Az etilén státusz szerepe a paradicsom sóstressz akklimatizációjában

Doktori (Ph.D.) értekezés

Borbély Péter Gábor

Témavezető:

Dr. Görgényi Miklósné Dr. *Habil.* Tari Irma

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola
Növénybiológiai Tanszék
SZTE TTIK

Szeged

2019

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 Az etilén jelentősége a növényekben	7
2.1.1. Az etilén bioszintézise és jelátvittele – az általános modellek és a paradicsomban megfigyelhető sajátosságok	7
2.1.2. Az etilén szerepe a fotoszintézis szabályozásában.....	14
2.1.3. Reaktív oxigén- és nitrogénformák a növényekben, kölcsönhatásuk az etilénnel	20
2.1.4. Az etilén prekursora, az 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC)	25
2.2. A sóstressz, mint az egyik fő abiotikus stresszfaktor	27
2.2.1. A sóstressz-specifikus növényélettani hatások	28
2.2.2. A paradicsom sóstressz reakciói	33
2.2.3. A sóstressz és az etilén hormon kapcsolata	33
3. Célkitűzések	36
4. Anyagok és módszerek	37
4.1 Felhasznált növényi anyag, nevelési körülmények és kísérleti elrendezések	37
4.3 Növekedési paraméterek meghatározása.....	40
4.4 A növényi részek etilén kibocsátásának meghatározása	40
4.5 Vízháztartással kapcsolatos vizsgálatok.....	40
4.6 Az elemtartalmak meghatározása	41
4.7 Fluoreszcens mikroszkópiás mérések	41
4.8 A levélszövetek H_2O_2 és $O_2^{\cdot -}$ akkumulációjának monitorozása.....	42
4.9 A pigmenttartalmak meghatározása.....	43
4.10 A levelek fotoszintetikus aktivitásának vizsgálata.....	43
4.10 Cukortartalmak meghatározása	44
4.11 A proteolitikus aktivitás meghatározása.....	46
4.12 Antioxidáns enzimek aktivitásának monitorozása	46
4.13 Egyes antioxidáns izoenzimek és a NADPH-oxidáz génexpressziójának vizsgálata.....	47
4.14 A sejthalál mértékének megállapítása	48
4.15 Statisztikai analízis	49
5. Eredmények	49
5.1. A gyökérzóna megnövekedett ACC tartalmának hatása paradicsomnövényekre, egyéb specifikus stresszfaktor alkalmazása nélkül	49
5.1.1. Az ET-termelésben, a növekedésben és az iontartalmakban bekövetkező változások exogén ACC kezelés hatására.....	49
5.1.2. Exogén ACC kezelés okozta változások a gyökércsúcsok, valamint a kifejelett, nem öregedő levelek ROS és RNF produkciójában.....	51

5.1.3. A gyökérszónában kialakuló ACC többlet-indukálta változások a paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitásában.....	52
5.2. Paradicsomgyökerek só-indukálta, etilén függő válaszai.....	56
5.2.1. Az ET jelátvitel szerepe a gyökerek sótoleranciájában, ROF és RNF produkciójában, ET receptor mutáns, Never ripe paradicsomnövényekben.....	56
5.3. A paradicsomnövények etilén státuszától függő változások tolerálható és letális sóstressz során.....	60
5.3.1. A só-indukált etilén produkció, a növekedés, a vízháztartás és a klorofill- valamint a Na ⁺ és K ⁺ tartalmak változása különböző ET státuszú növényekben	60
5.3.2. A ROF és RNF akkumuláció só-indukált válaszainak időfüggése megemelt ET produkciójú paradicsomnövényekben	65
5.3.3 A O ₂ ⁻ és a H ₂ O ₂ lebontásában szerepet játszó antioxidáns enzimek só-indukált aktivitásváltozásainak ET- és időfüggése	68
5.3.4 A O ₂ ⁻ és a H ₂ O ₂ lebontásáért felelős antioxidáns enzimek, valamint az <i>SIRBOH1</i> expresszió só-indukált válaszainak ET- és időfüggése	71
5.3.4. A fotoszintézis és az összcukor-, valamint keményítőtartalmak só-indukált válaszainak ET- és időfüggése	75
6. Az eredmények értékelése.....	82
6.1.1. A gyökérkezelésként adott ACC többlet egy koncentrációs küszöbértéket meghaladva indukál szignifikáns ET emissziót, azonban ennek elérése nélkül is fiziológiai válaszokat vált ki.	82
6.1.2. Az exogén ACC kezelés fokozta a H ₂ O ₂ felhalmozódást, koncentráció-függő módon befolyásolja a NO és a ONOO ⁻ akkumulációs mintázatát.	83
6.1.3. A gyökérszónában mutakozó ACC többlet a koncentráció és az expozíciós idő függvényében serkentheti vagy gátolhatja a fotoszintézist és befolyásolja a két fotokémiai rendszer működését.	84
6.2.1. Az ET receptor mutáns <i>Never ripe</i> paradicsomgyökerek érzékenyebbek a sóstresszre: a gyökércsúcsok már szubletális stressz esetén is mutatják a sejthalál jellegzetes fiziológiai tüneteit.....	87
6.3.1. Az exogén ACC előkezelés eltérő módon befolyásolja a levél és a gyökér ET produkcióját sóstressz során, a levelek ET státusza szabályozza a vízháztartást és a klorofilok lebomlását szupraoptimális sókoncentrációkon	90
6.3.2. A növények ET státusza szabályozza a ROF és RNF molekulák akkumulációját a sóstressz kialakulása során.....	93
6.3.3. Az ET státusz befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást és a cukorháztartást paradicsomnövényekben sóstressz alatt	104
7. Összefoglalás.....	114
8. Summary.....	120
9. Irodalomjegyzék	125
10. Publikációs lista.....	136
11. Nyilatkozat	139
12. Köszönetnyilvánítás.....	140
13. Mellékletek.....	141

Rövidítések jegyzéke

ABA	Abszcizinsav
AC	Ailsa Craig paradicsom fajta
ACC	1-aminociklopropán-1-karbonsav
ACS	ACC szintáz (EC 4.4.1.14)
ACO	ACC oxidáz (EC 1.14.17.4)
ACCD	ACC deamináz (EC. 4.1.99.4)
A _N	Nettó CO ₂ asszimiláció
ASC	Aszkorbát (redukált)
ARGOS	AUXIN REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE, az ETR receptorok lebontásában szerepet játszó protein
APX	Aszkorbát-peroxidáz (EC 1.11.1.11)
CBC	Calvin-Benson ciklus
CDPK	Ciklin-függő protein kináz
CET	Ciklikus elektrontranszport
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE, Ser/Thre kináz
Cu/ZnSOD	Réz/cink-szuperoxid-dizmutáz
DAF-2DA	4,5- diaminofluoreszcein-diacetát
EIN2	ETHYLENE INSENSITIVE2, etilén jelátviteli komponens
EIN3/EIL1-4	ETHYLENE INSENSITIVE3/EIN3 LIKE) transzkripciós faktorok
EL	Ionkieresztés (electrolyte leakage)
EOL1/2	E3 ligáz
ER	Endoplazmatikus retikulum
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR, transzkripciós faktor család
ET	Etilén
ETO1	ETHYLENE OVERPRODUCER1 E3 ligáz
ETR	ETHYLENE RESPONSE1, etilén receptor
FeSOD	Vas-szuperoxid-dizmutáz
FT	Friss tömeg
GACC	γ-glutamil- ACC
GPX	Glutation peroxidáz
GSNO	S-nitrozoglutation
g _{sw}	Sztómakonduktancia
H ₂ DCFDA	2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát
ISR	Indukált szisztémikus rezisztencia
J-ACC	Jazmonil-ACC
KAT	Kataláz (EC 1.11.1.6)
Kl <i>a</i> és <i>b</i>	Klorofill <i>a</i> és <i>b</i>
Kar	Karotinoid
LET	Lineáris elektrontranszport
LHC	Fénybegyűjtő komplex
LHT1	LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER1
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MACC	Malonil-ACC
MDA	Malondialdehid
MES/KCl	2-(N-morfolin)-etánszulfonsav/kálium-klorid
MnSOD	Mangán-szuperoxid-dizmutáz
MT	Micro-Tom paradicsom fajta
MTA	Metiltioadenozin

NADPH-oxidáz	Nikotinamid-dinukleotid-foszfát oxidáz (plazmamembrán kötött)
NBT	Nitrotetrazólium-kék
NO	Nitrogén-monoxid
NOA1	NITRIC OXIDE-ASSOCIATED 1 (NOA1) NO produkció
NOS	Nitrogén-oxid synthase
NOX	Plazmamembrán kötött NADPH-oxidáz
NR	NEVER RIPE paradicsom vad típus
<i>Nr</i>	<i>Never-ripe</i> (etilén receptor) paradicsom mutáns
PA	Foszfátidsav
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PCD	Programozott sejthalál (Programmed Cell Death)
PP2A; PP2C	Protein foszfatáz 2A és 2C
PK	Protein kinázok
PM	Plazmamembrán
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
POD	Gvajakol-peroxidáz (EC 1.11.1.7)
PRXR	Peroxiredoxin
PSI	Az első fotokémiai rendszer
PSII	A második fotokémiai rendszer
PVPP	Polivinil-polipirrolidon
q _L	PSII reakciócentrumok nyitott frakciója fényadaptált levelekben
qRT-PCR	Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
RAN1	Réz transzporter
RBOH	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE, NADPH oxidázok
RIN	RIN (RIPENING-INHIBITOR), transzkripció faktor
ROF	Reaktív oxigénformák (Reactive oxygen forms)
RNF	Reaktív nitrogénformák (Reactive nitrogen forms)
RVT	Relatív víztartalom
RuBisCO	Ribulóz-1,5- <i>bis</i> foszfát karboxiláz-oxigenáz
SAM	S-adenozil-L-metionin
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
SNP	Nátrium-nitroprusszid (NO generátor)
SNAP	S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillinamin (NO generátor)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1)
SZT	Száraz tömeg
TAGL1	TOMATO AGAMOUS-LIKE1, transzkripció faktor
TCA	Triklórecetsav (Trichloroacetic acid)
XBAT32	E3 ligáz
Y(II)	A PSII effektív kvantumhasznosítása
Y(I)	A PSI fotokémiai kvantumhatásfoka
Y(NA)	A PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka
Y(ND)	A PSI donor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka
Y(NO)	Szabályozatlan nem fotokémiai energia disszipáció kvantumhatásfoka
Y(NPQ)	Szabályozott nem fotokémiai energia disszipáció kvantumhatásfoka
ψ _w	Vízpotenciál

1. Bevezetés

A gáz halmazállapotú növényi hormon, az etilén (ET) fontos szereppel bír a növényi életfolyamatok szabályozásában, mint például a fotoszintézis vagy a reaktív oxigén- valamint nitrogénformák akkumulációja, továbbá kiemelt résztvevője az abiotikus stresszre adott növényi válaszok kialakításának. Az exogén forrásból származó ET-t számos tanulmány során használták a hormon hatásainak feltérképezésére. Ugyanakkor a természetes körülmények között, a gyökérszónában is jelenlévő ET prekursorának, az 1-aminociklopropán-1-karbonsavnak (ACC) hatását eddig relatíve keveset vizsgálták. Ennek következtében az exogén ACC koncentráció- és idő függvényében kifejtett befolyása a növényekre, különösen a fotoszintézisre és az említett reaktív molekulák akkumulációjára nagyrészt ismeretlen. A növények aktuális ET-érzékenysége, vagy ET produkciójának alakulása (összefoglalva: ET státusza), fontos lehet az abiotikus stressz akklimatizáció során, különös tekintettel a stresszor megjelenése előtti állapotokra. Mindezek tükrében kiemelten fontos az exogén ACC gyökérszóna-béli jelenléte által kiváltott olyan hatások azonosítása, mely az utólag jelentkező, kedvezőtlen környezeti faktorok megjelenése esetén befolyásolhatják a stresszválaszt.

A talaj vagy az öntözővíz magas sótartalma és az általa a növényekben kiváltott stresszhatás (sóstressz) a Földünk változó klímájában egyre nagyobb jelentőségűvé válik a mezőgazdasági növénytermesztésben. Ezért a növények sóstressz-válaszainak fiziológiai és molekuláris szintű felderítése alapvető szükségességet jelez. Az ET szerepe jelentős e folyamatok szabályozásában, ugyanakkor hatását nagyrészt hosszútávú sóstressz során vizsgálták, holott a stressz akklimatizáció korai időszakában – az órától néhány napig – történő események nagyban befolyásolják a növény későbbi sorsát. Ezen túlmenően, a reaktív oxigén- (ROF) és nitrogénformák (RNF) akkumulációjának kapcsolata a növény ET státuszával rövidtávú sókezelések során alig ismert. Ugyanez elmondható a fotoszintézis esetében is, különösen az I-es fotokémiai rendszer aktivitása tekintetében. Mindezeknek megfelelően, kísérleteink során kétféle megközelítést alkalmaztunk. Vizsgáltuk a paradicsomnövények gyökérszónájában megemelt ACC koncentrációk hosszútávú hatását a fotoszintézisre és más kapcsolódó folyamatra (vízháztartás, ionakkumuláció, ROF és RNF felhalmozódás) stresszmentes körülmények között. A második megközelítésben exogén ACC (elő)kezeléssel, és az ET receptor mutációval befolyásolt különböző ET státuszú növényeket kezeltünk szubletális (növekedésgátló, de tolerálható), 100 mM-os és a letális, 250 mM-os NaCl koncentrációkkal és vizsgáltuk a fenti paraméterek, valamint az oxidatív stresszt meghatározó legfontosabb enzimek expressziójának és aktivitásának változását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az etilén jelentősége a növényekben

A gáz halmazállapotú növényi hormon, az etilén (ET) a növényi életfolyamatok alapvető szabályozó molekulája. Az ET növényekre gyakorolt hatásának felfedezésekor figyelték meg az ún. hármass-választ, az ET indukálta általános morfológiai válaszreakciót etiolált borsó csíranövényekben, ennek jegyei a hosszirányú szármegnyúlás gátlása, az epikotil oldalirányú kiterjedése és a normális geotropikus válasz hiánya [1]. Az azóta világossá vált, hogy az ET a növényi növekedést és fejlődést koncentrációtól függően gátló, illetve serkentő faktorként is befolyásolhatja [2]. A gyümölcserést elősegítő hatása mellett fontos résztvevője a növényi programozott sejthalál (PCD) kialakításának és szabályozza a növényi szövetek öregedési folyamatát, a szenescenciát is [3]. A PCD genetikailag kontrollált folyamat és kiemelt szerepe van növények életében, beleértve a stresszválaszokat is [4]. Az ET kiemelt résztvevője mind a biotikus- [5, 6] illetve az abiotikus növényi stresszválaszoknak. Számos abiotikus környezeti stresszor, mint a szárazság, a magas sókoncentráció stb. befolyásolja a növényi szövetek ET-termelését [7]. Az alacsony endogén ET szintek közel optimális körülmények között valószínűleg csupán enyhe hatással lehetnek növények növekedésére, mivel számos faj ET-szenzitív és ET-inszenzitív genotípusai összehasonlítható ütemmel fejlődnek az említett környezeti adottságok mellett. Ugyanakkor, amikor a körülmények kevésbé optimálisak, a jól működő ET jelátvitel alapvető lehet a növekedés fenntartásához [2]. Bár általános az a koncepció, hogy az alacsony szöveti ET tartalom serkenti, míg a magas gátolja a növényi növekedést, fontos szem előtt tartani, hogy a növényfajok között jelentős különbségek lehetnek a serkentő/gátló koncentrációk között, továbbá egyes termesztett növényfajták is különbözhetnek ET-érzékenységükben, így a hormonra adott válaszreakcióikban is [2, 8]. Az ET növényekre gyakorolt hatása nagyban függ azok korától és állapotától, ugyanúgy, mint az esetleges stresszhatások típusától, intenzitásától és időtartalmától is [2].

2.1.1. Az etilén bioszintézise és jelátvitel – az általános modellek és a paradicsomban megfigyelhető sajátosságok

Az összes növényi szerv képes az ET bioszintézisére, a résztvevő kulcsenzimek szöveti megoszlása azonban eltérő lehet [9]. Az ET bioszintézisének az általános modell szerinti folyamatrendszerét és szabályozását, kiegészítve néhány paradicsomban leírt elemmel az 1. ábra foglalja össze. Az ET képződés kezdő lépése a metionin aktiválása S-adenozil-metioninná (SAM) történő átalakítása során a SAM-szintetáz enzim által (1. ábra).

1. ábra Az ET bioszintézisének és szabályozásának általános modellje, kiegészítve néhány paradicsom-specifikus elemmel [10-15]. PK: proteinkinázok; PH: protein foszfatázok; TF: transzkripciós faktorok; MACC: malonil-ACC; GACC: γ -glutamil-ACC; JA-ACC: jazmonoil-ACC.

Az ACC-szintáz (ACS) által katalizált reakcióban képződik az ET közvetlen prekursora, az 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC). E folyamat mellékterméke az 5'-metiltioadenozin (MTA), mely a Yang-ciklusba belépve végső soron újra metioninná alakul, ami egy kén-megtartó mechanizmus. Paradicsomban legalább nyolc ACS gén található. Kináz-foszforilációs helyeik alapján három csoportba sorolhatók, az 1-es csoport (*SIACS1a*, *SIACS1b*, *SIACS2*, *SIACS6*) mitogén aktivált- (MAPK) és ciklin-függő protein kinázok (CDPK) által foszforilálható helyekkel is rendelkezik, a 2-es csoportban (*SIACS3*, *SIACS7*, *SIACS8*) csak CDPK helyek fordulnak elő, míg a 3-as csoportban (*SIACS4*) nem találhatóak az említett kinázok számára foszforilációs pontok [11]. Az ACS katalizált ACC képződés az ET bioszintézis fő sebesség-limitáló lépése. A szabályozás egyrészt az ACS gének transzkripciójának szintjén történik, melyek csak indukáló faktorok jelenlétében expresszálódnak, másrészt az enzim stabilitásának poszttranszlációs kontrolljától függ (1. ábra), amit az enzim fél életidejét megnövelő foszforiláció is szabályoz.

A multigén családok által kódolt ACS expresszióját számos külső és belső környezeti tényező szabályozza, mint például a hormonális faktorok (auxinok, citokininok, brassinoszteroidok), ontogenetikus szignálok, mechanikai, kémiai és fizikai stimulusok, valamint a növényi patogének. Alacsony ET szint mellett, normál körülmények között az ACS ubiquitin-függő lebomlása fontos poszttranszlációs regulátor szereppel bír. A szóban forgó folyamat az E3 ligázok által katalizált, mint például az ETO1, EOL1/2 (ETHYLENE OVERPRODUCER 1; ETO1 LIKE -1/2), melyek ritka kivétellel az ACS C-terminális

doménjével lépnek kapcsolatba. Minden izoenzimnek megvan a maga E3 ligáz partnere, melyeken kívül MAPK-ok, CDPK-ok, foszfatázok, illetve bizonyos transzkripció faktorok – például paradicsomban a RIN (RIPENING-INHIBITOR) vagy a TAGL1 (TOMATO AGAMOUS-LIKE1) – is közvetíthetik a környezeti ingereket, illetve az ET által kiváltott visszacsatolási szignált is az ACS felé (1. ábra) [15]. A vegetatív növekedés során, az ET bioszintézist egy ET általi autoinhibitor rendszer szabályozza (I-es állapot), azonban, amikor több ET szükségeltetik – pl. szeneszcencia vagy a gyümölcsérés során – saját képződését az ET egy pozitív visszacsatolási körben serkenti (II-es állapot) [11].

A közvetlen ET felszabadulás az ACC oxidációjának az eredménye, melyet az ACC-oxidáz (ACO) enzim végez. Jelentősen megemelkedett ET képződés mellett az ACO válik az ET bioszintézis kulcs-szabályozójává. Az ACO izoenzimeket kódoló multigén család expresszióját maga az ET szabályozza transzkripcionális szinten, illetve poszttranszlációs befolyásolásuk is feltételezett *in silico* analízis alapján [15]. Paradicsomban eddig öt ACO izoenzimet írtak le (SlACO1-5), melyek génjeiben egyedi 5' és 3' nem transzlálódó régiók találhatók, azonban mindegyikük transzkripcionálisan aktív [14]. A szabad ACC pool mennyiségét a szövetekben az ACC konjugátumok (malonil-, γ -glutamil-, és jazmonoil-ACC) képződése is befolyásolja [15]. Az ACC lebontása a növényekben az ACC-deamináz (ACD) által is lehetséges, ami szintén szabályozhatja az elérhető ACC, és végső soron az ET mennyiségét [12]. Habár a növényi szövetekben az ET metatabolizmus megvalósulhat a hormon CO₂-dá oxidálásával, illetve az ET-oxid vagy ET-glikol konjugátumok képződése révén, valamint az utóbbi glükózzal való kapcsolódása is az ET bomlástermékek közé sorolható [10], a hormon legtöbbször csupán diffúzióval távozik a külső környezetbe [15]. Az ET diffúzióval halad sejtről sejtre is, azonban távolabbi ET válaszok kialakítása is lehetséges az ACC gyökér-hajtás vagy fordított irányú transzportja által [16]. Az ACC szállítását feltételezhetően a nempoláris aminosavak transzporterei végzik, mint például a LHT1 (LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER1) lúdfüben [17].

Az ET jelátvitel általános modelljének a paradicsomra jellemző komponensekkel kiegészített folyamatát a 2. ábra foglalja össze. Az ET percepcióért felelős receptorok nagy hasonlóságot mutatnak a bakteriális két-komponensű szabályozó rendszerekkel. Ezek az integrált, homo és heterodimert formáló membránfehérjék az endoplazmatikus retikulumban (ER) – ill. feltehetőleg a Golgi apparátusban – lokalizáltak és ET hiányában a szignalizáció negatív szabályozói [18, 19]. Preferenciális vagy véletlen módon kialakított klaszterben funkcionálnak és együttműködve kontrollálják a szignalizációt [20]. Három fő doménjük a szenzor, a kináz és a válaszregulátor domén. Az N terminálison elhelyezkedő szenzor domén a

felelős az ET-érzékelésért, a dimerizációért és az RTE1 kofaktor kötődésért. Az itt történő mutációk képtelenné teszik a receptort az ET kötésre, mely ET-inszenzitív fenotípust eredményez [21]. A kináz domén katalizálja a hisztidin csoport adenzin-trifoszfát (ATP)-függő autofoszforylációját. A hisztidinhez kapcsolt foszfát csoportnak a válaszüregulátor domén aszparaginsav csoportjára történő átvitele a régió aktiválását eredményezi. Paradicsomban jelenleg hét ET receptort írtak le, ezek az SIETR1, -2, -4, -5, -6, -7 és a NEVER RIPE (NR) [18, 21]. A hetedik receptor, az SIETR7 létezését a közelmúltban validálták filogenetikus analízis segítségével [23]. Az SIETR3-ra történeti okokból NR-ként hivatkoznak a szakirodalomban [24]. Három ET receptor, az SIETR1, -2 és a NR az I-es receptor alcsaládba tartozik, mivel rendelkeznek jól konzervált hisztidin-kináz (His-kináz) doménnel. A másik négy receptor (SIETR4-SIETR7) a II-es alcsaládba sorolandó, mivel egyes, a His-kináz aktivitáshoz szükséges alkotóelemeik hiányoznak, ennek ellenére azonban részt vesznek a jelátvitelben [23]. A paradicsom ET receptorok a legtöbb szövetben expresszálnak, azonban kifejezési mintázatuk a fejlődési állapot, illetve különféle környezeti stimulusok függvénye. [18]. Közülük kettő, az *SIETR1* és az *SIETR2* konstans módon expresszálnak a növényi szövetekben az egyedfejlődés során. Az *SIETR4* gén kifejeződése felülszabályozódik a gyümölcserés, a szenescencia és a levélhullás során, míg az *SIETR5* a gyümölcsben és a virágban expresszálnak, illetve patogén fertőzés során is aktiválódik [22].

A *Nr* egy domináns mutáció a gén N-terminális régióján, ami befejezetlen és késleltetett érési fenotípust és narancssárga színű, csekély mértékben puhult paradicsomgyümölcsöket eredményez, a receptor ET kötésének sérülése miatt [25]. A *Nr* expressziója megfigyelhető a gyümölcs perikarpiumában [26], azonban a paradicsomrügy és -levél szöveiben is [27]. A vegetatív szövetekben is aktív *Nr* mutáció ET inszenzivitást vált ki az összes vizsgált szövetben. Míg a termésben a mutáció domináns jellegű, vagyis a termésérés az *Nr/nr* heterozigótáknál is elmarad, a vegetatív szövetekben a gén szemidomináns jellemzőkkel rendelkezik. A homozigóta domináns *Nr/Nr* mutánsok csaknem teljesen érzéketlenek az ET-re a hármaválasz próba során, a petiolumok epinasztikus válaszában, a virágok szenescenciájában és lehullásában. Ezzel szemben a *Nr* mutációra heterozigóta növények (*Nr/nr*) csökkent intenzitású hármaválaszt mutatnak exogén ACC jelenlétében. A *Nr* mutánsokban a levél szenescenciájának késleltetését is megfigyelték [28].

2. ábra Az ET jelátvitelének és szabályozásának egyszerűsített modellje, kiegészítve néhány paradicsom specifikus elemmel. A lineáris útvonalat a szimpla vonalak jelzik; a fehérjék stabilitásának poszttranszlációs szabályozását a vastag, szaggatott vonalak mutatják; a visszacsatolási hurkokat a szimpla, szaggatott vonalak indikálják; a kérdőjelek potenciális szabályozási interakciókat feltételeznek [3, 15, 18, 20, 22, 23, 26, 27, 29, 30-35].

Mindazonáltal, a *Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig háttérű *Nr/Nr* mutánsok, rendelkeznek egy jelentősen csökkent, reziduális, exogén ET-érzékenységgel a hármas-válasz tesztben. A hipokotiljaik megnyúlása az exogén ET 1 ppm-es koncentrációra jelentősen csökkent mértékben, de reagál, azonban 1000 ppm ET hatására is csupán a vad típusú (VT) válasz töredékét mutatja. Továbbá, a *Nr/Nr* mutáns gyökerek megnyúlása csaknem teljesen inszenzitív az ET-re. A *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig háttérű *Nr/Nr* mutáció nagymértékű csökkenést okoz az ET-érzékelésben és a fennmaradó, reziduális szenzitivitás a fiziológiailag releváns ET koncentrációk esetében marginálisnak tekinthető [36].

