákat vizsgáló natív POD gél analízis, mely három eltérő szubsztrátot használt az eredmények összehasonlítására és értékeléséhez. Megmutattuk azt is, hogy az ABTS, OPD és GUA festés összehasonlítása alkalmas a POD izoformák kimutatására, mert különbözőképpen regisztrálta a kereskedelemben kapható tisztított HRP aktivitását is. A kísérletünk szerint a HRP is több izoforma keveréke. Eredményeink azt is megmutatták, hogy ezek az izoformák érzékenyebbek voltak az OPD használatára, mint a másik két szubsztrátra, mivel az OPD festés hatására egy negyedik sáv (POD4, Yannarelli és mtsai. 2006) is megjelent a gélen. Ennek az izoformának nem volt megfelelője a dohánylevél kivonatokban.

Az eltéréseket az izoformák aktiválását befolyásoló különböző környezeti faktorok is okozhatják, mivel funkcionális specializációjuk már régóta feltételezett (Cosio és Dunand 2009). Az UV-B indukált POD izoformák hasonló elkülönítését eddig csak sokkal magasabb, nem alkalmazkodást, hanem károsodást előidéző dózisok esetében végezték el. Korábbi tanulmányok (Yannarelli és mtsai. 2006, Jovanovic és mtsai. 2006) már beszámoltak szélsőséges UV dózisok alkalmazásával kapott eltérő POD izoforma válaszokról, mindkét kísérlet során 1-naftolt használtak POD szubsztrátként. A mi kísérletünkben alkalmazottnál közel 23-szor nagyobb UV-B dózis használatával Yannarelli és mtsai (2006) napraforgó csíranövény mintákban két erős POD izoforma (POD1 és POD2) megjelenéséről számolt be, ezeket a dohánylevélkivonatokban az alacsonyabb UV-B hatására is megfigyeltük. Egy harmadik izoformát (POD3) pedig az UV kezelést követően 20 óra helyreállítás után azonosítottak, ez a mi kísérletünkben közvetlenül az UV kezelés után sokkal gyengébben jelentkezett. Egy másik tanulmányban, szintén extrém magas UV-B dózis használatával (25-ször magasabb, mint a mi kísérletünkben) a fentiektől eltérő POD válaszokat észleltek hajdina csíranövények és kifejtett növények összehasonlításakor (Jovanovic és mtsai. 2006). Annak ellenére, hogy a natív gél nem alkalmas kvantitatív összehasonlításokra, arra alkalmasnak bizonyult, hogy illusztráljuk az UV-indukálta POD izoformák heterogenitását és különböző szubsztrát preferenciáikat.



5. ábra Felső sor: Tormaperoxidáz (HRP) és a dohányleveél kivonatok POD enzim aktivitás mintázata natív géleken az ábrák tetején jelzett festési módszerekkel. A sávok balról jobbra a következőket tartalmaztak: molekulatömeg-marker (M); HRP (2 μ U); dohánylevél kivonatok kontroll (C) és UV-kezelt (UV) levelekből (30 μ g összfehérje). Alsó sor: A natív gélek sematikus mintázata. A szaggatott vonalak a marker pozíciókat, a fehér négyyszögek a HRP sávokat, a szürke és fekete négyyszögek a kontroll és az UV-kezelt mintákban megjelenő sávokat jelképezik.

Bár a natív gélen szétválasztott POD izoformák szubsztrát preferenciáját a QUE-POD esetében nem tudtuk megvizsgálni, mert a QUE oxidációját kísérő abszorpcióváltozás nem a látható spektrum tartományba esik, a QUE-POD UV-indukált aktivitás változásait a további kísérletekben tovább vizsgáltuk.

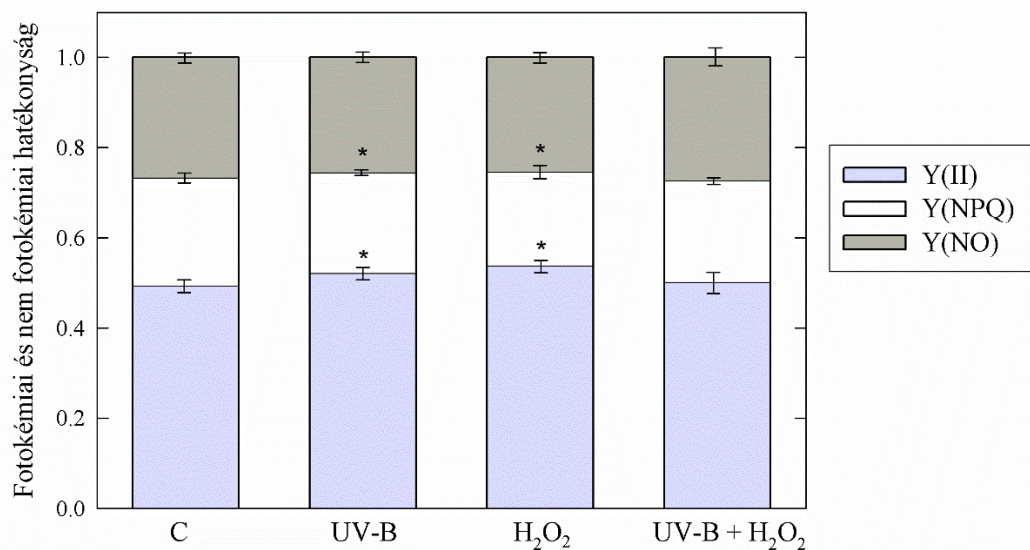
A fenti, részben szintetikus (ABTS, OPD), részben természetes, de a dohánylevelekben nem található fenolos vegyülettel (GUA) végzett kísérletek megerősítették, hogy az UV-B-hez történő alkalmazkodásban többféle POD izoforma is részt vesz. Más, kevésbé heterogén enzim családok esetében az egyes enzim fehérjéket kódoló gének jól azonosíthatóak, és a stresszválasz tanulmányozható például a mRNS szintek változásai, vagy célzott mutánsok segítségével. A POD esetében ez az út nem követhető, részben az enzimcsalád multigénes jellege miatt, részben számunkra nem volt elérhető olyan mutáns, mely az összes POD izoforma aktivitására hatással lenne. A célzott mutációkat tartalmazó növények hiányában más kutatási megközelítést alkalmaztunk. A POD enzim UV-B sugárzásra adott válasza nagy heterogenitást mutattak a reakció során használt szubsztrát tekintetében, mely lehetőséget adott nem csak a POD izoformák aktivitásának a tanulmányozására, de a szubsztrát preferenciák elemzésére is (Rác és mtsai. 2018). A dohánynövények sokféle fenolos vegyületet tartalmaznak, ezért továbbiakban ezeknek a szerepét vizsgáltuk az UV-B sugárzáshoz történő alkalmazkodás során.

5.3. A fenolos vegyületek és a POD izoformák szerepe az UV-B válaszban

Az UV sugárzás megváltoztatja a levelek fenoloid bioszintézisét, ami részben az UVR8 fotoreceptor által szabályozott folyamatok eredménye (Brown és mtsai. 2005). A fenolos vegyületek mennyiségének növekedése, illetve a fenoloid profil megváltozása azonban többféle más oxidatív stressz kísérő jelensége is (Bilger és mtsai. 2007; Alam és

mtsai. 2016.), így a fotoreceptor független válaszút, például az UV-B-keltette H₂O₂ hatása is feltételezhető volt. Ezért az UV-B-függő antioxidáns válaszok további vizsgálataival párhuzamosan a közvetlen H₂O₂ kezelés hatásait is tanulmányoztuk. Elsőként az UV-B kezelés szerepét mutatom be az 5.3. fejezetben, majd ezen eredményeket hasonlítom össze a H₂O₂ kezelés eredményeivel az 5.5. fejezetben.

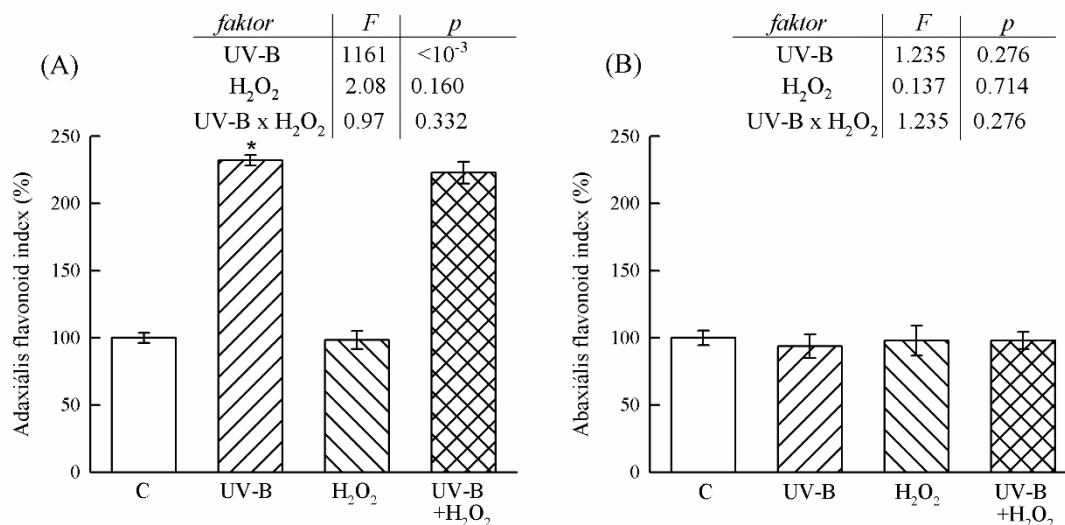
A 5.2. fejezetben leírtakhoz hasonlóan elvégzett klorofill fluoreszcencia alapú levél analízis azt mutatta, hogy sem az ebben a kísérletsorozatban alkalmazott 6.9 kJ m⁻² d⁻¹ kiegészítő UV-B kezelés, sem a H₂O₂ oldattal öntözés, sem pedig a két kezelés együttes alkalmazása nem csökkentette szignifikánsan a levelek fotokémiai aktivitását (6. ábra). Az eredmények alapján egyik kezelésünk sem okozott károsodást a növények számára, sőt, kismértékű fotokémiai hozamnövekedést tapasztaltunk a kezelt levelek esetén.



6. ábra Változások a levelek fotokémiai hozamában Y(II), szabályozott nem fotokémiai kioltásában Y(NPQ) és nem szabályozott nem fotokémiai kioltásában Y(NO) a négy kezelési csoportban: kezeletlen (C), H₂O₂-kezelt (H₂O₂), UV-B-kezelt (UV-B), vagy UV-B és H₂O₂-val (UV-B + H₂O₂) kezelt. Az oszlopmagasságok és hibásávok az átlagokat és a szórásokat jelentik, n = 4. A szignifikáns ($p < 0.05$) egyfaktoros hatásokat, például az UV-B és C, illetve a H₂O₂ és C levelek átlagai közötti különbséget csillaggal jelöltük. A kétfaktoros ANOVA elemzés nem azonosított szignifikáns faktoriális hatásokat vagy interakciókat (ennek az adatai nem szerepelnek az ábrán).

5.3.1. A fenolos vegyületek változása az UV-B-hez történő alkalmazkodásban

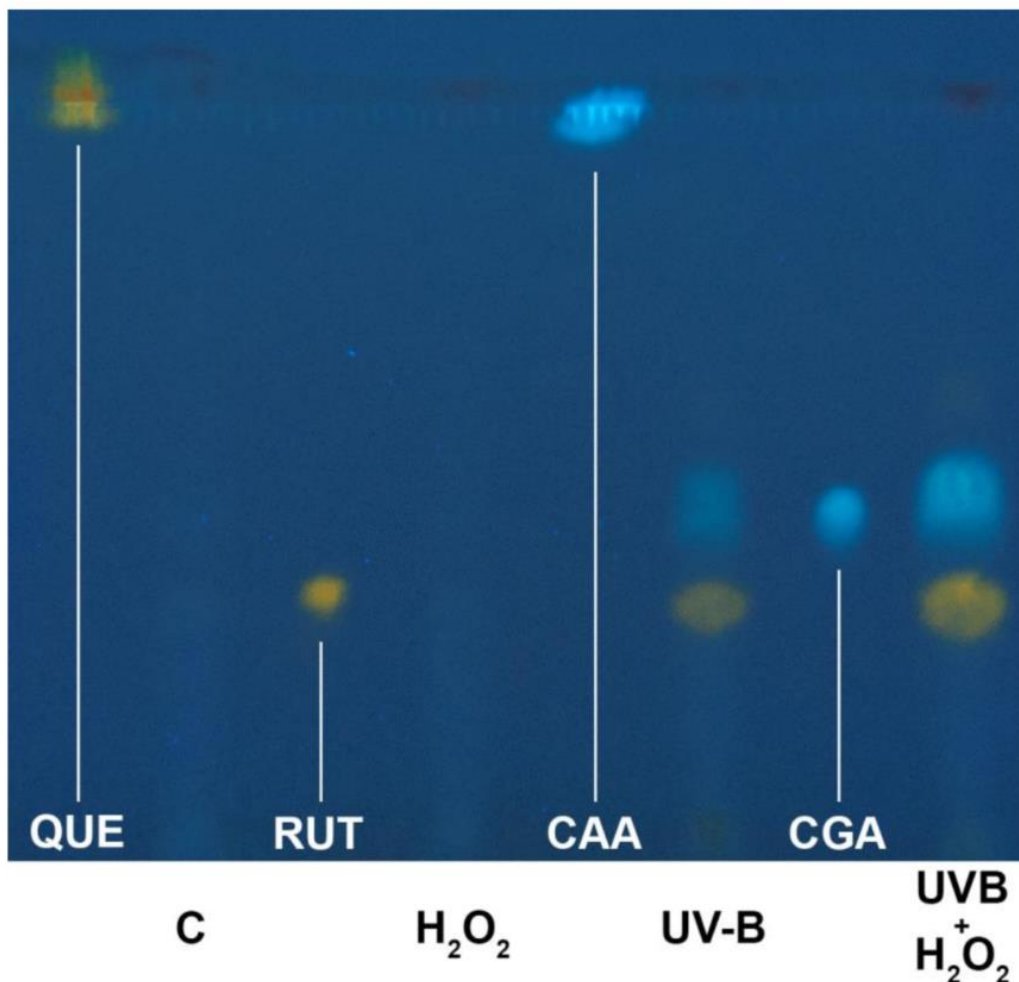
Az UV-B kezelt dohánylevelek fenoltartalmának jellemzését először a flavonoid index segítségével becsültük, mert ez a mérés noninvazív módszerként lehetővé teszi a levelek további elemzését is. Az eredményeink egy erős (120-130%-os) emelkedést mutattak az adaxiális flavonoid index esetében, mind a kontroll és UV kezelt levelekben, mind a kontroll és kettős kezelés hatására (7. ábra).



7. ábra Az adaxiális (A) és abaxiális (B) flavonoid index összehasonlítás a négy kezelési csoport leveleiben (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok magassága és a hibaszívek az átlagokat és a szórásokat jelképezik, n = 10. 100% = a kontroll levelekben mért flavonoid index átlaga. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeit az F és p értékek segítségével mutatjuk be (F_{kritikus} = 4.11).

A flavonoid indexet gyakran használják a levelek általános fenolos vegyület tartalmának jellemzésére is, bár a fenolos vegyületek közül a fenolos savaknak alacsonyabb hullámhosszon (az UV-B tartományban) található az abszorpciós maximuma, mint a flavonoidoké (az UV-A tartományban) (Csepregi és Hideg 2018), így a Dualex műszer 4.3. részben ismertetett 375 nm-es levélszöveti abszorpción alapuló működése (Goulas és mtsai. 2004) az utóbbiakat hatékonyabban detektálja. A H₂O₂ kezelés önmagában nem emelte a levelek flavonoid indexét, és nem módosította az UV-B kezelés hatását sem (7. ábra).

A fenolos vegyületek változásainak részletesebb megismerése érdekében a levélkivonatok vékonyréteg kromatográfiai (TLC) elválasztását is elvégeztük (8. ábra). Annak ellenére, hogy a kezeletlen levélminták fenolos vegyület tartalma túl alacsony volt a detektálhatóságához, az elválasztás sikeres volt a kezelési csoportok elkülönítésében. Az UV-B kezelt minták erőteljes sávokat mutatnak a CGA és a RUT futási távolságának megfelelő helyeken. A H_2O_2 kezelés önmagában nem indukált detektálható mértékű emelkedést a fenolos vegyületekben. Ez a módszer nem tette lehetővé az eredmények kvantitatív összehasonlítását, azonban eredményeink arra utalnak, hogy a két fenolos vegyület UV-B hatására történő megemelkedését a levelekben nem módosította jelentősen a H_2O_2 jelenléte, tehát a hatás egyértelműen az UV-B-nek volt tulajdonítható (8. ábra).



8. ábra A dohánylevél kivonatok és a fenolos tesztvegyületek vékonyréteg kromatográfias képe.

A quercetin (QUE), quercetin-3-*O*-rutinozid (RUT), kávéssav (CAA) és klorogénsav (CGA) tesztvegyületeket 1 mg mL^{-1} koncentrációban vittük fel a lemezre. A metanolos levél kivonatok (0.3 mg levél friss tömeg mL^{-1}) a következő kezelési csoportokból származtak: kezeletlen (C), H_2O_2 kezelt (H_2O_2), UV-B kezelt (UV-B) és UV-B és H_2O_2 kezeléseket is kapott (UV-B + H_2O_2).

A levélminták TLC használatával kapott fenolos vegyület profilját HPLC mérésekkel is alátámasztottuk (Függelék 2.). A Függelékben látható kromatogram igazolta a RUT és CGA nagymértékű UV-B indukcióját, valamint a TLC által nem detektált, de korábbi közleményekben dohánylevél komponensként említett kávésav (CAA) (Popova és mtsai. 2018) kismértékű jelenlétét is. A dohánylevelekben jelen levő összes komponens változásának kvantitatív értékelése további kutatásaink része, így az eredményei nem szerepelnek a dolgozatomban.

5.3.2. A fenolos vegyületek közvetlen antioxidáns funkciója

A levélkivonatok fenti vizsgálata alátámasztotta a flavonoid index méréseket, továbbá megmutatta, hogy nem csak a főként UV-A-t elnyelő flavonoid, hanem az UV-B-t abszorbeáló fenolos savak mennyisége is emelkedett. A TLC és HPLC eredmények alapján azonosítottuk azt a két fenolos vegyületet (a CGA és a RUT), amelyek mennyisége a legnagyobb mértékben változik az UV-B kezelés hatására (8. ábra és Függelék 2.). A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy ezen vegyületek a lehetséges közvetlen UV elnyelő szerepük mellett hogyan járulhatnak hozzá antioxidánsként az UV-B-hez történő alkalmazkodáshoz. Ehhez megvizsgáltuk a direkt (közvetlen H_2O_2 reaktivitáson alapuló) és indirekt (POD szubsztrát) antioxidáns funkcióikat.

