

Szabad és kötött β -indolilecetsav-formák kvantitatív összehasonlító vizsgálata bab csiránövények szerveiben

Kovács Ilona

JATE Növényélettani és Mikrobiológiai Intézet

A növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában nagy szerepet játszó auxinok kémiai természetére és fiziológiai hatására vonatkozólag az 1930-as évektől kezdve számos kutató végzett vizsgálatokat. A β -indolilecetsavat /IES/ először alacsonyabbrendű /KÖGL és KOSTERMANN 1934, THIMANN /1935/ majd magasabbrendű növényekből izolálták /HAAGENSMIT 1935/ és azóta szinte minden rendszertani kategóriában kimutatták jelenlétét.

Hogy a növényi szervezetekben az auxin kötött állapotban is előfordul, THIMANN és SKOOG /1940/, valamint GORDON /1946/ igazolták. Eleinte még nem volt egyértelmű a szabad és kötött auxin fogalma, de a metodikák tökéletesedése, izotópok alkalmazása, a molekuláris biológiai szemlélet általánossá válása lehetővé tette a ma is használatos meghatározások kialakulását.

Az auxintartalom azon részét, mely etiléttel 2-4 óra alatt, vagy metanollal 8-12 óra alatt teljesen extrahálható a szövetekből, "szabad auxinnak" tekintjük, ezzel szemben a "kötött auxin" különféle molekulákhoz kapcsolódott és csak hidrolizissal vagy enzimolizissal tehető szabaddá. A kötött auxinforma lehet konjugátum, amikor az IES peptid- vagy észterkötéssel kapcsolódik kisebb molekulákhoz /cukor, aminosav/. A szűkebb értelemben vett kötött auxinok illetve auxinkomplexek esetében viszont az IES a sejt makromolekuláris alkotórészeihez /fehérje, RNS/ kapcsolódik. A két típusú kötött auxin megkülönböz-

tetését az extrahálás és izolálás különbözősége, valamint eltérő fiziológiai jelentőségük indokolja.

A növekedés szabályozásában a szabad, mozgásképes IES /BENTLEY 1958/ az aktív auxinforma. A kötött IES jelentőségét az IES immobilizálásában és ezáltal IES koncentrációgrádiensek kialakításában látják /WINTER és THIMANN 1966/. Az IES-konjugátumok lehetnek az auxin raktározott formái, vagy a sejtfalanyagok szintézisében játszanak szerepet /KLÄMBT 1961/. Az IES-makromolekula komplexeknek GALSTON /1964/ információs értéket tulajdonít; s FELLEBERG /1968/ és ARMSTRONG /1966/ is - bár eltérő módon - a fehérjeszintézisben játszott szerepük igazolására törekednek.

Tekintettel a különféle auxinformák jelentőségére, célul tűztük ki a szabad IES, az IES-konjugátumok és a makromolekulához kötött IES mennyiségi analizisét a bab csiranövény egyedfejlődésének korai szakaszában, az egyes eltérő rendeltetésű szervekben. A mag, illetve sziklevel szabad és kötött indolvegyületeinek elemzése esetleges auxinraktározó szerepük eldöntésére szolgál. A gyorsan megnyuló szár és gyökér auxinformáinak vizsgálata viszont módot ad annak megítélésére, hogy a makromolekulához kötött auxin a megnyulásos növekedéssel milyen korrelációban van.

Anyagok és módszerek

1. A kísérleti objektum /Phaseolus vulgaris L. "Fehér gyöngy" bokorbab és csiranövény volt. Az üvegházban, kontrollált körülmények között nevelt növényekből 0, 4, 6 és 8 napos fejlettségi állapotban vettünk mintát a meghatározásokhoz.

2. Az auxinok extrakciója, kvalitatív és kvantitatív meghatározása FLETCHER és ZALIK /1964/ módszerével történt. 100-200 g növényi anyagot hidegen metanollal extraháltunk. Szűrés és centrifugálás után a pigmenteket és zsirokat petroléteres kirázással távolítottuk el. A szabad IES-t és az

IES-konjugátumokat tartalmazó metanolos extraktumot bepároltuk és Sch Sch papíron, izopropanol-ammónia-víz /10:1:1/ szolvenssel kromatografáltuk. Az indolfoltok előhívása Ehrlich reagenssel történt, a foltból kioldott IES mennyiségi mérését Spektrumom 202 fotométerben, 280 nm-nél végeztük.

3. A makromolekulához kötött auxin meghatározása /GALSTON és mtg. 1964/. A metanolos extrakció után visszamaradó szövethomogenizátumot foszfátpufferben /pH 7/ szuszpendáltuk, majd centrifugálás után 10 %-os triklórecetsavval /TCA/ kicsaptuk a makromolekulákat. Ismételt centrifugálás után a csapadékot 2 N NaOH-dal hidrolizáltuk.