Az ET a receptorok három transzmembrán doménjéhez kötődik réz kofaktor jelenlétében. A réz(I) ion a Golgiba a RAN1 réz-transzporter közreműködésével jut be, majd az ET receptorfehérje érése során kötődik az apoproteinhez [37, 38]. Az RTE1 (REVERSION

TO ETHYLENE SENSITIVITY1) membránfehérje túltermeltetése stabilizálja az ETR1 receptort lúdfűben és az egész növényre kiterjedő ET inszenzivitást vált ki, akár magas ET koncentráció jelenlétében is. Paradicsomban fellelhető homológja, a GR (GREEN RIPE) fehérje viszont a gyümölcserést késlelteti [20].

A soron következő szignalizációs komponens, az ugyancsak negatív szabályozó, Raf-szerű szerin/treonin kináz, a CTR (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE), melyből paradicsomban, ellentétben a lúdfűvel, több homológ is vehet részt az ET jelátvitelben [31]. Élesztő két-hibrid rendszerben interakciót mutattak ki az SlCTR1-es, 3-mas és 4-es izoformák és az I-es családba tartozó paradicsom ET receptorok között, továbbá hagyma epidermiszben koexpresszált NR receptor és a felsorolt SlCTR izoformák között is *in vivo* [30], míg az SlCTR2 csak az SlETR1 és -2 receptorokkal hat kölcsön, bár ennek *in vivo* szerepét még nem tisztázták. Az SlCTR3 teljesen komplementálta az lúdfű *ctr1-8* mutációt, míg az SlCTR1 és SlCTR4 csak részben. Az *SlCTR1* expresszió gyorsan válaszol az exogén ET jelenlétére, míg az *SlCTR2*, -3, -4 és az utóbbi splice variánsainak (*SlCTR4sv1* és -2) mRNS szintjei nem változtak szignifikánsan [39]. A CTR-szerű fehérjék C-terminális doménjének szekvenciája nagymértékű homológiát mutat a lúdfűben megtalálható ortológjukkal, míg N-terminális régiójuk kevésbé hasonló (<50%) az *AtCTR1* szekvenciához, viszont az itt található CN-box konzervált az összes *SlCTR* típusban. Továbbá a paradicsom CTR gének kifejeződési mintázata eltérő, szemben a lúdfűben található, konstitutívan expresszáldó *AtCTR1*-gyel [31]. Az *SITPR1* (TETRATRICOPEPTIDE REPEAT 1) feltételezhetően kötődik az SlETR1-hez és a NR-hoz, vagy a CTR-szerű fehérjék kötődésével interferál, illetve a receptorok lebontását segíti [21].

ET hiányában a CTR foszforilálja az EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2) pozitív szabályozó, a Golgi membránhoz kötött fehérjét. A paradicsomban leírt EIN2 homológ, az *SlEIN2* expressziója különböző mértékű az eltérő fejlődési stádiumokban a paradicsomlevelekben és gyümölcsben [29]. A hormon receptorhoz kötődése gátolja a CTR1-t, ezért az EIN2 foszforilálatlan, C-terminális doménje lehasad, majd a sejtmagba transzlokálódik és aktiválja az EIN3/EIL (ETHYLENE INSENSITIVE3/EIN3 LIKE) transzkripciós faktorokat, illetve az ET válaszelemeket (ERF; ETHYLENE RESPONSE FACTOR) [40]. Az MPK3 és az MPK6 proteinkinázok foszforiláció útján hatnak az EIN3 stabilitására, továbbá az EIN2 és EIN3/EIL fehérjék mennyisége ubiquitináció és proteasomális lebomlás útján is szabályozott, előbbi az ETP1 és -2 (EIN2 TARGETING PROTEIN1, -2), utóbbiak pedig az EBF1 és -2 (ETHYLENE BINDING F-BOX PROTEIN 1, -2) F-box fehérjék által [15, 21]. Paradicsomban négy EIL gént izoláltak, melyek az *Sl-EIL1*, *Sl-EIL2*, *Sl-EIL3*, *Sl-EIL4* neveket kapták [32]. Az EIN3/EIL transzkripciós faktorok

visszacsatolással szabályozhatják a CTR1, RTE1 és az ET receptorokat kódoló géneket lúdfüben [15].

Az ERF-ek rendelkeznek egy 58-59 aminosavból álló, konzervált AP2 (APETALA2) doménnel, melynek segítségével számos *cisz*-ható elemhez kötődnek az ET-indukálta gének promótereiben. Az ERF család két alcsaládból tevődik össze, nevezetesen a CBF/DREB (C-REPEAT BINDING FACTOR/DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR) alcsaládból, mely az etilén válaszének DRE/CRT (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT/C-REPEAT) elemeihez kötődnek, illetve az ET-indukált promóterekben található GCC-boxokhoz kötődő ERF-ek alcsaládjából. Paradicsomban 9 további alcsoportba rendszerezett, 77 ERF alcsaládba tartozó gént azonosítottak, míg a DREB alcsaládba eddig 48 gént soroltak. A CBF/DREB alcsaládban valin és glutaminsav található az AP2 domén 14-es és 19-es pozíciójában, míg az alanin és az aszparaginsav konzervált az ERF alcsalád megfelelő pozícióiban [41]. Az ERF transzkripciós faktorok rendszerezhetők a célgénre kifejtett gátló, vagy indukáló hatásuk alapján is [42]. Zhang és munkatársai [13] korábban kimutatták, hogy az SIERF2 részt vesz a paradicsom ACS és ACO gének expressziójának kontrolljában (1. ábra). A SIERF.B3 paradicsom ERF képes szabályozni az ACS és ACO enzimek, valamint az SIETR6 receptor expresszióját, továbbá befolyásolja az elsődleges ET transzkripciós faktorok (SIEIL) és számos más ERF expresszióját is (1. és 2. ábra), ami jó példája az ET saját bioszintézisének visszacsatolós szabályozására, továbbá az ERF-ek egymást is szabályozhatják. Az ERF-ek feltételezhetően egy olyan szabályozó hálózat tagjai, melyben transzkripciós faktorok versengenek a promóterekért, hogy kontrollálják az ET válaszének expresszióját [32].

Az ET hatás időben és térben szabályozott, csupán érzékennyé tett szövetekben és sejtekben okoz változást [3]. A szövetekben jelenlévő receptorok mennyisége és az ET-érzékenység között fordított arányosság áll fent. Minél több ET receptor található az adott sejtben, annál több ET szükséges a jelátviteli gátlás feloldásához és fordítva. Fontos megjegyezni továbbá, hogy a receptorok általi ET-kötés hosszú féléletidejű (több mint 12 óra), így az „inaktivált” receptor nagyon hosszú ideig – vagy akár véglegesen – képtelen lesz elnyomni az ET-indukált géneket [43]. Egyes hipotézisek alapján, az ET-t kötött receptor inaktíválja a klaszterben lévő többi receptort is, mely magyarázhatja, hogy a növények nagyon alacsony ET koncentrációt is érzékelnek. Azonban a szövetek nagyon széles koncentráció-tartományban képesek érzékelni az ET-t, amit az említett teória nem magyaráz. A klaszterbéli receptorok közti kooperáció meghatározza a jel erősségét. Az erős pozitív együttműködés erős ET receptor jelátvitelt közvetít, míg a gyenge vagy negatív kooperáció gyenge

szignáltranszdukciót eredményez. Ennél fogva, a változatos receptor csoportok a sejten belül képesek egy gyengétől-erősig terjedő receptor szignálgradienst létrehozni, így a növény széles ET koncentráció tartományra képes válaszolni. A klaszter összetételének megváltoztatásával – melyet maga az ET is képes indukálni – az elfojtott konstitutív ET válasz annak tükrében fog módosulni. A szöveti deszenzitizáció egyik legfontosabb eleme a ligand-asszociált receptorok lebontása, majd cseréje [20]. Az elérzéktelenítés folyamatában részt vehetnek az ARGOS (AUXIN REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE) géncsalád tagjai (2. ábra), melyek ET hatására indukálódnak, és az ER-ban lokalizált fehérjékként szabályozzák feltehetően a receptorokat és az EIN2 fehérjét [33]. Az SIETR1 miRNS-ek (mikro-RNS) általi szabályozását is kimutatták korábban, csakúgy, mint az ET-indukált transzkripciós faktorok esetében (2. ábra), mint például a MADs-box, F-box, AP2/EREBP vagy az AP2/ERF illetve számos ERF gén esetében [34]. Az utóbb felsorolt transzkripciós faktorok és gének további, ún. hosszú-nem-kódoló RNS-ek (lncRNS-ek) szabályozása alatt is állnak [35]. Az ET közvetítette szabályozás különbözhet az eltérő típusú abiotikus stresszfaktorok által [44], melyek közül az értekezés tárgyát 2.2.3. alfejezetben jellemzett a sóstressz folyamatai képezik.

2.1.2. Az etilén szerepe a fotoszintézis szabályozásában

A fotoszintézis alapvető résztvevője a növényi életnek, hiszen többek között redukált szénvázlat és energiát szolgáltat a szénhidrátok, aminosavak és másodlagos anyagcseretermékek szintéziséhez és végső soron a növekedéshez, illetve a terméshozamhoz [45]. Az ET egyik legkevésbé kutatott hatása, a fotoszintézisre, illetve az azzal asszociált elemekre gyakorolt szabályozó szerepe [46]. Annak érdekében, hogy könnyebb legyen megérteni az ET szerepét ebben a folyamatban, fontos felelevenítenünk annak fontosabb lépéseit és szabályozó faktorait.

A fotoszintézis főbb lépéseit a 3. és 4. ábra foglalja össze. A tilakoidok kapcsolt régióiban található II-es fotokémiai rendszerben (PSII) a reakciócentrum P680 klorofill *a* molekulája egy elektronját az abszorbeált fényenergia segítségével átadja az elsődleges elektronakceptor partnerének, a feofitinnek (Phe) majd a kinon A-nak (Q_A), majd az elektron a víz bontásából pótlódik. A sztrómatilakoidokban lokalizált I-es fotokémiai rendszerben (PSI) a P700 reakciócentrum klorofill *a* speciális pár és az A_0 molekula közt megy végbe töltésszétválasztás. A $P700^+$ közvetlen elektron donor molekulája a plasztocianin [45]. Ezt követően, elektronáramlás alakul ki a két fotokémiai rendszer, illetve a PSI és a terminális elektronakceptora, a $NADP^+$ között a lineáris elektrontranszport (LET) során (4. ábra).

A PSII-ből az elektronok a plasztokinon (PQ) pool-ba, majd a Citokróm b_6/f komplexbe jutnak, ahonnan a már említett plasztocianin továbbítja őket a PSI-be. A PSI-ből a ferredoxinra (Fd), majd a ferredoxin- $NADP^+$ -oxidoreduktáz (FNR) által a $NADP^+$ -ra kerül az elektron,

melynek eredményeképpen NADPH képződik (4. ábra). A folyamat során transztilakoid H^+ áramlás és elektromos potenciál gradiens (ΔpH és ΔE) is kialakul a tilakoid lumen és a kloroplasztisz sztróma között, melyet az ATP-szintáz enzim ATP képzésre használ fel [45].

3. ábra A fotoszintézis és néhány kapcsolódó folyamat [47-49].

A folyamat szerves része a PSI körüli ciklikus elektrontranszport (CET-PSI), mely optimális körülmények között is – bár nem domináns mértékben – hozzájárul a fotoszintézis során képződött ATP mennyiségéhez. A CET-PSI során az elektronok a Fd-ról a Citokróm b_6/f komplex közvetítésével PQ-pool-ba, majd a Citokróm b_6/f komplexen keresztül újra a PSI-be vándorolnak, mellyel hozzájárulnak a ΔpH kialakulásához nettó NADPH képződés nélkül. Zárwatermő növényekben eddig két CET-PSI útvonalat írtak le, melyek közül a főbb a PGR5/PGRL1 (PROTON GRADIENT REGULATION5/PGR5-LIKE PHOTOSYNTHETIC PHENOTYPE 1) komplex által mediált, míg a másik kloroplasztisz NDH-függő út (NADH DEHYDROGENASE-LIKE), mely szuperkompleket alkot a PSI-el (4. ábra) [49].

A gázcsereenyíásokon keresztül bejutott CO_2 megkötése és redukciója a Calvin-Benson ciklus (CBC) során, a kloroplasztisz sztrómájában történik (4. ábra). C_3 -as növényekben a

Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (RuBisCO) enzim katalizálja a ribulóz-1,5-biszfoszfát és a CO₂ reakcióját, melyet egy redukciós, majd regenerációs lépések követnek [48].

4. ábra A fotoszintézis lineáris elektrontranszportja és a ROF képződés/kioltás főbb résztvevői. Cherepanov és mtsai. [45] ábrája kiegészítve Roach és Krieger-Liszkay [48] nyomán. PQ_B: kinon B, A₀: A P700 elsődleges elektronakceptora, A₁: fillokinon, F_x, F_A, F_B: vas-kén klaszterek, AscH⁻: aszkorbinsav anion (teljesen redukált állapot), Asc^{•-}: monodehidroaszkorbát.

Mivel a fénybegyűjtő antennák hatékonysága elég magas, a fotoszintetikus fotonáram-sűrűség (PPFD) különböző okokból túllépheti a fotoszintetikus kapacitást és fényindukált károsodást, fotoinhibíciót okoz. Fontos megjegyezni, hogy a kedvezőtlen környezeti körülmények között az alacsonyabb intenzitású fény is túltelítheti a rendszert és a reaktív oxigén formák (ROF) – mint a szinglet-oxigén (¹O₂), szuperoxid-gyök anion O₂^{•-}, a hidrogén peroxid (H₂O₂) vagy a hidroxil-gyök (HO•) fokozott akkumulációját eredményezheti, melyek károsíthatják a tilakoidmembránokat és a fotokémiai rendszereket. A rendkívül reaktív ¹O₂ a PSII-ben lejátszódó, töltés-rekombinációs reakciók során keletkezhet. A CET-PSI mellett egy másik alternatív elektrontranszfer folyamat a pseudo-ciklikus elektron-transzport (pseudo-CET), ahol az elektron a Fd-ról a molekuláris oxigénre kerül és O₂^{•-} képződik [49]. A PSI akceptor oldala a O₂^{•-} legfőbb forrása a folyamatban. A H₂O₂ reakciója Cu⁺ vagy Fe²⁺ ionokkal a szintén nagyon reaktív HO• képződését eredményezheti, továbbá a Fe³⁺/Cu²⁺ visszaalakulhat Fe²⁺/Cu⁺ ionná a O₂^{•-} által. Kisebb mennyiségben az elektrontranszport más pontjain is keletkezhetnek reaktív molekulák (4. ábra) [48].

A O₂^{•-}-ból, protonok felvételével a szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim által a kevésbé reaktív H₂O₂ jön létre, melyet az aszkorbát-peroxidáz (APX, EC 1.11.1.11) vagy peroxiredoxin (PRX, 1.11.1.15) enzimek alakítanak vízzé. Az antioxidáns rendszer elfogyasztja a fotoszintézis által létrehozott redukáló ekvivalenseket, a Fd-t és a NADPH-t az aszkorbát regenerációjához (4. ábra) [49]. A SOD izoenzimek közül jellemzően a Fe (Fe-SOD) vagy a Cu és Zn (Cu/Zn-SOD) kofaktorral rendelkezők vesznek részt a folyamatban. Az APX aszkorbinsavat igényel, a PRX aktivitás pedig a tioredoxinok újra-redukálódásától függ.

További más antioxidáns aktivitású enzimek és molekulák is részt vesznek a fotoszintézis-kapcsolt ROF kioltásában. Bár a PSII sokkal sebezhetőbbnek tűnik a ROF okozta károsodásokkal szemben, rendkívül hatékony javító mechanizmusainak hála a hatás – egészen addig, míg a kár mértéke a kapacitásukat túl nem haladja – csupán átmeneti. A PSI ROF általi (leginkább $O_2^{\bullet-}$) károsodása, bár kevésbé gyakori, bekövetkezése esetén tartósan kivonja a működés alól ezt a fotokémiai rendszert, hiszen turnover rendkívül lassú. A PSII érzékenysége ennél fogva fontos szabályozó mechanizmusa az elektrontranszfer folyamatoknak [48]. Ezen túlmenően, az oxidatív módosítások hatnak a RuBisCO fehérje mennyiségére is [50, 51].

Egyéb befolyásoló elemek mellett az elektrontranszport gyorsan reagáló, talán legjelentősebb szabályozását a nem-fotokémiai kioltások (NPQ) közül – nevét a klorofill *a* fluoreszcencia nem fotokémiai úton történő kioltásáról kapta, bővebb magyarázat Kalaji és munkatársai [52, 53] munkáiban – a ΔpH -függő NPQ, a qE végzi (3. ábra). A lumensavanyodás következtében PsbS és az LhcSR3 fehérjék luminális részei és a fénybegyűjtő komplexek protonálódnak, illetve aktiválódik a xantofill-ciklus, mely zeaxantin képződésével jár, ami a PsbS fehérjéhez – valamint az LHCII-höz és egyéb LHC fehérjékhez – kötődve képes kioltani a gerjesztett klorofilokat. Így az excitációs energia hő formájában disszipálódik, mielőtt elérné a reakciócentrumot [48, 54]. További qE mechanizmus az LHCII PSII-ről történő leválását követő aggregálódása, mely zeaxatin és csapdázott protonoktól függő módon egy lassan relaxálódó NPQ folyamatért felel [55]. A ΔpH -függő NPQ-nak fontos szabályozója/indukálója a CET-PSI, mivel nagyban hozzájárul a lumen savanyodásához. Továbbá, a luminális pH csökkenése lassítja a Citokróm b_6/f komplex és a vízbontó komplex aktivitását, valamint a $P680^+$ redukciós kinetikáját. Fontos megfigyelés volt, hogy pH 5,2 alatt a vízbontó komplex reverzibilisen inaktíválódik. Mindezek tükrében könnyen megérthető, hogy míg normál körülmények között a LET működése dominál, kedvezőtlen környezeti körülmények között – a mikor a CO_2 mennyisége vagy hasznosítási folyamata limitált – nagyobb hangsúlyt kapnak az alternatív elektrontranszport folyamatok, mint a CET-PSI vagy a pseudo-CET, hogy kifejthessék szabályozó funkcióikat [48].

A CBC-ből a széndioxid-fixációból származó trióz-foszfátok folyamatos elvonása is szükséges, mely a kloroplasztikus keményítő raktározáson keresztül és/vagy a citoszolba történő exportálásuk során valósul meg. Ez utóbbi esetben szacharóz szintetizálódik belőlük, mellyel a növény a nem-fotoszintetizáló részeit táplálja. Hatékony szacharóz transzport szükséges a szénhidrátok felhasználóhelyekre történő szállításához, illetve a változó környezeti tényezőkre adott megfelelő válaszok kialakításához a növényekben [56].

A fotorespiráció jelensége, mely a RuBisCO oxigenáz aktivitásának az eredménye, a már megkötött CO₂-ot szabadítja újra fel, továbbá ATP-t és redukáló ekvivalenseket fogyaszt. Maga a folyamat több sejtszerv együttműködését igényli. Mivel elektronnyelő folyamat, megakadályozza az elektrontranszportlánc túlredukálódását és így a fotoinhibíciót, mely különösen stressz során jelentős [57]. A peroxiszómában lejátszódó lépéseken kívül – ahol intenzív H₂O₂ produkció megy végbe a reakciók során – a fotorespiráció a kloroplasztisz és a mitokondrium ROF státuszát is szabályozza [58].

Elsőként földimogyoró (*Arachis hypogaea*) levelekben figyelték meg, hogy az exogén ET gáz gátolja a fotoszintézist, azonban fontos megjegyezni, hogy a többféle koncentrációval történő, kétórás kezelések során, 0,1 µL ET/L-es koncentráció alatt ez a jelenség nem volt megfigyelhető [59]. Ezzel szemben, Taylor és Gunderson [60] nem tapasztalt szignifikáns CO₂ gázcsere gátlást, illetve sztómakonduktancia változást 4 órás, exogén ET gázzal kezelt paradicsomnövények esetében. Exogén, 300 mg/L koncentrációjú Ethephon – egy ET-t generáló vegyület – intakt paradicsomlevelekre permetezése csak a CO₂ asszimilátumok szervek közötti megoszlását befolyásolta, a fotoszintézist nem [61]. Egyéb munkákat is összefoglalva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az exogén forrásból származó ET – legtöbbször gáz vagy Ethephon – bizonyos fajokban gátolja, másokban nem befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást stresszmentes körülmények között [62-65]. Ceusters és Van De Poel [46] munkája jól összefoglalja az irodalomban eddig fellelhető, vonatkozó eredményeket. De vajon valóban elkönnyelhetjük az ET fotoszintézisre gyakorolt hatását a leírtaknak megfelelőként? Vagy csupán a vizsgálatok ET koncentráció- és expozíciós idő, esetleg fejlődési állapot-függő felbontása nem volt elég alapos? Esetleg az ET forrás jellegétől – minősége és eredete – is függ a hatás? Eddig csak mustárban mutatták ki, hogy alacsonyabb exogén ET koncentrációk serkentik a fotoszintézist (a nagyobbak ott is gátló hatásúak) [66].

ET-inszenzitív mutánsok vizsgálata alapján elmondható, hogy az ET közvetlenül szabályozza a fotoszintézist fiatal/nem-szenescens levelekben és indirekt módon idősebb levelekben, elsősorban a szenescencia – például a klorofill lebomlás – befolyásolásával (5. ábra). Lúdfű ET-inszenzitív mutánsban (*etr1-1*) alacsonyabb klorofill tartalmat, RuBisCO aktivitást, illetve néhány fotoszintézis-asszociált gén represszióját figyelték meg. Továbbá, az *etr1-1* és *ein2* mutáns lúdfű, illetve ET inszenzitív dohány (*Nicotiana tabacum*) transzgénikus növények csökkent fotoszintetikus kapacitással rendelkeznek, főleg telítési fényintenzitásokon. További megfigyelések alapján egy optimális endogén ET szint állapot szükséges a növényben a normális klorofill tartalom kialakításához fiatal levelekben, míg a szenescenciára hajlamosakban az ellenkezője igaz [46]. Az exogén ACC, csakúgy, mint az Ethephon gátolta a

sötétség és az abszcizinsav (ABA)-indukált sztómazárást *Vicia faba* zárósejtjeiben, valószínűleg a H_2O_2 kioltó rendszerek serkentésével. Továbbá, a két modulátor sztómanyitódást indukált sötétben [67, 68], utóbbiban szerepet játszhatott a nitrogén monoxid (NO) szint csökkenése is [69]. Ezzel szemben az ET gáz, az ACC és az Ethephon is sztómazárást váltott ki lúdfűben. Ugyanakkor, a megfelelő ET jelátvitel szükséges mind a normál sztómakonduktancia, mind a sztómaszám kialakulásához [46]. Az ET sztómazárást indukáló hatásának szignalizációja csupán részben ismert, viszont *Arabidopsis*-ban a receptoroktól downstream a heterotrimer G fehérje $G\alpha$ alegységének (GPA1) aktiválódásával jár, mely serkenti az At-RBOH függő NADPH oxidázok működését, így H_2O_2 képződést [70].

5. ábra Az ET hatása a fotoszintézisre és a kapcsolódó folyamatokra [46]. exACC: exogén ACC. A piros „?” bizonytalan hatást, a narancssárga „?” az exogén ACC-vel kapcsolatos hiányos ismereteket jelzi, melyet bővebben a 2.1.4-es alfejezet tárgyal

4 órás ET expozíció 30%-os csökkenést okozott a szója levelek fotoszintetikus elektrontranszport kapacitásában Wullschleger és munkatársai [71] szerint. A CitERF13 tranziens overexpresszálatása dohánylevelekben szignifikánsan csökkentette a PSI és a PSII kvantumhatásfokát telítési fényintenzitáson [72]. Viszont az *etr1-1*, ET-inszenzitív *Arabidopsis* mutáns is alacsonyabb PSII aktivitással rendelkezett. Továbbá, a megnövekedett ET-termelésű *eto1-1* mutánsokban gátlódott az NPQ kifejlődése a violaxantin-deepoxidáz (VDE), a zeaxantin bioszintézis kulcseznimének csökkent aktivitása miatt [46]. Ezek szerint intakt ET-érzékelés és normál ET produkció szükséges a PSII optimális működéséhez. Az exogén forrásból származó ET és a PSI aktivitásának kapcsolatáról eddig nincs fellelhető adat a szakirodalomban.

ET-inszenzitív (*etr1-1*) lúdfű fiatal leveleiben csökkent, míg az idősebb levelekben megemelkedett RuBisCO aktivitás figyeltek meg a VT növényhez viszonyítva [46]. Az ET szabályozza a szénhidrát háztartást is. A glükóz és ET szignalizáció között például kölcsönösen

antagonista kapcsolat áll fenn. ET-inszenzitív növények hiperérzékenyek a glükózra, míg a konstitutív ET válasz mutáció (*ctr1*) vagy az ET túltermelése (*eto* mutánsok vagy ACC kezelés) csökkent cukorérzékenységgel jár. Az ET kezelés befolyásolja a szacharóz szintézisért és transzportért felelős gének expresszióját is [46].

2.1.3. Reaktív oxigén- és nitrogénformák a növényekben, kölcsönhatásuk az etilénnel

A növényi sejtekben végbemenő aerob metabolizmus redox-kaszkádjainak működése során elkerülhetetlen a folyamatos ROF képződés, melyek egyfelől folyamatos antioxidáns kontroll alatt tartása alapvető szükséglete a sejteknek – hiszen némelyikük komoly károkat tud okozni, – míg másfelől a növények használják a ROF-at vagy ROF-asszociált másodlagos bomlástermékeket (alkoxi vagy peroxi gyökök) a növényi életműködés során. A ROF másodlagos hírvivőként funkcionálhat, mely módosítja bizonyos gének expresszióját, illetve specifikus fehérjék aktivitását a sejt redox-egyensúlyának megváltoztatásával. A ROF kölcsönhat több hormon szignalizációs elemeivel, illetve az indukált lipidperoxidáció termékei nemspecifikus jelmolekulákként is működhetnek [73].