Ahhoz, hogy egy metabolit a növényi szövetekben hatékonyan vehessen részt nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő folyamatokban, több biokémiai feltételnek kell teljesülnie. Egyrészt legyen magas H₂O₂ reaktivitása, másrészt az oxidált formái legyenek regenerálhatóak. Amennyiben az utóbbi feltétel nem teljesül, az antioxidáns funkció közben oxidált vegyület újbóli szintézise metabolikus forrásokat vonhat el a többi életfolyamattól. Az oxidált formából regenerálható nem enzimatis antioxidánsok tipikus példái a növényekben az aszkorbinsav (ASA) és a glutation (GSH) (Noctor és Foyer 1998). A különböző fenolos vegyületek nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő kapacitásáról már készült egy összehasonlító tanulmány, ami tesztvegyületek mérésével igazolta a QUE és a RUT magas H₂O₂ reaktivitását (Csepregi és Hideg 2018). Ebben a munkában azonban nem szerepelt valamennyi, a dolgozat szempontjából jelentős vegyület, ezért a mérések egy részét megismételtük és az eredményeinkhez hozzáadtuk a CGA és a GSH H₂O₂ semlegesítő

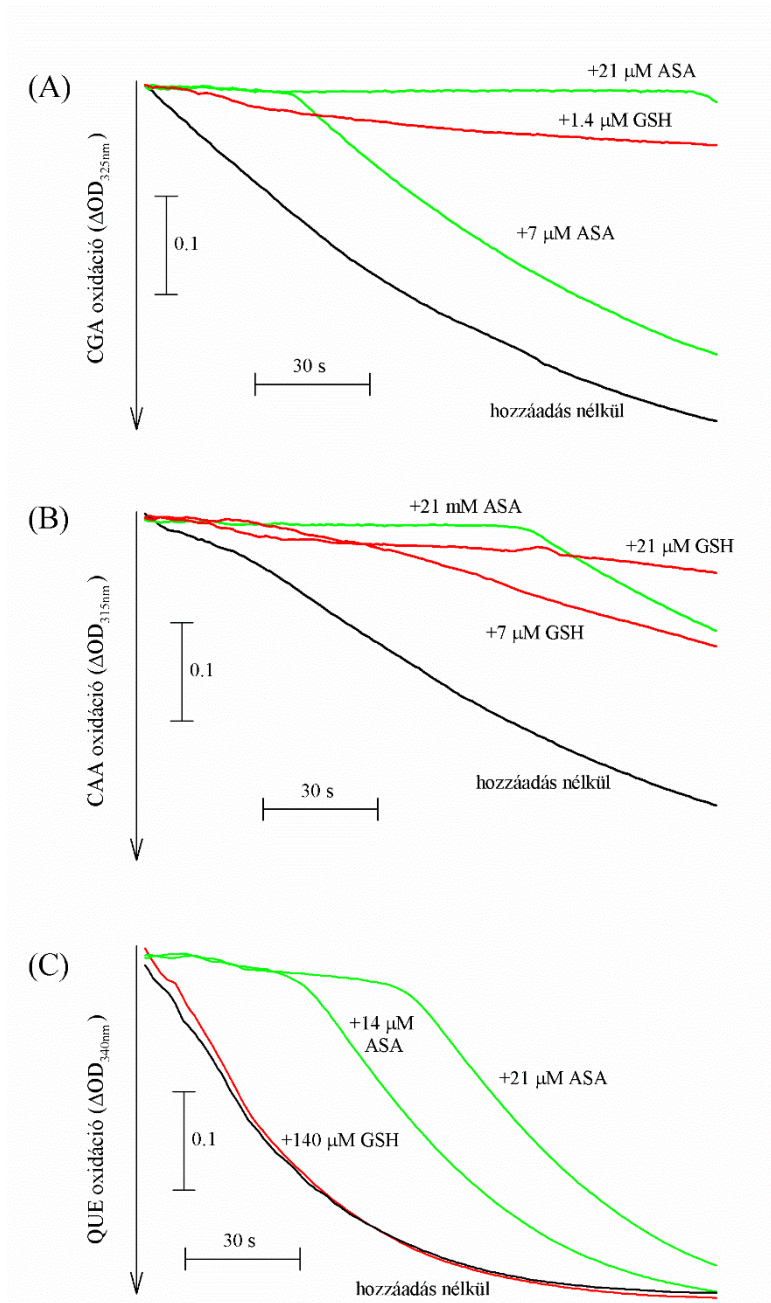
kapacitását is (3. táblázat). Az eredmények azt mutatták, hogy az UV-B kezelés hatására keletkező fenolos savak kevésbé hatékony direkt H₂O₂ antioxidánsok, mint a flavonoidok.

3. táblázat Tesztvegyületek relatív nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő képesség értékei

Tesztvegyületek	H ₂ O ₂ semlegesítő képesség (μ M aszkorbát ekvivalens egységekben)
Kávésav (CAA)	0.55
Klorogénsav (CGA)	0.69
Glutation (GSH)	0.57
Quercetin (QUE)	3.50
Quercetin-rutinozid (RUT)	1.65
Aszkorbinsav (ASC)	1.00

A továbbiakban azt tanulmányoztuk, helyreállíthatóak-e az oxidált fenolos vegyületek. A fenolos vegyületek oxidációja sokféle terméket eredményez, amelyek között fenoxil és kinon jellegű szabad gyökök is vannak. Ezek a vegyületek nem csak inaktívak mint antioxidánsok, de a gyökös termékek károsító hatása is feltételezhető (Maegawa és mtsai. 2007; Zhou és Sadik 2008; Bolton és mtsai. 2018). Izolált HRP enzimmal végzett kísérletekben azt találták, hogy az enzim H₂O₂ semlegesítő működése közben oxidált QUE-t ASA (Yamasaki és Grace 1998) vagy GSH (Metodiewa és mtsai. 1999) is helyre tudta állítani. Ezt azzal igazolták, hogy jelenléte a reakcióelegyben lassította a QUE fogyását az enzim és H₂O₂ jelenlétében. Hasonló kísérleteket végeztünk el annak megállapításra, hogy a dohánylevelekben található QUE, RUT, CAA és CGA oxidált formái helyreállíthatóak-e ASA vagy GSH segítségével. A kísérletünkben különböző mennyiségű ASA vagy GSH jelenlétében követtük a fenti vegyületek POD szubsztrátként történő oxidációját az adott vegyület abszorpcióváltozása alapján (9. ábra). Az ASA és GSH oxidált fenolos vegyületeket helyreállító hatását széles, 1.4 - 140 μ M koncentráció tartományban vizsgáltuk az oxidáció késleltetése alapján. A fotometriás mérésekhez UV-B kezelt levélmintákat használtunk. A RUT oxidációjára nem volt hatással sem az ASA sem a GSH, még az alkalmazott legmagasabb koncentrációban sem, így ezeket az eredményeket nem ábrázoltuk. A GSH a legnagyobb reaktivitást az oxidált CGA-val mutatta, ennél alacsonyabbat az oxidált CAA-val, az oxidált QUE-t pedig a legnagyobb koncentrációban sem volt képes helyreállítani. Az ASA képes volt mindhárom oxidált

szubsztrát helyreállítására, 21 μM koncentrációjának hatékonysága a következő, a GSH-val azonos sorrendet mutatott: $\text{QUE} < \text{CAA} < \text{CGA}$.



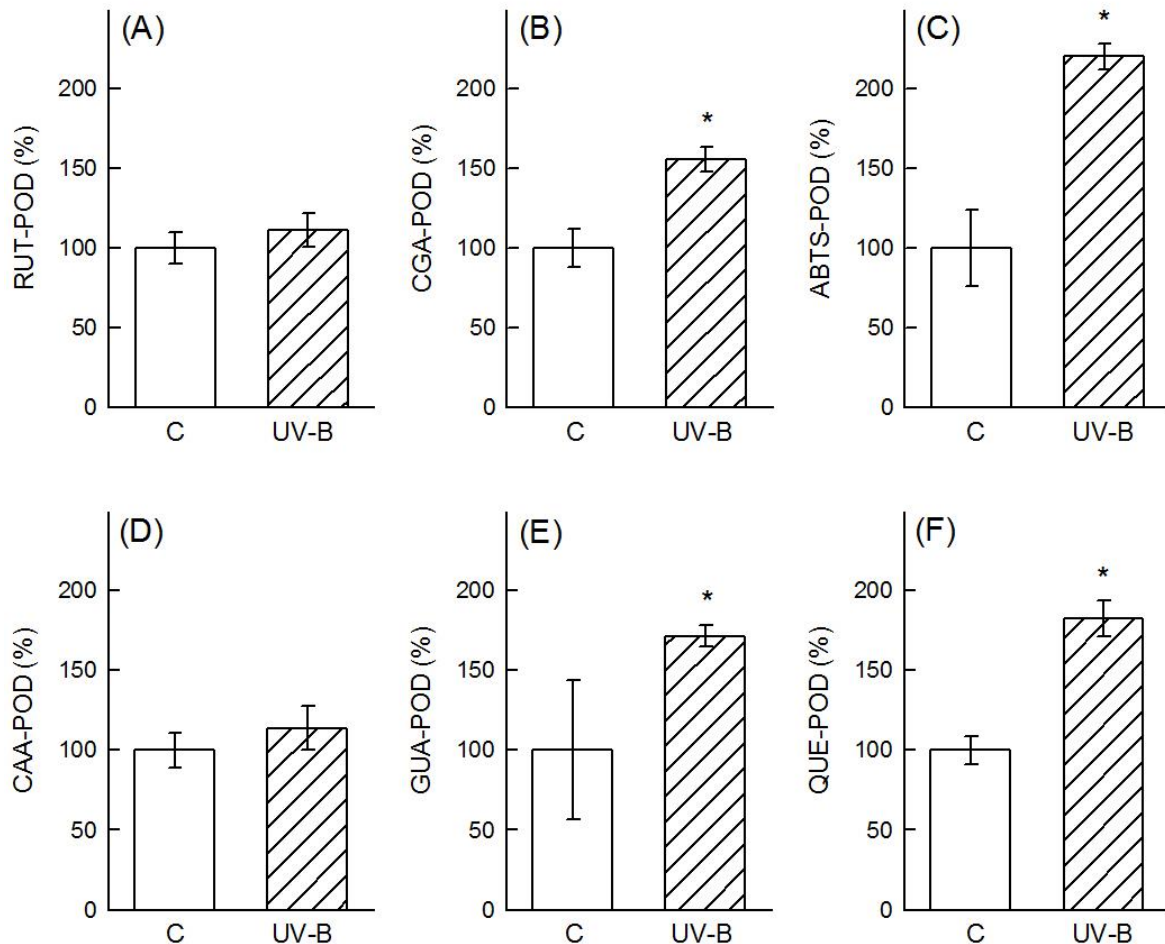
9. ábra Az aszkorbát (ASA) és glutation (GSH) hatásai az oxidált fenolos vegyületekre. (A) klorogénsav (CGA), (B) kávéssav (CAA) és (C) quercetin (QUE) fogyása POD és H_2O_2 hatására különböző, az ábrán feltüntetett ASA és GSH koncentrációk jelenlétében. A $\Delta\text{OD} = 0.1$ változásnak megfelelő koncentrációváltozások 83 μM CGA (A), 62 μM CAA (B), és 387 μM QUE (C).

A fentiek alapján összefoglalásképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy fenolos vegyület mindegyike jól reagál H_2O_2 -dal (3. táblázat), tehát a POD szubsztrát szerepük mellett lehetséges, hogy ez a direkt antioxidáns funkció a levelekben is megvalósul. Jelentős különbségek mutatkoztak azonban az oxidált formák helyreállíthatóságában. A RUT nem volt újra aktív állapotúvá redukálható sem ASA sem GSH-val, tehát amennyiben ez a vegyület a levelekben antioxidánsként működik, akkor újbóli bioszintézissel kell pótolni. Ezzel szemben az oxidált CGA-t már viszonylag kis mennyiségű ASA vagy GSH is képes volt helyreállítani. Az oxidált CAA helyreállításához több volt szükséges ezekből az antioxidánsokból, az oxidált QUE regenerálására pedig csak az ASA volt alkalmas. A fenolos vegyületek oxidációjának és regenerációjának különbségeit figyelembe fogjuk venni az UV-B válaszok alábbi tárgyalásában, mivel kulcsfontosságúak a növényi UV sugárzáshoz történő alkalmazkodási folyamatokban.

5.3.3. A fenolos POD-ok szerepe az UV-B-hez történő alkalmazkodásban

A dohánylevelek UV-B indukált fenoloid tartalom változásai alapján megvizsgáltuk a CGA és RUT lehetséges hozzájárulását az alkalmazkodás során megnövekedő enzimikus H_2O_2 semlegesítéshez. Ezen két vegyület mellett a levélminták POD aktivitásának meghatározását elsőként a két leggyakrabban használt szubsztrát, az ABTS (mesterséges szubsztrát) és a GUA (a dohányban nem jelen lévő szubsztrát) használatával végeztük el. Ezután a POD méréseket elvégeztük a dohánynövényekben leírt POD szubsztrátként is funkcionáló fenolos vegyületek használatával is. A négy további szubsztrát közül az első kettő (CGA és RUT) az 5.3.1. alfejezetben leírt tulajdonságaik és az UV-B kezelt növényekben megemelkedett mennyiségük miatt választottuk. A RUT aglikon formája, a QUE hatékony POD szubsztrát szerepét már bemutattuk (5.2.1. fejezet, Rácz és mtsai. 2018). A CAA a szakirodalom alapján a dohánynövények egyik fő fenolos vegyülete (Li és mtsai. 2003), bár a mi kísérleteinkben használt fajtában és az itt alkalmazott növénynevelési körülmények között a CGA-hoz képest sokkal kisebb mennyiségben volt jelen a levelekben. Az 5.1. fejezethez hasonlóan a POD aktivitásokra a felhasznált szubsztrát neve alapján fogunk utalni, mint például a RUT-POD utal arra a POD aktivitási értékre, melyet RUT szubsztráttal mértünk meg. Ahogy korábban megállapítottuk, az enzim aktivitás értékeket nagyban befolyásolta a használt szubsztrát. A

kezeletlen dohánylevelek POD aktivitási értékei különböző szubsztrátok használatával a következő sorrendet mutatták: RUT-POD > CGA-POD > ABTS-POD > CAA-POD > GUA-POD > QUE-POD, és a legnagyobb és a legkisebb aktivitás között közel százszoros különbség volt (adatok a 10. ábra aláírásában).



10. ábra Az UV-B indukált POD aktivitás változásának mérése különböző enzim szubsztrátokkal.

Az UV-B kezelt (UV-B) levelek adatai minden ábrarészen a kezeletlen (C) növényekben ugyanazzal szubsztráttal mért átlaghoz képest vannak megadva. Az oszlopok magassága és a hibásávok az átlagot és szórást jelölik ($n = 4$). A csillag a $p < 0.05$ mellett szignifikáns különbségeket mutatja. A 100% aktivitásnak megfelelő értékek az egyes szubsztrátokkal mérve a következők voltak: Quercetin-3-*O*-rutinozid: 88.46 U mg^{-1} protein RUT-POD (A), klorogénsav 43.51 U mg^{-1} protein CGA-POD (B), ABTS 5.97 U mg^{-1} protein ABTS-POD (C), kávésav 2.66 U mg^{-1} protein CAA-POD (D), guaiacol 1.77 U mg^{-1} protein GUA-POD (E), quercetin: 0.93 U mg^{-1} protein QUE-POD (F),

Az UV-B kezelés hatása nem volt detektálható mindegyik POD szubsztráttal, a CAA-POD és a RUT-POD aktivitások nem mutattak szignifikáns változást (10. ábra). Az 5.1. fejezetben bemutatottakat megerősítve, az ABTS-POD, GUA-POD és QUE-POD is megemelkedett aktivitást mutatott az UV-B kezelés hatására a kontrollokhoz képest. A

kromatográfiás eredmények alapján a kísérletbe bevont CGA is olyan szubsztrátnak bizonyult, ami az UV-B kezelésre érzékenyen reagáló CGA-POD aktivitást támogatja.

A kísérleteinkben felhasznált két flavonoidról (RUT, QUE) már leírták, hogy elektron donorként viselkednek egy specifikus POD formával a HRP-vel szemben (Takahama és mtsai. 1997, Yamasaki és mtsai. 1997). Eredményeink bizonyították, hogy ezek a vegyületek képesek a dohánylevelekben jelen lévő POD-okkal is együttműködni, annak ellenére, hogy a dohányenzim biokémiai tulajdonságai különböznek a HRP tulajdonságaitól (Gazaryan és mtsai. 1996). A kezeletlen levelekben különböző POD szubsztrátokkal mért jelentősen eltérő aktivitás értékek magyarázhatóak lehetnének egy homogén, széles szubsztrát specificitású, de az egyes szubsztrátokat különböző mértékben hasznosító enzimcsoport feltételezésével. Az UV-B által kiváltott POD válaszok heterogenitása azonban arra utal, hogy léteznek különböző, az UV-B-hez történő alkalmazkodásban különböző szerepet játszó POD izoformák. Ez a megfigyelés, a korábban bemutatott natív gél elektroforézis vizsgálatok eredményeivel (5.3.1. fejezet, RácZ és mtsai. 2018) együtt jelentősen megváltoztatja a POD enzimekről általánosan elfogadott képet. A 10. ábrán bemutatottak közül négy, a dohánylevélben természetesen előforduló fenolos vegyület (CAA, CGA, RUT, QUE) segítségével tárgyaljuk a lehetséges szerepek különbségeit. Bár mind oxidálhatóak POD szubsztrátként, de közülük csak kettő támogatja a kiegészítő UV-B kezeléshez történő enzimatis antioxiáns alkalmazkodást (CGA, QUE). Érdekes módon, ezek csak részben fednek át a kezelés hatására felhalmozódó vegyületekkel (CGA, RUT). A következőkben ezt a látszólagos ellentmondást kíséreljük meg feloldani, a következőket feltételezve: (1) a fenolos vegyületek nemcsak UV-szűrő vegyületekként, hanem antioxiánsokként is megvédik a leveleket az UV-B sugárzástól, (2) a POD működése közben vagy a H₂O₂-al közvetlen reakcióba lépve oxidált fenolos vegyületek regenerálhatóak, és (3) az egyes vegyületek védelmi funkciókhoz való hozzárendelése nemcsak antioxiáns kapacitásuktól függ, hanem az oxidált formák regenerációjának hatékonyságától is.

