

Doktori (Ph D) értekezés tézisei

**A FORMALDEHID ÉS TERMÉSZETES GENERÁTORAI,
MINT KÖRNYEZETI HATÁSOK JELZŐ MOLEKULÁI
A CSERTÖLGY KORAI ONTOGENEZISÉBEN**

Németh Zsolt István

**Sopron
2002**

I. Kutatás tárgya és célkitűzései

A magyarországi erdőgazdálkodás távlati fejlődésében a tervezett és a folyamatban lévő erdőtelepítések meghatározó szerepet fognak betölteni. A következő 50 évben nagy jelentőségűvé válik a veszteséggel művelhető ill. parlagon hagyott mezőgazdasági termőföldek erdősítése. Az erdőművelésbe kerülő közel 700 ezer ha terület jelentősen növelni fogja a szaporító anyag iránti keresletet, ami az ellenőrzött, minőségi és mennyiségi csemetetermesztést előtérbe helyezi.

A tölgy makk tárolásával és a csírázás folyamatának vizsgálatával a Nyugat-Magyarországi Egyetem Erdőművelés Tanszéke 1993 óta foglalkozik. Az első vizsgálatok során kapott eredmények értékelésénél nyilvánvalóvá vált, hogy komplex biológiai és biokémiai alapismeretek, valamint analitikai kémiai módszerek alkalmazása nélkül e téma kutatása intenzíven nem művelhető. Ez indokolta a Kémiai Intézet, az Erdőművelés Tanszék és a célcsoportos támogatást kezelő Állami Erdészeti Szolgálatnak a együttműködését e kutatási témában.

A vizsgálatok elvégzésére a csert választottuk, mint rendszeresen termő fafajt, ami biztosította az azonos származási körzetből, termőhelyről gyűjtött friss makk vizsgálatát.

A vizsgálatok célja: **(a)** a csertölgy korai ontogenezisének jellemzése az endogén formaldehid ill. formaldehid generátorok tartalmaival, **(b)** és a környezeti tényezők hatásainak nyomon követése a csermakk endogén formaldehid tartalmának változásain keresztül.

II. Vizsgálati módszerek és anyagok

Csíráztatási kísérletek

Friss makkokat csíráztattunk, származási körzetük: Kisalföldi Erdészeti RT. (Vitnyéd, 1994-2001). A magvakat csíráztatás előtt kezeltük (DITHANE M45 0,5 % + Chinoin Fundazol 0,1 %).

Csíráztató eszköz: Jacobsen-asztal QB-117/3 (Gyártó: Labor MIM-Esztergom)

Csíráztatási hőmérséklet: 22-23°C;

Megvilágítás: 750 Lux /16 h naponta

Analitikai technika

Az endogén formaldehid tartalom meghatározásához használt nagy teljesítményű folyadékkromatográf (HPLC) Gynkotek M 480 típusú gradiens pumpából, TOSOH 6040 UV detektorból (260 nm) és 20 µl mintabemérő hurokkal rendelkező Rheodyne 8125 injektorból, mint részegységekből állt. Az endogén formaldehid dimedonnal képezett származékát (formaldemeton) ChromSpher C 18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) típusú oszlopon választottuk el. Az elválasztásokhoz 0,01 M HCl oldat és metanol (76:24 v/v; pH = 2.68) elegyét használtuk. A formaldehid generátor vegyületek kimutatása LASERMAT 2000 típusú (FinniganMat Ltd., Hemel Hempstead, Nagybritannia) MALDI-MS tömeganalizátorral történt.

III. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. A kísérletek tervezéséhez tanulmányoztam a formaldehid és a dimedon származékképző reakcióját. A reakcióban keletkező származék vegyület (formaldemeton) elválasztására egy fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztást (RP-HPLC) dolgoztam ki. Ez az új analitikai módszer - az egyedfejlődési állapotoktól függetlenül - alkalmasnak bizonyult a nyugalmi állapotú és a csírázó csermakk formaldehid tartalmának gyors és pontos meghatározására.

A metanolos minta-előkészítés (dimedon formaldehid generátorokkal, metanolban végbemenő reakciója) kinetikai modellezésével kimutattam, hogy a minta-előkészítési reakció másodrendű kinetikát követ, de a vizes közegtől eltérő sebességi állandó értékek mellett. A metanol jelenléte, a vizes közegben tapasztalható képest a reakció mechanizmusát nem módosítja. Meghatároztam a minta-előkészítés pH-tól és koncentrációtól való idő függését.

2. Módszert dolgoztam ki a sziklevél extraktum kis molekulatömegű, formaldehid generátorokat is magában foglaló komponenseinek MALDI analízisére.