A ROF molekulák viszonylag rövid féléletidejűek, mind közül a legstabilabb a H_2O_2 , melynek a többi molekulához viszonyítva kisebb a reaktivitása és membránokon is könnyedén keresztül juthat, így szignálmolekulaként is ideális. A H_2O_2 keletkezhet a peroxiszómában a fotorespiráció során, a glioxiszómában, a kloroplasztiszbán – a már ismertetett módokon – és a mitokondriális elektrontranszportlánc működésekor, ez esetben elsősorban $O_2^{\bullet-}$ -ből. A plazmamembránban a NADPH-oxidáz, az apoplastban pH-függő sejtfal peroxidázok, a germin-szerű oxalát oxidázok és aminoszázok is lehetnek a H_2O_2 forrásai [73]. A H_2O_2 diffúzióval a membránokon vagy az aquaporinokon halad keresztül [74].

A $O_2^{\bullet-}$ keletkezhet a fotoszintetikus és a légzési (I-es, II-es és III-as komplex) elektrontranszportláncok működése, illetve a mikroszómális elektrontranszport során. Továbbá a sejtfal peroxidázok oxidálhatják a NADH-t H_2O_2 felhasználásával, mely során $O_2^{\bullet-}$ keletkezik, ami azt követően H_2O_2 -á dizmutálódik a SOD által. A két legreaktívabb szabadgyök, a 1O_2 és a $HO^{\bullet}$ a mitokondriumban, a kloroplasztiszbán és a sejt egyéb membránjaiban képződhet, és képesek lipidek, fehérjék és nukleinsavak oxidálására. Egyéb fontos ROF források a citoplazmában és az ER-ben található citokróm P_{450} által katalizált detoxifikáló reakciók [73]. Azonban a különböző ROF-generáló mechanizmusok hozzájárulása a sejtek ROF termeléséhez eltérő lehet [75].

A ROF szignalizáció a különböző bomlástermékek mellett történhet közvetlenül a redox érzékeny transzkripciós faktorok módosításával is. A redox-szenzor proteinek – a cisztein és metionin aminosavakon – található aktív tiol-csoportokkal (-SH) rendelkeznek, melyek

potenciális ROF célpontok. Oxidációt követően, a szenzorfehérjék kölcsönhatásba lépnek és oxidálják az effektor fehérjét, feltehetően redox-relét alkotva. A H_2O_2 metionin aminosavak -S- CH_3 csoportjaival is reakcióba léphet, mely a legtöbbször inaktíválja a fehérjét, továbbá az érzékelő funkciót maguk az antioxidánsok is elláthatják [75].

A kloroplasztikus ROF termelés szorosan kapcsolódik a fény-függő fotoszintetikus reakciókkal, így az itt megemelkedett ROF akkumuláció jól jelzi a külső vagy belső körülmények megváltozását. Fotoszintetizáló szövetekben, a mitokondrium hozzájárulása a sejt ROF termeléséhez relatíve alacsony. A peroxisomális H_2O_2 koncentráció szigorúan szabályozott a KAT által, így normál körülmények között nem haladhatja meg a $10\ \mu\text{M}$ -t az organelumon belül. A peroxisómában történő fotorespirációs H_2O_2 kioltás zavara fotorespirációt elősegítő körülmények között oxidáltabb irányba tolja el a sejt GSH és aszkorbát pool redox állapotát, mely a transzkriptóm gyors átalakulásához vezet. A peroxisomális KAT aktivitás szükség esetén leszabályozódhat – például szalicilsav által – és ez lehetővé teszi a tranziens H_2O_2 akkumulációt. Az apoplasztikus ROF a sejtorganelumokkal ellentétben ROF generáló enzimek működése során keletkezik, mint a sejtfall peroxidázok, poliamin oxidázok, NADPH oxidázok vagy RBOH-k (RESPIRATORY BURST OXODASE HOMOLOG), az utóbbiak működése kiemelten fontos a ROF szignalizációban abiotikus stressz során. A levélben található H_2O_2 legnagyobb részt apoplasztikus eredetű [74].

Annak ellenére, hogy a ROF „család” fontos szignálmolekuláknak is otthont ad, túlzott mértékű akkumulációjuk túlterhelheti az antioxidáns rendszereket, ami oxidatív károsodáshoz és növekedésredukcióhoz vezethet a növényekben, melyet oxidatív stressznek nevezünk [48]. A ROF kezelés – főleg a H_2O_2 – képes stressztoleranciát kiváltani a növényekben, mivel aktiválhatja a védelmi folyamatokat. A H_2O_2 a PCD és a szenescencia egyik kulcsszabályozója, mely szignalizációs útvonalak aktiválásával indukálja a sejthalált. A sejthalált kiváltó oxidatív robbanás bekapcsolásakor elsőnek $\text{O}_2^{\bullet}$ keletkezik. A legtöbb egyéb ROF a $\text{O}_2^{\bullet}$ dizmutációja során, vagy azt követően jön létre. A ROF a növényi növekedés során is fontos szereppel bír [73].

A ROF-on kívül, a NO és származékai, mint például a peroxinitrit (ONOO^-), a dinitrogén trioxid (N_2O_3), az S-nitrozoglutation (GSNO), a nitrogén dioxid (NO_2), a nitrozil kation (NO^+) [76], S-nitrozotiolok (SNO), nitro-zsírsavak ($\text{NO}_2\text{-FA}$) stb. – gyűjtőnevükön RNF – is kiemelt szereppel bírnak a növényi életfolyamatokban [77]. A NO gáz halmazállapotú növényi növekedésszabályozó molekula, mely fontos szerepet tölt be a fejlődés során, az abiotikus- és biotikus stresszválaszok kialakításában, beleértve a PCD-t is [78-80]. Életideje rövid, koncentrációjától is függően szignálmolekulaként vagy destruktív hatással rendelkezhet

[80]. Az állatokkal ellentétben – ahol a NO L-argininből képződik a NO-szintáz (NOS) által – növényekben a NO létrejöhet redukzív és oxidatív típusú enzimatis reakciókkal [81-83], illetve nem-enzimatis úton is. Növényekben eddig még nem találták meg az állati NOS homológ enzimet, azonban a NOS-aktivitást már kimutatták a peroxiszómákban, viszont a NO egyéb módokon képződhet a kloroplasztisban és a mitokondriumban is [84]. A NO hatása főleg a származékai makromolekulákkal alkotott kölcsönhatásán keresztül valósul meg. Ezek közül a fehérje működést módosító hatások a nitráció, az S-nitroziláció, ahol a NO kovalensen kötődik cisztein tiol csoportjaihoz és a metalloproteinek fémcentrumának nitrozilációja. A NO és a glutation reakciójából GSNO jön létre, mely fontos a hosszútávú NO szignalizációban [77].

A ROF túlzott akkumulációját az enzimatis és a nem enzimatis antioxidánsok tartják kordában. Utóbbiak közül a β -karotin antioxidáns hatásával képes kioltani a $\text{HO}^\bullet$ -t, a peroxil-gyököt és a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ot, valamint a glutation is kiemelt antioxidáns funkcióval bír. Az antioxidáns enzimek overexpresszáltatása (pl. KAT, SOD, APX) növelheti a toleranciát számos környezeti stresszel szemben [84]. A SOD három fő izoformája van jelen növényekben, melyek – fémion tartalmuk alapján megkülönböztetve – a mitokondriális és peroxiszomális elhelyezkedésű mangán SOD (MnSOD), a kloroplasztisban található vas-SOD (FeSOD), illetve a citoplazmatikus, apoplasztikus és kloroplasztisz lokalizációjú réz/cink-SOD (Cu/ZnSOD) [85]. Paradicsomban eddig négy *Cu/ZnSOD*, egy *MnSOD* és három *FeSOD* gént azonosítottak [86]. A MnSOD aktivitást nem gátolja a H_2O_2 , míg a Cu/ZnSOD és FeSOD működését igen [87].

A KAT a H_2O_2 -ra mM-os nagyságrendű szubsztrátaffinitással rendelkezik, ezért működése stresszfolyamatok során válik jelentőssé [88]. A növényekben legtöbbször három izoformája található meg: KAT1, KAT2, KAT3, lokalizációjukat tekintve a glioxiszómákban és a peroxiszómákban (KAT1 és -2), a sejtfalban (KAT1 és -3) [89, 90]. A mitokondriális KAT3 előfordulását leírták spenótban és kukoricában is [91]. Szöveti kifejeződésük alapján ezek az enzimek további csoportokra oszthatók: az I. osztályba a fotoszintetizáló szövetekben előforduló, fényfüggő expresszióval rendelkező KAT enzimek tartoznak, mint például az *Arabidopsis*-ban a KAT2; a II. osztályba a vaszkuláris szövetekben lokalizált KAT enzimek (pl. a TOMKAT1 paradicsomban); a III. osztályba pedig a glioxiszómákban, leginkább fiatal növényekben és magvakban kifejeződő KAT enzimek sorolhatók [92]. Az APX, ahogy már említésre került, szintén részt vesz a H_2O_2 kioltásában, azonban elektrondonorként redukált aszkorbátot használ. Affinitása a H_2O_2 -hoz μM -os nagyságrendű [88]. Paradicsomban három citoszolikus, két peroxiszomális és két kloroplasztikus lokalizációjú APX izoenzimet azonosítottak [93]. A kloroplasztikus APX szerepe korábban már említésre került, míg a

citoszolikus izoenzimek általános védelmet nyújtanak stressz esetén. A mikroszómális APX-ek elsősorban a zsírsavak β oxidációja során eliminálják a keletkező H_2O_2 -dot [94]. A növényi peroxidázok (POD, EC, 1.11.1.7.) a H_2O_2 lebontásához elektron donorként aromás vegyületeket, *in vitro* mérésük során leginkább gvajakolt vagy pirogallolt használnak. Megtalálhatóak a vakuolumban, citoszolban és a sejt falban, de a sejtszervecskében nem [88].

A ROF és az antioxidánsok között létrejövő egyensúlyhiány oxidatív stresszt okozhat, mely kialakulhat a túlzott ROF akkumuláció, illetve az antioxidánsok kioltó képességének csökkenése következtében egyaránt [84]. Mivel a ROF kölcsönhathatnak a RNF-kal, oxidatív mellett nitrozatív stressz is kialakulhat, melyet összefoglaló néven nitro-oxidatív stressznek nevezünk, amit számos abiotikus faktor, köztük a talaj magas sótartalma is kiválthat. A folyamat kialakulásában nagy szerepet játszik a NO képződése vagy elérhetősége, melyet a GSNO és az azt lebontó enzim, a GSNO reduktáz (GSNOR) valamint a ROF ($\text{O}_2^{\bullet-}$ és H_2O_2) közötti egyensúly szabályoz [95]. A lúdfű APX1 S-nitrozilációja megnöveli az enzim H_2O_2 kioltó aktivitását és így növeli az oxidatív stresszel szembeni ellenállóképességet [96]. A nitráció egy nitro-csoport ($-\text{NO}_2$) hozzáadását jelenti a zsírsavakhoz, fehérjékhez vagy nukleinsavakhoz. Fehérjék esetében létre jöhet a tirozin, cisztein, metionin vagy triptofán aminosavakon, ami lehet hatástalan, okozhat funkciónerést, vagy leggyakrabban funkcióvesztést. A NO és a $\text{O}_2^{\bullet-}$ reakciójából létrejövő ONOO^- által mediált nitráció a legtöbbször az utóbbi típusú hatást váltja ki, például néhány antioxidáns enzim, mint a KAT, vagy az APX stb. esetében. A ONOO^- vezérelt tirozin nitráció nitrozatív stresszt válthat ki a sejtben, így ez a molekula jó markereke ennek a stressztípusnak. A PRX képes detoxifikálni a ONOO^- -et, viszont aktivitását gátolhatja az S-nitroziláció, csakúgy, mint az RBOHD-t *Arabidopsis*-ban [77]. A ONOO^- felhalmozódás csökkentheti a sejt $\text{O}_2^{\bullet-}$ tartalmát, így végső soron védheti a biomolekulákat az oxidációtól és megakadályozhatja a további ROF termelődést. A legújabb eredmények szerint, a ONOO^- nem olyan toxikus növényekben, mint az állatokban. Továbbá, a ONOO^- csökkentheti a H_2O_2 termelődését a SOD számos izoformájának blokkolása által [96].

Bár stressz során, mint a sóstressz [97, 98], vagy az ozmotikus stressz [99], számos tanulmány vizsgálta az ET és a ROF, illetve az ET és a RNF kapcsolatát, azonban stresszmentes körülmények között, néhány fejlődési folyamatot – például a szenescencia, a gyökérfejlődés, illetve az azzal asszociált PCD – és a sztómazárás szabályozását kivéve az ET és a szóban forgó reaktív molekulák szimultán vizsgált kölcsönhatásáról viszonylag keveset tudunk. Továbbá, a szakirodalomban fellelhető – specifikus stressz faktor jelenléte nélküli – vizsgálatok ritkán terjedtek ki a ROF és RNF, illetve az ET kapcsolatának, valamint az időbeni egymásra hatásuk

egyidejű monitorozására. A növényi sejthalál különböző típusaiban az ET és a ROF kölcsönhatása alapvető. Az exogén Ethephon kezelés H_2O_2 akkumulációt és szeneszenciát indukált édesburgonya-levelekben [100]. A rizs mellékgöker primordium képződését megelőző, ET-indukált epidermális sejthalál során a H_2O_2 downstream hatott az ET-től és függött a $O_2^{\bullet}$ termelő NADPH-oxidáz aktivitástól, továbbá az ET és a H_2O_2 egymást amplifikáló szignálként funkcionált a folyamat során [101]. A H_2O_2 akkumuláció stimulálta az ACO expressziót és az ET bioszintézisét transzgénikus burgonyában [102].

Számos ET jelátviteli elem vesz részt a sejtek ROF válaszában kialakításában. Az *Arabidopsis erf6* ROF-indukált expressziója Ca^{2+} és NADPH-oxidáz (RbohD)-függő szignalizációt igényel. Az AtERF6 pozitív antioxidáns szabályozó a növényi növekedés és a stresszválasz során [103]. Az ET indukált MAPK kaszkád szabályozza a ROF termelődést az RBOH génnek transzkripcionális szabályozásával [104]. A paradicsom TERF1 az SLEIL3 és SLEIL4 által szabályozott ERF transzkripció faktor, exogén ROF generáló vegyületek hatására is indukálódik. A TERF1 ektopikus expresszálatása dohányban fokozta a KAT expresszióját [105]. Továbbá *Agrostis stolonifera* előkezelése ACC-vel például fokozta SOD, az APX és a POD aktivitását hőstressz során [106]. Az 1- metilciklopropán kezelés (1-MCP) – ami elfoglalja az ET receptorok ET kötőhelyét, így gátolja az ET hatást – csökkentette a POD és a KAT aktivitását szilvában [107]. Az exogén Ethephon indukálta az *NtKAT2* és *NtKAT3* izoenzimek expresszióját dohánylevelekben [108]. A ROF amplifikálhatja az ET jelátvitelt az ETO1 és ET bioszintézis-asszociált géneken keresztül [104]. Burgonyagumók sebzésekor az ACC-ből nem-enzimatis módon is képződhet ET, a $O_2^{\bullet}$ és az ACC reakciója során [109].

A NO az ET bioszintézist is szabályozhatja, ráadásul többféle módon. Lúdfűben a NOA1-függő (NITRIC OXIDE-ASSOCIATED 1) NO akkumuláció blokkolta az ACS1 szeneszencia-indukált bekapcsolását [110]. A Yang-ciklus különböző enzimek is célpontjai lehetnek az S-nitrozilációnak. Ezzel szemben, exogén NO-donorok lúdfű és dohány nem-szeneszencia leveleiben stimulálták az ET-termelést. A két molekula kölcsönös befolyással bír egymás bioszintézisére, hiszen az ACC kezelés NO emissziót váltott ki borsólevelekben, ahogyan *Arabidopsis* gyökér szubapikális régiójában is [111]. Az ET sztómazárást indukált a NO produkció fokozásával [112], viszont gátolta az ABA indukált sztómazárást a zárósejtek NO mennyiségének csökkentésével *Vicia faba* levelekben [113]. Mindezen túl, NO jelenlétében destabilizálódtak, majd proteolitikusan lebontódtak a VII csoportba tartozó ERF-ek [114]. Továbbá, az *ein2-1* lúdfű sejtekben fokozott $O_2^{\bullet}$ és ONOO⁻ akkumulációt figyeltek meg [115].

2.1.4. Az etilén prekursora, az 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC)

Az ET közvetlen prekursora, az ACC, egy diszubsztituált, ciklikus alfa-aminosav 101 Da molekulasúllyal. Háromtagú ciklopropán gyűrűje az alfa szénatomhoz fuzionált [116]. Az ACC-t oxigén és aszkorbát jelenlétében az ACO ET-né alakítja CO_2 és CN^- képződése mellett, melyet a β -cianoalanin szintáz β -cianoalaninná konvertál. Az ET bioszintézisben betöltött funkciójához az ACO Fe^{2+} kofaktort és aktivátorként bikarbonátot igényel [16]. Az ACO transzkriptumok szöveti megoszlása fontos markere az ET-termelés lokalizációjának [117]. Az ACC és néhány konjugált formája gyorsan transzportálható – akár percek alatt – a növények szöveteiben, a xilémen és a floémen keresztül is [118]. Napraforgó-csíránövények 1 órá, 10 μM ACC-s kezelése során a ^{14}C -ACC gyökérhez adását követően, 0,5 órával később már mérhető volt ^{14}C -gyel jelölt ET kibocsájtás a levelekben, ahol 6 óra után visszaállt a normális ET emisszió értéke, ahogyan a gyökérben is. A ^{14}C -MACC koncentrációk 2 órán belül túlhaladták a levél ^{14}C -gyel jelzett ACC tartalmát, míg a gyökérben ez 6 órába tellett. 24 óra elteltével, lényeges mennyiségű radioaktivitás exudációt fedeztek fel a gyökérből mind az ACC, mind a MACC frakcióban [119]. Az ACC hosszútávú transzportja számos stressztípus hatására is (tápanyag-stressz, szárazság- vagy sóstressz) bizonyítottan megtörténik a gyökérből a hajtásba [16]. Az ACC szubcellulárisan kompartmentizálódhat a tonoplasztban [120]. A növények endogén ACC tartalmát a magasabb fényintenzitások növelik [121], továbbá az ET felszabadulás kapcsolódhat a fotoszintetikus aktivitáshoz is [122].

Az ET felhalmozódhat a növények külső környezetében is, mind a légtérben, mind a talaj gázfázisában. Hajdanán, a gépjárművek kipufogó rendszere mérhető mennyiségű ET-t bocsájtott ki a környezetbe, mely szennyezett területeken (akár $0,70 \mu\text{L L}^{-1}$ koncentrációt elérve) befolyásolta a növényi növekedést [123]. Az ET relatíve alacsony koncentrációban ($0,1 \mu\text{L L}^{-1}$) elősegíti a levél [124], a koleoptil vagy a petiólum megnyúlását bizonyos fajokban, míg a nagyobb koncentrációk gátló hatásúnak bizonyulnak [2]. Az ET-okozta növényi növekedésgátlás a legtöbb esetben $1 \mu\text{L L}^{-1}$ ($6,5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 25°C) ET koncentrációtól következik be, mely egyéb, tipikus tüneteket, mint például a levél epinasztiáját vagy korai szeneszenciát eredményez [125]. Szerencsére, mára a gépjárművek ET kibocsátása lecsökkent, így az ET gáz csak speciális körülmények között érhet el gátló koncentrációt a természetben, ilyen a biomassza égetés vagy spontán erdőtüzek és a helyi/antropogén tevékenységből származó ET kibocsájtások [126]. A szennyezetlen területek ET koncentrációja $0,03$ - $0,50 \mu\text{L L}^{-1}$ között változhat [123].

Az ET parciális nyomása a talaj gázfázisában jóval magasabb, $0,50$ - $17,60 \mu\text{L L}^{-1}$ koncentráció közé eshet [124]. A talajban, az ET képződhet a szerves anyagok lebomlása során

és néhány talajlakó mikroorganizmus szintén képes szintetizálni különböző prekursorokból [118]. Nemcsak az ET, hanem az ACC is képes felhalmozódni a gyökér környezetében. A talajvízben az ACC elérheti a $0,23-0,52 \mu\text{M L}^{-1}$ koncentrációt elárasztott paradicsomgyökerek környezetében [127]. Egyéb kis molekulával egyetemben, a növény által szintetizált ACC egy része szekretálódik a gyökerekből a talajba és nemcsak más növények, hanem a gazdanövénnel laza asszociációban élő, rhizoszféra-baktériumok is felvehetik [118]. E baktériumok közül számos törzs indol-3-ecetsavat, auxin típusú növényi hormont is termel, mely stimulálja az ET bioszintézisét a növényben az ACS serkentése által. Az ACC-deamináz (ACCD) enzimmel rendelkező talajbaktériumok lebontják az ACC-t, így a talajoldat illetve a talajlevegő ET/ACC szintjének csökkentésével stimulálják a gyökér növekedését [128]. Továbbá, ezek a mikroorganizmusok elősegíthetik az esszenciális elemek felvételét és megelőzhetik a környezeti stresszorok káros hatását a növényi szisztémikus rezisztencia indukálásával [118, 129].

14 vizsgált *S. lycopersicum* fajta csíranövényei közül a legtöbb magas, de a többi is legalább közepes érzékenységet mutatott az ET-re az etiolált csíranövények hipokotiljának ET-indukált megnyúlásos növekedésgátlása alapján, melyet $100 \mu\text{M}$ -os exogén ACC kezelés segítségével monitoroztak. Kifejlett növények esetében – a levél epinasztia mértéke alapján – is hasonló eredményeket tapasztaltak, bár utóbbi esetben a jelenséget exogén ET-nel váltották ki. Más *Solanaceae* családba tartozó fajokban az ET válaszreakciók sokkal nagyobb mértékben függtek a fejlődési állapottól [130].

Az ACC-t számos tanulmány során alkalmazták ET-t generáló molekulaként a hormon hatásainak megismerésére. Az exogén ACC-nek a gyökér megnyúlására kifejtett, elsősorban gátló hatását $1 \mu\text{M}$ -nál kisebb koncentrációban is kimutatták, de különböző fajokban, széles, $5-50 \mu\text{M}$ -os koncentrációban is vizsgálták [131-133]. Mindezek mellett az exogén ACC megnövelheti a gyökér frisstömegét is [134], viszont 24 órás, $100 \mu\text{M}$ -os ACC kezelés csökkentette a gyökér hidraulikus vezetőképességét paradicsomban [135]. *Agrostis stolonifera* lombozatának, a hőstresszt megelőző, $100 \mu\text{M}$ -os ACC-vel történő permetezése növelte a hőtoleranciát, valószínűleg az antioxidánsok serkentésével [106]. *Lemna minor* $0,01-1000 \mu\text{M}$ -os ACC oldatokban, sötétben történő inkubációja során nem figyeltek meg telítést az ACC felvételében, viszont az ET-termelés $10 \mu\text{M}$ exogén ACC jelenlétében telítődött. Tapasztaltak mérhető növekményt az ET kibocsátásban $0,01 \mu\text{M}$ ACC jelenlétében is [136].

Az újabb eredmények azt sugallják, hogy az ACC ET-független módon is befolyásolhatja a növények életfolyamatait [16, 137] elsősorban a gyökérben [17, 138, 139], viszont a közelmúltban a hajtás esetében is mutattak ki ET független ACC hatást [140].

2.2. A sóstressz, mint az egyik fő abiotikus stresszfaktor

A helyhez kötött növényi életnek gyakorta kell megbirkóznia a kedvezőtlen környezeti feltételekkel, melyek közül a talaj magas sótartalma az egyik legfőbb abiotikus stressz tényező [141]. A sós talajok szilárd vagy folyékony fázisukban különféle sók ionjainak domináns befolyása alatt állnak [141]. Ugyanakkor, a növények ez által elszenvedett károsodásai faj-, fajta-, növekedési állapot-, környezeti faktor- és sóion-függők lehetnek, így nehéz pontosan definiálni e talajokat. Általánosan elfogadott kritérium, hogy ha a gyökérzóna telítési extraktumának – az a vízzel telített oldat, amit kivontak az adott talajmintából – elektromos vezetőképessége eléri, vagy meghaladja a 4 dS m^{-1} értéket, 25°C -on, illetve amennyiben a kicserélhető Na^+ mértéke eléri a 15%-ot, a vizsgált talaj magas sótartalmúnak tekintendő [142, 143]. A FAO 2008-as adatbázisa szerint, a világon 800 millió ha földterület érintett, mely 2015-re 1 milliárd ha-ra nőtt [144, 145], beleértve az öntözött termőföldek legalább 20%-át [146].

A talaj sóösszetétele szerint megkülönböztetjük a szalinitást, mely az összes ásványi só optimum feletti koncentrációját jelenti, illetve a szodicitást, mely a Na^+ többletet fejezi ki [147]. A nátriumsók elektrolitjainak – leginkább nátrium klorid (NaCl) és nátrium szulfát (Na_2SO_4) – közel semleges reakciójával létrejövő nagy sótartalmú talajok a leggyakoribbak, melyek leginkább szárazabb régiókban fordulnak elő [141]. Európa összterületének 3,6%-a – 73 millió ha – érintett a magas szodicitás által [145]. Hazánkban szikes talajok főleg a Duna-Tisza közén (Homokhátság), a Tiszántúlon (Körösvidék, Hortobágy, Nagykunság) találhatóak [148]. Az oldható sók felhalmozódása jelentősen csökkenti a talajok értékét és termőképességét, biológiai aktivitását, megváltoztatja a fizikai és kémiai tulajdonságaikat [141]. A problémát okozó legáltalánosabb kationok a Na^+ , a Ca^{2+} és a Mg^{2+} , míg az anionok a Cl^- , a SO_4^{2-} és a HCO_3^- . Mivel a Na^+ a talaj fizikai struktúráját is rontja és a Na^+ és a Cl^- is toxikus a megfelelő koncentrációban a növényekre, ezért ezeket tekintik a legfontosabb ionoknak. A sós talajok kialakulhatnak természetes és mesterséges úton is. A nem megfelelő öntözési rendszerek használata kiemelkedő az antropogén hatások közül. A másodlagos sóhatás is felléphet, ha a talajban vagy a talajvíz mélyebb rétegeiben tárolt só mobilizálódik és eléri a gyökérzónát [149].