Elsőként az UV-kezelt levélmintákból nagyobb mennyiségben megjelenő, vékonyréteg kromatográfiával is kimutatott két fenolos vegyület (CGA, RUT) lehetséges szerepeit mutatjuk be. Mindkét vegyület hatékony POD szubsztrátnak bizonyult, még az UV-B hiányában is, a kezeletlen levelekben 15 – 90-szer magasabb POD aktivitás értékeket mértünk használatukkal a többi fenolos vegyülethez (CAA, QUE) képest. A fenolos védelmi válaszok összetettséget bizonyítja az az eredményünk is, hogy az UV-B

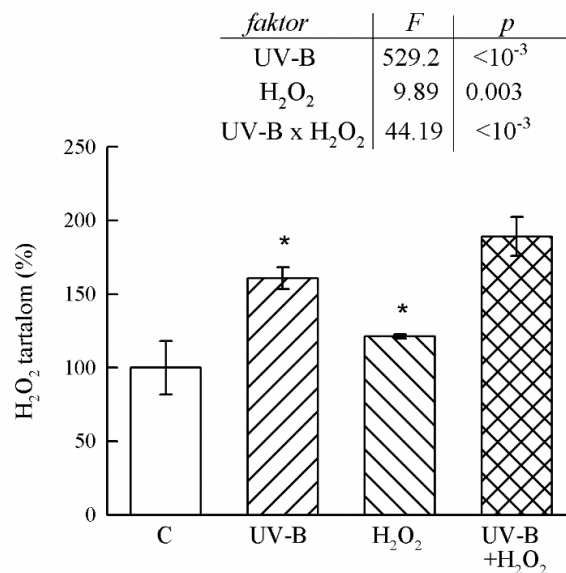
indukálta POD izoformák által felhasznált fenolos vegyületek (CGA, QUE) nem egyeznek meg teljesen azokkal a vegyületekkel, melyek az UV-B kezelt levelekben akumulálódtak (CGA, RUT). Viszont érdekes, hogy a CGA-POD közel 50%-al magasabb aktivitást mutatott az UV-B kezelt levelekben, mint a kontrollokban, a RUT-POD esetében viszont nem volt szignifikáns változás. Másrészt, a RUT egy erős direkt H_2O_2 semlegesítő antioxidáns, 1.65-ször magasabb reaktivitással rendelkezik, mint az ASA (3. táblázat). Következésképpen, a levelek UV-B hatására jelentősen megemelkedő RUT tartalma várhatóan nem a vegyület POD enzimhez történő elektron donor funkciójában, hanem a direkt antioxidánsként hasznosulhat. A RUT-hoz képest a CGA gyengébb nem enzimatis antioxiáns (3. táblázat), amellet, hogy hatékony POD szubsztrát (10. ábra). A POD működés közben oxidált CGA pedig hatékonyan regenerálódik ASA vagy GSH által, amit az oxidált RUT esetében nem figyeltünk meg (9. ábra). Ezek az eltérések magyarázhatják azt a megfigyelésünket, hogy a CGA-POD aktivitás növekedése része az UV válaszoknak, a RUT-POD pedig nem (10. ábra). A CGA bioszintézisét az UV mellett számos más stressz faktor is serkenti (Grace és Logan 2000), és az eredményeink alapján feltételezhető, hogy más körülmények között is fontos szerepe lehet az oxidatív károsodás POD szubsztrátként történő mérséklésében.

A másik két fenolos levélkomponens, a CAA és a QUE szerepe a fentiekől eltérő lehet. Egyrészt ezek a CGA-hoz és a RUT-hoz képest sokkal kisebb mennyiségben voltak jelen a levelekben, másrészt a mennyiségüket nem befolyásolta jelentősen az UV-B kezelés (8. ábra és Függelék 2.). A CAA relatíve gyenge direkt antioxiáns (3. táblázat) és a kezeletlen levelekben viszonylag alacsony CAA-POD aktivitás (a CGA-POD 6%-a) sem változott szignifikánsan az UV-B besugárzás hatására. Ennek alapján a CAA szerepe az UV válaszokban elhanyagolhatónak tűnik. Annak ellenére, hogy a QUE aglikon flavonoidként sokkal kisebb mennyiségben van jelen a levelekben, mint a glikolizált formái, mint például a RUT (Wollenweber és Dietz 1981), szerepe lehet az UV-B válaszban. Az alacsony QUE-POD aktivitást (kb. 90-szer kisebb, mint a RUT-POD és 45-ször kisebb, mint a CGA-POD a kezeletlen levelekben) magyarázhatja az, hogy kevés olyan POD izoforma van, amely preferálna egy kis mennyiségben hozzáférhető szubsztrátot. Ez az alacsony QUE-POD aktivitás azonban UV-B hatására közel megduplázódik, ami nagyobb mértékű változás, mint a CGA-POD esetében megfigyelt (10. ábra). Másrészt a QUE egy nagyon hatékony direkt H_2O_2 antioxiáns, 3.5-szer magasabb reaktivitással, mint az ASA (3. táblázat). Ugyanakkor a QUE oxidált formájának regenerációja a legkevésbé „éri meg” a növénynek, mivel kísérletünk alapján sokkal több

ASA szükséges hozzá, mint a CGA vagy a CAA esetében, a GSH pedig nem képes a regenerációjára (9. ábra). Ez utóbbi tulajdonsága arra utal, hogy az QUE inkább ASA-reaktív fenoxil gyökként van jelen a levélben, mint GSH-reaktív szemikínoként, hasonlóan az állati sejtekben azonosított formához (Metodiewa és mtsai. 1999). Az egy molekula QUE regeneráció CGA-éhoz képest nagyobb metabolikus igényét a flavonoid sokkal kisebb mennyiségével együtt értékelve nem kizárható, hogy a QUE mint a RUT bioszintézis kiváló antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező köztes terméke hozzájárulhat a levelek UV-B tűréséhez.

5.4. Mi váltja ki az UV-B-hez történő alkalmazkodást elősegítő antioxidáns válaszokat?

Bár az UV-B-re adott antioxidáns válaszok több ponton hasonlítanak más abiotikus stressz hatásokra adott válaszokra (Jansen és mtsai. 2019), előbbinek azonban vannak egyedi sajátosságai is. Ezt bizonyítják a fenolos vegyületek mennyiségében és a fenolos POD enzimek aktivációjában az UV-B fénynek és a H₂O₂ kezelésnek kitett növényekben megtalálható különbségek. Bár mindkét kezelés megnövelte a levelek H₂O₂ tartalmát (11. ábra), a továbbiakban bemutatott eredmények a különböző jelátviteli utak létezését támasztják alá.



11.ábra A levelek H₂O₂ tartalmának összehasonlítása a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok

magassága és a hibaszávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, $n = 10$. 100% levél H_2O_2 tartalom = 21.49 $\mu M \text{ mg}^{-1}$ levél frisstömeg. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeinek F és p értékeit mutatjuk be.

A H_2O_2 kezelés önmagában nem emelte meg szignifikánsan a levelek flavonoid index értékét, és nem befolyásolta az UV-B kezelésre adott növekedés mértékét sem (7. ábra). Ezzel összhangban, a kromatográfiai módszerek sem azonosítottak a H_2O_2 kezelés hatására bekövetkező jelentős növekedést a levélkivonatokban (8. ábra).

A II. kísérleti elrendezésben leírt mindkét kezelés szignifikánsan megemelte a levelek H_2O_2 tartalmát, a hatásaik pedig interaktívak voltak, erősebb pozitív hatással voltak egymás jelenlétében (11. ábra). Levelek UV-indukálta H_2O_2 tartalom emelkedését már leírták olyan növényekben, ahol az alkalmazott magas UV dózis erősen csökkentette a levelek fotoszintézisét (Hideg és mtsai. 2013), de az UV-hez alkalmazkodott, megtartott fotokémiai aktivitású növényekben eddig még nem.

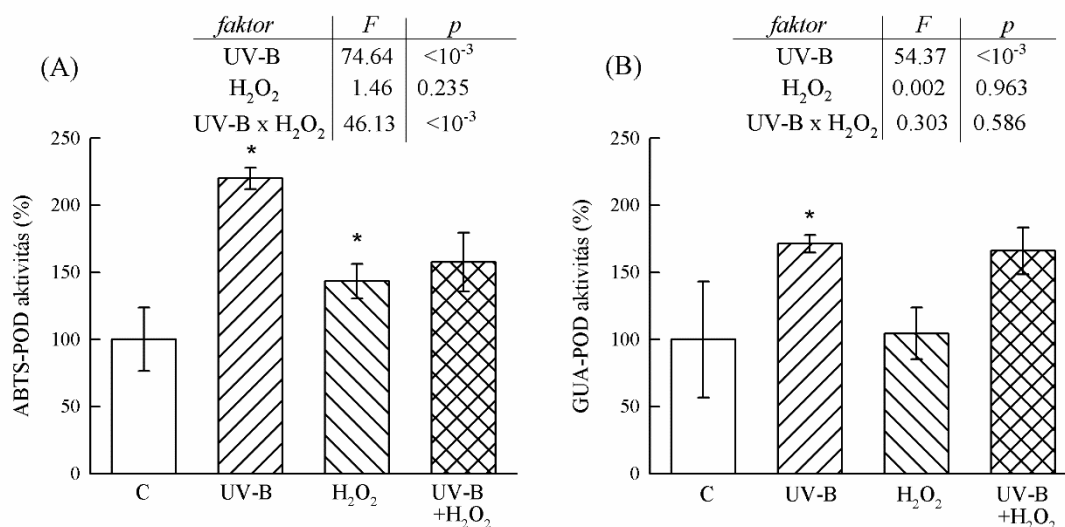
A H_2O_2 egy jól ismert másodlagos hírvivő molekula (Petrov és Van Breusegem 2012) és többféle környezeti hatás esetében feltételezett, hogy ennek a ROS-nak az alacsony szintje vesz részt a stresszválaszok kiváltásában. Az, hogy az UV-toleranciát kialakító antioxidáns válaszokat (i) az UV-B közvetlenül, az UVR8 fotoreceptoron keresztül (Brown és mtsai. 2005) vagy (ii) az UV-B által indukált megemelkedett H_2O_2 szint útján, esetleg (iii) a két jel kombinációjával váltja ki, még mindig nyitott kérdés. Az első modellt az igazolná, ha az UVR8 fotoreceptor mutánsokban az UV-B kezelés nem váltana ki antioxidáns válaszokat, ilyen különbséget azonban egyelőre nem azonosítottak. Annak a módja, hogyan növeli meg a levelekben a H_2O_2 mennyiségét a H_2O_2 talajba juttatása, egyelőre nem ismert. A H_2O_2 az egyetlen membránokon is átjutni képes ROS (Bienert és mtsai. 2006, Vestergaard és mtsai. 2012), bár a hosszú távú, gyökerektől levélsejtekig jutó közvetlen transzportjánál valószínűbb a többféle reakció együttese, pl. az aquaporinok által elősegített diffúzió (Bienert és Bienert 2017) és a NADPH oxidáz aktiváció általi szuperoxid gyökkeltés (Mittler 2002) részvételével. Bár az UV-B és a közvetlen H_2O_2 kezelés által kiváltott H_2O_2 keletkezési helyéről nincs információnk, a H_2O_2 sejtek közötti diffúziója miatt ennek feltehetőleg kevésbé van jelentősége, mint más ROS molekulák esetében.

Hasonlóan öntözéssel, bár más koncentrációkkal végzett exogén H_2O_2 kezelés Wan és Liu (2008) kísérleteiben szintén növelte rizs levelek H_2O_2 tartalmát. Azt tapasztalták, hogy 0.6-15 mM H_2O_2 gyökéren keresztüli alkalmazása 50-200%-os növekedést eredményezett rizslevelek H_2O_2 tartalmában, ami oxidatív membránkárosodást, a fotoszintetikus aktivitás

csökkenését és az APX aktivitás csökkenését okozta. A kísérletünkben alkalmazott alacsonyabb H₂O₂ kezelés eltérő válaszokat okozott. Az alacsonyabb koncentrációjú (0.1 mM) H₂O₂ oldat talajba juttatása kb. 20%-os emelkedést okozott a dohánylevelek H₂O₂ tartalmában (11. ábra), de nem okozott semmilyen veszteséget a fotokémiai hozamban, a levelek tehát képesek voltak alkalmazkodni mind az UV-B, mind pedig az exogén H₂O₂ kezeléshez, sőt a két kezelés együttes alkalmazásához is (6. ábra). A továbbiakban megvizsgáltuk, hogyan hatottak ezek a kezelések a levelekben a H₂O₂ mennyiségét befolyásoló antioxidánsok aktivitására illetve mennyiségére.

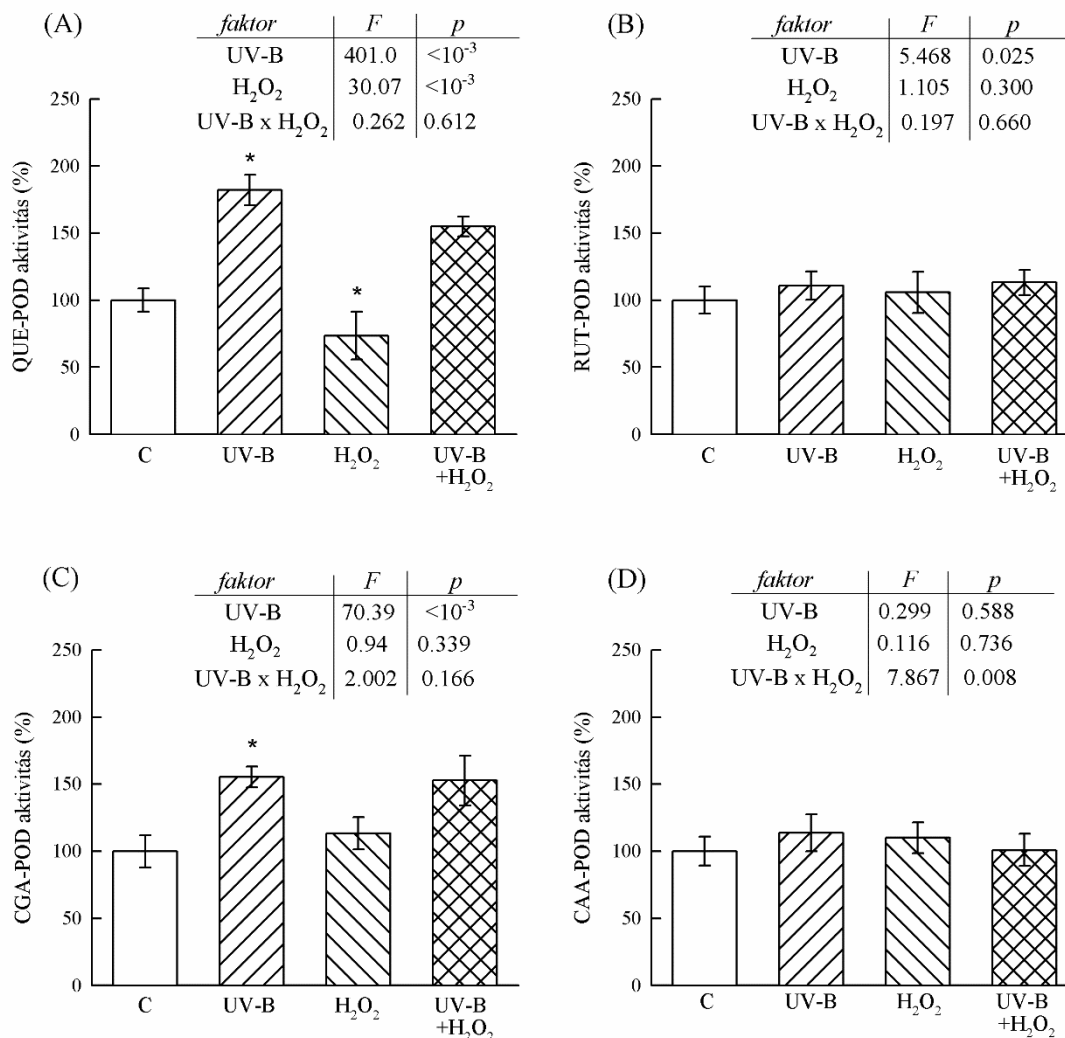
5.5. Az UV-B besugárzás és a H₂O₂ kezelés különböző antioxidáns válaszokat vált ki

A két, dohánylevelekben nem található szubsztráttal (ABTS és GUA) végzett POD mérések közül csak az ABTS-POD aktivitása emelkedett meg H₂O₂ kezelésre (12. ábra). Ez megerősítette azt a korábbi eredményt, hogy az ABTS, mint szintetikus donor más levél POD enzimeket ér el, mint a természetes vegyületek.



12. ábra A POD enzim aktivitásának összehasonlítás ABTS (A) és GUA (B) szubsztrát használatával a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok magassága és a hibásávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, n = 10. 100% = a kontroll levelekben mért enzim aktivitások átlaga. A 100%-os POD aktivitási értékek U mg⁻¹ proteinben megadva a következők voltak: 5.97 ABTS-el, 1.77 guaiacol-al (GUA) mérve. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeit az F és p érték segítségével mutatjuk be (F_{kritikus} = 4.11).

A levelek fenolos vegyületeivel mint POD szubsztrátokkal végzett kísérletek is a kétféle kezelés különböző hatását igazolták (13. ábra). Az UV-B által megnövelt CGA-POD aktivitást nem befolyásolta a H₂O₂ kezelés, ami önmagában nem váltott ki CGA-POD választ. Az UV-B kezelésre nem reagáló CAA-POD és RUT-POD a H₂O₂ kezelésre sem változott. A GUA-POD és a CGA-POD emelkedett aktivitást mutatott az UV-B hatására, a H₂O₂ kezelés alkalmazásától függetlenül, ami önmagában nem volt szignifikáns hatású. Az egyetlen meglepő kivételt a QUE-POD válaszok elemzése hozta: QUE-POD aktivitási értékekre az UV-B pozitív, míg a H₂O₂ negatív hatással volt (13. ábra).

