

**A KALCIUMHIÁNY ÉS A SZUPEROXID ( $O_2^-$ ) TERMELŐDÉSÉNEK ÖSSZEFÜGGÉSE PAPRIKA-BOGYÓ-SZÖVETEKBE**LANTOS FERENC<sup>1</sup>, CSÜLLÖG KITTI<sup>1</sup>, ALBERT RÉKA<sup>2,3</sup>, KÜNSTLER ANDRÁS<sup>2</sup>, KIRÁLY LÓRÁNT<sup>2</sup>

E-mail: lantos@mgk.u-szeged.hu

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem, Növénytudományi és Környezetvédelmi Intézet, Hódmezővásárhely<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet<sup>3</sup>Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság és Élelmiszertudományi Kar

Zöldségnövényeink közül az étkezési paprika (*Capsicum annuum* L.) intenzív termesztése a hazai zöldségajtatás mintegy 50%-át fedi le, termőterülete jelenleg megközelíti a 2000 ha-t. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a paprikafajták érzékenyen reagálnak a megváltozott környezeti hatásokra, több esetben tápanyagforgalmi és tápanyag-hasznosítási hiánytünetek jelennek meg a növény egyes részein. A hazai intenzív – főként a talaj nélküli – paprikahajtatásban az elmúlt tíz évben súlyos termesztéstechnológiai problémát jelent a bogyók kalciumhiány okozta csúcsrothadása. A termésben kialakult elemhiányt nem minden esetben a természetközeg tényleges kalciumhiánya okozza, többnyire a gyökérszóna túlzott fölmelegedése gátolja meg a növényt a kalciumionok felvételében. Ugyancsak bizonyított tény, hogy bizonyos stresszhatások a növényben az ún. reaktív oxigénszarmazékok (pl. szuperoxid,  $O_2^-$  és hidrogén-peroxid,  $H_2O_2$ ) termelődését idézik elő. Ebből kiindulva megfigyeléseket végeztünk a paprikabogyó szövetében kialakult kalciumhiány és a szuperoxid termelődésének összefüggésének vizsgálatára.

**BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

Az étkezési paprika (*Capsicum annuum* L.) intenzív termesztése a hazai zöldségajtatás mintegy 50%-át fedi le, termőterülete jelenleg megközelíti a 2000 ha-t. Erről a területről évente 150-175 ezer tonna paprikát takarítanak be. A nagyobb termésátlag elérése érdekében, illetve az intenzív monokultúra kialakíthatósága miatt, a paprikahajtatásban is egyre nagyobb területet fed le Európában az ún. aggregátonika alkalmazása (LANTOS, 2011). Magyarországon a kőzetgyapoton és kókuszroston történő zöldségajtatás területe megközelíti az 500 ha-t. A paprika nyári hajtatási időszakában gyakran előforduló tápanyaghiány-betegség, a kalciumhiány okozta csúcsrothadás biológiai tünet, de kialakulása sokkal inkább termesztéstechnológiai okokra vezethető vissza (LANTOS et al., 2012). A paprika eladhatóságát, piacosságát leginkább az I. osztályba sorolható minősége határozza meg, amely a fajtára jellemző szín, terméshalmaz, nagyság, pultállóság, illetve az egészséges, ép bőrszövet és az ízanyagok jellegzetessége tekintetében a legmagasabb elvárásoknak is megfelel (ANGELI, 1959; TERBE és SZABÓ, 2003). A biztonságos termesztés érdekében fontos tehát a paprika kalciumfelvételének és -hasznosításának élettani folyamatával összefüggő hiánytünetek tanulmányozása és feltárása. Célkitűzésünk volt az egészséges, valamint a kalciumhiány miatt kialakult csúcsrothadt bogyók szövettani vizsgálata, különös tekintettel az indukálódó szuperoxid ( $O_2^-$ ) meghatározására.

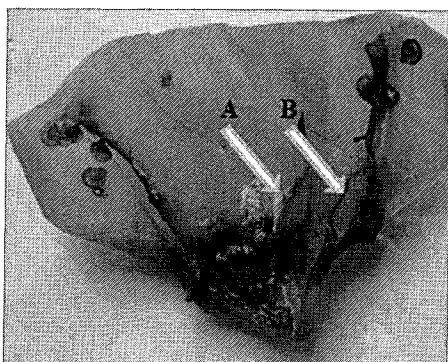
A kalciumionok ( $Ca^{2+}$ ) sejten belüli koncentrációja viszonylag alacsony, a környezet  $Ca^{2+}$  koncentrációjának mindössze 1/100-ad része. A sejten belüli magasabb koncentráció megváltoztatná az enzimek térbeli szerkezetét, amely irreverzibilis károsító folyamatokat indítana el (TAKAHASHI et al., 1999). Mindezek ellenére a kalciumnak igen jelentős szerepe van a környezeti hatások változásának kiküszöbölésében, mivel a környezeti hatásokat közvetítő hormonok a kalcium segítségével biztosítják az anyagcsere-folyamatok zavartalan működését (LAMBERT, 1999). A kalcium hiányának tünetei legelőször a fiatal differenciálódó szövetekben alakulnak ki. A kalciumhiányos paprikabogyón a csúcshoz közel besüppedő, barna nekrotikus folt, ún. csúcsrothadás alakul ki (LANTOS, 2011).