A rohamosan növekvő területű, magas sótartalmú talajok okozta probléma komoly, hiszen a termesztett haszonnövényeink többsége glikofita, tehát érzékenyek vagy hiperérzékenyek a talaj sótöbbletére [150]. Szerencsére akadnak köztük mérsékelt sótoleranciával rendelkező fajok/fajták – például a paradicsom – is, melyek növekedését a túl magas sókoncentráció szintén gátolja [151]. A talaj sótartalma a természetben általában fokozatosan nő meg, azonban antropogén hatásokra hirtelen is megemelkedhet [152].

A magas sótartalom növényekre gyakorolt kedvezőtlen hatásait sóstressznek nevezzük. Jelen disszertáció keretei között, sóstresszként a NaCl – mint a leggyakrabban előforduló és legtöbb problémát okozó só típus – hatásait tárgyaljuk. Mindezek alapján elmondható, hogy a növények sóstresszre adott válaszreakcióinak alaposabb megismerése globális jelentőségű.

2.2.1. A sóstressz-specifikus növényélettani hatások

A sóstressz hatása a növényekre ozmotikus és ionikus komponensekre bontható [146]. Az ozmotikus komponens – mely megelőzi az ionikust – a talajoldat ozmotikus potenciáljának esését jelenti, ami csökkenti a víz hozzáférhetőségét a növények számára [153]. Ez megváltoztatja a gyökér hidraulikus konduktivitását és zavarokat okoz a xilémtranszportban is [147]. Az így kialakuló vízdeficit ABA-függő (például a sztómazárás) és ABA-független (például a fotoszintézis hatékonysága és a fotoinhibíció stb.) utak aktiválódásán keresztül [152] a biomassza produkció csökkenését eredményezi [154]. Az ozmotikus hatás a sókoncentráció emelkedésével azonnal jelentkezik, viszont – amennyiben nem történt plazmolízis – a gyökér növekedése hamar helyreáll, vagy beáll egy csökkent alapszintre, mely a hajtásban időben később tapasztalható [155]. A természetben az ozmotikus hatás kevésbé kifejezett [152].

Az intercelluláris térben található sóoldatok kémiai potenciálja kibillenti az apoplast és szimplaszt közti vízpotenciál egyensúlyát, mely turgornyomás csökkenést és végül növekedésgátlást eredményez. Ebben a helyzetben a sejtek ozmotikus adaptációra való képessége határozza meg a túlélésüket [150]. A NaCl kezelés gyorsan indukálja az inozitol-1,4,5-tiszfoszfát (IP3) prekursor, foszfinozítid foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát bioszintézisét, és az IP3 koncentráció növekedése közvetíti a jelet a sejt Ca^{2+} mobilizálása felé. A citoszolikus Ca^{2+} a plazmamembrán, a tonoplast és az ER membránjaiban található Ca^{2+} pumpákon és csatornákon keresztül transzlokálódik. A downstream elhelyezkedő MAPK kaszkádok befolyásolják a génexpressziót számos transzkripciós aktivátor foszforilálásával. Az ozmotikus egyensúly felborulása során fontos a sejtmembrán integritásának megőrzése, mely membrán-újrendeződés útján valósulhat meg. Amennyiben a membránintegritás sérül, az elektrolitok kiszivároghatnak a sejtől. Az ozmotikus adaptáció megtörténhet kompatibilis ozmolitok akkumulálásával, melyek lehetnek különféle szerves ozmolitok – például egyszerű cukrok, diszacharidok, cukoralkoholok stb. – de jelentheti a szervetlen ionok, főleg a K^+ felvételét és felhalmozását is. A kompatibilis ozmolitok helyreállíthatják a sejt ozmotikus potenciálját a metabolikus folyamatok gátlása nélkül. Továbbá ozmoprotektánsként védik a fehérjéket, a membránokat, illetve antioxidánsokként is funkcionálnak [152].

A sóstressz ionikus komponense a Na^+ és Cl^- ionok lassú felhalmozódása által az ionhomeosztázisban okozott zavart jelenti. Az ionfelvétel megvalósulhat szimplasztikus és

apoplasztikus úton. Például rizsben a Na^+ és a Cl^- felvétele a xilémbe 50%-ban apoplasztikus transzporttal megy végbe, mely egy folyamatos áramlást jelent a külső tér és a xilém között. A Na^+ beáramlás a sejtbe a legnagyobb mértékben a nemszelektív kationcsatornákon (NSCC) keresztül történik a glikofitákban, továbbá a folyamatban részt vehetnek a HKT1; az aquaporin AtPIP2,1; a shaker-típusú K^+ csatornák, mint az AKT1 (akár 30-40%-ban) és az LCT1 kis-affinitású kation transzporter. Mindazonáltal, intakt gyökerekben az egyirányú Na^+ influx sebessége a $20\text{-}200\ \mu\text{M g}^{-1}$ friss tömeg h^{-1} határok között mozog. A Na^+ ionnal ellentétben a Cl^- esszenciális ion, mely H^+/Cl^- szimporttal juthat a sejtbe, feltételezhetőleg anion csatornákon keresztül, azonban a specifikus felvételének molekuláris mechanizmusa eddig ismeretlen [156]. A K^+ a növényekben a sejt legfontosabb, esszenciális kationja, alapvető szerepe van a turgornyomás fenntartásában, valamint a membránpotenciál, a membránintegritás és funkció megőrzésében, továbbá számos enzim működéséhez szükséges [152]. A növényi sejtek ionfelvevő rendszerében a Na^+ a K^+ direkt kompetitora, ráadásul magas sókoncentrációk esetén a Na^+ felvétele sokkal hatékonyabb, mint a K^+ -é [150]. A magas extracelluláris Na^+ koncentráció az alacsony szelektivitású K^+ felvevő rendszereket érinti, míg a nagy-affinitású rendszerek tovább működnek sóstressz során is és kiemelt szerepük van a sótoleranciában [152]. A citoplazmában felhalmozódott Na^+ a K^+ -hoz viszonyított, magasabb töltéssűrűsége miatt több vizet vonz maga köré és dehidratálja a fehérjéket, melyek így elveszíthetik natív konformációjukat, továbbá a DNS-re is hasonló hatással lehet [156]. Stresszmentes körülmények között a citoszolban körülbelül $20\ \text{mM Na}^+$ és $100\ \text{mM K}^+$ található, azonban amennyiben a K^+/Na^+ arány ettől jelentősen eltér, az enzimatis folyamatok, illetve a fehérjeszintézis gátlódhat [158]. Mivel a Na^+ és a K^+ ionok közti fizikokémiai hasonlóság nagy, kompetitív kapcsolat áll fent köztük a K^+ kötő enzimek katalitikus helyeiért [150], ez azonban nem minden enzimnél jelent gátlást, illetve azoknál, ahol mégis, a Na^+ mennyiségnek a K^+ tartalom többszörösét kell elérnie [156]. A citoszol magas K^+/Na^+ arányának megőrzése tehát fokozza a növények sótoleranciáját. A növényi védekezés megvalósulhat – többek között – a Na^+ vakuólumba történő kompartmentizációjával, valamint a kevésbé fontos szövetekben történő felhalmozásával [150]. A Na^+ és a K^+ újraelosztása a sejtkompartmentumok között fontos a citoszol magas K^+ tartalmának fenntartásához [159]. A NaCl-indukált K^+ kieresztés a GORK-on (GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K^+ CHANNEL) keresztül valósul meg, melynek az aktivitás csökkenése segíti a sótoleranciát [160]. A sótűrő halofiták képesek fenntartani a megfelelő K^+/Na^+ arányt a citoplazmájukban, melyre speciális K^+ felvevő rendszereket fejlesztettek ki. A citoszolikus Cl^- enzim inhibitor hatását $80\text{-}100\ \text{mM}$ koncentráció fölött fejt ki. továbbá, az ionikus komponens a membránpotenciál befolyásolásán

keresztül – mivel számos transzportfolyamat feszültség-függő – megzavarhatja az esszenciális tápanyagok felvételét [156].

A külső tér megemelkedett Na^+ koncentrációjának érzékelését végző szenzort egyelőre még nem találták meg, azonban az egyik jelölt a SOS5 (SALT OVERLY SENSITIVE5) plazmamembrán lokalizált fehérje, továbbá az Annexin1 (ANN1) is képes érzékelni az extracelluláris Na^+ koncentráció emelkedését, melynek hatására ROF-aktivált Ca^{2+} beáramlást indít el a sejtbe (6. ábra). A sejten kívüli Na^+ az intracelluláris Ca^{2+} , foszfátidsav (PA) és ciklikus-guanidin monofoszfát (cGMP) növekedéséhez vezet. A sóstressz által indukált Ca^{2+} szignált a SOS3 – mirisztirált, EF-hand tartalmú, kalcium-kötő fehérje – érzékeli, mely elősegíti a Ser/Thr protein kináz, SOS2 és a SOS3 komplex képződését. Ez foszforilálja, és aktiválja a SOS1, Na^+/H^+ antiportert, mellyel serkenti a Na^+ eltávolítását a citoplazmából, továbbá a SOS2-SOS3 komplex meggátolja a Na^+ felvételét a HKT2-n keresztül. A SOS1 segíti a Na^+ ionok betöltését is a xilémbe. A PA ettől függetlenül az MPK6-on keresztül is aktiválhatja a SOS1-t. A SOS2 közvetlenül befolyásolhatja a vakuoláris ATP-áz (V-ATPáz) aktivitását is, illetve egyéb vakuolum transzporterét is, mint a CAX (ARABIDOPSIS CALCIUM EXCHANGER) és az NHX (Na^+/H^+ ANTIPORTER). A citoszolikus Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) akkumuláció hathat a SOS1 gén promóterére is az RSA1-RITF1 (ROOT IN SALT MEDIUM 1-RSA1 INTERACTING TRANSCRIPTION FACTOR) komplex kialakulásának elősegítésével. A CDPK3 és a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aktiválja vakuoláris kétpórusú K^+ csatornákat, így a K^+ kieresztését a vakuulumból a citoszolba. A cGMP megemelkedése valószínűleg a ciklikus nukleotid-kapuzott ioncsatornákon (CNGS) és a glutamát-receptorokon (GLR) keresztül gátolja a Na^+ felvételt. A PIP2;1, a CNGC és a GLR blokkolható Ca^{2+} hozzáadásával [156].

6. ábra A sóstresszt okozó ionok felvétele és az érzékelésük komponensei [156].

A SOS2-SOS3 komplex számos gén expresszióját is indukálja, beleértve a SOS1 gént is. A NaCl végül interferál a Ca^{2+} felvétellel is, így csökkenti a kationnak a citoszolikus koncentrációját, mely egyébként fontos a membránstabilitáshoz, az ozmotikus egyensúly megtartásához és a sejten belüli jelátvitelhez [152]. A xilém parenchima sejtekben található AtHKT1 kiválasztja a Na^+ -ot a xilémelemekből a xilém parenchima sejtekbe. Ezt követően a Na^+ plazmodezmoszokon át a floémbe jut szimplasztikus diffúzióval. Ez csökkenti a levelek Na^+ terhelését sóstressz során [161]. A sóhatás kifejlődése során az akut, leginkább gyors ozmotikus fázis egy általános stresszválaszt vált ki a növényekből, viszont a késői válaszgenek NaCl specifikusak [105].

A só-indukálta sztómazárás nem csupán a növény vízmegőrzését biztosítja, hanem a káros ionok felvételét is limitálja [162]. Ugyanakkor, ez a mechanizmus a fotoszintetikus aktivitás és a biomassza termelés csökkenéséhez vezet [154], a megmaradt energia pedig felhasználódik a védelmi folyamatok működtetésére [163]. A növekedés csökkenése a fel nem használt fotoszintetikus termékek felhalmozódásához is vezethet a szövetekben [164]. A sóstressz csökkentheti a levelek klorofill és karotinoid tartalmát is [165], továbbá a kloroplasztisban megnövekedhet a Na^+ és a Cl^- koncentrációja és csökken a K^+ tartalom. Bár a RuBisCO nem túl sóérzékeny, a Na^+ más CBC enzimek aktivitását csökkentheti, így a sóstressz közvetlenül is gátolhatja a fotoszintézist. A megemelkedett ROF produkció, a Na^+ és a Cl^- bejutása a sztrómába sóstressz során megváltoztatja a sztróma ionösszetételét, ami gátolja a gránumok összefűződését, így csökkenti PSII aktivitását. Mindemellett, a K^+ homeosztázis megzavarása a protonmozgató erő ΔpH komponensére is hathat [163]. A NaCl ionjai károsíthatják a fénybegyűjtő komplexeket is [166]. A CET-PSI aktivitása sóstressz során alapvető szerepet játszhat, mivel nemcsak extra ATP-t termel, hanem csökkenti ROF képződést is, valamint az általa létrehozott ATP javasolt a Na^+ túlzott akkumulációjának megelőzésére szója kloroplasztiszokban. A Cl^- nemcsak a PSII komplex egyik kofaktora, hanem számos egyéb kloroplasztikus folyamatban is fontos szereplő, ugyanakkor a sóstressz okozta túlzott Cl^- akkumuláció telítheti a Cl^- kötődését a PSII-höz, mely megemelkedett ROF produkcióhoz és fotoinhibícióhoz vezethet glikofitákban [163].

A ROF – pl. $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$ – és a NO szignálmolekulaként is részt vesznek a sóstressz-válaszok kialakításában, túlzott mennyiségük azonban másodlagos, nitro-oxidatív stresszt indukál a növényi sejtekben, mely a sóstressz harmadik komponensének is tekinthető [105, 150]. Nyárfá kallusz sejtekben a só-indukált H_2O_2 termelés sótoleranciát indukált, a Na^+ szintek alacsonyan, míg a K^+ tartalom magasan tartásán keresztül. Ezen túlmenően, a sókezelésnek kitett, talajban nevelt *Arabidopsis* növények gyökereiben az AtrbohF által megnövelt

vaszkuláris ROF ($O_2^{\bullet-}$) produkció korlátozza a xilémedv Na^+ tartalmát, így csökkenti a Na^+ transzportját a gyökérből a hajtásba, ahol így magasabb K^+/Na^+ arányt és sótoleranciát indukált [167]. A ROF a Na^+ és K^+ homeosztázist a plazmamembrán Ca^{2+} áteresztő csatornájának aktivitásán keresztül is szabályozhatja, mely befolyásolja a downstream elhelyezkedő komponenseket, mint az MPK-ok, a SOS2 és hasonló fehérjék. Továbbá, a ROF kifejtheti ezirányú hatását a SOS1 mRNS stabilitásának fokozásával, illetve a plazmamembrán H^+ -ATPáz aktivitásának kontrollálásával [105].

A sóstressz során a tolerancia kialakításában kiemelt szerep jut az antioxidáns enzimeknek. A KAT aktivitása növekedhet és gátlódhat is hatására, továbbá az APX és a SOD aktivitás is érintett lehet [168]. A túlzott ROF produkció K^+ kiáramláshoz vezethet, főleg a GORK és NSCC csatornákon keresztül, ami inicializálja a PCD-t [156].

A sóstressz szignalizációban a NO és a többi RNF is szerepet játszhat [169]. Sókezelés során megemelkedett a NO felhalmozódás számos növényi szervben [170, 171]. A szakirodalmi eredmények alapján a só-indukálta NO akkumuláció függ a stressz mértékétől és időintervallumától, valamint a szövetek korától [171-173]. A magas NO koncentráció önmagában nem olyan káros [174]. Sóstressz során a túlzott NO és $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció viszont $ONOO^-$ képződéséhez és nitrooxidatív stressz kialakulásához vezet a növényekben [175]. NaCl jelenlétében a NO fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását [172, 176, 177], továbbá szignálként is funkcionálhat a megemelkedett Na^+/K^+ hatására, aktiválhatja a plazmamembrán Na^+/H^+ antiportert, a plazmamembrán és vakuoláris H^+ ATPáz és a H^+ pirofoszfátáz [172, 178]. A NO akkumuláció a sókezelés nagyon korai szakaszában – percektől órák – elérheti a maximum szintjét [98]. A sóstressz megnöveli az SNO akkumulációt is [179].

Sóstressz során a Na^+ felhalmozódás okozta membrán depolarizáció K^+ kiáramlást vált ki a sejtéből. A $[Ca^{2+}]_{cit}$ emelkedése fokozza a ROF produkciót, mely a már leírt módon egy pozitív visszacsatolási kört eredményez. Ez további K^+ effluxot okoz, majd a citoszol K^+ tartalma lecsökken, ami aktiválja a cisztein proteázokat, végül PCD-hez vezet [158]. Az oxidatív robbanás, a DNS feldarabolódása, illetve a sejtmagi kromatin-kondenzáció is megfigyelhető a sóstressz-indukált PCD során a növényekben [180]. A DNS fragmentáció, mely akár a NaCl expozíciót követő 1 óra elteltével is detektálható, az ionikus stressz eredménye [181, 182]. A sejtek megemelkedett elektrolit-kieresztése is tipikus PCD jellemző, továbbá gyakran használják a sótolerancia meghatározására is, mivel legfőképpen a K^+ effluxot jelzi, ugyanakkor a K^+ fogyás társulhat Ca^{2+} és H^+ kiáramlással is a sejtéből. [183-185]. Ugyanakkor a só-indukált PCD megjelenése vagy mértéke függ a stressz erősségétől is [98]. Fontos megjegyezni, hogy a sóstresszre adott válaszreakciók kialakulásában is kiemelt szerepet

játszanak a növényi hormonok [186], azonban a jelen dolgozat a szupraoptimális sókoncentráció és az ET kapcsolatának vizsgálatára tér ki, melynek szakirodalmi vonatkozásait a 2.2.3. alfejezet tárgyalja.

2.2.2. A paradicsom sóstressz reakciói

A növények sóstresszre adott válaszreakciói nagyban függenek annak erősségétől. Nyolchetes paradicsomnövények 100 mM NaCl-dal történő kezelése a hetedik napra szignifikáns mértékben csökkentette a hajtáshosszt, a teljes növény friss tömegét, valamint az össz-karotinoid tartalmat, a klorofill *a* és *b* összemennyiségét, ugyanakkor nem befolyásolta a membránok oxidatív károsodását jelző, malondialdehid (MDA) tartalmat [187]. Paradicsom szuszpenzióban kb. 20%-os életképesség redukciónak detektáltak egy hetes, 100 mM NaCl koncentráció hatására, mely azonban hosszabb távon regenerálódott. Ezzel szemben 300 mM NaCl teljesen lecsökkentette a sejtek életképességét és az elektrolit-kieresztés mértéke is csaknem elérte a 70%-ot, továbbá még magasabb ROF produkciót eredményezett. Bár itt 100 mM NaCl hatására is csökkent a K^+/Na^+ arány, 300 mM-os só esetében ez sokkal erősebbnek bizonyult az intenzív K^+ kieresztés és a sokkal nagyobb arányú Na^+ akkumuláció miatt [188]. Ezen túlmenően, 250 mM NaCl PCD-t váltott ki paradicsom sejszuszenzióban is, és 6 óra leforgása alatt a sejtek 80%-a elpusztult [189]. Adódhatnak azonban apróbb különbségek a paradicsomfajták között a sótolerancia tekintetében [168]. Ezekből az eredményekből jól látható, hogy míg 100 mM NaCl szupraoptimális, növekedésgátló, de még tolerálható mértékű sókoncentráció a paradicsom számára, 250 mM már sejthalált indukál. A sóstresszre adott válasz, a tolerancia mértéke már a stressz kezdeti fázisában eldőlt [152]. Ugyanakkor relatíve kevés tanulmány foglalkozik a sóstressz korai eseményeivel a teljes növény szintjén.

2.2.3. A sóstressz és az etilén hormon kapcsolata

Az ET fontos szereppel bír a növények szupraoptimális sókoncentrációra adott válaszainak kialakításában, bár a szakirodalomban ellentmondásos eredmények születtek azzal kapcsolatban, hogy az ET pozitív vagy negatív korrelációban áll-e a sótoleranciával. Számos ellentmondás valószínűleg azért jöhetett létre, mert sok tanulmány egyszerre csupán egy, vagy kevés komponenst vizsgál [146], legtöbbször szűk időfelbontásban. A „stressz ET” termelődése általában két csúcsban történik. Az első, kisebb csúcs a stressz kialakulásának korai időszakában jelenik meg, és főleg a védelmi folyamatok beindulásáért felel, viszont kimeríti az aktuálisan rendelkezésre álló ACC készletet. Ez az állapot később újabb ACC készlet szintetizálásához vezet, mely a második ET csúcshoz szükséges, ami azonban sokkal nagyobb és hosszabb ideig is tarthat, akár több órás vagy hetes intervallumot jelenthet. A hosszasan megemelkedett ET produkció így PCD-t vagy szenescenciát indukálhat a szervben vagy a

növényben [190]. A következőkben részletezett ismeretek bepillantást nyújthatnak az ET komplex szerepére a sóstressz-válaszok kialakításában.

Sóstressz során az ET szabályozza például a K^+/Na^+ homeosztázist a Na^+ Rboh-függő akkumulációján keresztül, illetve a K^+ tartalom Rboh-független befolyásolásával [146]. Az ET transzkripciós szinten is képes szabályozni a K^+ felvételt, például a HAK5 fehérjén keresztül, K^+ hiány és teljes tápanyagellátás mellett is [191, 192]. Sóstressz során, az ET-receptor mutáns *Arabidopsis (etr1-3)* sokkal érzékenyebbnek bizonyult a többlet Na^+ hatásaival szemben, mint a vad típusú társa, mely a mutáns növény fokozott elektrolit-kieresztésében, csökkent K^+/Na^+ arányában és redukált PM H^+ -ATPáz aktivitásában nyilvánult meg. Mindemellett, a VT kallusz exogén ACC kezelést követően magasabb K^+/Na^+ arányt, intenzívebb PM H^+ -ATPáz működést, és ennél fogva stimulált sótoleranciát mutatott, amely nem volt megfigyelhető az ET-receptor mutáns kultúrákban [97]. A sóstressz indukálta számos ACS izoforma expresszióját *Arabidopsisban* és gyapotban, valamint az ACS1-et dohányban, illetve az ACO is indukálódik magas sókoncentráció hatására. Ugyanakkor számos esetben megfigyelték, hogy a megemelkedett ET produkció sóérzékenységhez, míg az ET tartalom csökkenése sótoleranciához vezetett [146]. Például búza ACO1 túlexpresszázó *Arabidopsis* növények megemelkedett ET-termeléssel és csökkent sótoleranciával rendelkeztek, továbbá rizs exogén ET kezelés is növelte a sóérzékenységet [105]. Az ET inszenzitív, *etr1-1* funkciónyeréses lúdfű mutáns gyengébb sótoleranciával rendelkezik, míg a funkcióvesztéses *etr1-7* mutáció az ellenkezőjét váltotta ki. Az ET befolyásolja számos só-válaszgén expresszióját is [193].

Az eddig leírtakkal ellenzézőleg, az *in vivo* ET-termelés segítette a sótoleranciát sós talajon nevelt lúdfű növényekben, ahol a transzspiráció aktív. Ennek az ellentéte figyelhető meg *in vitro* nevelt növényeknél, ahol a transzspiráció gátolt. A sótoleráns *Antirrhinum majus* genotípus hajtásában rövid és hosszútávon is magas ET produkciót mértek, míg a sóérzékeny mutánsban ez hamarabb lecsengett. Az ETO1 erős represszállása (sok ET) a nagy-affinitású K^+ transzporter, a HAT5 expressziójának erős indukcióját okozta, mely fokozza a sejtek K^+ akkumulációját a toleráns *A. majus* mutánsban. Ennek megfelelően az ETO1 felszabályozása (kevés ET) fokozta a sóérzékenységet az érzékeny genotípusban [194]. *Arabidopsis ein2-5* és *ein3-1* ET inszenzitív mutánsokban sóstressz hatására fokozódott a sejthalál mértéke, míg ez nem volt megfigyelhető *ctr1-1* mutánsokban. Exogén ACC is csökkentette a PCD szintjét sóstressz során lúdfű protoplasztokban, valószínűleg a ROF kioltás serkentésén keresztül. Mindazonáltal számos egyéb – a dolgozatban fel nem sorolt – ET jelátviteli mutánsokat felsorakoztató vizsgálat alapján az ET szignalizáció inkább pozitív módon befolyásolja a sótoleranciát [105]. Több ERF gén túlexpresszálltatása dohányban és paradicsomban – pl.

SIERF.F5 – szintén fokozta a növények sötűrését [44]. Paradicsomban az SIERF.C1, -B2, -E3, -E2, -E4, -B7, -C11, -D3, -H6 is részt vesz a sóstressz-válaszok kialakításában [195].

Az ET indukálta, Rboh függő ROF termelés is kritikusnak mondható a folyamatban, egyebek mellett, részt vesz a sztómamozgás szabályozásában sóstressz során [105]. Lúdfüben az EIN3/EIL1 indukál 92-, míg represszál 121 gént sós körülmények között. Az ET hat a POD [105], a KAT és a SOD enzimek aktivitására sóstressz során. Érdekes megfigyelés, hogy a *ctr1-1* mutánsok alapból jóval kisebb biomasszával rendelkeztek, mint a másik két mutáns és a VT növény, ugyanakkor K^+ tartalmukat, szacharóz tartamukat, klorofill *a/b* arányukat és az F_v/F_m paraméterüket is jobban megőrizték sóstressz során, mint az *ein2-5* és *ein3-1* mutánsok, vagy a VT növény [196]. Az APX és az ET kapcsolata sóstressz során kevésbé vizsgált.