Kísérleti eredmények és megbeszélés

1. Szabad IES-tartalom vizsgálata a 0-8 napos bab csiranövények különböző szerveiben.

A csiranövény egyes részeiben mért szabad auxintartalmat az I. táblázat összegezi. Az adatok szerint a sziklelevélben az IES-szint kezdetben igen alacsony, a 4-6. napon jelentősen emelkedik, majd ismét erősen csökken. Az IES-tartalom hasonló csökkenése tapasztalható a 8. napon a gyökérben és szárban is. Ez az erős csökkenés a sziklelevélben a tartaléktápanyagok kiürülésével, a gyökérben és hipokotilben pedig a növekedési folyamat lassubbodásával lehet kapcsolatos. A primér levélben viszont ekkor az IES-szint éppen jelentősen emelkedik, mivel e szerv növekedése csak a 6. napon indul meg, és a 8. napon igen intenzíven folyik. A csiranövények egyes részeinek kora és növekedésintenzitása, valamint akcióképes szabad IES tartalma között tehát határozott parallelitás tapasztalható. A szabad auxin-szint és a meggyulásos növekedés közötti direkt összefüggést, a mi vizsgálatainkhoz hasonlóan, más publikációk is közlik /BRIGGS 1962, FLETCHER és ZALIK 1964, WINTER és THIMANN 1966/. A csiranövény növekedésének intenzív szaka-

szában /4-6. nap/ nő az IES-tartalom is, majd a megnyulás lelassulásakor csökken.

2. Az IES-konjugátumok és a makromolekulákhoz kötött IES mennyiségének vizsgálata a 0-6 napos csiránövény egyes szerveiben.

A kötött auxin mennyiségére és szervekenti eloszlására vonatkozó mérési eredményeket a II. táblázat tartalmazza. Ezen adatok növekedéssel való egybevetésével tanulmányozható a kötött IES-szint és a szervek kora illetve megnyulása közötti összefüggés is.

IES-konjugátumot legnagyobb mennyiségben a sziklevélben találtunk, s ez IES-glukozidnak /G/ bizonyult. Mennyisége, a szabad IES-éhoz hasonlóan, a 4. és 6. napon igen lecsökkent. Ugyancsak IES-glukozid a hipokotilben kimutatható konjugátum is. A gyökérben viszont egy ismeretlen, Ehrlich reagenssel szürke foltot adó konjugátum /X/ fordul elő, mely Avena koleoptil tesztben auxinaktivitást mutatott. IES-aszparaginsavat csak a vizsgálati idő végén, és csak kvalitatíve sikerült kimutatni. A primordiális levélben IES-konjugátum, mérhető mennyiségben, nem volt.

Az IES-konjugátumok élettani szerepét nehéz eldönteni, de irodalmi adatok és saját eredményeink szerint valószínűleg aktív formái az auxinnak. Erre mutat az a körülmény is, hogy mennyiségük és a megnyulásos növekedés között az IES-éhoz hasonló korreláció van. Egy más koncepció szerint /STREET 1963/ az IES-konjugátumok az auxin tartalékformáinak tekinthetők, melyekből az IES felszabadulhat és újra hasznosulhat. Eredményeink nem zárják ki ezt a feltételezést, s valószínűnek tartjuk, hogy pl. a sziklevelekben előforduló IES-glukozidoknak ilyen szerepük lehet.

Makromolekulákhoz kötött IES-t viszonylag legnagyobb mennyiségben a hipokotilben és a primordiális levélben találtunk. A gyökérben IES-komplex aig mutatható ki; a sziklevelekben pedig - bár mérhető szinten előfordul -

mennyisége igen kicsi s így nem valószínű, hogy mint hormonraktározó, szerepet játszana. A gyorsan megnyuló szárban és primér levelekben az IES-komplexek relative magasabb szintje és gyarapodása arra enged következtetni, hogy az auxin makromolekulákhoz való kötődésének a növekedéssel valamiféle kapcsolata lehet.