A reaktív oxigénszarmazékok (ROS) növényi sejten belüli képződésének mennyiségi viszonyai napjainkban még nem teljesen tisztázottak. Nagy koncentrációban a ROS vegyületek toxikus hatásúak, amennyiben nem specifikus módon reagálnak a DNS-, fehérje-, lipid- vagy szénhidrát-molekulákkal. Szabályozott körülmények között keletkezve célzott szerkezeti változásokat hozhatnak létre a sejtekben (ENYEDI, 2011), illetve kis koncentrációban a növényi stresszvédelemért felelős folyamatokat aktiválják (lásd pl. LEVINE et al., 1994). Az egyik legjelentősebb ROS, a  $H_2O_2$ , fontos szerepet játszhat a növényi sejtek kalciumháztartásának szabályozásában is. TAKEDA et al.

(2008) kutatásai igazolták, hogy az *Arabidopsis thaliana* gyökérszörei károsodnak a mesterségesen létrehozott kalciumhiány során, amely szoros összefüggést mutat a kalciumfüggő RHD2 (Root Hair Defective 2) enzim hiányával. Az RHD2 aktiválódása ugyanakkor fokozta a  $H_2O_2$  képződését, amely pozitív visszacsatolással tovább növelte a  $Ca^{2+}$  felvételét. A növényi  $H_2O_2$  nagy része egy másik ROS vegyületből, a szuperoxidból ( $O_2^{\cdot-}$ ) keletkezik, a  $O_2^{\cdot-}$ -termeléséért pedig elsősorban egy sejtmembránhoz kötött enzim, a NADPH-oxidáz felelős. Dohányban (*Nicotiana tabacum*), illetve *A. thaliana*-ban a NADPH-oxidázt a  $Ca^{2+}$  közvetlenül és egy  $Ca^{2+}$ -függő kinázon (CPK5) keresztül közvetve is képes aktiválni (SAGI és FLUHR, 2006; DUBIELLA et al., 2013). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a  $Ca^{2+}$  fontos szerepet játszik a ROS vegyületek képződésében, és a növényben mérhető ROS-koncentráció a  $Ca^{2+}$  szint indikátora lehet.

## ■ ANYAG ÉS MÓDSZER

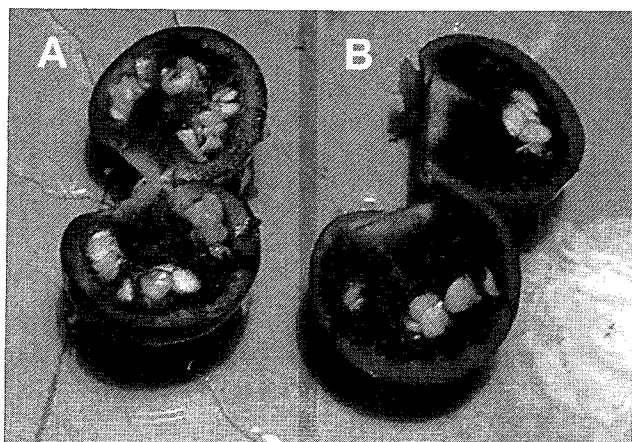
A laboratóriumi vizsgálatainkat a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpontjának Növényvédelmi Intézetében végeztük el 2015 tavaszi paprikahajtatási időszakában. A célkitűzésünkben felvázolt anyagösszefüggés-vizsgálatokhoz vizuális növénydiagnózissal meghatározott, ugyanazon növényről származó, egy kalciumhiány okozta csúcsrothadt és egy egészséges borszövetű, 'Szentesi piacos' fajtájú, csipős paprikát vizsgáltunk (1-2. ábra). Kontrollvizsgálatainkat egészséges termésű 'Szentesi cseresznyepaprika' (*Capsicum annum*



1. ÁBRA Az NBT (nitro blue tetrazolium) kezelés eredménye kalciumhiányos paprikabogyó metszetén (A-B: szövetrothadás tünetek)



2. ÁBRA Az NBT (nitro blue tetrazolium) kezelés eredménye egészséges paprikabogyó metszetén



3. ÁBRA Az NBT (nitro blue tetrazolium) kezelés eredménye kalciumhiánytól mentes cseresznyepaprika-bogyó metszetén (A félretett állapot, B teljes érés)