3. A csíráztatási kísérletekben a makk tömege és sűrűsége között lineáris függvénykapcsolatot tapasztaltam. A csírázás makktömegre gyakorolt hatásának vizsgálatában megállapítottam, hogy a makk egyedfejlődésére mérettől független, fajlagos vízfelvétel jellemző. A tömegnövekedés és az azt kísérő sűrűségcsökkenés lineáris korrelációja azt jelzi, hogy az egységnyi relatív tömegnövekedésre eső sűrűségcsökkenés a csírázó

csertölgymakk általános biológiai sajátossága. Bizonyítottam, hogy a csertölgymakk csírázását kísérő fizikai tulajdonságok determinisztikus változása a biológiai rendszer lényegéből fakad. Ezen felismerés alapján az egyedfejlődési állapotokat relatív tömeg (nyugalmi állapothoz viszonyított tömeg) és sűrűség értékekkel definiáltam. Értékeik egyértelműen jellemzik a csírázási állapotot. A csírázó csertölgymakk tömege és sűrűsége alapján tervezett mintavétellel az azonos fejlődési állapotú makkegyedek kiválaszthatók. Ily módon a csíráztatási kísérletek egymással statisztikailag összevethetők.

Az egyedfejlődési állapot relatív tömeg és sűrűség értékekkel történő definiálása lehetővé tette az endogén formaldehid tartalomban környezeti hatásokra bekövetkező periodikus (ciklikus) változás leképezését és bizonyítását.

4. Az endogén formaldehid tartalmának emelkedésén keresztül megállapítottam, hogy a csíranövény szöveti struktúráinak kialakulását a demetilezési folyamatok aktivitás-növekedése jellemzi.

A makk imbibícióban a kataláz aktivitás és az endogén formaldehid tartalom ellentétes irányban változik. Az endogén formaldehid tartalom emelkedése a sziklevelek kataláz aktivitásának csökkenése mellett valósul meg. A változások tendenciájában tapasztalható kapcsolat ellenére erős statisztikai korreláció nem értelmezhető a két paraméter között. A kataláz aktivitás csökkenését nem csak a demetilezés fokozódása, hanem egyéb hidrogén-peroxid szubsztrátú metabolizmusok (pl. a szénhidrátok oxidációja) együttesen indukálják.

A demetilezés intenzívebbé válása hozzájárul a redukciós potenciál csökkenéséhez.

5. A tárolás hatásának vizsgálatában azt tapasztaltam, hogy a nyugalmi állapotú makk endogén formaldehid tartalma a vegetációs időszak kezdetéig emelkedik, majd azt követően csökken. A csíráztatott makk esetében márciusig - az alkalmazott analitikai módszerrel - nem érzékelhető az endogén formaldehid szint szignifikáns változása. Ezt követően értéke júliusra szignifikánsan lecsökken.

Tendenciaként megállapítható, hogy a nyugalmi állapotú makk a vegetáció kezdetekor maximális endogén formaldehid képző potenciállal rendelkezik. A tavaszi vetésen túli tárolás során az endogén formaldehid szint csökken, ami a hosszabb időtartamú makk-tárolás alatt bekövetkező minőség csökkenéssel kapcsolatban lehet.

6. Hidegsokk hatására, a biotikus stressz alarm fáziséhoz hasonlóan, de elmentés kitéréssel a csermakk endogén formaldehid tartalma oszcillál, majd néhány nap elteltével, a rezisztencia tartományban a kiindulásinál magasabb értéken állandósul.

7. Több órás hőhatás eredményeként az endogén formaldehid tartalom a terméshéj nélküli, fóliába csomagolt makkoknál magasabb szintre áll be. Az alarm reakcióban a formaldehid tartalom ez esetben is periodikusan változik.

Az endogén formaldehid tartalom alarm fázisban jelentkező két helyi minimuma egymástól független, de a hőterhelés által fáziseltéréssel kiváltott stresszhatás eredménye. Feltételezésünk alapján az első formaldehid minimum a megemelt hőmérsékletre, a második az egyre jelentősebbé váló vízvesztésre (kiszáradásra) adott alarm-válasz. A csírázó magvak biokémiai jellemzőinek stressz hatására történő változása mellett a cser makk fizikai paramétereiben is

szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk. A stressz bekövetkezését megelőzően a makk csírázását összehangolt relatív tömegnövekedés és a sziklevek sűrűségcsökkenése jellemzi. A stresszesemény bekövetkezésekor a csírázó makk tömeg- és sűrűség változása közötti korreláció megszűnik.

8. Dimedon hatására (kémiai stressz) megemelkedik az endogén formaldehid tartalom. A dimedon *in vivo* dózisára a sziklevekben a demetilezés fokozódik. A dimedonos stressz megnöveli a csírázó csertölgy makk endogén formaldehid képző potenciálját.