A ROF mellett a NO is szerepet játszik a növényi sóstressz-válaszok kialakításában, kapcsolata az ET-nel sóstressz során viszont eddig relatíve kisebb figyelmet kapott. Vad típusú lúdfű magvak sókezelése során az exogén ACC serkentette a csírázást. A rendszerhez cPTIO (2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid) – NO kioltó molekula – csökkentette az ACC jótékony hatását [197]. A VT lúdfű kalluszkultúrák ACC vagy SNP kezelése növelte a sejtek K^+/Na^+ arányát és a plazmamembrán H^+ -ATPáz aktivitását, ami növelte a sótoleranciát, azonban ez a jelenség az *etr1-3* mutánsban nem volt megfigyelhető. Az SNP hatása a VT sejtekben szintén elmaradt ET bioszintézis inhibitor alkalmazása esetében. Érdekes módon, a VT sejtekben a NaCl hatására a kezelés 12. és 24. órájában detektáltak NO növekedést, 48 órát követően pedig a só gátolta a NO felhalmozódást, melyet az exogén ACC sem tudott visszafordítani [97]. A só indukálta, magas ET szinteket a levelek exogén NO donor kezelése csökkentette, mérsékelve a stressz káros hatásait [198]. Ugyanakkor, SNP alkalmazása sóstressz során serkentette a fiatal lúdfű csíranövényekben az ACS2 és EIN3 fehérjék génjeinek transzkripcióját. Míg az EIN3 túlakkumuláló növény kiváló sótoleranciával bírt a VT növényekhez képest is, addig az *ein3eill* kettős mutáns és a NO bioszintézis mutánsok a VT csíranövényekhez mérten is sokkal érzékenyebbek bizonyultak a NaCl jelenlétére [199]. Paradicsom sejtszuspenzióban az exogén ACC hozzáadása 250 mM NaCl kezelés jelenlétében [188], illetve 100 mM-os sókoncentráció különbözőképpen befolyásolta a NO produkciót [189]. Az ET és a ONOO⁻ képződés kapcsolatát sóstressz során eddig még nem vizsgálták.

Az exogén ACC alkalmazása (10 és 100 μ M) visszafordította a sóstressz által kiváltott fenotipikus változásokat lúdfüben [200] továbbá VT *Arabidopsis* csíranövények exogén Ethephon segítette a hajtás K^+/Na^+ arányának a jobb megőrzését [196]. Más esetben az ACC serkentette a sóstressz indukálta oxidatív stresszt és a szenescenciát [201]. Két paradicsomfajta sókezelése során megfigyelték, hogy a toleráns fajtában az endogén ACC koncentráció 50%-

kal csökkent, míg az érzékenyben 50%-kal nőtt [168]. A só indukálta korai, gyökérből kiinduló hormonális szignálok – mint az ACC hajtásba szállítása – fontos szereppel bírnak [202].

Az ET a szupraoptimális NaCl koncentrációra adott válaszok kialakításában betöltött fontos szerepe ellenére, kapcsolatát fotoszintézissel sóstressz során kevés esetben vizsgálták, szintén ellentmondásos eredményekkel [203, 204]. a hormon kapcsolatáról a PSI-el sóstressz során pedig nem található szakirodalmi adat. Bár a felsorolt példák rávilágítanak az ET és a sóstressz kapcsolatának bizonyos részleteire, azonban nagyon kevés tanulmány vizsgálja ezt a kölcsönhatást a sókezelés korai óráiban, kifejtett növényekben, valamint a különböző, sóstressz-válasz komponensek változásait az idő függvényében összehasonlító tanulmányok száma pedig még kevesebb.

3. Célkitűzések

Az ET a növényekre gyakorolt hatásának koncentráció-, illetve időfüggő felbontású ismerete kiemelten fontos. A stressz hatására megemelkedett ET emisszió a stressz-ET koncentrációjától függően kedvezőtlenül hathat az akklimatizációra, azonban az ET szabályozhatja a stressz elleni védekezési mechanizmusokat is. Míg a stressz-ET fiziológiai szerepét széles körben vizsgálták, addig az ET prekursorának, az ACC-nek növényekre gyakorolt közvetlen hatását alig, holott az ACC természetesen előfordul a növény gyökérszónájában, mennyisége a talajoldatban változhat. Különböző koncentrációinak a stressz akklimatizációban fontos paraméterekre (mint például az elemtartalom, ROF és RNF felhalmozódás, valamint a fotoszintézis változásai) gyakorolt hosszútávú, időfüggő hatásairól keveset tudunk. Szintén hiányosak az ismereteink a növények ET-státuszának és a fotoszintézisnek a kapcsolatáról a só-akklimatizáció korai szakaszában, különös tekintettel a PSI szabályozására. Ezen túlmenően, a növények ET státuszának kapcsolata a ROF és RNF akkumulációval és annak szabályozásával szintén alig ismert rövidtávú sókezelés során. Továbbá fontos megjegyezni, hogy a levélben bekövetkező változások nehezen értékelhetők a gyökérben történtek ismerete nélkül.

A dolgozatban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan befolyásolja a gyökérszóna megemelt ACC tartalma a VT paradicsomnövények vízháztartási paramétereit, ionakkumulációját, valamint a ROF és RNF képződést a koncentráció függvényében?
2. Hogyan befolyásolja a gyökérszóna megemelt ACC tartalma a vad típusú paradicsomlevelek fotoszintetikus aktivitását a koncentráció és az idő függvényében?

3. Milyen kapcsolatban vannak a gyökérszóna megemelt ACC tartalmával kapcsolatos fiziológiai változások a paradicsomnövények potenciális abiotikus stressztűrő képességével? Mivel a nem patogén mikroorganizmusok által kiváltott, indukált szisztémikus rezisztencia (ISR) is az ET jelátvitel aktiválásán keresztül hat, felmerülhet a kérdés, hogy az ET/ACC-indukált változások gyakorolhatnak-e hatást az abiotikus stresszakklimatizációra?
4. Milyen, a sóstressz kialakulásához köthető, etilénfüggő válaszokat tapasztalhatunk a NaCl többlet által előidézett sóstressz első támadási pontján, a gyökérben?
5. Miként módosítja az etilén jelátvitel ET receptor szintjén történő blokkolása és az exogén ACC kezeléssel megemelt szöveti ACC/etilén koncentráció a paradicsomnövények különböző sókoncentrációkra adott fiziológiai válaszait, valamint a ROF és RNF akkumulációját? A gyökérben bekövetkező változások miként vetülnek le a levélben?
6. Milyen ET státusz-függő változások történnek a szubletális és letális sóstressz hatására az antioxidáns enzimek aktivitásában és ezek egyes izoenzimeinek expressziójában, és milyen különbségek figyelhetők meg a gyökérben és a levelekben lezajló folyamatok között?
7. Milyen kapcsolatban áll a paradicsomnövények ET státuszával a fotokémiai rendszerek aktivitása, szabályozása, illetve a CO₂ asszimilációval történő együttműködése a sóstressz korai szakaszában?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált növényi anyag, nevelési körülmények és kísérleti elrendezések

Kísérleteinket *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar. Rio Fuego VT, valamint cvar. Ailsa Craig VT és homozigóta *Nr/Nr*, ET receptor mutáns növényeken végeztük, kétféle megközelítésben, de technikai okokból háromféle kísérleti elrendezésben (7. ábra). A paradicsommagokat három napon keresztül, sötétben, 26°C-on csíráztattuk, majd (1. és 3. elrendezés) kéthetes korukig perlitben, végül 6-7 hetes korukig (a 7 valódi leveles állapot eléréséig) folyadékkultúrában, üvegházi körülmények között neveltük. A 2. kísérleti elrendezés során a vegetatívan szaporított paradicsomnövényeket talajkultúrában, 2,5 kg kereskedelmi talajban (Bioland Tőzegfeldolgozó Kft., Biatorbágy, Magyarország), 25 cm átmérőjű cserepekben neveltük, A talaj N (200-500 mg L⁻¹), P₂O₅ (200-500 mg L⁻¹); K₂O (300-600 mg L⁻¹), fehér tőzeg (50 m/v %), fekete tőzeg (50 m/v %), és CaCO₃ (2 kg m⁻³) összetevőket tartalmazott és 5,5-ös pH értékkel rendelkezett. A kísérletekhez a háromleveles állapotú hajtásokat elvágtuk és 4 hétig gyökerezettettük folyadékkultúrában.

A hidropóniában nevelt növények esetén az alábbi összetételű tápoldatot alkalmaztuk: 2 mM Ca (NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KCl és a mikroelemek (10⁻⁶ M MnSO₄, 5x10⁻⁷ M ZnSO₄, 10⁻⁷ M CuSO₄, 10⁻⁷ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10⁻⁵ M H₃BO₄), 2x10⁻⁵ M Fe-EDTA, pH 5,8 [205], melyet kétnaponta cseréltünk. A növényeket 12/12 órás nappali/éjszakai fotoperiódusban, 300 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD-n (F36W/GRO fénycsővek, Osram Sylvania, Danvers, MA, USA), 55-56%-os relatív páratartalmon (RH) és 25/22°C nappali/éjszakai hőmérsékleten neveltük. Vizsgálatainkat reggel 8 és délután 16 óra között végeztük, melyhez – ahogy a különböző kísérleti elrendezések esetében pontosan jelezzük – a gyökér teljes hosszát (főgyökér + oldalgyökerek + járulékos gyökerek), járulékos gyökerek teljes hosszát vagy 1 cm-es apikális régiójukat, illetve a hajtáscsúcstól számított a 3-4. levélemeleten elhelyezkedő kifejllett, nem-szeneszccens leveleket használtuk fel. Az alkalmazott kísérletei elrendezések további részletei a következők:

1. elrendezés: A vizsgálataink első szakaszában, a gyökérszóna megemelt ACC tartalmának hatását vizsgáltuk egyéb, specifikus stresszfaktor alkalmazása nélkül, *S. lycopersicum* Mill. L. cvar. Rio Fuego paradicsomfajta leveleiben és gyökereiben. Az előző alfejezetben leírt állapotú növények gyökérszónáját a vízkultúrában alkalmazott, a természetben is előforduló 0,01 μM-os és 1,0 μM-os, valamint a stressz ET mennyiségéhez hasonló ET-szintet generáló, 100 μM-os ACC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kezelésnek tettük ki egy hetes intervallumban. Frissen feloldott ACC-t adtunk a tápoldathoz a cserék alkalmával is. A fotoszintetikus aktivitást naponta, a levelek és teljes gyökerek ET produkcióját az 1. 2. és 7. napon, a növekedési paramétereket, a gyökércsúcsok-, valamint a levelek ROF és RNF tartalmát, a teljes gyökerek és levelek szénhidrát és elemtartalmát a 7. napon vizsgáltuk. A kísérletek mintavételi időpontjai 8-13 óra közé estek. Egy minta előállításához egy egyedi növény részeit használtuk fel, a mintaszámokat pedig az ábraalírásokban, „n” jelöléssel adtuk meg. Ez alól kivételt képeztek a fluoreszcens mikroszkópiás mérések, ahol 4-4 növényből 16-16 szövet-szegmenst preparáltunk. Az összes kísérletet háromszor ismételtük.

2. elrendezés: Munkánk soron következő lépéseként kétféle erősségű sókezelés rövidtávú hatásait vizsgáltuk VT és *Nr* mutáns gyökerekben, *S. lycopersicum* Mill. L. cv. Ailsa Craig genetikai háttérben. A hajtás gyökereztetése során kifejlődött, egyforma típusú, járulékos gyökereket hidropónikus kultúrában, a tápoldaton keresztül 100 mM-os – növekedésgátló, de tolerálható koncentrációjú, a továbbiakban „szubletális”, vagy 250 mM-os, néhány napon belül a növény pusztulását okozó, a továbbiakban „letális” koncentrációjú NaCl-dal kezeltük. A mintavételeket a kezelés megkezdését követő 1, 6, illetve 24 óra elteltével

végeztük el. Egy minta előállításához egy egyedi növény részeit használtuk fel, a mintaszámokat pedig az ábraalírásokban, „n” jelöléssel adtuk meg. A kezeléseket délelőtt 9 órakor indítottuk el, továbbá legalább háromszor ismételtük meg független kísérletsorozatok formájában. A fehérje- és az elemtartalmak, illetve a proteolitikus aktivitás meghatározásához a járulékos gyökerek teljes hosszát; az elektrolit-kieresztés (EL) és a DNS fragmentáció vizsgálatához pedig a gyökércsúcsokat használtuk fel. A felsorolt kísérletekhez tartozó minták a kezeléseket 24 órás mintavételi időpontjából származtak. Ezen túlmenően, az ET produkció, a sejt életképesség, valamint a ROF és RNF akkumuláció monitorozását a gyökércsúcsokban végeztük az összes időpontban.

7. ábra Az alkalmazott kísérleti elrendezések

3. elrendezés: Kísérleteink harmadik szakaszában, a kétféle erősségű, rövidtávú sókezelésre adott válaszreakció és a növények ET státuszának kapcsolatát VT, VT és exogén ACC kezelt, valamint Nr mutáns *S. lycopersicum* Mill. L. cv. Ailsa Craig paradicsomfajta gyökereiben és leveleiben vizsgáltuk. Ennek megfelelően, a VT növények egy része a tápoldaton keresztül, 1 óráig, 10 μ M-os koncentrációjú – nem túl magas, de biztosan ET többletet generáló – ACC előkezelésben részesült, melyet a 100 mM-os, valamint 250 mM-os NaCl tápoldathoz adása követett, az ACC jelenlétének megtartása mellett. Ebben az időpontban, melyet a kísérlet kezdő, tehát 0. időpontjának tekintettünk, a VT növények fennmaradó része, továbbá a Nr mutánsok is részesültek az említett sókezelésekben. A mintavételeket a kezelés megkezdését követő 1, 6, illetve 24 óra elteltével végeztük el. Egy minta előállításához egy egyedi növény részeit használtuk fel, a mintaszámokat pedig az ábraalírásokban, „n” jelöléssel adtuk meg. A sókezeléseket délelőtt 9 órakor indítottuk el, továbbá legalább háromszor ismételtük meg független kísérletsorozatok formájában. Az ET produkciónak, a friss és száraz tömegnek, az oldható cukor- és keményítőtartalomnak, a vizsgált antioxidáns enzimek aktivitásának és génexpressziójának a meghatározásához a gyökér teljes hosszát és a leveleket, a ROF és RNF akkumuláció monitorozásához a járulékos gyökerek

apikális szegmensét és a leveleket, a relatív víztartalom, a vízpotenciál és a fotoszintetikus aktivitás változásainak nyomon követéséhez pedig csak a leveleket használtuk fel az összes időpontban. A teljes gyökér és a levelek elemtartalmát, valamint a levelek pigmenttartalmát a 24 órás időpontban határoztuk meg.

4.3 Növekedési paraméterek meghatározása

A már definiált növényi részeket friss tömegeik meghatározását követően 60°C-on, tömegállandóságig szárítottuk, majd meghatároztuk száraz tömegeiket.

4.4 A növényi részek etilén kibocsátásának meghatározása

1000 mg (1. kísérleti elrendezés), 500 mg (2. és 3. kísérleti elrendezés), duplán desztillált (dd.) vízzel mosott növényi anyagot inkubáltunk 1 órán keresztül, sötétben, légmentesen záró, szilikongumi tetővel ellátott flaskákban. A szövetek hidratáltságát dd. víz hozzáadásával tartottuk fent. A küvetta gázteréből 2,5 mL térfogatot injektáltunk egy légmentesen záró fecskendő segítségével a lángionizációs detektorral és aktivált alumínium oszloppal rendelkező Hewlett-Packard 5890 Series II gáz kromatográfba (Hewlett-Packard, Wilmington, USA, DE). A He vivőgáz áramlási sebességét 35 mL m⁻¹, míg a H₂-ét 30 mL m⁻¹ és a levegőét 300 mL m⁻¹ értékeken tartottuk. Az alábbi hőmérsékleti paramétereket használtuk: 100°C a kolonna, 120°C az injektor és 160°C detektor esetében [98]. A növényi anyag feletti légtér térfogatának meghatározásához a mérés elvégzése után az üvegcsék egyenkénti, dd. vízzel történő feltöltését alkalmaztuk. A növényi szövetek által kibocsátott ET mennyiségét ET standardok sorozatának segítségével határoztuk meg.

4.5 Vízháztartással kapcsolatos vizsgálatok

A relatív víztartalom (RVT) monitorozásához megmértük a levelek friss tömegét (aktuális vízállapotú tömeg), majd 12 órás, ioncserélt vízben történő áztatást követően meghatároztuk a minták teljes vízállapotú tömegét, minekután 60 °C-on tömegállandóságig szárítottuk, majd meghatároztuk száraz tömegeiket. A RVT kiszámítása az alábbi képlet szerint történt:

$$\frac{\text{Aktuális vízállapotú tömeg} - \text{Száras tömeg}}{\text{Teljes vízállapotú tömeg} - \text{Száras tömeg}} \times 100$$

A vízpotenciál (ψ_w) meghatározásához a 3.-4. levélemeleten elhelyezkedő összetett levél nyelét a szártól 2 cm-re elvágtuk, majd a levelet a vágott felszínnel a külső környezet felé a nitrogén gázzal feltöltött nyomáskamrába (PMS instrument Co., Corvallis, Oregon, USA) helyeztük. A kamrában a N₂ gáz beáramoltatással kialakuló nyomás növelése során a levélnyél vágott felületén folyadékcsepp jelenik meg. Az ennek detektálásakor leolvasott nyomásértéket (Bar) - 0,1-gyel szorozva kapjuk a levél aktuális vízpotenciálját (MPa-ban).

4.6 Az elemtartalmak meghatározása

Az elemtartalmak meghatározásához 100 mg növényi mintát – a gyökereket a szárítást megelőzően, két alkalommal, 50 mL dd. vízzel mostuk – emésztettünk tömény HNO_3 és 30%-os H_2O_2 elegyében, 200 °C-on egy mikrohullámú roncsolóban (MarsXpress, CEM, USA). A HNO_3 (Reanal, Budapest, Magyarország) és H_2O_2 (Reanal) mennyisége 5- és 4 mL volt az 1. kísérleti elrendezés, valamint 6- és 2 mL a 2. és 3. kísérleti elrendezés esetében. A lehűlt mintákat HPLC minőségű vízzel hígítottuk, majd Packard üvegcsövekbe (Packard, Groningen, Hollandia) transzferáltuk és 4°C-on tároltuk az analízisig. Az 1. és 2. kísérleti elrendezés esetében az elemtartalmakat atomabszorpciós spektroszkópia (Hitachi Z-8200, Tokió, Japán) [98], míg a 3. elrendezés esetében induktív-csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) segítségével határoztuk meg, az utóbbit a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ-Öntözési és Vizgazdálkodási Kutatóintézet intézet (NAIK-ÖVK) Környezetanalitikai Központ Vizsgáló Laboratóriumának közreműködésével.

4.7 Fluoreszcens mikroszkópiás mérések

A gyökércsúcsok $\text{O}_2^{\bullet-}$ akkumulációját 10 μM dihidroetidium (DHE) segítségével, míg a H_2O_2 tartalmát 50 μM 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin (AR; ADHP vagy Amplifu™ Red) alkalmazásával határoztuk meg [206]. A gyökércsúcsi szegmensek, illetve a levelekből, dugófűró segítségével preparált, 1 cm átmérőjű korongok NO akkumulációját 10 μM 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetát (DAF-FM-DA), a ONOO^- tartalmát pedig 10 μM aminofenil fluoreszcein (APF) segítségével monitoroztuk [207]. A fluoreszcens festékeket a Sigma-Aldrich forgalmazótól vásároltuk, valamint a kísérletet megelőzően hígítottuk 25 mM-os (1. kísérleti elrendezés) illetve 10 mM-os (2. és 3. kísérleti elrendezés) TRIS(hidroximetil) aminometán (TRIS)/sósav (HCl), pH 7,4 pufferrel. A gyökércsúcsokat szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk 30 percig az AR és DHE, míg 30 percig (2. kísérleti elrendezés), valamint 40 percig (1. és 3. kísérleti elrendezés) a DAF-FM-DA és APF festékoldatokban. A levélkorongokat 2x5 percig vákuum alatt infiltráltuk a festékekkel, majd további 30 perces inkubációban részesítettük (vákuum nélkül). Az inkubációs idők leteltével, a mintákat két alkalommal mostuk TRIS-HCl pufferben, 10 percig (2. kísérleti elrendezés), illetve 5 percig (1 és 3. kísérleti elrendezés).

A gyökércsúcsi sejtek életképességét fluoreszcein-diacetát (FDA) (Sigma-Aldrich) festék segítségével határoztuk meg, melyet 10 mM 2-(N-morfolino) etánszulfonsav (MES)/kálium-klorid (KCl) (pH 6,15) pufferrel hígítottunk a kísérletet megelőzően. A

gyökércsúcsokat sötétben, 10 percig inkubáltuk 10 μM -os FDA festék jelenlétében, majd 2x10 percig mostuk MES/KCl (pH 6,15) oldatban [207].

A fluoreszcencia intenzitását 5X objektívvel felszerelt, Zeiss Axiowert fluoreszcens mikroszkóp segítségével határoztuk meg (200M típus, Carl Zeiss Inc., Jena, Németország). A digitális fényképeket egy nagyfelbontású digitális kamerával (Axiocam HR, HQ CCD camera; Carl Zeiss Inc.) készítettük el, melyhez a 10- (gerjesztés: 450-495 nm, emisszió: 515-565 nm) vagy a 20HE filter szetteket (gerjesztés: 535-585 nm, emisszió: 600-655 nm) használtunk. A pixelintenzitás mérését az AXIOVISION REL. 4.8 (Carl Zeiss Inc.) szoftverrel végeztük, mely a gyökér csúcsától számított 2 mm-es távolságban, 150 μm -es átmérőjű körökben történt. A levélkorongok nagyságát tekintve, a középvonaluknál négyfelé osztottuk őket, majd minden negyed cikkely esetében a vágott felszíntől 100 μm távolságra elhelyezett, 3 db, ugyancsak 150 μm átmérőjű körben mértük meg a pixelintenzitást, melyek átlagát vettük 1 levélkorong pixelintenzitás értékének.

4.8 A levélszövetek H_2O_2 és $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumulációjának monitorozása

A levelek H_2O_2 tartalmát Takács és mtsai. [208] munkája lapján határoztuk meg. 100 mg mintát 0,5 mL jéghideg, 0,1%-os triklórecetsavban (TCA) homogenizáltunk, majd centrifugáltunk 10000 g-vel 20 percig, 4 °C-on. A reakcióelegy 0,25 mL, 10 mM-os kálium-foszfát pufferből (pH 7,0), továbbá 0,5 mL, 1 M-os kálium jodidból (KI) és 0,25 mL felülúszóból állt. A minták H_2O_2 tartalmát 10 perc inkubációt követően 390 nm-en mértük egy Uvikon XL (Secomam, Alés Cedex, Franciaország) spektrofotométerrel, különböző koncentrációjú H_2O_2 (Sigma-Aldrich) oldatsorozat segítségével.

A levelek $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumulációját Bournonville és Diaz-Ricci [209] módszere alapján követtük nyomon. Elsőként a hisztokémiai festés során, levélnyelükkel történő leválasztásukat követően, az ép leveleket azonnal vákuum infiltráltuk 10 mM nátrium azidban (Sigma-Aldrich) 10 percig, majd ezt az oldatot eltávolítva, 0,1% tetrazóliumkék-klorid (NBT) nátriumsó (Sigma-Aldrich) oldatban 2 percig. A leveleket ezt követően az NBT oldatban inkubáltuk 2 órán keresztül, teljes sötétségben, vákuum jelenléte nélkül. Mindkét anyagot 50 mM-os kálium-foszfát pufferben (pH 7,7) oldottuk fel a kísérletet megelőzően. Az inkubációs idő leteltével, a mintákat 96%-os etanolban, 96°C-on forraltuk kétszer 30 percig. A formazánt kiszáritott levelekből, háromszor, 2 M kálium-hidroxid (KOH):kloroform (1:1, v/v) jéghideg elegyével, mindhárom alkalommal 10 perces, 3000 g-vel, 18 °C-on történő centrifugálás segítségével vontuk ki. A kloroformos extraktumot nitrogén-áram alatt szárítottuk jégen, majd a szilárd formazán maradékot dimetilszulfoxid:2M KOH (1,6:1, v/v) elegyében oldottuk fel. Az így

kapott formazán oldatok optikai denzitását egy Uvikon XL (Secomam) spektrofotométerrel mértük 630 nm-en. A kalibrációs görbéket *in vitro* termelt és tisztított formazán standard oldataival vettük fel, melyet tovább korrigáltunk a cellulóz mátrix által visszatartott formazán mennyiségével. A $O_2^{\cdot-}$ tartalmat az NBT-vel alkotott reakciójának hozamából becsültük meg: négy elektron/mol redukált diformazán képződik a folyamat során.

4.9 A pigmenttartalmak meghatározása

A pigmentanalízis Sims és Gamon [210] munkája alapján történt. 25 mg tömegű levélkorongokat 24 órán keresztül inkubáltuk 1 mL 100%-os aceton jelenlétében, sötétben, 4°C-on, majd a centrifugálást (12000 x g, 15 perc, 4°C) követően a felülúszót félre tettük. A visszamaradt szöveteket 1 mL aceton/TRIS pufferben (80:20, v/v, pH 7,8) inkubáltuk újabb 24 órán keresztül sötétben, 4°C-on. Újabb centrifugálást követően a felülúszókat egyesítettük. A kivonatok pigmenttartalmát egy Uvikon XL (Secomam) spektrofotométer és az alábbi egyenletek segítségével határoztuk meg:

$$\text{Klorofill } a \text{ (Kl } b) = 0,01261 \times A_{661} - 0,001023 \times A_{534} - 0,00022 \times A_{643}$$

$$\text{Klorofill } b \text{ (Kl } a) = 0,02255 \times A_{643} - 0,00439 \times A_{534} - 0,004488 \times A_{661}$$

$$\text{Karotinoidok (Kar)} = (A_{470} - 17,1 \times (\text{Kl } a + \text{Kl } b) - 9,479 \times \text{Antocianin korrekció}) / 119,26$$

$$\text{Antocianin korrekció} = 0,0821 \times A_{534} - 0,00687 \times A_{643} - 0,002423 \times A_{661}$$

4.10 A levelek fotoszintetikus aktivitásának vizsgálata

A steady-state nettó CO_2 asszimilációs rátát (A_N), a sztómák vízgőzvezető képességét (g_{sw}), valamint az intercelluláris és az atmoszférikus CO_2 koncentráció arányát (C_i/C_a) egy Li-6400-as, infravörös gázanalizátorral felszerelt mérőrendszerrel (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) határoztuk meg. A levélkamra hőmérsékletét 25 °C-ra, az exogén forrásból származó, $450 \mu\text{mol s}^{-1}$ CO_2 tartalmú levegő áramlási sebességét $300 \mu\text{mol s}^{-1}$ -ra. A fényforrás $221 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD mellett, 90%-ban vörös (635 nm) és 10%-ban kék (465 nm) fényből állt [205].