*convar. cerasiforme* L.) fajtával végeztük. A terméseket először a teljes, biológiai érés (A), illetve a zöld színű félérett állapotban (B) is megvizsgáltuk (3. ábra). A növényi szövetekben indukálódó  $O_2^{\cdot-}$  kimutatására ún. NBT (nitro blue tetrazolium) festési eljárást alkalmaztunk, a korábban leírt módszer (ÁDÁM et al., 1989; HÜCKELHOVEN et al., 1999) kis változtatásával. A csúcsrothadt és az egészséges termésekbe injekciós tűvel 50 ml, 10 mM  $NaPO_4$ -ban (pH 7,8) feloldott 50 mg NBT festékanyagból 6-6 ml/bogyó oldatot fecskendeztünk. Ezt követően 12 óra elteltével a bogyókból metszeteket készítettünk, melyeket a klorofill kivonásához 48 órára ún. szintelenítő oldatba (800 ml etanol [ $C_2H_6O$ ], 200 ml kloroform [ $CHCl_3$ ], 1,5 g triklór-ecetsav [ $CCl_3COOH$ ]) helyeztünk. Megfigyeléseinket két ismétlésben hajtottuk végre. Az eljárás végén a kéken elszíneződött területeken egyértelműen meghatározható volt a  $O_2^{\cdot-}$  jelenléte (az NBT és a  $O_2^{\cdot-}$  reakciójából formazán keletkezik), a szintelen területeken pedig annak hiánya.

## EREDMÉNYEK

A kalciumhiány okozta csúcsrothadás esetében az NBT festési eljárást követően a metszett bogyószelet rothadt szövetei körül, illetve az egészséges szövetrészekben egyáltalán nem vagy alig volt tapasztalható a  $O_2^{\cdot-}$  jelenléte utaló kék elszíneződés (1. ábra). A rothadt szövetfelületet klorofilltól mentes, enyhén sárga színű szövetek határolták. Ugyanakkor a teljesen egészséges bőrszövettel rendelkező paprikabogyóból készített metszet egész területén jól felismerhető, kék elszíneződések voltak láthatók. Mivel az NBT-vel a  $O_2^{\cdot-}$  könnyen reagál, eredményeink alapján megállapítható volt, hogy a kalciumhiányos szövetekben és azok körül alig termelődik  $O_2^{\cdot-}$ . Ugyanakkor az egészséges bogyó szöveteiben, melyek nem szenvedtek  $Ca^{2+}$ -hiányt, a kéken elszíneződött területek erős  $O_2^{\cdot-}$  felhalmozódásra utaltak (2. ábra). A cseresznyepaprika egészséges terméseinek festését követően a félérett termés esetében erős, a teljes érés állapotában lévő termés esetében igen erős kék elszíneződéseket tapasztaltunk (3. ábra).

## MEGVITATÁS

Laboratóriumi vizsgálatunk eredményei egyértelműen igazolták a  $Ca^{2+}$  jelenlétének, és a  $O_2^{\cdot-}$  termelődésének összefüggését a természetes körülmények között kialakult kalcium hiánytünetek esetében is. GILROY et al. (2014) megállapították, hogy az *Arabidopsis thaliana* növény sejtjeiben a reaktív oxigénszármazékok (ROS) és a  $Ca^{2+}$  között nyomon követhető, sejtről-sejtre terjedő jelátvitel alakul ki. Állati és növényi szövetekben a  $Ca^{2+}$  közvetlenül vagy közvetve szabályozza a reaktív oxigénszármazékok, így például a  $O_2^{\cdot-}$  termelődését. Ezt a folyamatot nevezik kalcium-indukált ROS termelésnek (CIRP). KOMÁRY (2012) kutatásai bizonyítják, hogy emberi sejtek mitokondriumaiban a  $Ca^{2+}$  hatással van a ROS képződésére, azonban a paprikában e mechanizmust több enzim, a bogyó érettségi állapota, valamint a kalcium koncentrációja is befolyásolhatja. Magasabb rendű növények ROS termelését a  $Ca^{2+}$  közvetlenül és egy  $Ca^{2+}$ -függő kinázon (CPK5) keresztül közvetve is képes aktiválni (SAGI és FLUHR, 2006; DUBIELLA et al., 2013).

A  $Ca^{2+}$  és a  $O_2^{\cdot-}$  termelődés paprikában megfigyelt összefüggésének alaposabb tisztázásához, a pontosan meghatározott biokémiai leíráshoz több megfigyelésre lesz még szükségünk a jövőben. Eredményeink alapján azonban a paprikabogyókban mérhető ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ) felhalmozódás csökkenése, illetve elmaradása a kalciumhiány megbízható indikátorának tűnik.