9. Az időkésleltetés nélküli stresszválaszban a demetilezési vagy a metilezési folyamatok válnak meghatározóvá. A folyamat stressz-tényezők általi zavarása előidézi az endogén formaldehidtartalom periodikus ingadozását. A formaldehidszint növekvő amplitúdójú oszcillációja azt jelzi, hogy a sejtek a belső szabályozási mechanizmusaikkal egyre nehezebben képesek irányítani a transzmetilezési folyamatokat.

IV. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Kísérleti eredményeinkből következik, hogy az imbibíció alatti makk életképességéről kémiai és fizikai paraméterek mérésén keresztül is információ nyerhető. A csírázó makk biokémiai és fizikai jellemzőinek tapasztalt determinisztikus változása új, alternatív, csíráképeségi-életképességi vizsgálat alapját képezheti.

V. A doktori értekezés témakörében megjelent közlemények és előadások

Közlemények:

1. Varga Sz., Albert L., Németh Zs.I. (1997): A formaldehid metabolizmus vizsgálata a cser makk csírázásának kezdeti szakaszában, *Erdő-, vad- és fagazdálkodás*, (szerk. Bondor A., Solymos R.), MTA Agrártudományok Osztálya, Budapest, pp. 79-86.
2. L. Albert, Zs. I. Németh, T. Barna, Sz. Varga, E. Tyihák, Measurement of endogenous formaldehyde in the early development stages of European Turkey oak (*Quercus cerris* L.), *Phytochemical Analysis*, **9**, (1998), 227.
3. L. Albert, Zs.I. Németh, Sz. Varga, The effect of heat shock on the formaldehyde cycle in germinating acorns of European Turkey oak, *Acta Biologica Hungarica*, **49 (2-4)**, (1998), 363.
4. L. Albert, Zs.I. Németh, Sz. Varga, Changes in formaldehyde contents of germinating acorns of *Quercus cerris* L. under low temperature stress conditions, *Acta Biologica Hungarica*, **49 (2-4)**, (1998), 369.
5. Németh Zs. I., Albert L., Varga Sz. (1999): A csírázó csertölgy makkok stressz jelenségeinek vizsgálata. Kutatói nap 1998-1999 - Tudományos eredmények a gyakorlatban, (szerk. Horváth B.), *Alföldi Erdőkért Egyesület*, Sopron, pp.81-90.

Előadások:

6. L. Albert, T. Barna, Zs. I. Németh, Sz. Varga (1997): Change of formaldehyde and some betaines in parts of *Quercus cerris* L. at abiotic stress conditions, "*Stress of Life*". *International Congress of Stress*, Budapest, július 1-5.
7. L. Albert, Zs. I. Németh, Sz. Varga, T. Barna (1997): The cold shock in the early stage of European Turkey oak (*Quercus cerris* L.), "*Stress of Life*". *International Congress of Stress*, Budapest, július 1-5.

- 8.** Zs. I. Németh, L. Albert (1997): Identification of endogenous formaldehyde in different biological samples by MALDI-MS, "*Stress of Life*". *International Congress of Stress*, Budapest, július 1-5.
- 9.** Zs. I. Németh, L. Albert, Sz. Varga (1998): Change of formaldehyde and some betaines in the germinating acorns of European Turkey oak (*Quercus cerris* L.) at low temperature stress conditions, *4th International Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS*, Budapest, július 1-4.
- 10.** L. Albert, **Zs.I. Németh**, Sz. Varga (1998): Effect of the heat shock for formaldehyde cycle in germinating accorns of European Turkey oak (*Quercus cerris* L.), *4th International Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS*, Budapest, július 1-4.
- 11.** E. Tyihák, Zs. I. Németh, L. Albert, Zs. Király-Véghely, Gy. Kátay : Advantages of combination of MALDI MS, HPLC and OPLC in Biochemical Analysis. *Balaton Symposium ' 99 on high-performance separation methods, September 1-3, 1999, Siófok*.
- 12.** Zs. I. Németh, T. Hofmann, L. Albert, E. Tyihák, Analogies and differences in the reactions of dimedone with formaldehyde and special fromaldehyde generators, *5th International, Jubilee Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS*, October 9-13, 2000 Sopron, Hungary.
- 13.** Zs. I. Németh, L. Albert, Sz. Varga, M. Balaskó, Changes of catalase activity and endogenous formaldehyde level in the germinating acorns of *Quercus cerris* L., *5th International, Jubilee Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS*, October 9-13, 2000 Sopron, Hungary.
- 14.** Zs. I. Németh, L. Albert, Sz. Varga, Relationship between dimedone shock and formaldehyde level in the germinating acorns of European Turkey oak, *5th International, Jubilee Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS*, October 9-13, 2000 Sopron, Hungary.