A makromolekula-IES komplexeknek az egyes kutatók is eltérő fiziológiai jelentőséget tulajdonítanak. Legérdekesebbek azok a hipotézisek, melyek szerint szabályozó szerepet töltenek be a nukleinsav- és protein-anyagcserében. Így pl. GALSTON és mts. /1964/ szerint az RNS-hez kapcsolódott IES vagy ennek egy része, információs értékkel rendelkezik. ARMSTRONG /1966/ hipotézise szerint az IES szabályozó szerepe a magasabbrendű növényekben hasonló az aminosavak baktériumokban betöltött szerepéhez, amennyiben s-RNS-hez való kötődésük az RNS-szintézis indukciójaként szolgál. FELLEMBERG /1968/ pedig DNS-represszálo hatást tulajdonít az IES kötődésének. Ezen elméletek alapján feltehető, hogy az IES-makromolekula komplexek az RNS- és fehérjeszintézis szabályozásán keresztül a növekedésben és fejlődésben is meghatározó jellegűek. A növekedéssel való kapcsolat azonban onnan is eredhet, hogy az auxinkomplex képződés stabilisabbá teszi a nukleinsavakat az enzim elbontással szemben /KAUR-SAWHNEY és mts. 1966/.

A kötött IES élettani szerepe azonban, az eddigi értékes eredmények ellenére, még koránt sincs pontosan tisztázva, és további részletes vizsgálatokat igényel.

Összefoglalás

A bab csiranövény egyes szerveiben 0-8 nap között vizsgáltuk a szabad és kötött IES tartalmat és a különböző IES-formák mennyiségi viszonyainak a növekedéssel való összefüggését.

A szabad IES minden szervben kimutatható, és koncentráció-változása direkt összefüggésben van a szervek korával illetve növekedésintenzitásával.

Az IES-konjugátumok közül IES-glukozidot találtunk a sziklevéiben és a hipokotilban, a gyökérben pedig egy ismeretlen, biológiailag aktív IES-konjugátum fordul elő. A sziklevél IES-glukozidjai az auxin raktározott formái lehetnek. A gyökérben és szárban levő IES-konjugátumok mennyisége a növekedéssel összhangba hozható.

Makromolekulákhoz kötött IES jellemezhető mennyiségben a hipokotilban és primordiális levélben található, a sziklevéiben és gyökérben alig vagy nem mutatható ki. A makromolekula-IES komplexek növekedésben játszott szerepe kérdéses és további vizsgálatokat igényel.

Irodalom

- ARMSTRONG, D.J.: Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 64, 1966.
- Bagi, G.: FARKAS, G.L.: Phytochem., 6, 161, 1967.
- BENTHEY, J.A.: Ann. Rev. Plant Physiol., 9, 47, 1958.
- BRIGGS, W.R.: Am. J. Bot., 49, 1056, 1962.
- FELLENBERG, G.: Planta, 84, 324, 1968.
- FLETCHER, R.A., ZALIK, S.: Plant Physiol., 39, 328, 1964.
- GALSTON, A.W., JACKSON, P., KAUR-SAWHNEY, R., KEFFORD, M.O.,
MEUDT, W.J.: Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci.,
123., 251, 1964.
- GORDON, S.A.: Am. J. Bot., 33, 160, 1946.
- KAUR-SAWHNEY, R., BARA, M., GALSTON, A.W.: Plant Physiol.,
41, Suppl. XLVII. 1966.
- KLAMBT, H.D.: Planta, 56, 618. 1961.
- KÖGL, F.R., KOSTERMANN, Z.: Physiol. Chem. 13, 228, 1935.
- STREET, H.E.: Internat. Soc. Plant Morph., 82, 104, 1963.
- SZALAI, I.: Növényélettani Praktikum, Tankönyvkiadó, Budapest,
1962.
- THIMANN, K.V., SKOOG, F.: Am. J. Bot., 27. 951, 1940.
- WINTER, A., THIMANN, K.V.: Plant Physiol., 41, 335, 1966.

T Á B L Á Z A T O K

I. táblázat: Szabad IES-tartalom a bab csiranövény különböző szerveiben

Nap	IES $\mu\text{g/g}$ friss suly			
	sziklevél	gyökér	hipokotil	primér levél
0	9,6	-	-	-
4	37,0	22,1	-	-
6	56,3	50,4	58,9	22,6
8	12,6	36,4	19,9	37,1

II. táblázat: A kötött IES-tartalom változása a bab csiranövény különböző szerveiben. /Konj. = IES konjugátum, kötött - makromolekulákhoz kapcsolódott IES/

Nap	IES $\mu\text{g/g}$ friss suly							
	sziklevél		gyökér		hipokotil		levél	
	konj.kötött	konj.kötött	konj.kötött	konj.kötött	konj. kötött	konj. kötött	konj. kötött	konj. kötött
0	G 18,0	3,0	-	-	-	-	-	-
4	G 3,0	2,2	X 9,8	-	G 8,2	6,4	-	7,2
6	G 2,0	1,7	X 7,3	1,1	-	-	-	16,4

G = IES-glukozid, X = ismeretlen konjugátum