## THE RELATIONSHIP OF CALCIUM DEFICIENCY AND SUPEROXIDE ( $O_2^{\cdot-}$ ) ACCUMULATION IN PEPPER FRUIT TISSUES

LANTOS, F.<sup>1</sup>, CSÜLLÖG, K.<sup>1,2</sup>, ALBERT, R.<sup>3</sup>, KÜNSTLER, A.<sup>2</sup>, KIRÁLY, L.<sup>2</sup>

E-mail: lantos@mgk.u-szeged.hu

<sup>1</sup>University of Szeged, Institute of Plant Sciences and Environmental Protection, Hódmezővásárhely

<sup>2</sup>Hungarian Academy of Sciences, Centre for Agricultural Research, Plant Protection Institute

<sup>3</sup>University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences

## SUMMARY

The intensive forcing of sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) corresponds to approximately 50% of Hungarian vegetable cultivation, currently involving about 2000 hectares. As such, sweet pepper classifies as a major Hungarian vegetable crop. A number of research papers have shown that the sensitivity of sweet peppers to environmental changes has resulted in the appearance of symptoms of nutrient deficiency. These nutrient deficiency symptoms appear on different parts of the plant. The calcium deficiency of sweet peppers (blossom end rot) has been the most serious problem for large scale producers in Hungary over the last ten years, especially in forcing technology which does not use soil. But the symptom of blossom end rot is not always caused by the actual calcium deficiency of the growing medium. Usually it is the consequence of the overheating of the root zone which blocks the calcium uptake of sweet pepper. It is also a proven fact that certain stresses induce the production of reactive oxygen species (ROS, e.g. superoxide,  $O_2^-$  and hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) in plants. Therefore, observations were performed regarding the relationship between the calcium deficiency in pepper fruit tissues and the production of superoxide.

## TABLES AND FIGURES

**FIGURE 1.** Results of NBT (nitro blue tetrazolium) treatment on a segment of calcium deficient sweet pepper fruit. (symptoms of calcium deficiency, A-B)

**FIGURE 2.** Results of NBT (nitro blue tetrazolium) treatment on a segment of healthy sweet pepper fruit.

**FIGURE 3.** Results of NBT (nitro blue tetrazolium) treatment on segments of cherry pepper fruit. (A full ripeness, B unripe status)

## IRODALOMJEGYZÉK

- ANGELI L. (1959): Paprikatermesztés. Mezőgazdasági Kiadó Budapest. 13-21.
- ÁDÁM A.L., FARKAS T., SOMLYAI G., HEVESI M., KIRÁLY Z. (1989): Consequence of  $O_2^-$  generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34: 13-26.
- DUBIELLA U., SEYBOLD H., DURIAN G., KOMANDERA E., LASSIGA R., WITTEA C.P., SCHULZEB W.X., ROMEIS T. (2013): Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 8744-8749.
- ENYEDI B. (2011): Új módszerek emlős sejtek hidrogén-peroxid termelő mechanizmusainak vizsgálatára. Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola Budapest. PhD értekezés 2.
- GILROY S., SUZUKI N., MILLER G., CHOI W.G., TOYOTA M., DEVIREDDY A.R., MITTLER R. (2014): A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science.* 19: 623-630.
- HÜCKELHOVEN R., FODOR J., PREIS C., KOGEL K-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with  $H_2O_2$  but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1251-1260.
- KOMÁRY ZS. (2012): A kalcium hatása az izolált mitokondriumok reaktív oxigénszarmazék képzésére. Semmelweis Egyetem Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola Budapest. PhD értekezés. 81.
- LAMBERT D. (1999): Calcium Signalling Protocols. *Methods Mol. Biol.* 144.
- LANTOS F. (2011): A kalciumhiány kialakulásának és hiánytüneteinek vizsgálata a paprikatermesztésben. Szent István Egyetem Növény-tudományi Doktori Iskola Gödöllő. PhD értekezés. 3.
- LANTOS F., MIKE K., MONOSTORI T., HELYES L. (2012): Evaluation of calcium deficiency symptoms in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits via visual plant diagnosis and microscopic examination. *Acta Horticulturae* 938: 283-289.
- LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R., LAMB C. (1994):  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- SAGI M., FLUHR R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141: 336-340.
- TAKAHASHI A., CHAMACO, LECHLEITER P., HERMAN, B. (1999): Measurements of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79: 1089-1125.
- TAKEDA S., GAPPER C., KAYA H., BELL E., KUCHITSU H., DOLAN L. (2008): Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cell. *Science* 319: 1241-1244.
- TERBE I., SZABÓ ZS. (2003): A paprika csúcsrothadásos betegségét kiváltó okok megszüntetése és megelőzése. *Kertgazdaság.* 35 (1): 100-104.