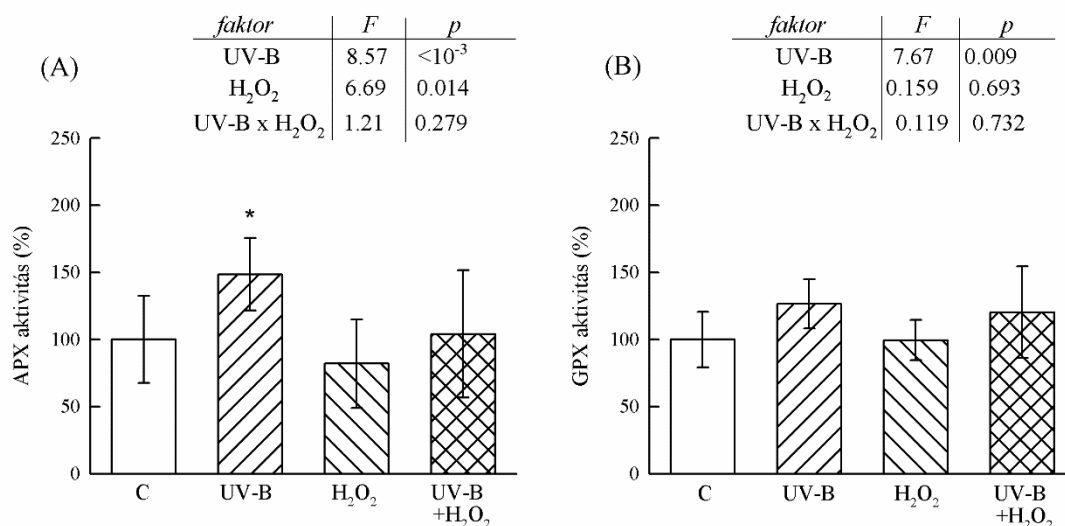


13. ábra A POD enzim aktivitásának összehasonlítás quercetin (A), quercetin-rutinozid (B), klorogénsav (C) és kávéssav (D) szubsztrát használatával a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok magassága és a hibásávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, n = 10. 100% = a kontroll levelekben mért enzim aktivitások átlaga. A 100%-os POD aktivitási értékek U mg⁻¹ proteinben megadva a következők voltak: 0.93 quercetinnel (QUE),

88.46 quercetin-rutinoziddal (RUT), 43.51 klorogénsavval (CGA) és 2.66 kávéssavval (CAA) mérve. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeit az F és p érték segítségével mutatjuk be ($F_{\text{kritikus}} = 4.11$).

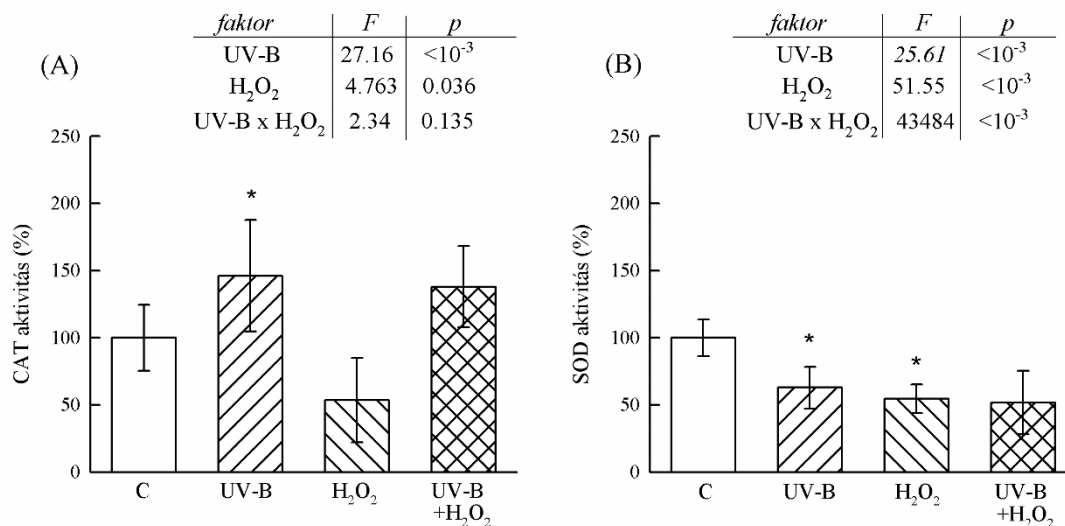
A további összehasonlítást a POD-tól különböző, de a levelek H_2O_2 szintjét befolyásoló enzimek aktivitásainak elemzésével folytattuk.

Az APX aktivitás közel 50 %-kal megemelkedett az UV-B besugárzott levelekben, de változatlan maradt a H_2O_2 kezelés hatására, mind az UV-B jelenlétében, mind a hiányában (14. ábra). A GPX aktivitás méréséhez először H_2O_2 -t használtunk szubsztrátként és csak egy nem szignifikáns, marginális ($p=0.084$) emelkedést tapasztaltunk az UV-B kezelés hatására, míg a H_2O_2 kezelés hatástalan volt (14. ábra). A mérést megismételtük szerves hidroperoxiddal, mint GPX szubsztrát, de nem tapasztaltunk eltérést az aktivitások között (ábrán nem szereplő adatok). Eredményeink nem támasztják alá az *Arabidopsis*-ban leírt UV-B szabályozta GPX expresszió növekedéssel (Ulm és mtsai. 2004), amit a két kísérletben alkalmazott UV-B dózisok különbsége, valamint a genomikai és enzimatisz vizsgálatok eltérő érzékenysége is indokolhat.



14. ábra A levelek aszkorbát peroxidáz aktivitásának (A), glutation peroxidáz aktivitásának (B) összehasonlítása a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H_2O_2 kezelt, H_2O_2 ; UV-B és H_2O_2 kezelt; UV-B + H_2O_2). Az oszlopok magassága és a hibasávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, $n = 10$. 100% APX aktivitás = $347.29 \text{ mU mg}^{-1}$ protein, 100% GPX aktivitás = 66.70 mU mg^{-1} protein. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeinek F és p értékeit mutatjuk be.

Az két kezelés ellentétes hatással volt a CAT aktivitásra: az UV-B megemelte (kb. 47%-kal), míg a H₂O₂ lecsökkentette (kb. 87%-kal) (15. ábra). Annak ellenére, hogy a H₂O₂ egyfaktoros tényezőként csökkentette az aktivitást, az UV-B jelenlétében nem mutatkozott meg ez a negatív hatás. A CAT aktivitás sokkal kisebb mértékű volt, mint az APX vagy a POD aktivitások, ami valószínűleg a viszonylag alacsony PAR mellett nőtt levelek alacsony fotorespirációjának tudható be. Az egyetlen közös válasz a két különböző kezelésre a SOD enzim aktivitásának csökkenése volt, tehát mind az UV-B megvilágítás, mind pedig a H₂O₂ öntözés csökkentette a szuperoxid gyökök enzimatis H₂O₂-dá történő átalakulását (15. ábra). A levélminták SOD aktivitása lecsökkent mind a UV-B-nek kitett, mind a H₂O₂ kezelt növényeknél és a két tényező erősítette egymás negatív hatását.

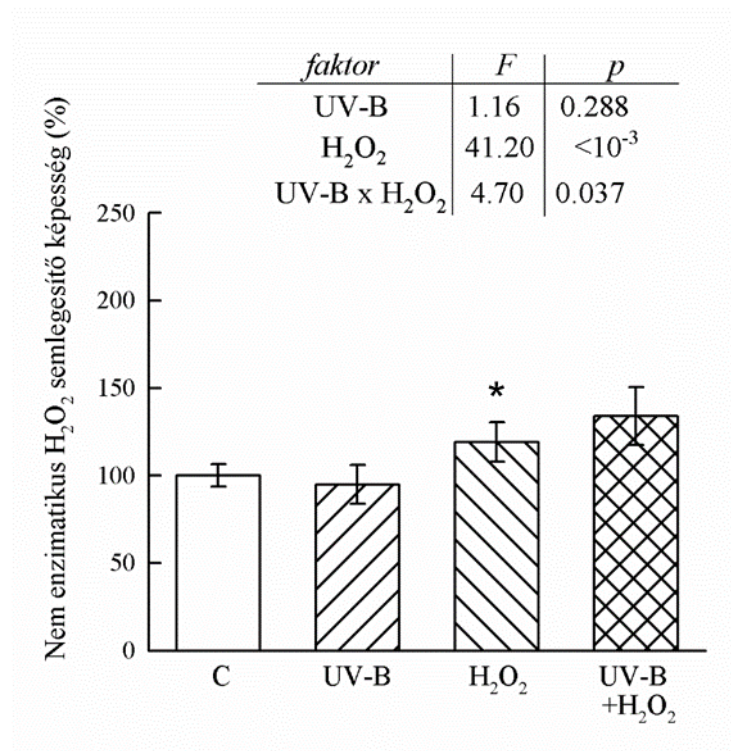


15. ábra A levelek kataláz (A) és szuperoxid dizmutáz aktivitásának (B) összehasonlítása a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok magassága és a hibasávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, n = 10. 100% CAT aktivitás = 20.61 mU mg⁻¹ protein, SOD aktivitás = 257.30 U mg⁻¹ protein. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeinek F és p értékeit mutatjuk be.

A fenti kísérletek megmutatták, hogy az UV-B besugárzás szelektíven módosítja az antioxidáns enzimek részét. Tanulmányok igazolták már az enzimatis válaszok UV-B indukálta aktivitásbeli változásait, kutatócsoportunk pedig már leírta, hogy a POD aktivitás SOD-hoz képest erőteljesebb növekedése, az UV-B akklimációs folyamat egyik sajátos jellemzője (Czégény és mtsai. 2016). Ennek a válasznak a magas levél H₂O₂ tartalom elkerülése a célja, megelőzve az UV-B hatására bekövetkező hidroxil gyök

képződést (Czégény és mtsai. 2014). Jelen dolgozat eredményei alátámasztják ezt a modellt, és új eredményként azt is mutatják, hogy a sikeres akklimáció (a levél fotokémiai hozamának elvesztésének elkerülése) a SOD aktivitás csökkenésével és az APX, a POD és a CAT aktivitások növekedésével kombinálva is megvalósulhat.

Az enzimatikus antioxidánsok mellett a levelek ROS szintjét nem enzimatikus antioxidánsok direkt ROS kioltása is szabályozhatja.



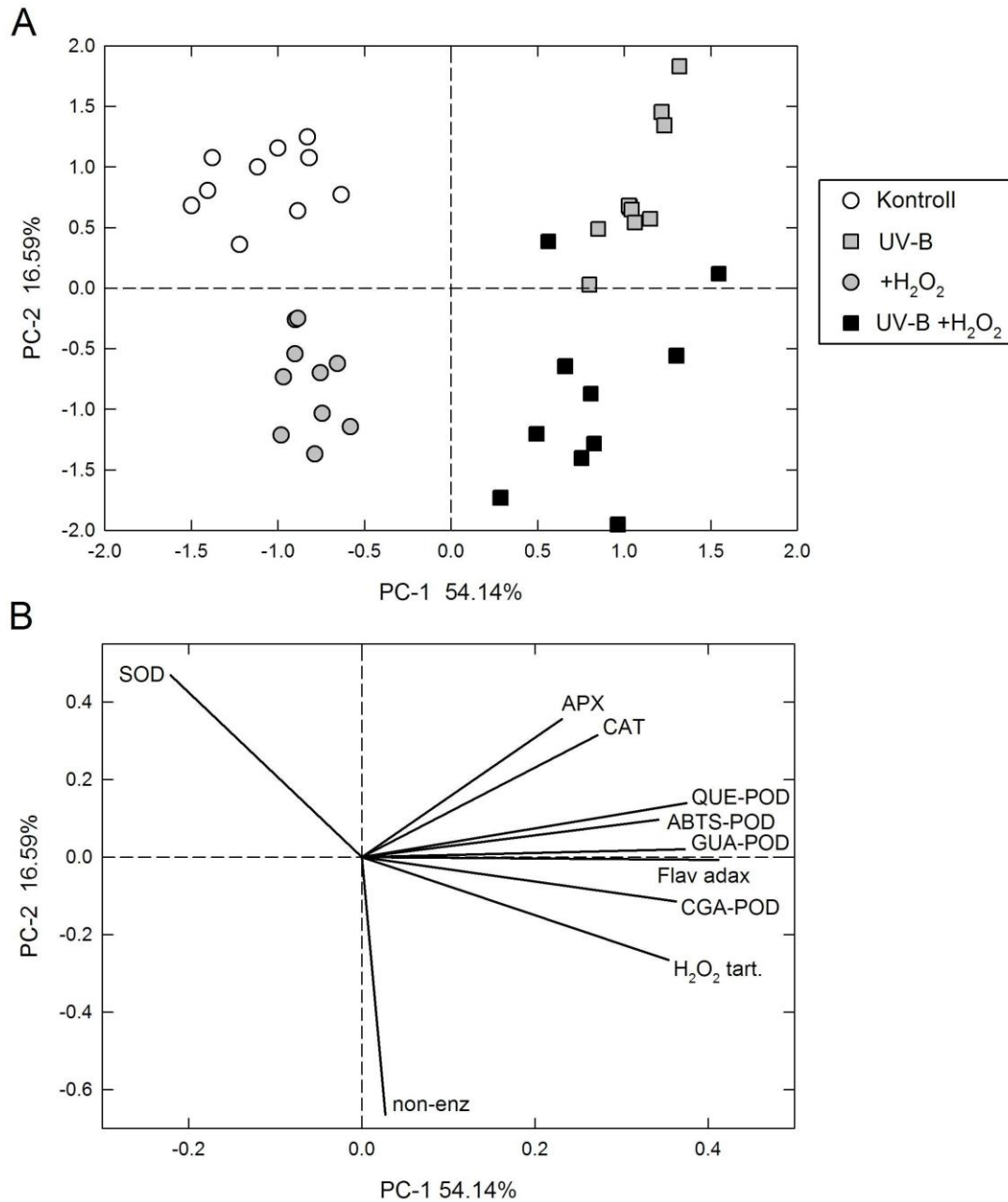
16. ábra A levelek nem enzimatikus H₂O₂ semlegesítő képességének összehasonlítása a négy kezelési csoportban (kezeletlen kontroll, C; UV-B kezelt, UV-B; H₂O₂ kezelt, H₂O₂; UV-B és H₂O₂ kezelt; UV-B + H₂O₂). Az oszlopok magassága és a hibásávok az átlagokat és a szórásokat jelképezik, n = 10. 100% nem enzimatikus H₂O₂ semlegesítő képesség = 1.55 μM ASA ekvivalens mg⁻¹ levél frisstömeg. A szignifikáns egyfaktoros hatásokat csillaggal jelöltük. A kétutas ANOVA eredményeinek F és p értékeit mutatjuk be.

A nem enzimatikus H₂O₂ semlegesítő képesség mérési eredményei azt mutatták, hogy az UV-B kezelés nem befolyásolta ezeket, a H₂O₂ kezelés pedig kis mértékben aktiválta. A nem-enzimatikus H₂O₂ semlegesítő kapacitást kb. 20 %-kal növelte meg az az exogén H₂O₂ kezelés, míg az UV-B erre nem volt hatással (16. ábra). Az UV-B azonban befolyásolta a H₂O₂ kezelés hatását, ami nagyobb emelkedést (kb. 35%) váltott ki az UV-B jelenlétében mint önmagában. (16. ábra).

Eredményeink alapján, az UV-akklímáció elsősorban a csökkent SOD és a megnövekedett POD aktivitások révén valósul meg; utóbbi olyan izoformákat tartalmaz, amelyek CGA-t és kisebb mértékben QUE-t használnak elektrondonorként. Bár a megnövekedett RUT-készlet jelzi a hatékonyabb, nem enzimátikus H₂O₂ semlegesítés lehetőségét, az UV kezelt levelekben mégsem történt jelentős változás ezen a téren, ami azt jelzi, hogy a RUT hozzájárulása csekély volt ezen védelmi úthoz.

A fenti kísérletek azt bizonyították, hogy UV-B és a H₂O₂ kezelések az antioxidáns hálózat különböző részeit aktiválták. Mivel az exogén H₂O₂ a nem enzimátikus antioxidáns kapacitás növekedése nem járt együtt a fenoltartalom szignifikáns növekedésével, a levelek fenolos vegyületeinek a közvetlen H₂O₂ semlegesítésben való részvétele ezekben a levelekben valószínűleg csekély volt, és a megfigyelt választ más H₂O₂-reaktív metabolitok szintjének növekedése okozta.

Az UV-B és a H₂O₂ kezelt levelek antioxidáns válaszainak különbségét a 17. ábrán bemutatott főkomponens analízis foglalja össze. A 17.A. ábra azt mutatja, hogy a négy kezelési csoportunkhoz tartozó pontok jól elkülönültek. A 17. ábra azt mutatja, hogy az adataink kovarianciamátrixának főkomponensei milyen mértékben magyarázzák a teljes szórás. A különböző paraméterek vektorai azonos irányba mutatnak, kivéve a SOD és a nem enzimátikus H₂O₂ semlegesítő képesség vektorát. A többségük az UV-B kezelést reprezentáló jobb felső kvadrátba mutat, míg a SOD ellentétes irányultsága az UV-B kezelés hatására bekövetkező aktivitáscsökkenéssel van összhangban. A nem enzimátikus kioltás vektora pedig szinte rásimul a második magyarázó tengelyünkre, ami azt jelzi, hogy az UV-B nem volt rá hatással.



17. ábra Főkomponens analízis eredményei a négy kezelési csoport paramétereinek összehasonlításával. (A) adatpontok, (B) a különböző paraméterek projekciói. SOD: szuperoxid-dizmutáz; APX: aszkorbát-peroxidáz; CAT: kataláz; QUE-POD, ABTS-POD, GUA-POD, CGA-POD: quercetin, ABTS, guaiacol és klorogénsav szubsztráttal peroxidáz; Flav adax: adaxiális felavonoid index; H₂O₂ tart.: H₂O₂ tartalom; non-enz: nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő kapacitás.