A klorofill *a* fluoreszcencia és a PSI (P700) abszorbancia változásainak monitorozása szimultán történt egy DUAL-PAM-100 (Heinz-Walz, Effeltrich, Germany) fluoriméter segítségével, DUAL-E és DUAL-DR mérőfejeket használatával [211]. Röviden, 30 perc sötétadaptációt követően, a modulált mérőfény (620nm , $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bekapcsolásakor a sötétadaptált állapotban mérhető minimális fluoreszcencia (F_0) meghatározásra került. Ezt követően, a sötétadaptált állapotban mérhető maximális fluoreszcencia szint (F_M) megállapítása egy $14000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású telítési impulzus segítségével történt, majd kezdetét vette a levelek folyamatos, aktinikus megvilágítása $216 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű vörös (635 nm) fénnel. 13 percet követően, rögzítettük a fény-adaptált állapot steady state fluoreszcencia szintjének (F_S) értékét, illetve egy telítési fényimpulzus adásával, a fényadaptált állapot maximális

fluoreszcencia szintjét (F_M') is. A fényadaptált állapot minimális fluoreszcencia szintjét (F_0') az aktinikus fény tranziens kikapcsolásakor, 3 másodperces távoli vörös megvilágítás (720 nm, $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) segítségével határoztuk meg. Ezt követően az 1. táblázatban foglalt paramétereket vizsgáltuk [212].

1. táblázat A klorofill *a* fluoreszcencia és PSI aktivitással kapcsolatos paraméterek

A PSII maximális kvantumhatásfoka sötétadaptált levelekben	F_v/F_M	$F_v/F_M = (F_M - F_0) / F_M$
A PSII effektív kvantumhatásfoka fényadaptált levelekben	$Y(II)$	$Y(II) = (F_M' - F_s) / F_M'$
A (fény)szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfoka	$Y(NPQ)$	$Y(NPQ) = (I - Y(II) - I) / ((F_M / F_M' - I) + I + qL \times (F_M / F_0 - I))$
A szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfoka	$Y(NO)$	$Y(NO) = I / ((F_M / F_M' - I) + I + qL \times (F_M / F_0 - I))$
A PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciója fényadaptált állapotban	q_L	$q_L = (F_M' - F_s) / (F_M' - F_0) \times F_0' / F_s$
A PSI fotokémiai kvantumhatásfoka	$Y(I)$	$Y(I) = 1 - Y(ND) - Y(NA)$
A PSI donor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka	$Y(ND)$	$Y(ND) = 1 - P700_{red}$
A PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka	$Y(NA)$	$Y(NA) = (P_M - P_M') / P_M$
A CEF-PSI kvantumhatásfokának $Y(II)$ feletti aránya / CEF-PSI mértéke [213]	$Y(CEF)/Y(II)$	$Y(CEF)/Y(II) = [Y(I) - Y(II)] / Y(II)$

A P700 redox változásait a 830 és a 875 nm-es mérőfények differencia jeléből Klughammer és Schreiber [211] munkája nyomán határoztuk meg. Az F_0 , valamint az F_M meghatározást követően a maximális P700 jel (P_M) detektálása is megtörtént. A 13 perces aktinikus megvilágítás végén adott telítési impulzussal a P_M' meghatározását is elvégeztük, majd az 1. táblázatban foglalt paraméterek segítségével követtük nyomon a PSI aktivitását.

4.10 Cukortartalmak meghatározása

Az oldható cukortartalom meghatározásához az 1. kísérleti elrendezés esetében 0,5 g friss növényi anyagot folyékony N_2 -ben elporítottunk, majd 5 mL, 80%-os etanollal (2 mM-os HEPES pufferrel [pH 7,5] készítve) elhomogenizáltunk. A centrifugálást követően ($15000 \times g$, 4°C , 30 perc), az üledéken a leírtak szerint ismételtük meg az extrakciót, majd az egyesített felülúszóból 45°C -on, vákuum segítségével elpárologtattuk a folyadékot. A kiszáritott mintákat 3 mL dd. vízzel oldottuk fel, 0,3 g polivinilpirollidon (PVP) hozzáadása mellett. Ezt követően az összes oldható cukor mennyiségét a fenol-kénsavas módszerrel határoztuk meg [214], mely során a reakcióelegyet 490 nm -en fotometráltuk egy Kontron Uvicon 530 típusú spektrofotométerrel (Milano, Olaszország). Az összes oldható cukor tartalmakat szacharóz koncentrációssal készített kalibrációval határoztuk meg.

Ezen túlmenően, vizsgáltuk a minták szacharóz, glükóz, fruktóz és szorbitol koncentrációját enzimatis reakciók segítségével, melyhez Boehringer Mannheim/R Biopharm (Németország) cukor analízis kitet (Kat. Sz. 10 716 260 035) használtunk a

szacharóz/D-glükóz/D-fruktóz esetében [205], továbbá, ugyanazon gyártótól származó D-szorbitol analízis kitet (Kat. Sz. E 0670 057) a szorbitol tartalom meghatározásához [215], a gyártó által leírt instrukciókat követve. Röviden, a glükóz koncentrációját a D-glükóz hexokináz (HXK) általi, G-6-P dehidrogenáz jelenlétében végbemenő glükóz-6-foszfáttá (G-6-P) alakításával, a vak mintával történő korrekciót követően, a keletkező NADPH 340 nm-en való detektálásával kaptuk meg. A D-fruktózt a HXK fruktóz-6-foszfáttá (Fru-6-P) alakította, melyből a foszfoglukóz-izomeráz G-6-P-tot képez. A szacharóz invertáz általi hidrolízisét követően meghatároztuk a minta D-glükóz mennyiségét a fentebb leírtak szerint. A keletkezett NADPH mennyisége sztöchiometrikus volt a D-glükóz, D-fruktóz és a szacharóz mennyiségével kapcsolatban. A D-szorbitolból a NAD^+ -függő szorbitol dehidrogenáz által D-fruktóz képződött, majd a redukált NADPH-t a jódnitrotetrazolium redukciója diaforáz reakció során elfogyasztotta. A képződött formazán abszorbanciáját 492 nm-en detektáltuk – ahogy a fentebb jellemzett reakciók esetében is – egy Kontron Uvicon 530 típusú spektrofotométerrel.

A 3. kísérleti elrendezés esetében az összes oldható cukor, valamint keményítő tartalmakat Poór és mtsai. [216] által jellemzett módszer mikrotiter körülmények között elvégezhető adaptációjának segítségével határoztuk meg, Laurentin és Edwards [217] munkája nyomán. Röviden, az oldható cukrokat 100 mg folyékony N_2 -ben elporított mintából, 1 mL, 80%-os etanol hozzáadását követő, 80 °C-on, 30 percig történő inkubációval vontuk ki két alkalommal. A homogenizátumot 2600 x g-n centrifugáltuk 10 percig, mindkét esetben, majd az egyesített felülúszóból 20-20 μL -t, 96-helyes, polisztirol mikroplatekbe (Nunc, Maxisorp R, Life Technologies, USA) osztottunk szét. 15 perces, 4°C-on történő inkubációt követően, 100 μL Antron reagenst (0,2 % Antron [Normapur, VWR Int., Leuven, Belgium] 72%-os kénsavoldatban) adtunk a mintákhoz. A mikroplateket lefedtük, majd enyhe vortex keverést követően 3 percig, 92 °C-os vízfürdőben, majd 5 percig szobahőmérsékleten, végül 15 percig, 45 °C-kon inkubáltuk. A színváltozás abszorbanciáját 630 nm-en detektáltuk, plate olvasó spektrofotométer segítségével, az extrakciós puffert tartalmazó reagenst használva referenciaként. Az oldható cukortartalom meghatározáshoz a kalibrációt glukóz-monohidrát oldatsorozatot használtunk. A keményítő tartalom meghatározásához, az oldható cukor méréshez használt mintákból visszamaradt üledéket mostuk 1 mL dd. vízzel, majd 1 mL, 1,1%-os HCl jelenlétében emésztettük 100 °C-on, 30 percig, melyet 10 perces, 2600 x g-n történő centrifugálás követett. A felülúszó keményítő tartalmát a már leírtak szerint határoztuk meg, a hidrolizált keményítő (Normapur, VWR Int.) oldatsorozattal.

4.11 A proteolitikus aktivitás meghatározása

500 mg gyökérmintát 0,5 mL extrakciós puffer (50 mM nátrium-acetát, 1 mM ditiotritol; pH 6,1) jelenlétében homogenizáltunk 4 °C-on, majd 10 percig, 11300 x g-n centrifugáltunk, 4 °C-on. A felülúszók fehérjetartalmát Bradford [218] módszere alapján, spektrofotometriásan határoztuk meg 595 nm-en, borjú szérum albumint használva standardként.

Azokazeint (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk nemspecifikus szubsztrátként a teljes proteolitikus aktivitás meghatározásához. 50 µL kivonatot 0,3 mL, 1%-os azokazeinnel (w/v) és 650 µL kálium-foszfát pufferrel inkubáltunk 37 °C-on 2 óráig, majd a reakciót 300 µL, 10%-os (w/v) TCA hozzáadásával és 4 °C-on, 20 percig történő inkubációjával állítottuk le. A minták centrifugálását (10 perc, 4 °C, 11300 g) követően a felülúszó abszorbanciáját 440 nm-en mértük. A teljes proteolitikus aktivitás egy egysége (U) az enzim mennyiségének a reakció ideje alatti, 0,01 abszorbancia egység / perc hozama alapján lett meghatározva. A cisztein proteáz aktivitás meghatározásához, a kivonatok 10 mM, specifikus, cisztein proteáz inhibitor, a transz-epoxiszukcinil-L-leucilamid (4-guanidin)bután (E-64, Sigma-Aldrich) jelenlétében inkubáltuk 1 órán át, 20 °C-on azokazeines kimutatás előtt. A cisztein proteáz aktivitás kiszámítása a gátlószer hiányában mért proteolitikus aktivitás arányában történt [219].

4.12 Antioxidáns enzimek aktivitásának monitorozása

A folyékony N₂-ben történő porítást követően, 100 mg növényi anyagot feloldottunk 400 µL extrakciós pufferben (50 mM-os K⁺/Na⁺ foszfát puffer, pH 7,0; 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF); 1% polivinilpolipirrolidon (PVPP)). Az APX specifikus aktivitás nyomon követéséhez 1 mM redukált aszkorbátot is (ASC) adtunk az extrakciós pufferhez. A centrifugálás után (10 perc, 10844,6 x g, 4°C) a felülúszókkal dolgoztunk tovább. Az enzimaktivitások meghatározásához egy Uvikon XL Secomam spektrofotométert használtunk.

A SOD specifikus aktivitás meghatározásának alapja a tetrazóliumkék (NBT) riboflavin, metionin és fény jelenlétében történő redukciójának gátlása [220]. A reakció 5 mM-os NBT, 0,2 mM-os riboflavin, 13 mM metionint, 0,1 mM etiléndiamin tetraecetsav nátrium-só (NaEDTA) elegyét, 50 mM-os K⁺/Na⁺ foszfát puffert (pH 7,0) és 11,8 µL enzimkivonatot tartalmazott. 200 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD fényforráson történő, 5 perces inkubációt követően a keletkezett formazán extinkcióját 560 nm-en mértük. Egy enzimegység (U) megegyezik az NBT redukciójának 50%-os gátlását okozó enzimmennyiséggel.

A KAT specifikus aktivitás meghatározásához az enzimkivonathoz 50 mM-os K⁺/Na⁺ foszfát puffert (pH 7,0) és 10 mM-os H₂O₂-ot adtunk, majd 240 nm-en monitoroztuk a H₂O₂ bomlását [220]. A 0,2 és az 1,2 perc között mért extinkcióváltozás alapján 1 U az 1 µmol H₂O₂

elbontását 1 perc alatt elvégző enzim mennyiség, amelyet az $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens alapján számítottunk.

A POD specifikus aktivitás meghatározásához az enzimkivonathoz 50 mM-os K^+/Na^+ foszfát puffert (pH 7,0) és 1%-os gvajakolt, valamint 1%-os H_2O_2 -ot adtunk, majd 470 nm-en követtük nyomon a gvajakol oxidációja által okozott abszorbancia növekedést [221]. 1 U az 1 μmol tetragvajakol képződését 1 perc alatt katalizáló enzim mennyiség, amelyet az $\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens alapján számítottunk.

Az APX specifikus aktivitás vizsgálatához az enzimkivonathoz 50 mM-os K^+/Na^+ foszfát puffert (pH 7,0), 5 mM redukált ASC-ot és 10 mM-os H_2O_2 -ot adtunk, majd 290 nm-en követtük nyomon az ASC oxidációját. 1 U az 1 μmol ASC oxidációját 1 perc alatt katalizáló enzim mennyiség az $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens alapján [220].

4.13 Egyes antioxidáns izoenzimek és a NADPH-oxidáz génexpressziójának vizsgálata

Az össz-RNS kivonása során a folyékony N_2 -ben, kvarchomok segítségével elporított, körülbelül 100 mg növényi mintához 1 mL TRI reagenst (1,822 M guanidium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát (pH 4,0), 0,7341 mM N-laurilszarkozin, 45,45% fenol) majd 3 perces, 65 °C-os inkubáció után 200 μL kloroformot adtunk. Centrifugálást (10000 x g, 15 perc, 4 °C) követően 375 μL hideg kloroform:izoamilalkohol elegyébe (24:1) helyeztük át a felülúszót. Ismételt centrifugálási lépést követően, a vizes fázisban található RNS-t 500 μL izopropanolban csaptuk ki, 10 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálás során. A centrifugálást követően az üledéket 70%-os etanollal tisztítottuk [222]. A poliszacharid szennyezések eltávolításához az üledéket 100 μL molekuláris biológiai tisztaságú vízben (AccuGene, Thermo Fisher Scientific, UK) oldottuk fel, majd hozzáadtunk 100 μL 2 M-os kálium-acetátot és 30 percen keresztül jégen inkubáltuk. Centrifugálást követően (12000 x g, 20 perc, 4 °C) a felülúszót 500 μL , 96%-os etanolba helyeztük, majd -20 °C-on inkubáltuk 15 percig. Ismételt centrifugálási lépés után az üledéket 70%-os etanollal mostuk, végül rövid, steril légáram alatti szárítást követően AccuGene vízben oldottuk fel. A kivont RNS integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük [222].

A genomi DNS maradványokat DNáz enzim (Fermentas Fermentas UAB, Vilnius, Litvánia) segítségével távolítottuk el, 17 μL AccuGene vizet, 4 μL DNáz puffert, 0,2 μL RNáz inhibitor (Fermentas Fermentas UAB) és 12-18 μg RNS mintát tartalmazó reakcióelegy 30 perces, 37 °C-on történő inkubációja során. A fehérjéket kloroform:fenol (1:1, v/v) elegyével elimináltuk, majd centrifugálást követően (10000 x g, 15 perc, 4 °C) a vizes felülúszót 200 μL kloroformmal tisztítottuk. Az így kapott felülúszót 550 μL , jéghideg etanol és 3 M-os Na-acetát jelenlétében 18 órát inkubáltuk, majd a centrifugálást követően (12000 x g, 15 perc, 4 °C) kapott

csapadékot 70%-os etanollal mostuk, végül AccuGene vízben oldottuk fel. A tisztított teljes-RNS integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük [222].

A 1 µg-nyi teljes-RNS mintából cDNS-t szintetizáltunk 200 U reverz transzkriptáz (RT) enzimet, (Fermentas Fermentas UAB) 4 µl RT puffert, 0,5 µl random hexamer primert, 1 µl, 25 mM-os dNTP keveréket, 0,5 µl RNáz inhibitor és 13 µl AccuGene vizet tartalmazó elegy segítségével, 1 óráig, 37 °C-on zajló reakcióban [220].

A mitokondriális *SlMnSOD*, a kloroplasztikus *SlFeSOD* és *SlCu/ZnSOD*, a peroxisomális *SlKAT1*, *SlKAT2*, *SlKAT3*, a citoszolikus *SlAPX1* és *SlAPX2*, valamint a plazmamembrán lokalizált *SlRBOH1* gének expresszióját kvantitatív, valós-idejű PCR (qRT-PCR) segítségével monitoroztuk. Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és a Sol Genomics (<http://solgenomics.net/>) adatbázisok segítségével azonosított szekvenciákra a Primer 3 szoftverrel [223] terveztünk primereket (1. melléklet), melyek génspecifitását az NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) használatával ellenőriztük. A qRT-PCR reakcióelegy 1,6 µl 20-szorosára hígított cDNS-ből, 0,4 µl primerpárból, 3 µl nukleázmentes vízből és 5 µl SYBRGreen mixből (Fermentas Fermentas UAB) állt. A 7 perces, 95 °C-os kezdeti hevítésből, majd 40 ciklusos sorozatból (95 °C 15 percig, 60 °C 1 percig) álló program során a SYBRGreen festék intenzitását egy qTOWER PCR készülékkel (Analytik Jena, Németország) követtük nyomon, majd a termékek specifikusságát az olvadási görbék analízisével ellenőriztük (55°C-tól 90°C-ig, 0,2°C/ms). Az adatokat a qPCRsoft szoftver (Analytik Jena) segítségével értékeltük ki. A génexpressziós változások meghatározására a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk [224], referencia génekként a paradicsom elongációs faktor 1 alfa (*SlEF1*) [225], valamint a 18S rRNS [226] génjét választottuk (1. melléklet), melyek mindvégig konstans módon expresszáálódtak a vizsgált szövetekben. A kapott eredményeket az adott időpont kezeletlen, VT értékére normalizáltuk.

4.14 A sejthalál mértékének megállapítása

A gyökércsúcsi sejtek relatív elektrolit-kieresztését (EL) Poór és mtsai. [98] által használt módszer alapján monitoroztuk. Egy grammnyi gyökércsúcsi szegmenst 15 mL dd. vízbe helyeztünk 2 órára, 25°C-on. Ezt követően, meghatároztuk az áztató oldat konduktivitását (K1) egy vezetőképesség mérővel (OK-102/1 Radelkis, Budapest, Magyarország), majd 95 °C-on 40 percig főztük a mintákat és meghatároztuk a teljes konduktivitást (K2). A gyökércsúcsok EL értékét a teljes konduktivitás %-ában fejeztük ki: $EL (\%) = (K1 / K2) \times 100$.

A gyökércsúcsokban kialakuló DNS fragmentációt Kubis és mtsai. [227] általunk módosított módszere alapján detektáltuk. A gyökerek kétszer 50 mL dd. vizes mosását követően 100 mg csökércsúcsi szegmenst fagyasztottunk le, majd porítottunk el folyékony nitrogénben.

Az így kapott porhoz hozzáadtunk 10 mL extrakciós puffert (0,1 M NaCl, 2% SDS, 50 mM TRIS-HCl [pH 9], 10 mM EDTA), majd inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. 300 mL fenol-kloroform 1:1 (v/v) elegy hozzáadása után 10 percig, 4 °C-on, 3000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóval megismételtük a fenol-kloroformos lépést. 0,5 mL kloroform-izoamil alkoholt (24:1; v/v) adtunk az így kapott felülúszóhoz, majd ismételt centrifugálás következett (10 perc, 4 °C-on, 3000 g-vel). Az újonnan kapott felülúszót 3 órán keresztül inkubáltuk 550 mL izopropanol és 20 mL Na-acetát jelenlétében, amit a minták újbóli centrifugálása követett, 11300 g-vel, 4 °C-on, 10 percig. Az üledéket 70%-os etanolban két alkalommal mostuk, illetve centrifugáltuk az utóbb megadott paraméterekkel. Végül, az üledéket a kiszárítását követően 20 mL TE pufferben (10 mM TRIS [pH 8,0]; 1 mM EDTA) feloldottuk, majd 0,1 mg mL⁻¹ DNáz mentes RNázzal kezeltük az agaróz gélelektroforézis megkezdése előtt (80 mV, 2 óra).

4.15 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisét a SigmaPlot 11 programmal végezzük, Student-t teszt, illetve egyutas varianciaanalízist követő Duncan vagy Student-Newman-Keuls (SNK) teszt alkalmazásával, ahogy azt az ábrák aláírásaiban feltüntettük. A statisztikailag szignifikánsnak jelölt átlagok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten különböznek egymástól

5. Eredmények

5.1. A gyökérszóna megnövekedett ACC tartalmának hatása paradicsomnövényekre, egyéb specifikus stresszfaktor alkalmazása nélkül

5.1.1. Az ET-termelésben, a növekedésben és az iontartalmakban bekövetkező változások exogén ACC kezelés hatására

A gyökéren keresztül történő exogén ACC kezelés koncentrációtól és a növényi szövettől függően fokozza az etilénprodukciónak paradicsomnövényekben (8. ábra). A 0,01 µM-os ACC kezelés csupán marginális változásokat okozott a gyökér ET produkciójában, ugyanakkor az 1,0 µM -os kezelés kissé, nem szignifikánsan emelte meg a gyökér ET emisszióját, ami csupán a 7. napon vált szignifikánssá. A 100 µM -os ACC viszont már az 1. naptól kezdve jelentős mértékben, tartósan fokozta az ET kibocsájtást a gyökérben. Érdekes módon, a két kisebb ACC koncentráció nem okozott szignifikáns ET emisszió növekedést a levélben sem (8. ábra), viszont a 100 µM ACC a levélben is gyorsan megemelkedő ET emissziót váltott ki, ami a 7. napra a kezeletlen kontroll értékre esett vissza.

A gyökér friss- és száraz tömeg, valamint hossznövekedési paramétereiben egy ACC koncentráció sem okozott szignifikáns változást 7 nap alatt (2. táblázat). Annak ellenére, hogy az ET szabályozhatja a megnyúlásos növekedést, és a magasabb ACC koncentrációk hajtás frisstömeg gyarapodást indukáltak, ezek a változások nem bizonyultak szignifikánsnak (2.

táblázat). Ugyanakkor a hajtások száraz tömeg értékeiben szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a 0,01 és az 1,0 μM -os, valamint csökkenést az egy hetes, 100 μM -os ACC kezelés hatására. Fontos megemlíteni, hogy a 100 μM -os ACC alkalmazása a levélgyekek extrém epinasztiáját eredményezte (2. melléklet)

8. ábra 0,01, 1,0 és 100 μM ACC kezelésnek kitett paradicsomlevelek (A) és -gyökerek (B) ET kibocsátása. Kezeletlen kontroll: fekete oszlopok; 0,01 μM ACC: kék oszlopok; 1,0 μM ACC: zöld oszlopok; 100 μM ACC: piros oszlopok. Átlag + SE, n=4. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten, (Duncan teszt), ns = nem szignifikáns.

2. táblázat A növekedési paraméterek alakulása [hossz, friss- és száraz tömeg] 7 nappal a 0,01, 1,0 és 100 μM -os ACC kezeléseket követően, paradicsomgyökerekben és -hajtásokban

	Gyökér				Hajtás			
	ACC (μM)				ACC (μM)			
	Kontroll (0)	0,01	1,0	100	Kontroll (0)	0,01	1,0	100
Hossz (cm)	22.83±0.7 ^{ns}	22.33±0.2 ^{ns}	23.67±1.1 ^{ns}	24.17±0.2 ^{ns}	21.25±0.7 ^{ns}	21.58±0.7 ^{ns}	22.00±0.6 ^{ns}	22.92±1.3 ^{ns}
Friss tömeg (g)	5.68±0.2 ^{ns}	5.42±0.4 ^{ns}	4.98±0.2 ^{ns}	5.26±0.3 ^{ns}	12.11±1.2 ^{ns}	11.27±1.2 ^{ns}	13.41±1.5 ^{ns}	14.04±1.7 ^{ns}
Száraz tömeg (g)	0.36±0.0 ^{ns}	0.34±0.0 ^{ns}	0.31±0.0 ^{ns}	0.30±0.0 ^{ns}	1.40±0.0 ^c	1.60±0.0 ^a	1.50±0.0 ^b	1.20±0.0 ^d

Átlag ± SE, n = 10. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten, (Duncan teszt), ns = nem szignifikáns.

Bár a gyökér K^+ tartalmában nem tapasztaltunk szignifikáns, exogén ACC okozta változást a kísérlet 7. napján, szignifikáns Na^+ akkumuláció növekedést detektáltunk az 1,0 és a 100 μM -os ACC kezelés hatására (3. táblázat). A kifejllett, nem öregedő levelek esetében szignifikáns K^+ deficitet detektáltunk a 0,01 és az 1,0 μM -os ACC koncentráció hatására 7 nap elteltével, továbbá jelentős mértékű Na^+ felhalmozódást a legnagyobb ACC koncentráció

esetében (3. táblázat). Ezek alapján elmondható, hogy a gyökerek hosszabb intervallumú kitettsége 100 μM ACC-nek csökkent K^+/Na^+ arányhoz vezetett mindkét vizsgált növényi részben (3. táblázat).

3. táblázat A makroelem- és vastartalmak alakulása ($\mu\text{mol g}^{-1}$ száraz tömeg) 7 nappal a 0,01, 1,0 és 100 μM -os ACC kezelések követően, paradicsomgyökerekben és -levelekben

	Gyökér				Levél			
	ACC (μM)							
	Kontroll (0)	0,01	1,0	100	Kontroll (0)	0,01	1,0	100
Na^+	75,8 $\pm$ 3,5 ^c	74,27 $\pm$ 4,1 ^c	88,1 $\pm$ 3,1 ^b	111,7 $\pm$ 2,1 ^a	51,3 $\pm$ 1,23 ^b	40,1 $\pm$ 2,8 ^b	44,4 $\pm$ 4,6 ^b	63,7 $\pm$ 4,8 ^a
K^+	949,9 $\pm$ 91,6 ^{ns}	1000,9 $\pm$ 44,7 ^{ns}	1003,1 $\pm$ 104,4 ^{ns}	1054,8 $\pm$ 35,3 ^{ns}	674,3 $\pm$ 19,4 ^a	489,6 $\pm$ 26,1 ^b	500,7 $\pm$ 16,9 ^b	616,0 $\pm$ 24,7 ^a
Ca^{2+}	148,4 $\pm$ 9,0 ^{ns}	191,37 $\pm$ 13,8 ^{ns}	171,1 $\pm$ 29,9 ^{ns}	147,7 $\pm$ 4,9 ^{ns}	411,3 $\pm$ 38,2 ^{ns}	315,9 $\pm$ 27,0 ^{ns}	325,7 $\pm$ 34,5 ^{ns}	394,1 $\pm$ 13,2 ^{ns}
Mg^{2+}	187,1 $\pm$ 16,1 ^b	190,21 $\pm$ 15,7 ^b	189,5 $\pm$ 1,7 ^b	293,3 $\pm$ 11,1 ^a	173,9 $\pm$ 12,5 ^a	138,6 $\pm$ 2,9 ^b	140,2 $\pm$ 12,1 ^b	173,9 $\pm$ 9,6 ^a
Fe^{2+}	4,8 $\pm$ 0,2 ^c	6,2 $\pm$ 0,2 ^b	7,3 $\pm$ 0,5 ^a	6,1 $\pm$ 0,2 ^b	1,8 $\pm$ 0,1 ^{ns}	1,5 $\pm$ 0,1 ^{ns}	1,4 $\pm$ 0,1 ^{ns}	1,9 $\pm$ 0,2 ^{ns}
K^+/Na^+	12,5 $\pm$ 0,6 ^a	13,5 $\pm$ 0,5 ^a	11,4 $\pm$ 0,5 ^a	9,4 $\pm$ 0,4 ^b	13,1 $\pm$ 0,6 ^a	12,2 $\pm$ 1,0 ^a	11,3 $\pm$ 0,9 ^a	9,7 $\pm$ 0,8 ^b

Átlag $\pm$ SE, n=6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten, (Duncan teszt), ns = nem szignifikáns.