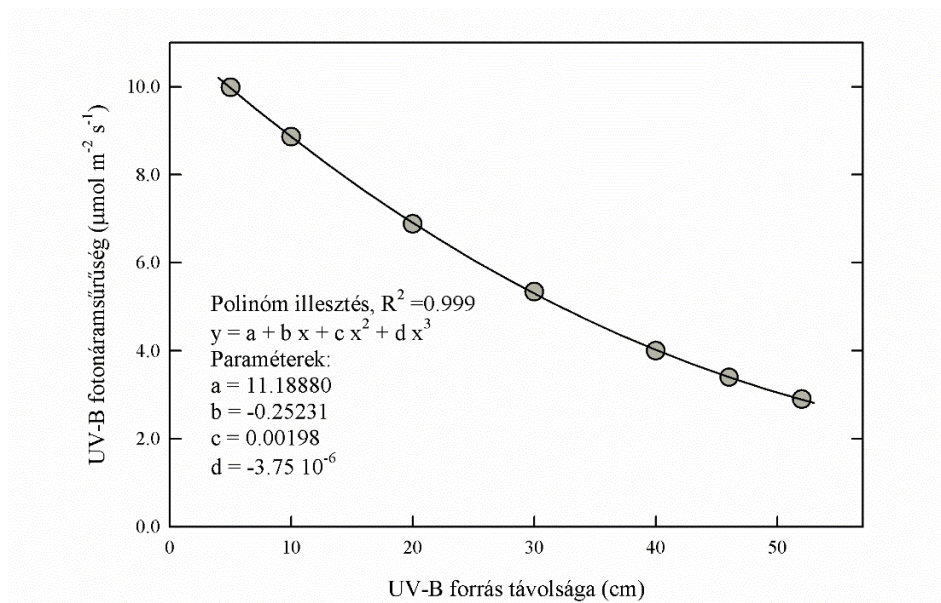
A fenti kísérletek eredményei azt jelzik, hogy a levelek UV-B sugárzáshoz történő antioxidáns szintű alkalmazkodása nem az UV-B keltette H₂O₂ hatására következik be. Az UVR8 fotoreceptoron keresztül megvalósuló antioxidáns enzim választ bizonyító irodalmi adat egyelőre nem ismert, ennek bizonyítására fotoreceptor mutánsok antioxidáns

válaszainak vizsgálata, illetve monokromatikus, az UVR8 fotoreceptort szelektíven gerjesztő UV-B sugárforrás (pl. 280-300 nm UV-B LED) lesz majd alkalmas.

A közelmúltban felvetődött egy az UVR8-tól független, 311 nm körüli abszorpciós maximummal rendelkező UV-B sugárzásra reagáló ANAC13 elnevezésű transzkripciós faktorok létezésének lehetősége is (O'Hara és mtsai. 2019). Mivel az ilyen emissziós maximumú közel monokromatikus UV-B forrás számunkra is elérhető volt, megvizsgáltuk a 311 nm UV-B szelektív hatásait, és ezzel az ANAC13 lehetséges szerepét korábban megfigyelt szélessávú, a 311 nm-es UV-B-t is tartalmazó megvilágításra adott válaszokban.

5.6. A monokromatikus (311 nm-es) UV sugárzás hatásainak vizsgálata

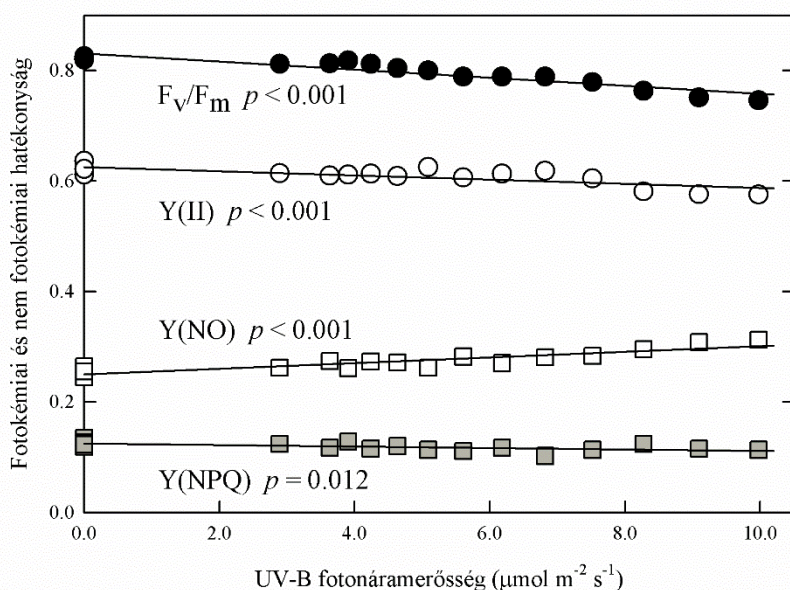
Az UV-B-hez történő alkalmazkodás komplex folyamat, különböző jelátviteli, védelmi és kijavítási folyamatok együttese, amit a természetben a napfény más hullámhosszai mellett egyéb környezeti tényezők is módosítanak (Jansen és mtsai. 2019). A 311 nm UV sugárzás hatásainak vizsgálatához egy különleges kísérleti elrendezést alkalmaztunk (III. kísérleti elrendezés 4.1. fejezet), ami lehetővé tette, hogy a növénynevelő kamrában minden növény eltérő UV-B dózisnak legyen kitéve, a többi tényező (PAR, hőmérséklet és páratartalom) azonosságá mellett. Ez az UV-B gradiens lehetővé tette a különböző dózisok hatásainak összehasonlítását, $2.9\text{--}9.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ közötti monokromatikus fotonáramsűrűsége mellett (18. ábra). Összehasonlításképpen, a dolgozatban bemutatott szélessávú UV-B kezelések fotonáramsűrűsége $5.5\text{--}6.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt.



18. ábra A III. kísérleti elrendezés során használt keskenysávú UV-B forrás fotonáramlásának távolságfüggése.

A pontok a mért adatokat jelzik, az egyenes pedig egy polinóm illesztés eredményét mutatja, amit a kezelés során az egyes növényeket érő 311 nm fotonáramlás meghatározásához használtunk.

Az alkalmazott megvilágítás hatással volt mind a levelek fotokémiai aktivitására, mind pedig a nem fotokémiai kioltások hatékonyságára is (19. ábra). Az Y(II) és az Y(NPQ) csökkent az emelkedő UV-B dózissal, míg az Y(NO) emelkedett. A legnagyobb relatív változást a az Y(NO) esetében tapasztaltuk, a kontroll növények és legmagasabb UV-B dózissal kezelt növény között 20 %-os volt a különbség, míg az Y(II) 6 %-kal, az Y(NPQ) pedig 11 %-kal csökkent. Az F_v/F_m értékek szintén lineárisan csökkentek az emelkedő UV-B dózissal, a PSII maximális hatékonysága az alkalmazott legerősebb UV-B dózis hatására 9 %-kal csökkent a kontrollhoz képest.

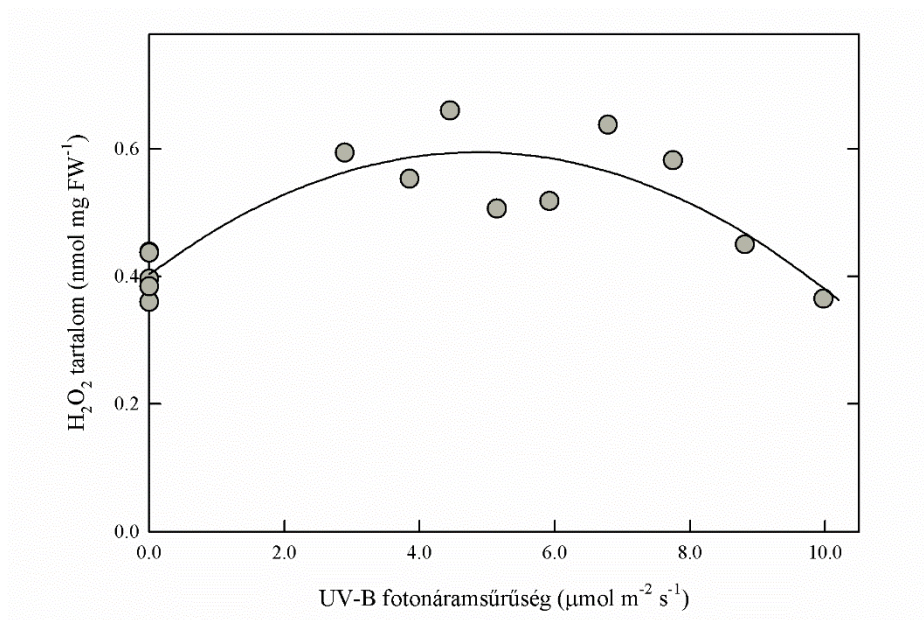


19. ábra A klorofill fluoreszcencia mérésen alapuló paraméterek változásai növekvő 311 nm UV-B foton fluxusoknak kitett dohánylevelekben. A szimbólumok az egyes levelek adatait ábrázolják, a folytonos vonalak pedig lineáris illesztések eredményeit mutatják, amiket p -értékek jellemeznek.

A klorofill fluoreszcencia mérésen alapuló eredményeket trendanalízisnek vetettük alá, és az UV-B erősségével egyenesen arányos változásokat találtunk. A kísérletünkben legnagyobb mértékben változó, nem regulált nem fotokémiai kioltáshoz ($Y(NO)$) többféle reakció is hozzájárul: egy fényfüggetlen állandó alapérték, és egy PAR-függő komponens. Utóbbi a hasznos fotokémiai reakciók helyett potenciálisan károsító (fotoinhibíciót vagy egyéb triplet állapotokat kialakító) folyamatok mértékét jelzi (Kramer és mtsai. 2004, Klughammer és Schreiber 2008). A 311 nm-es UV-B sugárzásnak kitett levelekben mindkét komponens aktiválódott és az UV dózis emelkedésével együtt nőtt. A fényfüggetlen komponens emelkedését az F_v/F_m csökkenése jelzi, mivel sötét adaptált állapotban a következő egyenlet érvényes: $Y(NO) = 1 - F_v/F_m$. A második, károsító utakhoz köthető $Y(NO)$ fokozatos növekedését pedig az $Y(NO) = 1 - Y(II) - Y(NPQ)$ összefüggés magyarázza, amiben az UV-B dózis emelkedésével lecsökkent mind az $Y(II)$, mind a védelmi utaknak megfelelő $Y(NPQ)$ (19. ábra). Az UV kezelés hatására kialakuló, kontroll levelekhez képest alacsonyabb $Y(NPQ)/Y(NO)$ arány a fotoprotektív reakciók szuboptimális kapacitását és az oxigénhez történő energia és/vagy elektron transzferrel keletkező ROS mennyiségének lehetséges növekedését tükrözi. A fotokémiai hozam ($Y(II)$) veszteségének maximális mértékét még az alkalmazott legnagyobb dózisu 311 nm-es megvilágítás alatt is viszonylag alacsonynak, 10% alatti értéknek becsülhetjük (19.

ábra), ezért az előbbi reakcióból származó szinglet oxigén mennyisége, várhatóan nem lesz közvetlenül kimutatható. Egy korábbi kísérletben Barta és mtsai. (2004) spenót leveleket tettek ki sokkal erősebb kvázi-monokromatikus UV-B sugárzásnak (310 ± 5 nm UV-B, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 15 perc), ami nem okozott jelentős szinglet oxigén keletkezést annak ellenére, hogy közel 30%-os Y(II) veszteséget okozott. Így az itt bemutatott kísérletben sem várható, hogy a Y(NO) növekedés által jelzett 311 nm indukálta folyamatok $^1\text{O}_2$ keletkezéséhez vezetnének. Valószínűbb, hogy a ROS képző reakciók során a fotoszintetikus elektrontranszportból szuperoxid anion gyökök keletkeznek, melyek helyben semlegesítődnek a SOD enzim és a kloroplasztisz APX enzime által. Ez a víz-víz ciklusként ismert folyamat többféle stresszválasznak is fontos része (Asada 1999). Abban az esetben, ha az ebben résztvevő két enzim aktivitása nem elegendő a hatékony semlegesítéshez, a szuperoxidból képződő H_2O_2 elhagyhatja a kloroplasztiszt (Bienert és mtsai. 2006, 2007), és a POD-ok szabályozhatják a lokális koncentrációját. A fenti folyamatok vizsgálatához meghatároztuk a levelek H_2O_2 tartalmának és azt ezt befolyásoló antioxidáns tényezőknek a változását.

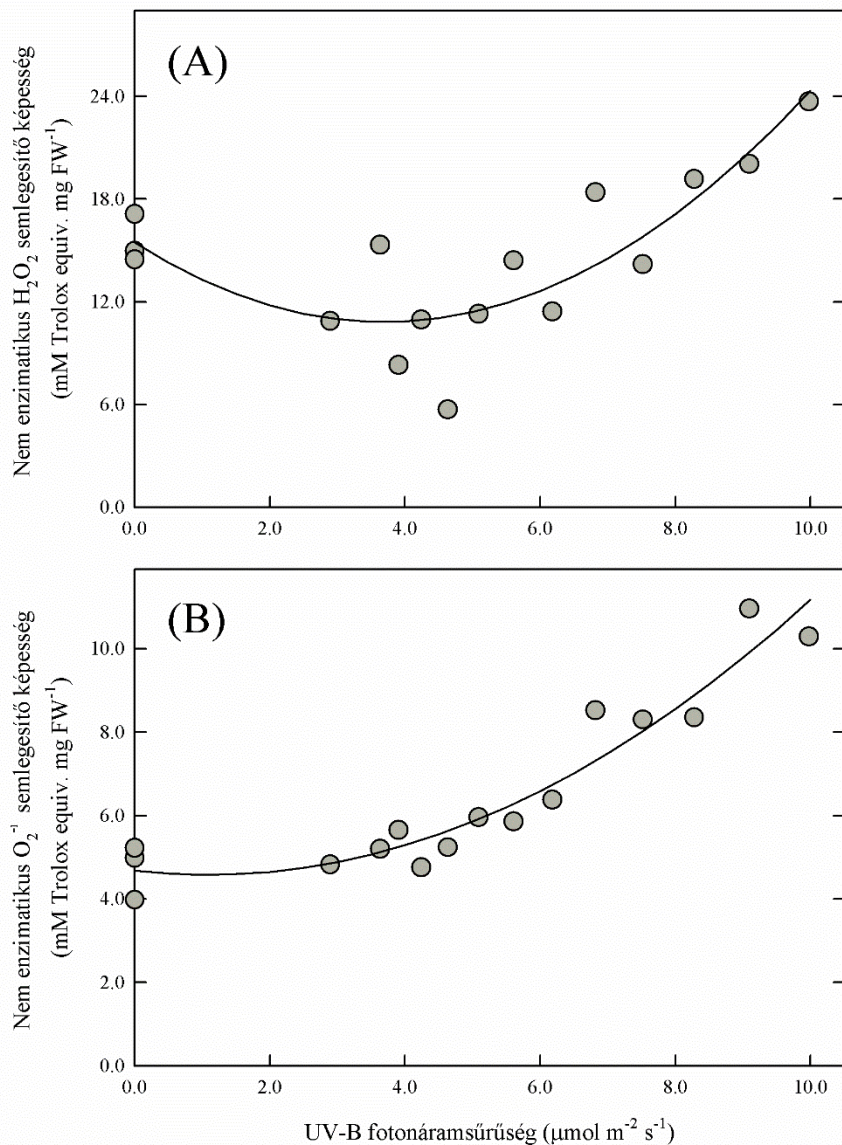
A levelek H_2O_2 tartalma nem követte lineárisan a növekvő 311 nm-es UV-B dózist, a tapasztalt emelkedő-csökkenő kinetikát egy másodrendű polinomiális függvénnyel tudtunk közelíteni ($p < 0.001$) (20. ábra).



20. ábra A dohánylevelek H_2O_2 tartalmának változása növekvő 311 nm UV-B fotonáramsűrűség hatására.

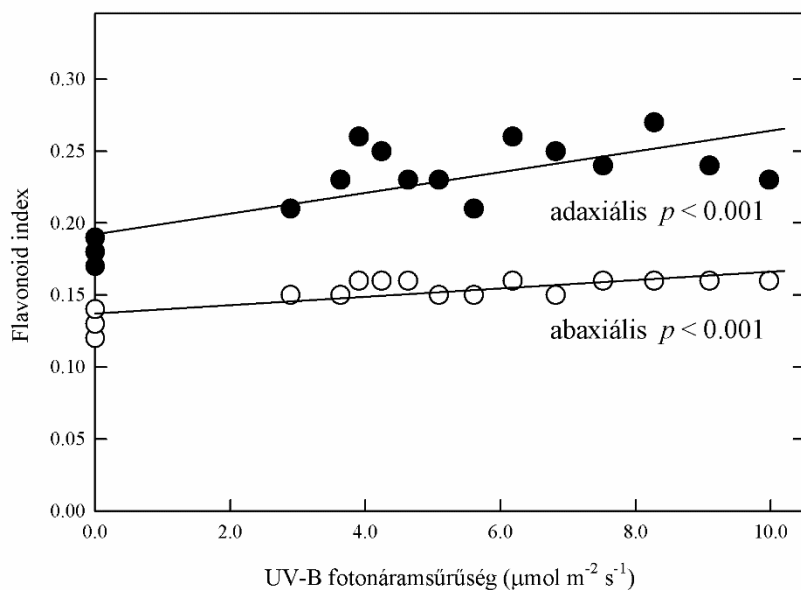
A szimbólumok az egyes levelekhez tartozó adatpontokat jelölik, a vonal pedig a pontokra illesztett szignifikáns ($p < 0.001$) másodrendű polinomiális modell eredményét ábrázolja.

A H₂O₂ tartalom 311 nm-es sugárzás dózistól való függésének magyarázatához megvizsgáltuk a mennyiségét csökkentő nem enzimikus H₂O₂ és O₂^{-•} semlegesítő kapacitás válaszokat. A növekvő keskenysávú UV-B kezelésre a két ROS semlegesítő kapacitás eltérően változott és egyik válasz sem követett lineáris trendet (21. ábra). Az alacsony UV-B dózissal kezelt levelek értékei egyik ROS semlegesítő mód esetében sem voltak nagyobbak a kezeletlen minták értékeitől, sőt a H₂O₂ kioltó kapacitás kis mértékben lecsökkent ezekben a levelekben. Magasabb, 6-10 μmol m⁻² s⁻¹ fotonáramsűrűség hatására mindkét antioxidáns kapacitás növekedett, bár eltérő mértékben. Az UV-indukálta emelkedés a H₂O₂ kioltó képességnél kisebb mértékű volt, mint a O₂^{-•} semlegesítésnél. Míg előbbi a kontrollhoz képest a legmagasabb dózusra közel 60%-al emelkedett meg, addig az utóbbi közel 200%-kal. Ezt az aktiválódást nem feltétlenül a 311 nm UV-B indukálta, hanem a ROS-ok megemelkedett koncentrációja is okozhatja. Ahogy a direkt H₂O₂ kezelést alkalmazó kísérletünkben megmutattuk, a levelek megemelkedett H₂O₂ tartalma okozhatja a H₂O₂ kioltó képesség emelkedését az UV teljes hiányában is (11. ábra) (Rácz és mtsai. 2020). A szélessávú UV-B és a H₂O₂ kezelés hatásait összehasonlító kísérletünkből az is kiderült, hogy a levél flavonoid szint változása és a nem enzimikus antioxidáns kapacitások válaszai eltérőek lehetnek, ami azzal magyarázható, hogy a semlegesítést végző antioxidánsok között más kémiai természetű metabolitok is találhatóak.



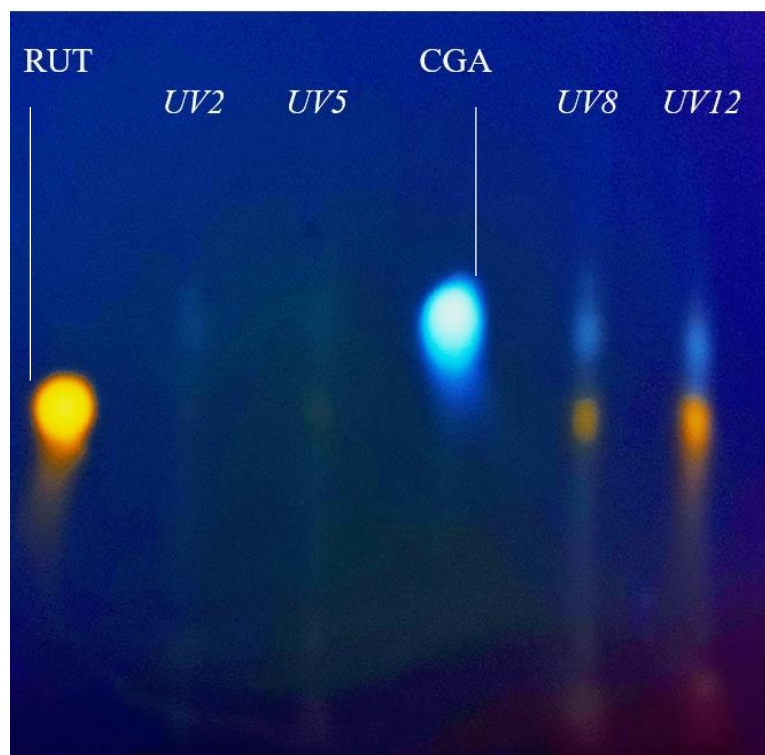
21. ábra Változások a nem enzimatis H₂O₂ (A) és O₂⁻ (B) semlegesítő kapacitásokban növekvő 311 nm UV-B fotonáramsűrűség hatására. A szimbólumok az egyes levelekhez tartozó adatpontokat jelölik, a vonalak pedig a pontokra illesztett másodrendű polinomiális illesztés eredményét ábrázolja ($p < 0.001$ mindkét esetben).

Az UV válasz egyik jellegzetes része a polifenolos vegyületek bioszintézisének serkentése (Schreiner és mtsai. 2012), amit a szélessávú UV-B kezelést alkalmazó kísérleteinkben a flavonoid index emelkedése jelzett (3. és 7. ábra). A 311 nm hullámhosszúságú UV-B besugárzás hasonló hatással volt erre a levelek polifenol tartalom becslő indexére, és a paraméter emelkedő lineáris trendet mutatott, mind az adaxiális, mind az abaxiális levéloldalon (22. ábra).



22. ábra Az adaxiális (teli kör) és az abaxiális (üres kör) flavonoid index változásai a növekvő 311 nm UV-B fotonáramsűrűség hatására. A szimbólumok az egyes levelek adatait ábrázolják, a folytonos vonalak pedig az ábrán feltüntetett p szignifikancia értékekkel jellemzett lineáris illesztések eredményeit mutatják.

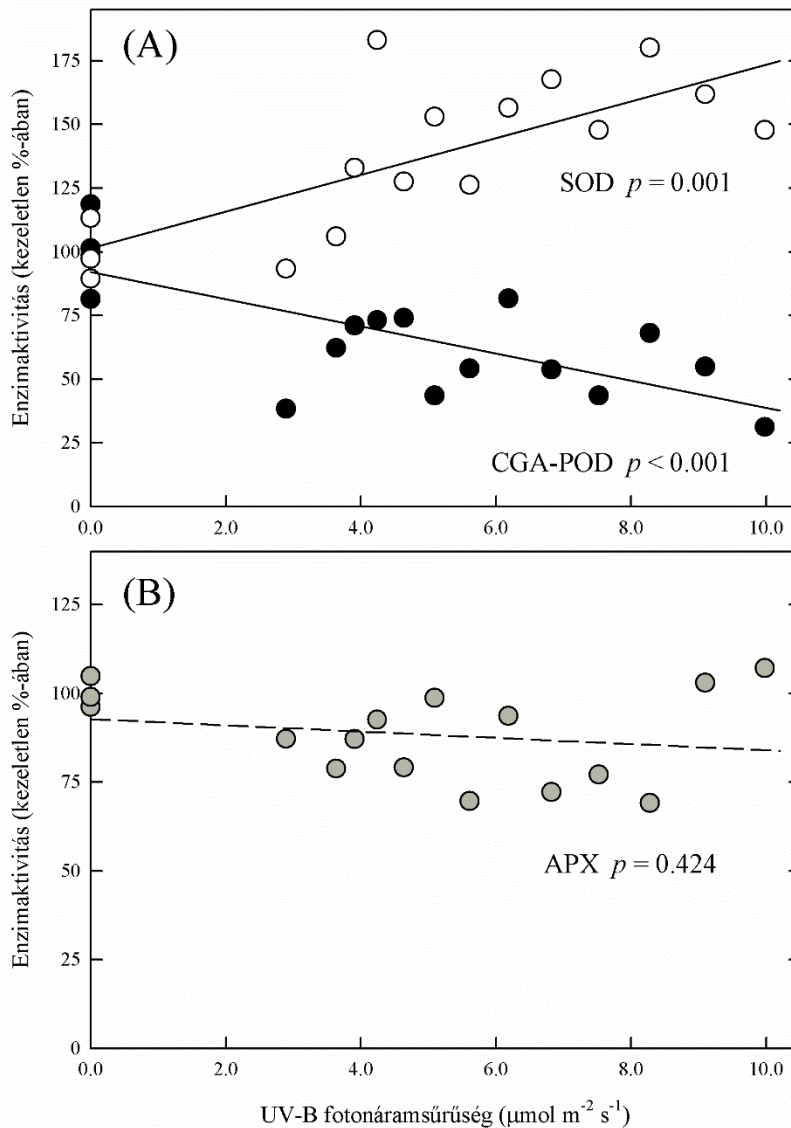
A levelek fenolos vegyület tartalmának részletesebb megismeréséhez négy eltérő 311 nm UV-B dózissal kezelt mintát és két tesztvegyületet analizáltunk TLC használatával (23. ábra). Megállapítható, hogy a keskenysávú UV-B sugárzás a szélessávúhoz hasonlóan megemelte a kezelt levelekben RUT és CGA mennyiséget, a növekvő 311 nm UV-B fotonáramsűrűség hatására egyre nagyobb mértékben. A kezeletlen levelekben nem volt a TLC érzékenységét elérő mennyiségben jelen egyik fenolos vegyület sem, így ezt nem ábrázoltuk. Az eredmény azt mutatja, hogy a 311 nm UV-B önmagában is képes hasonló változásokat előidézni a levelek fenolos metabolit profiljában, mint a szélessávú UV-B kezelés, legalábbis a fő komponensek (CGA, RUT) tekintetében. A részletes mennyiségi és minőségi összehasonlításhoz azonban HPLC vizsgálatokra lesz szükség, ami a terveink között szerepel.



23. ábra Dohánylevél kivonatok és a fenolos tesztvegyületek vékonyréteg kromatográfiás képe.

A quercetin-3-O-rutinozid (RUT) és klorogénsav (CGA) tesztvegyületeket 1 mg mL^{-1} koncentrációban vittük fel a lemezre. A metanolos levél kivonatok ($0.3 \text{ mg levél friss tömeg mL}^{-1}$) növekvő 311 nm UV dózissal kezelt levelekből készültek: $UV2 = 3.6$, $UV5 = 4.6$, $UV-8 = 6.8$ és $UV12 = 9.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Mivel a TLC vizsgálat a keskenysávú UV-B kezelés esetén is igazolta a CGA növekvő bioszintézisét, a korábbi kísérletekben jelentősnek bizonyult enzimatis antioxiidáns válaszok közül (5.4. fejezet) megvizsgáltuk a CGA-POD aktivitását is. A szélessávú UV-B kísérletünk eredményével ellentétben a 311 nm -es UV-B kezelés hatására lecsökkent CGA-POD aktivitást tapasztaltunk. Az aktivitás az emelkedő UV-B dózissal lineárisan csökkent (24.A ábra). A SOD enzimaktivitás az UV-B dózis növekedésével együtt nőtt és a trendjét statisztikailag szignifikáns lineáris modellel jellemeztük (24.A ábra). Az APX enzimaktivitást kevésbé befolyásolta a 311 nm UV-B kezelés, sem lineáris sem pedig polinomiális illesztéssel nem tapasztaltunk szignifikáns trendet követő változást (24.B ábra).



24. ábra Dohánylevelek (A) szuperoxid-dizmutáz (SOD), klorogénsav szubsztráttal mért peroxidáz (CGA-POD) és (B) aszkorbát-peroxidáz (APX) enzim aktivitásának változása növekvő 311 nm UV-B fotonáramsűrűség hatására. A szimbólumok a mérési adatokat, a vonalak egyenes illesztések eredményeit mutatják. A szignifikáns lineáris modellt folytonos, a $p < 0.05$ szinten nem szignifikáns egyenest szaggatott vonal jelzi.

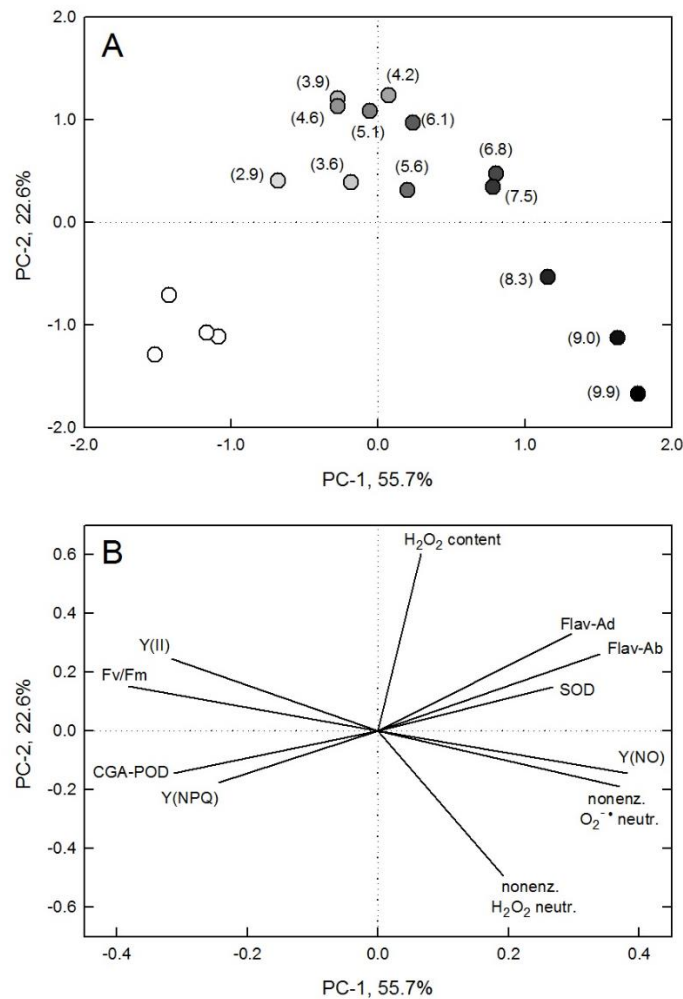
A 311 nm UV kezelt levelek antioxidáns enzim aktivitásában (24. ábra) és a nem enzimikus antioxidáns kapacitásában (21. ábra) megfigyelt változások jól magyarázzák a levelek H_2O_2 tartalom változását. A $3\text{-}6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dózistartományban a nem enzimikus ROS semlegesítés nem változott, így H_2O_2 keltő SOD enzim aktivitás növekedése és H_2O_2 semlegesítő POD enzim aktivitás csökkenése emelkedő H_2O_2 tartalomhoz vezet. Az enzimaktivitások a magasabb ($6\text{-}10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) UV dózisok alatt

is hasonló tendenciát mutatnak, de itt már emelkedik a nem enzimatis ROS kioltó metabolitok szintje is. Ezek az egyelőre nem azonosított vegyületek egyrészt direkt H_2O_2 semlegesítéssel, másrészt a H_2O_2 forrásául szolgáló $\text{O}_2^{\cdot-}$ kioltással járulnak hozzá a H_2O_2 tartalom csökkenéséhez (21. ábra). Az alacsony detektált H_2O_2 szint ellenére a magasabb UV dózisek alatt a levelekben csökkent a fotokémiai hatékonyság. A nem regulált nem fotokémiai kioltás növekedése (Y(NO), 19. ábra) azt jelzi, hogy az ezekben a folyamatokban keletkező $\text{O}_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 egy része nem az antioxidánsokkal reagált, hanem más funkcionális összetevőket oxidált.

A 311 nm-es UV-B sugárzásra adott enzimatis válaszok az alacsonyabb, funkcionális károsodáshoz nem vezető dózisek esetében is teljesen ellentétes képet mutatnak a szélessávú UV-B kezelés hatásaihoz képest. Utóbbit növekvő APX és POD, továbbá változatlan vagy csökkenő SOD aktivitás jellemezte (Czégény és mtsai. 2016, Rác és mtsai. 2020). Két azonos UV fotonáramsűrűségű kezelést összehasonlítva, a dolgozatban az 5.3. és 5.4. fejezetekben bemutatott szélessávú ($5.5\text{-}6.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) UV-B és az ebben a fejezetben tárgyalt 311 nm-es a kezelésekre H_2O_2 szintet szabályozó hatásai között jelentős különbségeket találtunk. Ennek az egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH}$ fotokonverziót legnagyobb hatékonysággal az alacsonyabb (295-305 nm) UV hullámhosszak okozzák, és a magasabb hullámhosszokon megy végbe (Czégény és mtsai. 2014). Alacsony dózisu UV-B-re (mint például $0.1\text{-}1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton fluxus használata 15-60 percen keresztül) adott válaszok az UVR8 fotoreceptoron keresztül mennek végbe (Jenkins 2009), melynek abszorpciós maximuma 280 nm körüli. Az elmúlt években több tanulmány is felvetette az UVR8-független szabályozási utak lehetőségét (Ulm és Nagy 2005; González Besteiro és mtsai. 2011), de egy magasabb hullámhosszúságú UV-B által aktiválható fotoreceptor lehetősége is felmerült (O'Hara és mtsai. 2019). Mivel az UV-B besugárzás hatására jelentős változások mennek végbe a növények antioxidáns tartalmában, a ROS-ok szerepét már többen javasolták fotoreceptor független szignálútként (Rao és mtsai. 1996, Mackerness és mtsai. 2001, Hideg és mtsai. 2013).

Eredményeinket PCA használatával is kiértékeljük (25. ábra). A két magyarázó változónk jól elkülöníti a kezeletlen növényekhez, illetve a magasabb dózissal kezelt növényekhez tartozó pontokat (25.A ábra). A PCA vektorok iránya azt mutatja, hogy az F_v/F_m és a fény adaptált Y(II) párhuzamosan változtak, ami arra utal, hogy UV-B erősebb

hatással volt a PSII-re, mint a UV-indukálta fotoprotektív utakra. Ezt az is alátámasztja, hogy negatív korreláció áll fenn az Y(NPQ) és az Y(NO) között.



25. ábra Főkomponens analízis eredményei a keskenysávú UV-B kezelt növények paramétereinek összehasonlításával.

(A) adatpontok, (B) a különböző paraméterek projekciói. SOD: szuperoxid-dizmutáz; CGA-POD:

klorogénsav szubsztráttal peroxidáz; Fla-Ad: adaxiális flavonoid index; Flav-Ab: abaxiális flavonoid index

H₂O₂ content: H₂O₂ tartalom; nonenz H₂O₂ neutr.: nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő kapacitás; nonenz O₂⁻ neutr.: nem enzimatis O₂⁻ semlegesítő kapacitás. Az üres karikák a kezeletlen növények adatpontjait, a teli karikák (a sötétéddel) az eltérő UV-B dózissal kezelt növények adatpontjait jelölik.

A közel-monokromatikus 311 nm-es UV-B forrással végzett kísérleteink azt mutatták, hogy ez a hullámhossz önmagában alkalmazva eltérő változásokat okoz a H₂O₂ szabályozásban, mint egy széles spektrumú UV-B forrás. A szélessávú UV-B kezelés is tartalmazott 311 nm fotonokat, azonban ezek részaránya a teljes UV-B spektrumban viszonylag kicsi. A monokromatikus UV-B alkalmazása kétségtelenül mesterséges körülmény, azonban további mérésekkel kiegészítve alkalmas lehet arra, hogy az UV-B

tartományon belül az egyes energiatartományok szerepét elkülönítve is megvizsgáljuk. Az itt bemutatott eredményeink támogatják azt az UV-indukált jelátviteli utak kezdeti lépéseinek analízisén alapuló felvetést, mely szerint lehetséges egy 310-311 nm sugárzással aktiválható, az UVR8-tól fotoreceptortól különböző szabályozási út (O'Hara és mtsai. 2019). Amennyiben ennek a fotoreceptornak a léte bizonyosságot nyer, az eredményeink alapján ez az út a POD antioxidáns válaszok szabályozásában várhatóan nem vesz részt.

6. Összefoglalás

A növények UV-B toleranciájának kialakulásában kulcsfontosságú szerepe van a H₂O₂ semlegesítő utaknak, különösen a fenolos peroxidáz enzimeknek (POD). Vizsgálatainkhoz dohány (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havanna és cv. Xanthi) növényeket használtunk, és növénynevelőkamrában a nevelőfényt (PAR) kiegészítő UV sugárzást alkalmaztunk.