Ezzel egyidőben, a 100 μM -os ACC Mg^{2+} felhalmozódást okozott a gyökérben (3. táblázat). Annak ellenére, hogy a két kisebb ACC koncentráció szignifikánsan csökkentette a levelek Mg^{2+} akkumulációját, a 100 μM -os ACC nem befolyásolta azt jelentősen.

A szövetek Ca^{2+} tartalmában nem kaptunk szignifikáns változást a kísérlet során. Az exogén ACC szignifikánsan fokozta a gyökerek Fe^{2+} szintjét, míg a levelekben a kisebb koncentrációk enyhe, marginális Fe^{2+} csökkenést okoztak (3. táblázat).

5.1.2. Exogén ACC kezelés okozta változások a gyökércsúcsok, valamint a kifejtett, nem öregedő levelek ROS és RNF produkciójában

A járulékos gyökerek apikális régiójában a H_2O_2 , illetve a NO felhalmozódás hangsúlyos változása figyelhető meg (9. ábra). A 100 μM ACC egy hét alatt drasztikusan megemelte a gyökércsúcsok H_2O_2 tartalmát, miközben a NO akkumulációra nem volt hatással.

A 0,01 és az 1,0 μM -os ACC viszont jelentősen csökkentette a gyökércsúcsok NO tartalmát. A $\text{O}_2^{\cdot-}$ termelődés a túl magas standard mérési hiba értékek miatt nem bizonyult szignifikánsnak és a gyökércsúcsok ONOO⁻ produkciója sem változott a 7. napon (9. ábra).

A gyökér környezetében megemelkedett ACC koncentráció enyhe, de szignifikáns mértékű H_2O_2 akkumulációt okozott a levelekben 7 napot követően, azonban a $\text{O}_2^{\cdot-}$, a NO és a ONOO⁻ produkció csupán a 100 μM -os ACC kezelés hatására mutatott szignifikáns emelkedést, noha ez a növekmény a ONOO⁻ esetében kevésbé volt kifejezett, mint a NO akkumulációban történő változás. Az 1,0 μM -os ACC alkalmazása viszont szignifikánsan gátolta a kifejtett, nem öregedő levelek NO termelődését (10. ábra).

9. ábra A H₂O₂ (A), a O₂⁻ (B), a NO (C) és a ONOO⁻ (D) tartalmakban bekövetkező változások 1 hetes, 0 (fekete oszlopok), 0,01 (kék oszlopok), 1,0 (zöld oszlopok) és 100 µM (piros oszlopok) ACC kezelésnek kitett paradicsomnövények járulékos gyökereinek apikális szegmensében. A különböző molekulákra specifikus festékek fluoreszcencia intenzitása a kontroll értékek %-ában került ábrázolásra. Átlag + SE, n=16. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között P ≤ 0,05 szinten, (Duncan teszt).

10. ábra A H₂O₂ (A), a O₂⁻ (B), a NO (C) és a ONOO⁻ (D) tartalmakban bekövetkező változások 1 hetes, 0 (fekete oszlopok), 0,01 (kék oszlopok), 1,0 (zöld oszlopok) és 100 µM (piros oszlopok) ACC kezelésnek kitett paradicsomnövények leveleiben. A NO és a ONOO⁻ specifikus festékek fluoreszcencia intenzitása a kontroll értékek %-ában került ábrázolásra. Átlag + SE, n=16. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között P ≤ 0,05 szinten, (Duncan teszt).

5.1.3. A gyökérzónában kialakuló ACC többlet-indukálta változások a paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitásában

A sztómák záródásának mértéke meghatározza a párologtatás mértékét, valamint a gázcsere, ezen belül a CO₂ felvételének lehetőségét is. A 0,01 és az 1,0 µM-os ACC koncentrációk csupán marginális változásokat okoztak a g_{sw} paraméterben a kezelés alatt, viszont a 100 µM-os ACC expozíció hatására a levelek csaknem 50%-os g_{sw} redukción szenvedtek el 24 óra múltán, mely a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb maradt a 2. és 5. napok között (11. ábra, A).

A C_i/C_a a g_{sw} -hez hasonló tendenciát mutatott az első 2 napon, azonban néhány különbség megfigyelhető a 3. naptól (11. ábra, B). A 100 μM -os ACC kezelést követő 24 óra elteltével szignifikáns csökkenés látható a C_i/C_a paraméterben, majd érdekes módon, a 3. napon a kontroll szintre történő visszatérést tapasztaltunk. Ezt egy ismételt szignifikáns, a 4. napon megfigyelhető tranzienst csökkenés, majd a kontroll érték felé közelítés követte az 5. naptól.

11. ábra A CO_2 asszimiláció és a kapcsolódó paraméterek (A, B, C) illetve a PSII állapotára (D, E, F) vonatkozó klorofill a fluoreszcencia paraméterek időbeni változásai 7 napos, 0 (●), 0,01 (●), 1,0 (▼) és 100 μM (▼) ACC kezelésnek kitett paradicsomnövények leveleiben. A: A sztomák vízgőzvezető képessége, g_{sw} ; B: az intercelluláris és az atmoszférikus CO_2 koncentráció aránya, C_i/C_a ; C: a nettó CO_2 asszimilációs ráta, A_N ; D: a PSII maximális kvantumhatásfoka sötétadaptált levelekben, F_v/F_m ; E: a sötétadaptált levelek minimális fluoreszcenciája, F_0 ; F: a PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciója, q_L . Átlag + SE, $n = 3$ (A, B, C) és $n = 4$ (D, E, F). A *, ** és *** jelekkel jelölt adatok szignifikáns eltéréseket mutatnak az adott nap kezeletlen kontroll értékeihez viszonyítva $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ és $P \leq 0,001$ szinteken (Student's t teszt).

A két kisebb ACC koncentráció számottevően növelte az A_N mértékét 24 illetve 48 órát követően (11. ábra, C). Ezzel szemben, a 100 μM -os ACC az A_N szignifikáns, konstans

csökkenését okozta a kísérlet elején. Egy, a 3. napon detektált minimum értéket követően rövid normalizálódási szakasz figyelhető meg, majd az A_N a 6. naptól ismét csökkent. A kísérlet során nem tapasztaltunk jelentős változást az F_V/F_M (11. ábra, D) és az F_0 paraméterekben (11. ábra, E). Érdekes módon, a 0,01 és a 100 μM -os ACC is csökkentette a q_L -t, azonban ez sokkal kifejezettebb volt a magasabb koncentráció esetében (11. ábra, F).

12. ábra A P700 abszorbancia változások (A, B, C) és a korofill a fluoreszcencia indukciós paraméterek (D, E, F) időbeni változásai 7 napos 0 (●), 0,01 (○), 1,0 (▼) és 100 μM (▼) ACC kezelésnek kitett paradicsomnövények leveleiben. Átlag + SE, 4. A: a PSI fotokémiai kvantumhatásfoka fényadaptált levelekben, $Y(I)$; B: a PSI donor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka, $Y(ND)$; C: a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka, $Y(NA)$; D: a PSII effektív kvantumhatásfoka, $Y(II)$; E: a nem-szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfoka, $Y(NO)$; F: szabályozott (fényaktivált) energia disszipáció kvantumhatásfoka, $Y(NPQ)$. A * jellel jelölt adatok szignifikáns eltéréseket mutatnak az adott nap kezeletlen kontroll értékeihez viszonyítva $P \leq 0,05$ szinten (Student's t teszt)

A tápoldat ACC tartalmának kisebb megemelése (0,01 és 1,0 μM) a $Y(I)$ enyhe, lépcsőzetes növekedését okozta (12. ábra, A), mely szignifikáns eltért a kontrolltól az 6. napon. Meglepő módon, a $Y(I)$ értékének megváltozását ebben az esetben nem követte a $Y(II)$

kontrollhoz viszonyított tendenciális növekedése (12. ábra, D). A 100 μM -os ACC kezelés a $Y(\text{II})$ szignifikáns csökkenését okozta az 1. a 2. és az 5. napon.

A $Y(\text{ND})$ és $Y(\text{NA})$ paraméterekben apróbb fluktuációk figyelhetők meg a kezelési periódus elején. Fontos megemlíteni azonban, hogy a 0,01 μM -os ACC koncentráció (és enyhébb mértékben az 1 μM -os is) szignifikánsan megváltoztatta a PSI nem fotokémiai kioltási profilját donor-oldal dominánssról akceptor-oldal dominánssra az 5. naptól, még hozzá nettó $Y(\text{I})$ limitáció nélkül (12. ábra, B, C). A 100 μM ACC-nek történő kitettség $Y(\text{II})$ gátló hatása az 5. napig erősödő $Y(\text{NPQ})$, illetve marginális, ingadozó növekményeket mutató $Y(\text{NO})$ paraméterekkel társul (12. ábra, E, F). Bár a 0,01 μM ACC is okozott tranziens, szignifikáns $Y(\text{II})$ redukciót és $Y(\text{NPQ})$ növekedést a 2. napon, a kisebb ACC koncentrációk hatására később csupán marginális változások voltak megfigyelhetők a $Y(\text{NO})$ és $Y(\text{NPQ})$ értékekben.

13. ábra A PSI körüli ciklikus elektronáramlás kvantumhatásfok-többszöröse időbeni változásai 7 napos, 0 (●), 0,01 (○), 1,0 (▼) és 100 μM (▼) ACC kezelésnek kitett paradicsomnövények leveleiben. Átlag + SE, $n = 4$. A * jellel jelölt adatok szignifikáns eltéréseket mutatnak az adott nap kezeletlen kontroll értékeihez viszonyítva $P \leq 0,05$ szinten (Student's t teszt)

A $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ arány vizsgálatából kiderült, hogy a 0,01 és az 1,0 μM -os ACC kezelések szignifikánsan növelték a CEF-PSI mértékét az 1. és a 2. napon, azonban a 100 μM -os ACC expozíció a CEF sokkal hangsúlyosabb emelkedését okozta. Ez az 5. napon érte el a maximumát, melyet érdekes módon egy jelentős visszaesés követett (13. ábra).

4. táblázat A paradicsomlevelek klorofill a és b (Kl a Kl b) valamint az össz-karotinoid (Kar) tartalmában (mg g^{-1} friss tömeg) bekövetkező változások 7 nappal a 0,01, 1,0 és 100 μM -os ACC kezeléseket követően.

	Kontroll (0 μM ACC)	0,01 μM ACC	1,0 μM ACC	100 μM ACC
Kl a	$1,69 \pm 0,06^{\text{ns}}$	$1,78 \pm 0,03^{\text{ns}}$	$1,89 \pm 0,10^{\text{ns}}$	$1,56 \pm 0,18^{\text{ns}}$
Kl b	$0,62 \pm 0,02^{\text{ns}}$	$0,63 \pm 0,02^{\text{ns}}$	$0,70 \pm 0,05^{\text{ns}}$	$0,58 \pm 0,07^{\text{ns}}$
Kl $a+b$	$2,31 \pm 0,08^{\text{ns}}$	$2,41 \pm 0,04^{\text{ns}}$	$2,59 \pm 0,14^{\text{ns}}$	$2,14 \pm 0,25^{\text{ns}}$
Kar	$0,44 \pm 0,01^{\text{ab}}$	$0,46 \pm 0,01^{\text{a}}$	$0,48 \pm 0,02^{\text{a}}$	$0,39 \pm 0,03^{\text{b}}$

Átlag $\pm$ SE, $n=3$. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $p \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt), ns = nem szignifikáns.

Az oxidatív stresszre utaló körülmények ellenére, nem találtunk számottevő eltérést a levelek klorofill- és karotinoidtartalmában egy hét elteltével, kivéve a 100 μM -os ACC kezelés esetét, ahol a karotinoidok enyhe, de szignifikáns csökkenése figyelhető meg (4. táblázat).

A 0,01 és az 1,0 μM -os ACC kezelések a kontrollhoz képest szignifikánsan növelték a gyökerek összcukor tartalmát a 7. napra (5. táblázat). Mind a fruktóz, mind a glükóz akkumuláció ACC általi serkentését megfigyelhettük a gyökérben, azonban a fruktóz tartalom háromszorosa volt a glükózénak. A 1,0 és a 100 μM -os ACC koncentráció is csökkentette a gyökerek szacharóz felhalmozását. Az exogén ACC expozíció növelte a gyökérszövetek szorbitol tartalmát a 7. napra, kivéve a 100 μM -os ACC kezelés esetét.

5. táblázat Az összcukor-tartalom (mg g^{-1} friss tömeg) és a különböző típusú cukrok és a szorbitol ($\mu\text{mol g}^{-1}$ friss tömeg) akkumulációja 7 nappal a 0,01, 1,0 és 100 μM -os ACC kezeléseket követően.

	Gyökér				Levél			
	ACC (μM)							
	Kontroll (0)	0,01	1,0	100	Kontroll (0)	0,01	1,0	100
Összcukor	55,8 $\pm$ 2,3 ^b	74,0 $\pm$ 2,8 ^a	75,0 $\pm$ 1,1 ^a	57,9 $\pm$ 2,2 ^b	85,7 $\pm$ 5,0 ^b	95,6 $\pm$ 0,7 ^{ab}	106,5 $\pm$ 4,0 ^a	91,0 $\pm$ 3,4 ^b
Glükóz	3,74 $\pm$ 0,10 ^d	8,91 $\pm$ 0,05 ^a	7,80 $\pm$ 0,04 ^b	5,81 $\pm$ 0,04 ^c	8,84 $\pm$ 0,01 ^c	12,8 $\pm$ 0,2 ^b	14,3 $\pm$ 0,2 ^a	13,5 $\pm$ 0,5 ^b
Fruktóz	13,0 $\pm$ 0,3 ^c	19,9 $\pm$ 0,1 ^a	20,2 $\pm$ 0,2 ^a	14,5 $\pm$ 0,2 ^b	17,7 $\pm$ 0,1 ^c	20,0 $\pm$ 0,3 ^b	21,7 $\pm$ 0,3 ^a	19,8 $\pm$ 0,4 ^b
Szacharóz	2,66 $\pm$ 0,33 ^a	3,12 $\pm$ 0,10 ^a	1,08 $\pm$ 0,18 ^c	1,91 $\pm$ 0,12 ^b	1,34 $\pm$ 0,18 ^b	3,07 $\pm$ 0,28 ^a	2,04 $\pm$ 0,27 ^{ab}	1,58 $\pm$ 0,52 ^b
Szorbitol	0,09 $\pm$ 0,01 ^b	0,14 $\pm$ 0,09 ^a	0,15 $\pm$ 0,02 ^a	0,08 $\pm$ 0,01 ^b	0,27 $\pm$ 0,013 ^b	0,41 $\pm$ 0,02 ^a	0,46 $\pm$ 0,02 ^a	0,45 $\pm$ 0,02 ^a

Átlag $\pm$ SE, n=3. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A levelek összcukor, glükóz és fruktóz akkumulációjában a gyökéréhez hasonló tendenciákat figyeltünk meg, azzal a kivétellel, hogy a levélben a fruktóztartalom csupán körülbelül kétszerese volt a glükózénak (5. táblázat). A 0,01 μM -os ACC fokozta a levelek szacharóz koncentrációját is. Az exogén ACC a levelek szorbitol tartalmát is növelte a 7. napra.

5.2. Paradicsomgyökerek só-indukálta, etilén függő válaszai

5.2.1. Az ET jelátvitel szerepe a gyökerek sótoleranciájában, ROF és RNF produkciójában, ET receptor mutáns, *Never ripe* paradicsomnövényekben.

Az ET-érzékelésnek a gyökér sóstressz-válaszaiban betöltött szerepét vizsgálva meghatároztuk a gyökércsúcsok ET kibocsájtását a 100 mM-os és a 250 mM-os NaCl kezelést követően.

Mindkét sókoncentráció növelte az ET emissziót a *Nr* mutáns gyökerek apikális szegmensében (14. ábra). A szubletális sókoncentráció mindkét genotípus ET produkcióját megnövelte a 6. órától. A 250 mM-os NaCl kezelés 24. óráját követően a VT és *Nr* gyökércsúcsok ET produkciója is szignifikánsan csökkent.

A sókezelések hatására, már 1 óra elteltével $\text{O}_2^{\cdot -}$ felhalmozódást tapasztaltunk mindkét genotípus gyökércsúcsában, ami viszont szignifikánsan magasabb értéket ért el a *Nr* mutánsban (15. ábra, A). 100 mM NaCl jelenlétében, 6 óra elteltével a $\text{O}_2^{\cdot -}$ produkció csökkent a VT gyökerek apikális régiójában ellentétben a *Nr* mutánsokéval. Ugyanakkor, 250 mM NaCl

magas, maradandó $O_2^{\cdot -}$ felhalmozódást indukált a VT és a *Nr* gyökércsúcsokban, bár az utóbbiak esetében ismét magasabb értékeket detektáltunk 1, illetve 6 óra elteltével.

14. ábra Az ET produkció VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) paradicsomnövények járulékos gyökereinek apikális régiójában a 100 ill. 250 mM-os NaCl kezelés 1., 6. és 24. óráját követően. Átlag + SD, n = 6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között, az adott időpontban $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

15. ábra A $O_2^{\cdot -}$ (A), a H_2O_2 (B), a NO (C) és a $ONOO^{\cdot -}$ (D) akumuláció VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) paradicsomnövények járulékos gyökereinek apikális régiójában a 100 ill. 250 mM-os NaCl kezelés 1., 6. és 24. óráját követően. A különböző molekulákra specifikus festékek fluoreszcencia intenzitása a kontroll értékek %-ában került ábrázolásra. Átlag + SD, n = 6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között, az adott időpontban $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A só expozíció 1. óráját követően csupán a VT gyökércsúcsok H_2O_2 mennyisége emelkedett meg (15. ábra, B), a *Nr* növényekben ez a változás az időben eltolva és csak a 250 mM-os NaCl kezelés esetében volt megfigyelhető. Míg a letális NaCl koncentráció tranziens NO akkumulációt indukált, a szubletális stressz minden időpontban megemelte a NO szinteket a VT és *Nr* gyökércsúcsokban. Utóbbiak esetében a kezdeti, só-indukálta NO felhalmozódás sokkal intenzívebbnek mutatkozott, illetve a letális stressz során tartósabbnak is (15. ábra, C).

A $ONOO^-$ képződés csupán a letális NaCl kezelés hatására emelkedett meg szignifikánsan, ami kifejezettebb volt a *Nr* mutáns esetében (15. ábra, D).

A NaCl kezelés káros hatásainak meghatározására többek között a gyökércsúcs sejtjeinek életképességét detektáló FDA festését választottuk. 250 mM NaCl jelenlétében, 6 óra elteltével szignifikáns életképesség csökkenést tapasztaltunk mindkét genotípusban (16. ábra). Hasonló változást figyeltünk meg a *Nr* gyökércsúcsok esetében is szubletális stressz során, ellentétben a VT növényekkel. Ez azt sugallja, hogy a *Nr* mutánsok gyökércsúcsi sejtjeinek sóérzékenysége jóval magasabb, így a károsodás is sokkal kifejezettebbé vált a 24. órára.

16. ábra Az FDA fluoreszcencia (életképesség) VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdeciskos, halványkék oszlopok) paradicsomnövények járulékos gyökereinek apikális régiójában a 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelés 1. 6. és 24. óráját követően, a kontroll értékek %-ában ábrázolva. Átlag + SD, n = 6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között, az adott időpontban belül $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

17. ábra Az elektrolit-kieresztésben (A) és a DNS-fragmentációban (B) bekövetkező változások VT és *Nr* mutáns paradicsomnövények járulékos gyökereiben 24 óras 100 ill. 250 mM-os NaCl kezelést követően. M: DNS marker. Átlag + SD, n = 6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között (A) $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A szövetek elektrolit kieresztése szintén tükrözi a stressz által okozott membránkárosodást. A gyökércsúcsi sejtek életképességében bekövetkező sóstressz okozta változásokat a teljes gyökérzet elektrolit-kieresztésének vizsgálata is megerősítette (17. ábra, A). Az elektrolit-kieresztés mértéke 80%-os volt mindkét genotípus esetében az erős sóstressz 24. órájában, míg 55%-os a *Nr* gyökerekben 100 mM NaCl kezelés hatására.

A sejtek életképességének csökkenésével párhuzamosan egyes sejtek elhalnak. A kialakuló programozott sejthalál mértékét a DNS degradáció is tükrözi. A DNS-fragmentáció mindkét genotípusban megfigyelhető volt a 250 mM-os NaCl kezelés hatására, ugyanúgy, mint a szubletális sóstresszt elszenvedő *Nr* gyökerek esetében (17. ábra, B).

Az ion-homeosztázis fenntartása, különösen az optimális K^+/Na^+ arány alapvető a sejtek túléléséhez a sóstressz során, mivel az ionegyensúlyban bekövetkező irreverzibilis változások képesek aktiválni a PCD-t. A 24 órán át jelen levő, letális NaCl koncentráció mindkét genotípusban csökkent K^+ tartalmat eredményezett, illetve már a szubletális sóstressz is hasonló változást okozott a *Nr* gyökerekben. Emellett, a sókezelések hatására szignifikáns Na^+ akkumuláció volt mérhető mindkét genotípusban (6. táblázat). A K^+/Na^+ arány mindkét sókoncentráció esetében a *Nr* gyökerekben csökkent jelentősebb mértékben az alacsony K^+ tartalom miatt, míg a VT gyökerekben csak 250 mM NaCl koncentrációnál volt megfigyelhető.

6. táblázat A K^+ és Na^+ tartalmakban (mg száraz tömeg $^{-1}$ g^{-1}), valamint a K^+/Na^+ arányban bekövetkező változások VT és *Nr* mutáns paradicsomnövények járulékos gyökereiben 24 órás 100 ill. 250 mM-os NaCl kezelést követően

	Kontroll		100 mM NaCl		250 mM NaCl	
	VT	<i>Nr</i>	VT	<i>Nr</i>	VT	<i>Nr</i>
K^+	$23,8 \pm 2,5^b$	$17,6 \pm 3,75^b$	$39,44 \pm 7,33^a$	$12,43 \pm 3,13^c$	$9,66 \pm 1,29^c$	$6,03 \pm 0,7^c$
Na^+	$14,16 \pm 0,14^d$	$12,8 \pm 1,75^d$	$25,33 \pm 1,73^b$	$20,62 \pm 0,3^c$	$27,93 \pm 0,94^a$	$26,16 \pm 1,36^{ab}$
K^+/Na^+	$1,68 \pm 0,17^a$	$1,36 \pm 0,12^b$	$1,55 \pm 0,18^{ab}$	$0,6 \pm 0,16^c$	$0,35 \pm 0,06^d$	$0,23 \pm 0,01^d$

Átlag $\pm$ SD, n=6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

18. ábra A fehérje tartalmában (A) és az össz-proteolitikus aktivitásban (B) bekövetkező változások VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) paradicsomnövények mellégyökereiben 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően, a specifikus cisztein proteáz gátlószer, E64 hiányában, vagy jelenlétében VT (sötétszürke oszlopok) és *Nr* mutáns (fehér, csíkos oszlopok) gyökereiben. Átlag $\pm$ SD, n = 6. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A stressz egyik velejárója lehet a fehérjék degradációjának fokozódása, amit specifikus proteázok katalizálnak. A sejthalállal kapcsolatosan különösen fontos lehet a cisztein proteázok

aktiválódása. A 250 mM NaCl jelenléte redukált protein tartalmakat okozott a VT és *Nr* gyökerekben egyaránt (18. ábra, A), amivel párhuzamosan a proteolitikus aktivitás is növekedett (18. ábra, B), mindez megfigyelhető volt a *Nr* növények esetében is szubletális sóstresszt követően. A specifikus cisztein proteáz gátló, az E-64 csökkentette a teljes proteáz aktivitást a gyökerekben, mely után láthatóvá vált, hogy a stresszhatás erősödésével az össz-proteolitikus aktivitás egyre nagyobb hányadában vettek részt a cisztein proteázok.

5.3. A paradicsomnövények etilén státuszától függő változások tolerálható és letális sóstressz során

5.3.1. A só-indukált etilén produkció, a növekedés, a vízháztartás és a klorofill- valamint a Na⁺ és K⁺ tartalmak változása különböző ET státuszú növényekben

A növények ET státuszának módosítására a VT növényeket exogén ACC-vel gyökéren keresztül (elő)kezeltük. Az ET jelátvitel hiányának sóstressz akklimatizációra gyakorolt hatását pedig az ET receptor mutáns *Nr/Nr* növényekben vizsgáltuk.

A 10 μ M ACC hozzáadását követő 2. órában – a kísérlet 0 időpontja az ACC kezelés 1. órájának leteltétől számítva – az ACC-kezelt VT gyökérben több mint kétszer magasabb ET emissziót detektáltunk, mint a kezeletlen VT növények esetében. Az ET felszabadulás mértékének maximuma a 6 órás mintavételkor volt megfigyelhető, azonban 24 óra után sem esett vissza a kezeletlen VT értékre (19. ábra, B). Só hiányában a *Nr* gyökerek ET produkciója nem különbözött a VT növényekétől.