A növényi POD aktivitást mérő különböző módszerek metodikai összehasonlításai alapján a következőket állapítottuk meg:

1. A különböző korú, teljesen kifejtett és még nem szenescens dohánylevelek UV-B-indukálta POD aktivitás növekedése különböző mértékűek, amik egy nádusz távolságban is detektálhatóak. Ennek alapján az UV-B hatások vizsgálata során nem javasoljuk növényenként egynél több levél összevonását egy mintaelemmé, sem pedig különböző korú levelek használatát a különböző mintákban (Rácz és mtsai. 2018).
2. A szakirodalom alapján leggyakrabban használt kromofórok közül az ABTS bizonyult a legalkalmasabb mesterséges szubsztrátnak a POD általános jellemzésére dohány növényekben, mert ezzel mérhető a legmagasabb aktivitás. Az ismert eljárások kiterjesztéseként alkalmaztunk a dohánylevelekben megtalálható polifenolos vegyületeket is POD szubsztrátként, és megmutattuk az UV indukálta POD válasz heterogenitását. A szubsztrátpreferenciák összehasonlítás alapján pedig azt találtuk, hogy az UV-alkalmazkodási válaszok vizsgálata során az enzim aktivitását klorogénsav (CGA) használatával (CGA-POD) érdemes detektálni (Rácz és mtsai. 2020).

A dohánylevelekben UV-B-indukált polifenolos vegyületek és fenolos peroxidázok vizsgálata (Rácz és mtsai. 2020) alapján elmondható, hogy:

3. Az UV-B kezeléshez alkalmazkodott, megtartott fotokémiai hatékonyságú növényekben a CGA és a quercetin-rutinozid (RUT) mennyisége növekedett a legnagyobb mértékben. Ez a két vegyület azonban különböző módon támogatja az UV-B-hez történő alkalmazkodást.
4. Az UV-B-vel kezelt levelekben a megnövekedett CGA-POD aktivitás magyarázata a megemelkedett CGA tartalom mellett az lehet, hogy a többi, direkt

antioxidánsként vagy POD szubsztrátként hatékony más fenolos vegyülethez képest az oxidált CGA regenerációja a leghatékonyabb.

5. Az UV kezelés hatására megemelkedő RUT mennyiség nem járt együtt a RUT-POD aktivitás megemelkedésével. A RUT nem POD szubsztrátként, hanem direkt H_2O_2 semlegesítő antioxidánsként járul hozzá az UV-B akklimáció folyamatához.

Az UV-B válaszok eredetét célzó, esetleges UVR8 fotoreceptor nélkül kialakuló válaszok vizsgálata során a következő megállapításokat tehetjük:

6. Az UV-B kezelés egyik hatása a levelekben megemelkedő H_2O_2 koncentráció, ami azonban UV-B megvilágítás nélkül, exogén H_2O_2 kezeléssel is elérhető. A H_2O_2 kezelés hatására kialakult antioxidáns válaszok azonban eltérő képet mutattak az UV-B kezeléshez képest. Az UV-B hatására elsősorban az enzimatikus védelmi utak aktiválódtak, és a kezeletlenekhez képest csökkent szuperoxid-dizmutáz (SOD) és emelkedett fenolos POD aktivitás jellemezte a leveleket. A H_2O_2 kezelés hatására viszont nem ezek a védelmi utak, hanem a nem-enzimatikus antioxidáns kapacitás nőtt meg, amihez a fenolos vegyületek hozzájárulása feltehetően csekély. Ez az különbség azt mutatja, hogy a H_2O_2 nem, vagy csak kis mértékben vesz részt másodlagos jelként az UV-B indukált válaszokban (Rácz és mtsai. 2020).
7. Az ismert UVR8 fotoreceptor jelenleg elfogadott abszorpciós tartományán kívül eső keskenysávú (311 nm) UV-B alkalmazásával a szélessávú UV-B hatásához képest ellentétes irányú antioxidáns enzim válaszokat kaptunk. A 311 nm UV-B hatására a levelekben a kezeletlenekhez képest csökkent a CGA-POD és emelkedett a SOD aktivitása. Az UV-B dózissal egyenes arányban bekövetkező változások mellett csak nagy dózisu 311 nm kezelés esetén jelent meg a levelek H_2O_2 szintjét csökkentő nem enzimatikus antioxidáns kapacitások emelkedése. A megfigyelt különbség további kísérletekkel releváns lehet az irodalomban nemrég felvetődött, UVR8-től különböző, feltételezeten 310-311 nm sugárzással aktiválható fotoreceptorral kapcsolatos kutatásokban; de jelezhet más, fotoreceptor független UV-B válaszutakat is. Ez az eredményünk rámutatott arra is, hogy az egyes UV-B hullámhosszak, keskeny hullámhossz tartományok elkülönített vizsgálata is fontos lehet a természetben bekövetkező komplex UV-B válasz megértésében (Rácz és mtsai. benyújtva).

7. Summary

Ultraviolet radiation (UV, 280-400 nm) has the highest energy among the radiation components reaching the surface of the Earth. UV-B (280-315 nm) is a potential stressor, and oxidative stress effects of high UV-B doses on plants have been studied extensively. However, over the past decade, several studies have shown that environmental UV-B by itself does not act as a stressor, but rather acts as a regulating factor. Nevertheless, even ambient UV-B can have a damaging effect when combined with other abiotic factors, stimulating reactive oxygen species (ROS) production. When ROS concentrations are increasing, oxidative damage can be avoided by adjusting the ROS – antioxidant balance. Plants have a diverse antioxidant defense system to regulate ROS levels and thus achieve a successful acclimation to changes of the environment. Defensive pathways include enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses. A well-documented effect of acclimation to UV-B is the biosynthesis of phenolic compounds. In addition acting as UV filters, these compounds may neutralize ROS as direct antioxidants or may support defence in an indirect way, as peroxidase enzyme substrates. Class III phenolic peroxidases (POD) have an important role in the acclimation to UV-B, as major components of the H₂O₂ controlling enzymatic defense system. In the experiments described in my Ph.D. thesis, we used tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana and cv. Xanthi), which were grown in growth chambers under photosynthetically active radiation (PAR) and supplemental UV-B from either broad- or narrowband sources. The aim of this work was to investigate the role of POD in acclimation to UV-B and explore the functional heterogeneity of these enzymes.

The comparison of different leaves assayed with diverse POD substrates showed that:

1. Fully developed leaves of different ages showed different POD responses to the same UV-B treatment. Thus, it is not recommended to pool more than one leaf per plant in one sampling element, and responses of leaves with different ages should not be directly compared.
2. Among the commonly used chromophores in POD assays, ABTS proved to be the most suitable artificial substrate for the general characterization of POD yielded the highest activity in tobacco plants. As an expansion of documented methods, polyphenolic compounds contained in tobacco leaves were also used

as POD substrates. These experiments demonstrated the heterogeneity of the UV-induced POD responses. Based on a comparison of substrate preferences, we found that the use of chlorogenic acid (CGA) is the best choice for studying UV acclimation responses.

Studies on possible roles of UV-B-inducible polyphenolic compounds in tobacco leaves, we found that:

3. The most pronounced change brought about by the UV-B treatment was the increase in leaf CGA and quercetin-rutinoside (RUT) contents. However, these two compounds support plant acclimation to UV-B in different ways.
4. CGA contributed to enzymatic H₂O₂ neutralization in UV-B-exposed leaves, due to its high levels, and because the regeneration of oxidized CGA was more effective compared to other phenolic compounds acting as direct antioxidants or POD substrates.
5. The increase in RUT content upon UV treatment did not result in any increase in RUT-POD activity. Therefore RUT contributes to the UV-B acclimation process not as a POD substrate but rather as a direct H₂O₂ neutralizing antioxidant.

The involvement of UVR8 photoreceptor dependent and independent pathways in the observed acclimative UV-responses was studied indirectly, and suggested the following conclusions:

6. One of the effects of UV-B treatment is an increase in leaf H₂O₂ concentrations. However, when the same effect was achieved with an exogenous H₂O₂ treatment without UV-B antioxidant responses were different from the effect of the UV-B treatment. UV-B activated enzymatic defense pathways and acclimated leaves were characterized by decreased superoxide dismutase (SOD) and increased phenolic POD activity as compared to untreated ones. On the other hand the H₂O₂ treatment, did not activate these enzymatic defense pathways, but increased non-enzymatic antioxidant capacity. These differences indicate that H₂O₂ is unlikely to be a secondary signal in UV-B specific responses.
7. Narrowband 311 nm UV-B is outside the currently known absorption range of UVR8 photoreceptor. Treatment with 311 nm UV-B resulted in antioxidant

enzyme responses which were distinct from the effects of broadband UV-B; 311 nm UV-B decreased CGA-POD and increased SOD activity. These changes were positively correlated to the 311 nm UV-B dose. In addition, an increase in non-enzymatic antioxidant capacities was observed as a non-linear response appearing, under high doses only. These findings may be relevant to UVR8-independent response pathways, such as the putative photoreceptor with maximum absorbance at 310-311 nm, which have recently been put forward. Our results also indicates the necessity of studying action spectra of separate UV-B wavelengths in order to understand the complexity of responses to UV radiation in nature.

8. Irodalomjegyzék

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.

Aiamla-or, S., Shigyo, M., Ito S., Yamauchi N. (2014) Involvement of chloroplast peroxidase on chlorophyll degradation in postharvest broccoli florets and its control by UV-B treatment. *Food Chem.* 165: 224-231.

Alam, M., Kaur, J., Khaira, H., Gupta, K. (2016) Extrusion and extruded products: Changes in quality attributes as affected by extrusion process parameters: A review *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56: 445-473.

Anders, K., Essen, L.-O. (2015) The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 35: 7-16.

Anouar, E.H., Gierschner, J., Duroux, J-L., Trouillas, P. (2012) UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry.* 131: 79–89.

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

Aphalo, P.J., Albert, A., Björn, L.O., McLeod, A., Robson, T.M., Rosenqvist, E. (eds.) 2012. *Beyond the visible: A handbook of best practice in plant UV photobiology.* COST Action FA0906 UV4growth. Helsinki: University of Helsinki, Department of Biosciences, Division of Plant Biology. ISBN 978-952-10-8362-4

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.

Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391-396.

Barnes, P.W., Williamson, C.E., Lucas, R.M. et al. (2019) Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. *Nat Sustain.* 2: 569–579.

Barta, Cs., Kálai, T., Hideg, K., Vass, I., Hideg, É. (2004) Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Funct. Plant Biol.* 31: 23-28.

- Berhow, M.A., Vaughn, S.F. (1999) Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In *Principles and Practices in Plant Ecology* (Inderjit, S., Dakshini, K. M. M., and Foy, C. L., eds.), Boca Raton: CRC Press 423-438.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.A., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282: 1183-1192.
- Bienert M.D., Bienert G.P. (2017) Plant Aquaporins and Metalloids. In: Chaumont F., Tyerman S. (eds) *Plant Aquaporins. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4_14.
- Bilger, W., Rolland, M., Nybakken L. (2007) UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 190-195.
- Bolton, J.L., Dunlap, T.L., Dietz, B.M. (2018) Formation and biological targets of botanical o-quinones. *Food Chem. Toxicol.* 120: 700–707.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J., Jenkins, G.I. (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 18225-18230.
- Castagna, A., Csepregi, K., Neugart, S., Zipoli, G., Vecerová, K., Jakab, G., Jug, T., Llorens, L., Martínez-Abaigar, J., Martínez-Lüscher, J., Núñez-Olivera, E., Ranieri, A., Schödl-Hummel, K., Schreiner, M., Teszlák, P., Tittmann, S., Urban, O., Verdaguer, D., Jansen, M.A.K., Hideg, É. (2017) Environmental plasticity of Pinot noir grapevine leaves: A trans-European study of morphological and biochemical changes along a 1,500-km latitudinal climatic gradient. *Plant Cell Environ.* 40: 2790-2805.
- Childs, R.E., Bardsley, W.G. (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azinodi-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145: 93-103.
- Cho, U.-H., Seo, N.-H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.* 168: 113-120.

- Cosio, C., Dunand, C. (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 60: 391-408.
- Czégény, Gy., Wu, M., Dér, A., Eriksson, L.A., Strid, Å., Hideg, É. (2014) Hydrogen peroxide contributes to the ultraviolet-B (280–315nm) induced oxidative stress of plant leaves through multiple pathways. *FEBS Lett.* 588: 2255-2261.
- Czégény, Gy., Le Martret, B., Pávkovics, D., Dix, P.J., Hideg, É. (2016a) Elevated ROSscavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. *J. Plant Physiol.* 201: 95-100.
- Czégény, Gy., Mátai, A., Hideg, É. (2016b) UV-B effects on leaves – oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* 248: 57-63.
- Czégény, G., Kőrösi, L., Strid, Å., Hideg, É. (2019) Multiple roles for Vitamin B6 in plant acclimation to UV-B. *Sci. Rep.* 9, 1259.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2016) A novel procedure to assess the non-enzymatic hydrogen-peroxide antioxidant capacity of metabolites with high UV absorption. *Acta Biol. Hung.* 67: 447-450.
- Csepregi, K., Coffey, A., Cunningham, N., Prinsen, E., Hideg, É., Jansen, M.A.K. (2017) Developmental age and UV-B exposure co-determine antioxidant capacity and flavonol accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Environ. Exp. Bot.* 140: 19-25.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2018) Phenolic compound diversity explored in the context of photo-oxidative stress protection. *Phytochem. Anal.* 29: 129-136.
- Csepregi, K., Czégény, G., Rácz, A., Hideg, É. (2019) Improving the stress tolerance of pepper seedlings via manipulating secondary metabolites with UV irradiation In: *Light & Life 2019 - Book of Abstracts.* p. 399.
- Deisseroth, A., Dounce, A.L. (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 50: 319-375.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141: 330-335.

- Deponte, M. (2017) The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxid Redox Signal*. 27(15): 1130-1161.
- Escobar-Bravo, R., Klinkhamer, P.G.L., Leiss, K.A. (2017) Interactive Effects of UV-B Light with Abiotic Factors on Plant Growth and Chemistry, and Their Consequences for Defense against Arthropod Herbivores. *Front. Plant Sci*. 8: 278.
- Fielding, J.L., Hall, J.L. (1978) A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*: I. A comparison of DAB-peroxidase and guaiacolperoxidase with particular emphasis on the properties of cell wall activity. *J. Exp. Bot*. 29: 969-981.
- Flint, S.D., Caldwell, M.M., (2003) A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiol. Plant*. 117: 137-144.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*. 119: 355-364.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M. (1996) Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry* 41: 1029-1034.
- González Besteiro, M.A., Bartels, S., Albert, A., Ulm, R. (2011) *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant J*. 68: 727-737.
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., Moya, I. (2004) Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl Opt* 43: 4488-4496.
- Grace, S.C., Logan, B.A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 355: 1499-1510.
- Gulen, H., Eris, A. (2004) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Sci*. 166: 739-744.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford: Oxford University Press.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron*. 4: 9.

- Hawrył, M.A., Waksmundzka-Hajnos, M. (2011) Two-dimensional thin-layer chromatography of selected *Polygonum sp.* extracts on polar-bonded stationary phases. *J. Chromatogr. A* 1218: 2812-2819.
- Hayes, S., Sharma, A., Fraser, D.P., Trevisan, M., Cragg-Barber, C.K., Tavridou, E., Fankhauser, C., Jenkins, J.I., Franklin, K.A. (2017) UV-B Perceived by the UVR8 Photoreceptor Inhibits Plant Thermomorphogenesis. *Current Biology*. 27(1):120-127.
- Hectors, K., Van Oevelen, S., Geuns, J., Guisez, Y., Jansen, M.A. and Prinsen, E. (2014) Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 152, 219-230.
- Heijde, M., Ulm, R. (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 17(4): 230-237.
- Hideg, É., Vass, I. (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* 115(2): 251-260.
- Hideg, É., Jansen, M.A.K., Strid, Å. (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18: 107-115.
- Hideg, É., Strid, Å. (2017) The Effect of UV-B on the Biochemistry and Metabolism of Plants. In: *UV-B Radiation and Plant Life: Molecular Biology to Ecology* (ed. B. R. Jordan), Chapter 7, pp. 90-110. CABI Wallingford, UK, ISBN 978-1-780648590.
- Hiner, A.N.P., Hernández Ruiz, J., Rodríguez López, J.N., García Cánovas, F., Brisset, N.C., Smith, A.T., Arnao, M.B., Acosta, M., (2002) Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 277: 26879–26885.
- Hofmann, R.W., Swinny, E.E., Bloor, S.J., Markham, K.R., Ryan, K.G., Campbell, B.D., Jordan, B.R., Fountain, D.W. (2000) Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: Differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Ann Bot* 86: 527-537.
- Holub, P., Nezval, J., Štroch, M., Špunda, V., Urban, O., Jansen, M.A.K., Klem, K. (2019) Induction of phenolic compounds by UV and PAR is modulated by leaf ontogeny and barley genotype, *Plant Physiol. Biochem.* 134: 81-93.

- Janknegt, P.J., Rijstenbil, J.W., van de Poll, W.H., Gechev, T.S., Buma, A.G.J. (2007) A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *J. Photochem. Photobiol. B.* 87: 218-226.
- Jansen, M.A.K., van den Noort, R.E., Tan, M.Y.A., Prinsen, E., Lagrimini, L.M., Thorneley, R.N.F. (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* 126: 1012-1023.
- Jansen, M.A.K., Elfstrand, M., Heggie, L., Sitbon, F., Dix, P.J., Thorneley, R.N.F. (2004) Over-expression of phenol-oxidising peroxidases alters the UV-susceptibility of transgenic *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 163: 585-594.
- Jansen, M.A.K., Hectors, K., O'Brien, N.M., Guisez, Y., Potters, G. (2008) Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175: 449-458.
- Jansen, M.A.K., Bilger, W., Hideg, É., Strid, Å., UV4Plants Workshop Participants, Urban, O. (2019) Editorial: Interactive effects of UV-B radiation in a complex environment. *Plant Physiol Biochem.* 134: 1-8.
- Jenkins, G.I. (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 407-431.
- Jenkins, G.I. (2017) Photomorphogenic responses to ultraviolet-B light. *Plant Cell Environ.* 40: 2544-2557.
- Jovanovic, Z.S., Milosevic, J.D., Radovic, S.R. (2006) Antioxidative enzymes in the response of buckwheat (*Fagopyrum esculentum moench*) to ultraviolet B radiation. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9472-9478.
- Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., Tyystjärvi, E. (2020) Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants* 9(91).
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., Harter, K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal.* 50: 347-363.

- Kim, B.H., Kim, S.Y., Nam, K.H. (2012) Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant. *Mol. Cells* 34: 539-548.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35.
- Kolb, C.A., Käser, M.A., Kopecky, J., Zotz, G., Riederer, M., Pfündel, E.E. (2001) Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol.* 127: 863-875.
- Königshofer, H., Tromballa, H.-W., Löppert, H.-G. (2008) Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant Cell Environ.* 31: 1771-1780.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79, 209-218.
- Larson, R.A., (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.
- Li, Z., Wang, L., Yang, G., Shi, H., Jiang, C., Liu, W., Zhang, Y. (2003) Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. Sci.* 41: 36-40.
- Liu, J., Shono, M. (1999) Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiol.* 40: 1297-1304.
- Lu, Y., Chen, Q., Bu, Y., Luo, R., Hao, S., Zhang, J., Tian, J., & Yao, Y. (2017) Flavonoid Accumulation Plays an Important Role in the Rust Resistance of Malus Plant Leaves. *Front Plant Sci.* 8, 1286.
- Mackerness, S.A.-H., Freda, J.C., Jordan, B.T. (2001) Early signalling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* 489: 237-242.

- Maegawa, Y., Sugino, K., Sakurai, H. (2007) Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. *Free Radic. Res.* 41: 110-119.
- Majer, P., Hideg, É. (2012) Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a greenhouse. *Plant Physiol. Biochem.* 50: 15-23.
- Majer, P., Czégény, Gy., Sándor, Gy., Dix, P.J., Hideg, É. (2014) Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. *Plant Physiol. Biochem.* 82: 239-243.
- Martínez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sánchez-Díaz, M., Gomés, E., Aguirreolea, J., Pascual I. (2013) Short- and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. *Plant Sci.* 213:114-122.
- Mátai, A., Hideg, É. (2017) A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Anal. Methods* 9: 2357-2360.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaité, E., Segura-Aguilar, J. (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 107-116.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459–481.
- Morales, L.O., Brosché, M., Vainonen, J., Jenkins, G.I., Wargent, J.J., Sipari, N., Strid, Å., Lindfors, A.V., Tegelberg, R., Aphalo, P.J. (2013) Multiple Roles for UV RESISTANCE LOCUS8 in Regulating Gene Expression and Metabolite Accumulation in Arabidopsis under Solar Ultraviolet Radiation, *Plant Phys.* 161(2): 744-759.
- Moran, J., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., Aparicio-Tejo P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.
- Moustaka, J., Tanou, G., Adamakis, I.-D., Eleftheriou, E.P., Moustakas, M. (2015) Leaf agedependent photoprotective and antioxidative response mechanisms to paraquat-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 13989-14006.

- Mullineaux, P.M., Karpinski, S., Baker, N.R. (2006) Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiol.* 141: 346-350.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880 (1981).
- Nesterenko, T.V., Shikhov, V.N., Tikhomirov, A.A., (2015) Chlorophyll fluorescence as an indicator of age-dependent changes in photosynthetic apparatus of wheat leaves. *Russ. J. Plant Physiol.* 62: 307-313.
- Neugart, S., Schreiner, M. (2018) UVB and UVA as eustressors in horticultural and agricultural crops. *Scientia Horticulturae* 234:370-381.
- O'Hara, A., Headland, L.R., Díaz-Ramos, L.A., Morales, L.O., Strid, Å., Jenkins, G.I. (2019) Regulation of *Arabidopsis* gene expression by low fluence rate UV-B independently of UVR8 and stress signaling. *Photochem. Photobiol. Sci.* 18: 1675-1684.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A., Sagisaka, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.
- Petrov, V.D., Van Breusegem, F. (2012) Hydrogen peroxide: a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* pls014.
- Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Georgiev, V., Hristeva, T., Nikolova, V., Docheva, M., Nikolov, N., Damyanova, S. (2018) Phytochemicals in leaves and extracts of the variety "Plovdiv 7" of Bulgarian oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Trends Phytochem. Res.* 2(1): 27-36.
- Qian, M., Kalbina, I., Rosenqvist, E., Jansen, M.A.K., Teng, Y., Strid, Å. (2019) UV regulates expression of phenylpropanoid biosynthesis genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) in an organ and spectrum dependent manner. *Photochem. Photobiol. Sci.* 18: 424-433.
- Raggi, S., Ferrarini, A., Delledonne, M., Dunand, C., Ranocha, P., De Lorenzo, G., Cervone, F., Ferrari, S. (2015) The *Arabidopsis* class III peroxidase AtPRX71 negatively regulates growth under physiological conditions and in response to cell wall damage. *Plant Physiol.* 169(4): 2513-2525.

- Raha, S., Robinson, B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25: 502-508.
- Rai, N, O'Hara, A, Farkas, D, Safronov, O., Ratanasopa, K., Wang, F., Lindfors, A.V., Jenkins, G.I., Lehto, T., Salojärvi, J., Brosché, M., Strid, Å., Aphalo, P.J., Morales L.O. (2020) The photoreceptor UVR8 mediates the perception of both UV-B and UV-A wavelengths up to 350 nm of sunlight with responsivity moderated by cryptochromes. *Plant Cell Environ.* 43: 1513-1527.
- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B., Soldatini, G.F. (2001) Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *J. Exp. Bot.* 52: 25-35.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (2018) Selective responses of class III plant peroxidase isoforms to environmentally relevant UV-B doses. *J. Plant Physiol.* 221: 101-106.
- Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (2020) Ultraviolet-B acclimation is supported by functionally heterogeneous phenolic peroxidases. *Sci. Rep.* 10:16303.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., Ulm, R. (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science.* 332: 103-106.
- Rodríguez-Calzada, T., Qian, M., Strid, Å., Neugart, S., Schreiner, M., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R.G. (2019) Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) *Plant Physiol Biochem.* 134: 94-102.
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M.A.K., Zrenner, R., Winkler, J.B., O'Brien, N., Krumbein, A. (2012) UV-B-induced secondary plant metabolites – potential benefits for plant and human health. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 229-240.
- Shirley, B. W. (1996) Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old”. *TIPS* 1: 377-382.

Ślesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z. (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Biochem. Biophys. Acta.* 54: 9-50.

Smirnoff, N., Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol.* 221: 1197-121.

Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H.S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H.S., Sudhakar, C. (1999) Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Sci.* 141: 1-9.

Stevens, H.C., Calvan, M., Lee, K., Siegel, B. (1978) Peroxidase activity as a screening parameter for salt stress in Brassica species. *Phytochemistry* 17: 1521-1522.

Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34: 497-500.

Szilárd, A., Sass, L., Deák, Zs., Vass, I. (2007) The sensitivity of Photosystem II to damage by UV-B radiation depends on the oxidation state of the water-splitting complex. *BBA - Bioenergetics* 1767: 876-882.

Takahama, U., Oniki, T. (1997) A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol. Plant.* 101: 845-852.

Takahama, U., Hirotsu, M., Oniki, T. (1999) Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid and activities of peroxidase and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Physiol.* 84: 438-442.

Tossi, V., Lamattina, L., and Cassia, R. (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *N. Phytol.* 181: 871-879.

Tossi, V., Cassia, R., Bruzzone, S., Zocchi, E., and Lamattina, L. (2012) ABA says NO to UV-B: a universal response? *TIPS* 17: 510-517.

Tossi, V., Lamattina, L., Jenkins, G. I., and Cassia, R. O. (2014) Ultraviolet-B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* is regulated by the UV RESISTANCE LOCUS8 photoreceptor in a nitric oxide-dependent mechanism. *Plant Physiol.* 164: 2220-2230.

Truetter D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4: 147-157.

Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Máté, Z., Ádám, É., Oakeley, E.J., Schäfer, E., Nagy, F. (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 1397-1402.

Ulm. R., Nagy. F. (2005) Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 477-482.

Velanis, Ch.N., Herzyk, P. & Jenkins, G.I. (2016) Regulation of transcription by the *Arabidopsis* UVR8 photoreceptor involves a specific histone modification. *Plant Mol. Biol.* 92: 425-443.

Vestergaard, C.L., Flyvbjerg, H., Møller I.M. (2012) Intracellular signaling by diffusion: can waves of hydrogen peroxide transmit intracellular information in plant cells? *Frontiers in plant science* 3: 295.

Wan, X.Y., Liu, J.Y. (2008) Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol. Cell Proteom.* 7: 1469-1488.

Wijewardana, C., Henry, W.B., Gao, W., Reddy K.R. (2016) Interactive effects on CO₂, drought, and ultraviolet-b radiation on maize growth and development *J. Photochem. Photobiol. B*, 160: 198-209.

Wollenweber, E., Dietz, V.H. (1981) Occurrence and distribution of three favonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20: 869-932.

Wydrzynski, T., Ngström, J., Vännngård, T. (1989) H₂O₂ formation by Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 973(1): 23-28.

Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 1405-1412.

Yamasaki, H., Grace, S.C. (1998) EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS Lett.* 422: 377-380.

Yannarelli, G.G., Gallego, S.M., Tomaro, M.L (2006) Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. *Env. Exp. Bot.* 56: 174-181.

Zhen, S., van Iersel, M.W. (2017) Far-red light is needed for efficient photochemistry and photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 209: 115-122.

Zhou, A., Sadik, O.A. (2008) Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. *J. Agric. Food Chem.* 56: 12081-12091.

9. Publikációs lista

9.1. A dolgozat témájához kapcsolódó, bírált folyóirat-közlemények

Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (2018) Selective responses of class III plant peroxidase isoforms to environmentally relevant UV-B doses. *J. Plant Physiol.* 221: 101-106.

Q1, IF₂₀₁₈ = 2.825, IF_{2019,2020} = 3.03

Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (2020) Ultraviolet-B acclimation is supported by functionally heterogeneous phenolic peroxidases. *Sci. Rep.*10:16303.

D1, IF_{2019,2020} = 3.998

Rácz, A., Hideg, É. (2021) Narrow-band 311 nm ultraviolet-B radiation evokes different antioxidant responses from broad-band ultraviolet. *Plants* 10: 1570.

Q1, IF₂₀₂₀ = 3.935

9.2. Egyéb bírált folyóirat-közlemények

Csepregi, K., Teszlák, P., **Rácz, A.**, Czégény, Gy., Kőrösi, L., Hideg, É. (2021) Changes in grapevine berry skin photochemistry may support metabolic responses to postharvest treatment by ultraviolet light. *Photosynthetica* 59(2): 286-293.

Q1, IF₂₀₂₀ = 2.562

9.3. Konferenciaközlemények a dolgozat témájában

Rácz, A., Hideg, É., Czégény, Gy. (April, 2018) Exogenous hydrogen peroxide affects leaf UV-B responses. 2nd Network Meeting of UV4Plants, Bled, Slovenia. ISBN: 978-961-6822-48-0

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É (June, 2018) The role of hydrogen peroxide and its detoxification in acclimation to supplemental UV-B. Plant Biology Europe 2018 Conference, Copenhagen, Denmark. ISBN: 978-879-9627-41-7

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É (April, 2019) Plants's little helper, the effects of hydrogen peroxid pre-treatment. UV-B and Climate Change; impacts on plants and vegetation. UV4Plants Workshop, Cork, Ireland.

Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É. (August, 2019) Leaf antioxidant responses to exogenous and photobiologically generated endogenous hydrogen peroxide. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Hideg, É., Czégény, Gy., Csepregi, K., **Rácz, A.** (August, 2019) Taking sides in the battle of pro-and antioxidants: Diverse roles of phenolic compounds in stressed plants. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Csepregi, K., Czégény, Gy., **Rácz, A.**, Hideg, É. (August, 2019) Proving the stress tolerance of pepper seedlings via manipulating secondary metabolites with UV irradiation. 17th International Congress of Photobiology, 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain.

Rácz, A., Czégény, Gy., Csepregi, K., Hideg, É. (April, 2020) New aspects of leaf phenolic responses to UV. 3rd Network Meeting of UV4Plants, Kiel, Germany.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hideg Éva témavezetőmnek a közös munka során nyújtott támogatásáért, az önzetlen segítségéért, a végtelen türelméért, tanácsaiért és nem utolsósorban annak a lehetőségért, hogy a kutatócsoportja tagjává válhattam.

Köszönöm a Növénybiológiai Tanszék munkatársainak és szakdolgozóinak a mindennapos teendőkben nyújtott rengeteg segítséget.

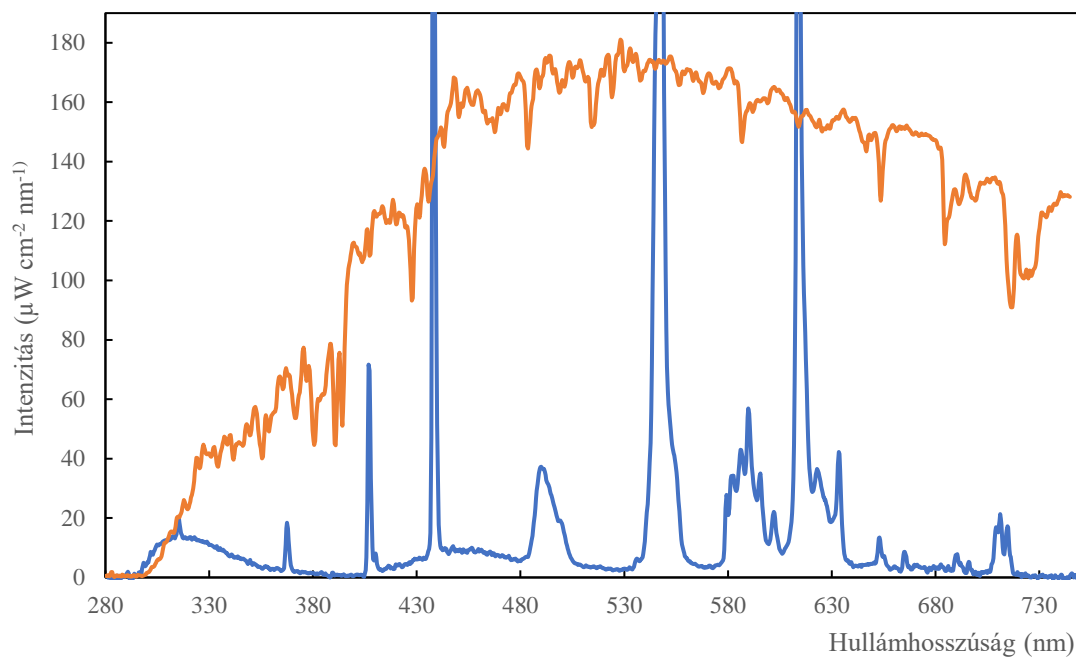
Külön köszönet illeti Dr. Czégény Gyulát, aki engem, mint ex-ökológust bevezetett a laboratóriumi munka rejtelmeibe és megtanított objektív szemmel nézni a biológiai kutatásokat.

Köszönettel tartozom Dr. Csepregi Kristófnak, akinek hála beleshettem az analitikai kutatások menetébe és akivel több közös érdeklődési tevékenységünk által, hozzá járulhattam a tanszék ismeretterjesztő munkájához.

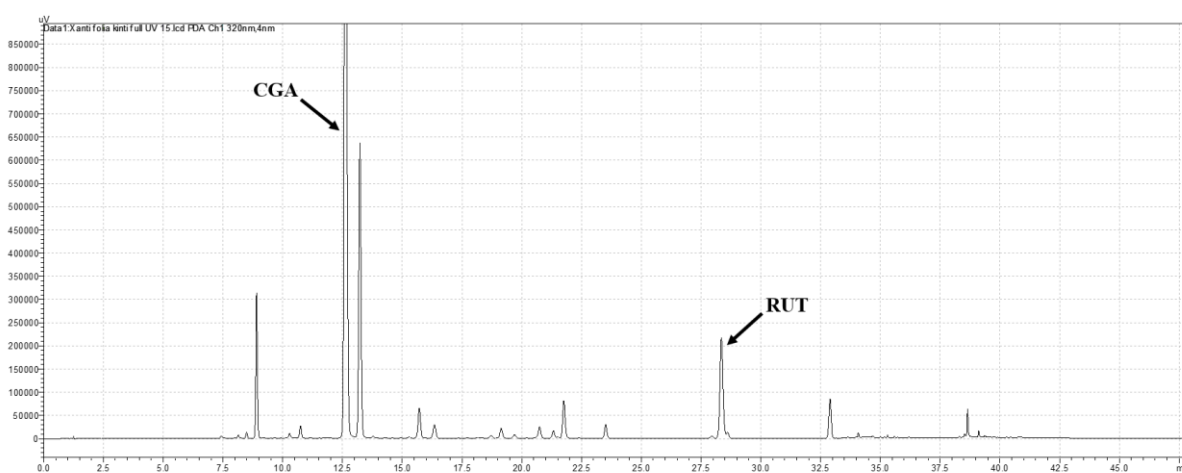
Köszönettel tartozom Kovácsné Balogh Zsuzsannának és Major Gyöngyinek a laboratóriumban eltöltött közös munkaidőért és nem munkaidőért is.

Nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, családomnak és barátaimnak a hosszú éveken át tartó támogatásukat és türelmüket, amivel segítettek céljaim elérésében.

Függelék



Függelék 1. A dolgozatban leírt kísérletekben használt szélesávú UV forrás és a napfény (egy felhőtlen júniusi nap délben) spektrális tulajdonságai. A szélesávú megvilágítás (kék vonal) az I. és II. kísérletben használt körülménynek felel meg, a narancssárga vonal pedig a napfény spektrumát jelöli.



Függelék 2. A II. kísérleti elrendezés UV kezelt dohánymintáinak HPLC kromatogramja a két fő fenolos vegyület csúcsával (CGA, klorogénsav; RUT, quercetin-rutinozid)

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott

név: Rácz Arnold

anyja neve: Sági Andrea

születési hely, idő: Dombóvár, 1991.12.26.

A fenolos peroxidáz enzimek szerepe a növények ultraibolya sugárzáshoz történő alkalmazkodásában

című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola részére.

Témavezető: Dr. Hideg Éva

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet - korábban más doktori iskolában (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be, - fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el, - az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom, - öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor, - értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljeseek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Pécs, 2021. 05. 25.

doktorjelölt aláírása