19. ábra A kifejlett, nem öregedő levelek (A) és a gyökerek (B) ET kibocsátása, VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdeciskos, halványkék oszlopok) (0 μ M ACC), valamint 10 μ M ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövényekben 1, 6, ill. 24 órás 100 ill. 250 mM-os NaCl expozíciót követően. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, n = 4. „FT” = friss tömeg. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között P ≤ 0,05 szinten, (SNK teszt).

A 100 mM-os ill. 250 mM-os NaCl koncentrációk hozzáadását követően a VT gyökerekben csupán 6 óra elteltével, a tolerálható stressz jelenlétében találtunk szignifikáns ET emisszió növekedést, míg a letális stressz a 24. órára szignifikáns visszaesést okozott a paraméter értékeiben (19. ábra, B). Az exogén ACC jelenléte a szubletális sóstressz során tartósan, szignifikánsan növelte a gyökér ET kibocsájtását a megfelelő sókezelte VT-hez képest, azonban letális sóstressz során csupán a 6. órában okozott emelkedést. A *Nr* mutánsok gyökerei szinte azonnali, drasztikusan megemelkedett ET emisszióval válaszoltak a NaCl megjelenésére a tápoldatban, mely szubletális stressz során a 6. és 24. órában alacsonyabb, de a VT értékénél szignifikánsan magasabb szintre állt be, az extra ACC-vel kezelt VT gyökerekhez hasonlóan. Érdekes módon, a gyökérszóna megnövelt ACC tartalma csupán a 6. órában váltott ki szignifikáns – több mint háromszor magasabb – ET emissziót a levélben, jóllehet a VT kontroll növények ET produkciója kissé magasabb volt az 1 órás mintavételi időpontban, mint a későbbi időpontokban (19. ábra, A). A gyökérrel ellentétben, a kezeletlen *Nr* levelek ET emissziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a VT növényeké az 1 órás mintavételkor.

A VT levelek már 1 óra múltán is jelentős ET produkcióval válaszoltak a sókezelésekre, ez 100 mM NaCl-nál az első órában mutatott maximumot, majd az idő előre haladtával kontroll értékre állt be (19. ábra, A). A 250 mM NaCl hatására a VT levél szintén megemelkedett ET produkcióval válaszolt, mely az 1. és a 24. órában mutatott maximumot és bizonyult szignifikánsnak. A levélben a gyökérével ellentétes tendenciákat lehetett felfedezni a 10 μ M ACC jelenlétében történő 100 mM-os NaCl kezelés során, ahol az első órában az ACC csökkentette a sóstressz indukált ET produkciót. A letális sókoncentráció exogén ACC jelenlétében még tovább növelte a levelek ET-termelését az 1. óra elteltével, míg 6 és 24 óra után, váratlan módon szignifikánsan gátolta azt a megfelelő sókezelést kapott VT levelekhez képest. A *Nr* levél esetében a szubletális, illetve a letális sókezelés 24. órája után találtunk szignifikáns emelkedést az ET produkcióban.

20. ábra A vízpotenciál VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) (0 μ M ACC), valamint 10 μ M ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, n = 4. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között $P \leq 0,05$ szinten, (SNK teszt).

A *Nr* mutánsok leveleinek ψ_w értékei kezeletlen állapotban is mutattak apróbb, időfüggő eltéréseket a VT növényekéhez képest (20. ábra). A 100 mM NaCl jelenléte a *Nr* mutánsok vízpotenciálját tartósan csökkentette, mely a VT levelek esetében időben eltolva jelentkezett.

7. táblázat A kifejlett, nem öregedő levelek és a gyökerek friss- (g), illetve száraz (g) biomassa produkciója, valamint a levelek relatív víztartalma (%), VT és *Nr* mutáns (0 μ M ACC), valamint 10 μ M ACC-vel kezelt VT paradicsomnövényekben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően.

Idő (Óra)	0 mM NaCl			100 mM NaCl			250 mM NaCl		
	VT	VT + 10 μ M ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μ M ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μ M ACC	<i>Nr</i>
Friss tömeg, levél (g)									
1	0,65 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,72 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,56 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,72 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,69 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,59 $\pm$ 0,08 ^{ns}	0,66 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,65 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,56 $\pm$ 0,05 ^{ns}
6	0,63 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,62 $\pm$ 0,09 ^{ns}	0,53 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,62 $\pm$ 0,07 ^{ns}	0,59 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,52 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,66 $\pm$ 0,06 ^{ns}	0,66 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,53 $\pm$ 0,06 ^{ns}
24	0,63 $\pm$ 0,08 ^{ns}	0,58 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,52 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,53 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,60 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,56 $\pm$ 0,06 ^{ns}	0,79 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,65 $\pm$ 0,09 ^{ns}	0,56 $\pm$ 0,04 ^{ns}
Száraz tömeg, levél (g)									
1	0,14 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,14 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,16 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,12 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,01 ^{ns}
6	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,13 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,00 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,00 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,13 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,14 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,09 $\pm$ 0,01 ^{ns}
24	0,12 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,12 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,11 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,09 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,12 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,01 ^{ns}
Friss tömeg, gyökér (g)									
1	3,72 $\pm$ 1,18 ^{ns}	3,80 $\pm$ 0,40 ^{ns}	3,03 $\pm$ 0,12 ^{ns}	2,81 $\pm$ 0,50 ^{ns}	3,07 $\pm$ 1,00 ^{ns}	3,00 $\pm$ 0,48 ^{ns}	3,35 $\pm$ 0,70 ^{ns}	3,62 $\pm$ 0,95 ^{ns}	2,57 $\pm$ 0,03 ^{ns}
6	2,72 $\pm$ 0,7 ^{ns}	3,36 $\pm$ 0,94 ^{ns}	2,89 $\pm$ 0,39 ^{ns}	3,02 $\pm$ 0,3 ^{ns}	4,24 $\pm$ 0,39 ^{ns}	2,48 $\pm$ 0,94 ^{ns}	2,27 $\pm$ 0,15 ^{ns}	3,59 $\pm$ 0,45 ^{ns}	2,81 $\pm$ 0,55 ^{ns}
24	3,11 $\pm$ 0,8 ^{ns}	4,07 $\pm$ 0,65 ^{ns}	3,38 $\pm$ 0,22 ^{ns}	3,69 $\pm$ 0,3 ^{ns}	2,79 $\pm$ 0,21 ^{ns}	3,22 $\pm$ 0,51 ^{ns}	3,50 $\pm$ 0,17 ^{ns}	4,11 $\pm$ 0,38 ^{ns}	2,83 $\pm$ 0,48 ^{ns}
Száraz tömeg, gyökér (g)									
1	0,21 $\pm$ 0,06 ^{ns}	0,24 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,18 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,16 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,23 $\pm$ 0,06 ^{ns}	0,19 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,17 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,19 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,16 $\pm$ 0,01 ^{ns}
6	0,15 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,23 $\pm$ 0,06 ^{ns}	0,18 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,18 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,28 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,24 $\pm$ 0,05 ^{ns}	0,10 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,22 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,18 $\pm$ 0,04 ^{ns}
24	0,20 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,28 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,20 $\pm$ 0,01 ^{ns}	0,21 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,23 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,18 $\pm$ 0,03 ^{ns}	0,23 $\pm$ 0,04 ^{ns}	0,26 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,16 $\pm$ 0,03 ^{ns}
Relatív víztartalom, levél (%)									
1	90,6 $\pm$ 0,9 ^{bc}	94,2 $\pm$ 3,0 ^{ab}	76,1 $\pm$ 2,9 ^{ef}	80,4 $\pm$ 1,5 ^{cdf}	89,7 $\pm$ 1,6 ^{bd}	82,0 $\pm$ 0,5 ^{bef}	100,7 $\pm$ 3,4 ^a	96,5 $\pm$ 0,9 ^{ab}	74,7 $\pm$ 1,5 ^f
6	83,4 $\pm$ 1,4 ^{bef}	89,6 $\pm$ 3,4 ^{bd}	82,3 $\pm$ 1,0 ^{bef}	83,0 $\pm$ 1,1 ^{bef}	85,9 $\pm$ 3,0 ^{bde}	88,4 $\pm$ 1,1 ^{bd}	83,2 $\pm$ 1,9 ^{bef}	78,3 $\pm$ 2,2 ^{ef}	79,4 $\pm$ 2,4 ^{bef}
24	86,1 $\pm$ 3,2 ^{bde}	97,2 $\pm$ 2,8 ^{ab}	85,6 $\pm$ 1,4 ^{bde}	80,1 $\pm$ 0,3 ^{cdf}	93,3 $\pm$ 2,6 ^{ab}	94,0 $\pm$ 4,9 ^{ab}	91,1 $\pm$ 2,1 ^b	81,8 $\pm$ 0,0 ^{bef}	77,6 $\pm$ 1,8 ^{ef}

A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag $\pm$ SE, n = 4. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezeléseket és az eltérő időpontok között $P \leq 0,05$ szinten, ns = nem szignifikáns (SNK teszt)

250 mM NaCl eleinte növelte, majd a 6 óra elteltével kb. 60%-kal csökkentette, később kontroll szintre állította a VT levelek vízpotenciálját, míg a *Nr* mutánsok végig jóval alacsonyabb ψ_w értékekkel rendelkeztek (20. ábra). Az ACC kezelés a letális sóstressz első

óráján kívül– ahol erős csökkenést okozott – szignifikáns emelkedést indukált a VT levelek vízpotenciáljában sóstressz során, illetve az 1 órás mintavételt kivéve, NaCl hiányában is.

Nem tapasztaltunk jelentős különbségeket a levelek, illetve a gyökerek friss- és száraz tömegeiben a kísérletek során (7. táblázat). A *Nr* levelek alacsonyabb relatív víztartalommal (RVT) rendelkeztek az 1 órás mintavételi időpontban, mint a VT, illetve ACC-kezelt növények, mely különbség az idő előrehaladtával eltűnt (7. táblázat). A *Nr* mutánsokban az ACC-kezelt VT levelekhez hasonló RVT emelkedést tapasztaltunk a szubletális stressz 24. órájában. Érdekes módon, a letális NaCl koncentráció 1 óra után szignifikáns RVT emelkedést okozott ugyanúgy, ahogy az ACC kezelt növények esetében, ezzel szemben a *Nr* mutánsokban szignifikáns csökkenést detektáltunk 24 órát követően.

A VT gyökerek K^+ tartalma a sókoncentráció növekedésével egyenes arányban csökkent, azonban a Na^+ akkumulációs kapacitásuk már 100 mM NaCl jelenlétében telítődött (8. táblázat). A VT gyökerek K^+/Na^+ aránya a K^+ tartalomhoz hasonló tendenciában csökkent a sókezelések hatására. A megfigyelt változásokat a kezeletlen kontroll és a 100 mM NaCl esetén nem befolyásolta az exogén ACC kezelés, letális sókoncentrációnál az iontartalmak és a K^+/Na^+ is csökkenni kezdett, bár nem szignifikánsan a VT-hez képest ACC előkezelés után.

8. táblázat A kálium (K^+) és nátrium (Na^+) tartalom, valamint a K^+/Na^+ arány ($mg\ g^{-1}$ száraz tömeg), VT és 10 μM ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények gyökereiben 24 órás 100 ill. 250 mM-os NaCl expozíciót követően.

	Kontroll		100 mM NaCl		250 mM NaCl	
	VT	VT + 10 μM ACC	VT	VT + 10 μM ACC	VT	VT + 10 μM ACC
K^+	32,02 $\pm 1,2^a$	34,41 $\pm 2,1^a$	19,46 $\pm 1,5^b$	21,45 $\pm 2,0^b$	5,79 $\pm 3,4^c$	2,76 $\pm 1,4^c$
Na^+	7,50 $\pm 1,1^c$	8,99 $\pm 0,2^c$	18,97 $\pm 1,3^{ab}$	15,63 $\pm 1,1^b$	22,11 $\pm 4,4^a$	17,49 $\pm 1,7^{ab}$
K^+/Na^+	3,72 $\pm 0,1^a$	3,84 $\pm 0,3^a$	1,03 $\pm 0,1^b$	1,41 $\pm 0,2^b$	0,28 $\pm 0,2^c$	0,15 $\pm 0,1^c$

Átlag $\pm$ SE, n=3. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten Duncan teszt).

9. táblázat A kálium (K^+) és nátrium (Na^+) tartalom, valamint a K^+/Na^+ arány ($mg\ g^{-1}$ száraz tömeg), VT és *Nr* mutáns (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények leveleiben 24 órás 100 ill. 250 mM-os NaCl expozíciót követően.

	0 mM NaCl			100 mM NaCl			250 mM NaCl		
	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>
K^+	21,60 $\pm 1,5^a$	21,27 $\pm 0,8^a$	21,73 $\pm 2,3^a$	19,00 $\pm 0,1^a$	19,38 $\pm 2,5^a$	13,98 $\pm 1,7^b$	20,97 $\pm 1,9^a$	24,09 $\pm 3,4^a$	21,08 $\pm 1,8^a$
Na^+	0,91 $\pm 0,2^d$	1,26 $\pm 0,1^d$	0,90 $\pm 0,2^d$	1,59 $\pm 0,4^d$	2,87 $\pm 0,5^c$	3,50 $\pm 0,4^c$	24,90 $\pm 0,2^b$	29,56 $\pm 5,0^a$	32,59 $\pm 0,1^a$
K^+/Na^+	25,39 $\pm 5,2^a$	17,40 $\pm 1,9^{ab}$	21,73 $\pm 3,4^{ab}$	13,47 $\pm 3,0^b$	7,62 $\pm 2,4^b$	4,17 $\pm 0,9^c$	0,84 $\pm 0,1^c$	0,87 $\pm 0,3^c$	0,65 $\pm 0,1^c$

A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag $\pm$ SE, n = 3. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A sókezelések nem voltak szignifikáns hatással a levelek K^+ -tartalmára, sem a VT, sem az exogén ACC kezelt VT növényekben, ez ugyanakkor csökkent a *Nr* mutánsokban a

szubletális sóstressz 24. óráját követően (9. táblázat). Az ACC kezelés és a *Nr* mutáció is tovább fokozta a só-indukálta Na^+ akkumulációt a levelekben, különösen a letális sókoncentráció esetében (9. táblázat). A 24 órás, 100 mM-os NaCl kezelés okozta enyhe csökkenés a VT levelek K^+ tartalmában, valamint a Na^+ tartalmuk enyhe növekedése kis mértékben, de szignifikánsan csökkentette a K^+/Na^+ arányt, mely a *Nr* mutáns kifejezettebb volt. A 250 mM-os NaCl drasztikusan csökkentette az összes csoport K^+/Na^+ arányát.

21. ábra A sejt-életképességének változása VT (0 μM ACC, fekete oszlopok), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsom járulékos gyökércsúcsokban, a 100 ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. A mért pixelintenzitás értékek az adott időpont kezeletlen, VT gyökér értékeire normalizálva. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. Átlag $\pm$ SE, $n = 4$. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

Érdekes módon, az exogén ACC kezelés önmagában, szignifikánsan fokozta a gyökércsúcsi sejtek életképességét az egy és hatórás mintavételi időpontokban. Bár a szubletális sókezelés nem okozott életképesség romlást a VT gyökércsúcsokban, az exogén ACC kezeléssel kombinálva mégis tapasztalható szignifikáns csökkenés a paraméterben 24 óra elteltével (21. ábra). Ezzel szemben, az ACC kezelés 250 mM NaCl jelenlétében tovább csökkentette a gyökércsúcsok életképességét, már 1 órát követően.

10. táblázat A klorofil *a* és *b* (Kl *a*, Kl *b*), illetve karotinoid (Kar) tartalom (mg g^{-1} friss tömeg), VT és *Nr* mutáns (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények leveleiben 24 órás 100 ill. 250 mM-os NaCl expozíciót követően.

	0 mM NaCl			100 mM NaCl			250 mM NaCl		
	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>	VT	VT + 10 μM ACC	<i>Nr</i>
Kl <i>a</i>	1,72 $\pm 0,02^{\text{de}}$	1,82 $\pm 0,04^{\text{bcd}}$	1,91 $\pm 0,05^{\text{b}}$	1,68 $\pm 0,03^{\text{de}}$	2,02 $\pm 0,04^{\text{a}}$	1,84 $\pm 0,05^{\text{bc}}$	1,77 $\pm 0,03^{\text{cd}}$	1,73 $\pm 0,02^{\text{de}}$	1,65 $\pm 0,01^{\text{e}}$
Kl <i>b</i>	0,58 $\pm 0,02^{\text{d}}$	0,65 $\pm 0,04^{\text{d}}$	1,15 $\pm 0,06^{\text{a}}$	0,61 $\pm 0,02^{\text{d}}$	0,76 $\pm 0,02^{\text{c}}$	0,97 $\pm 0,03^{\text{b}}$	0,66 $\pm 0,02^{\text{d}}$	0,59 $\pm 0,01^{\text{d}}$	0,80 $\pm 0,03^{\text{c}}$
Kar	0,34 $\pm 0,01^{\text{d}}$	0,37 $\pm 0,01^{\text{d}}$	0,58 $\pm 0,03^{\text{a}}$	0,36 $\pm 0,00^{\text{d}}$	0,45 $\pm 0,01^{\text{c}}$	0,49 $\pm 0,02^{\text{b}}$	0,35 $\pm 0,01^{\text{d}}$	0,38 $\pm 0,01^{\text{d}}$	0,43 $\pm 0,02^{\text{c}}$

A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag $\pm$ SE, $n = 5$. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések között $P \leq 0,05$ szinten (Duncan teszt).

A 24 órás, 10 μM -os ACC kezelés 100 mM NaCl-al kombinálva szignifikánsan, kb. 20%-kal megemelte a VT növények Kl *a* tartalmát, letális NaCl koncentráció jelenlétében ez azonban nem alakult ki (10. táblázat). A kezeletlen *Nr* mutáns növények csaknem 10%-kal magasabb Kl *a*, és körülbelül 50%-kal magasabb Kl *b* mennyiséggel rendelkeztek. A VT

levelek *Kl a* tartalmára a sókezelés nem volt jelentős befolyással a vizsgált időszakban. A letális sókoncentráció szignifikánsan csökkentette a *Nr* levelek *Kl a* tartalmát 24 óra alatt, azonban a megfigyelt értékek szubletális stressz során magasabbnak, míg letális stressz során alacsonyabbnak bizonyultak, mint a hasonló kezelésen átesett, VT növények leveleiben.

A gyökerek exogén ACC kezelése, szubletális sóstresszel kombinálva szignifikánsan megemelte a levelek *Kl b* tartalmát a 6 órás mintavételi időpontra (10. táblázat). Annak ellenére, hogy a *Nr* levelek *Kl b* koncentrációja só-indukálta csökkenésen ment keresztül, a kísérletek végére még mindig magasabbnak mutatkozott, mint a VT levelek esetében. A karotinoid tartalom változásai követték a *Kl b* esetében megfigyelt tendenciákat (10. táblázat).

5.3.2. A ROF és RNF akkumuláció só-indukált válaszainak időfüggése megemelt ET produkciójú paradicsomnövényekben

Mivel a *Nr* mutáns gyökerének sóstressz-válaszait az 5.2.1-es fejezetben már tárgyaltuk, az exogén ACC-vel kezelt, megemelt ET produkcióval rendelkező növények adatait az alábbi alfejezetben foglaltuk össze.

22. ábra A O₂⁻ (A) a H₂O₂ (B), a NO (C), illetve a ONOO⁻ (D) akkumulációja VT (0 μM ACC, fekete oszlopok), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsom járulékos gyökér csúcsokban, a 100 ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. Átlag + SE, n = 4. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak P ≤ 0,05 szinten (Duncan teszt).

Exogén ACC jelenlétében a letális koncentrációjú NaCl kezelés már az első órától, míg a szubletális sókoncentráció a 6. órától indukált fokozott $O_2^{\cdot-}$ felhalmozódást a VT járulékos gyökércsúcsokban (22. ábra, A).

A 10 μ M-os ACC kezelés megnövelte a VT gyökércsúcsok H_2O_2 tartalmát az 1 óras mintavételi időpontban, ugyanakkor sóstressz során csupán a 6. órában detektáltunk szignifikáns, exogén ACC hatást, mely a só-indukálta H_2O_2 akkumuláció mérséklődését jelentette (22. ábra, B). Ezzel szemben, 24 órát követően, az ACC-vel kombinált, 100 mM-os só jelenléte hangsúlyos H_2O_2 növekedést indukált, ellentétben a 100 mM-os NaCl kezelést önmagában kapott gyökerekkel.

Bár a 10 μ M-os ACC NaCl jelenléte nélkül mindhárom időpontban megemelte a NO szinteket, a szubletális sókezelés 6. órájától, illetve a 250 mM NaCl hozzáadását követő 1 óra elteltével, az exogén ACC szignifikánsan csökkentette a NO akkumulációt a gyökércsúcsokban (22. ábra, C), ez azonban a letális sóstressz esetében a 24 óras mintánál megfordult. Míg a kísérlet elején az exogén ACC enyhítette a természetes $ONOO^-$ felhalmozódást a gyökércsúcsokban, addig ugyanezt fokozta a 24. órára. Sóval kombinálva viszont, az ACC a letális koncentráció esetében, az 1. és a 6. órában jelentősen fokozta a $ONOO^-$ akkumulációt a csak 250 mM-os NaCl kezelésben részesült gyökerekhez viszonyítva (22. ábra, D).

A megemelkedett NaCl koncentráció hatására 1 és 24 óra elteltével a VT levelek intenzív $O_2^{\cdot-}$ akkumulációval válaszoltak, mely a 6. órában csupán a 250 mM-os NaCl esetében volt megfigyelhető. Bár mindkét sókezelés megemelt $O_2^{\cdot-}$ szinteket eredményezett rövid távon, 1 óra után a *Nr* növények leveleiben, ez a növekedés a későbbi időpontokban elmaradt, hasonlóan az ACC-vel kezelt VT növényekéhez a 250 mM-os NaCl jelenlétében (23. ábra, A).

A gyökérzónában jelenlévő extra ACC nem okozott szignifikáns változást a VT levelekben a H_2O_2 felhalmozódásban szubletális sóstressz alatt. A *Nr* levelekben viszont a VT-hoz képest hangsúlyosabb H_2O_2 felhalmozódást figyeltünk meg a 100 mM-os sókezelés 24. órájában (23. ábra, B). Érdekes módon, a letális koncentrációjú NaCl H_2O_2 akkumulációt indukáló hatása mind az ACC kezelt, mind a *Nr* mutánsok leveleiben fennmaradt a 24. óráig, bár az ACC alkalmazása esetén kisebb mértékben.

A 100 mM NaCl enyhén, de szignifikánsan csökkentette a VT levelek NO szintjeit 1 órát követően (23. ábra, C), mely az ACC kezelt és a *Nr* növények esetében elmaradt, sőt a 24. óras mintavételi időpontban a két utóbbi csoport esetében drasztikusan megnövekedett NO akkumulációt figyeltünk meg, mely kifejezettebb volt az ACC kezelt növények esetében. A letális sókezelésre a VT levelek gyors, de enyhe NO növekedéssel reagáltak, ami az idő előrehaladtával elhalványult. Ez a jelenség a *Nr* mutánsokban 6 órát követően figyelhető meg.

A gyökéren keresztüli, exogén ACC kezelés szignifikáns NO felhalmozódást okozott a letális sóstressz 24. óráját követően a levélben.

A ONOO^- akkumulációja általában egyenletes volt a mintákban. Az exogén ACC kezelés a só hozzáadását követő 1 órában enyhe, de szignifikáns ONOO^- akkumulációt indukált a VT levelekben a 100 mM-os NaCl koncentráció esetében, amely a *Nr* levelekben is megmutatkozott (23. ábra, D). 24 óra elteltével viszont az exogén ACC drasztikusan fokozta ONOO^- felhalmozódást 100 mM NaCl jelenlétében, viszont letális sóstressz során jelentősen visszafogja azt a VT-hez és a *Nr* mutáció okozta változásokhoz képest.

23. ábra A O_2^- (A) a H_2O_2 (B), a NO (C), illetve a ONOO^- (D) akkumulációja VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdeciskos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben, a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. Átlag + SE, n = 3 (A), n = 4 (B, C, D). A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak $P \leq 0,05$ szinten (SNK teszt).

5.3.3 A $O_2^{\cdot -}$ és a H_2O_2 lebontásában szerepet játszó antioxidáns enzimek só-indukált aktivitásváltozásainak ET- és időfüggése

Bizonyos enzimek aktivitása esetén a kezeletlen, VT kontroll növényeknél is jelentős napszakos ingadozás figyelhető meg az aktivitásban. Jelen kísérleteinkben ezt a jelenséget figyelhetjük meg a szuperoxid gyökianiont H_2O_2 -dá alakító SOD, illetve kisebb mértékben a H_2O_2 -ot bontó KAT esetén a gyökérben, valamint a SOD, POD és APX esetében a levelekben.

24. ábra SOD (A), KAT (B), POD (C), illetve APX (D) specifikus aktivitás VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomgyökerekben a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. Átlag + SE, n = 3. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak $P \leq 0,05$ szinten (SNK teszt).

Az exogén ACC kezelés önmagában, rövid idő alatt, jelentős mértékben indukálta bizonyos H_2O_2 detoxifikáló enzimek, a KAT (24. ábra, B) a POD (24. ábra, C) és az APX (24. ábra, D) specifikus aktivitását a VT gyökerekben, ami az utóbbi két enzim esetében, az idő előrehaladtával is magasabb szinten maradt (24. ábra, A). A *Nr* mutáns gyökereiben is felfedezhetőek időfüggő fluktuációk a vizsgált antioxidáns enzimek aktivitásában.

A gyökerek SOD aktivitása nem változik a sókezelések hatására rövid távon, sem a VT sem az ACC-kezelt gyökerekben. Ugyanakkor 250 mM NaCl hatására, a VT növényekben már 6 óra, 100 mM hatására pedig 24 óra múlva jelentősen megemelkedik, melyet az ACC kezelés megakadályoz. A *Nr* mutánsokban a SOD enzimaktivitás valamennyi sókezelt minta esetén szignifikánsan kisebb, mint a sókezelt VT esetében. (24. ábra, A).

A specifikus KAT aktivitás a VT gyökerekben 6 óra után kezd emelkedni 250 mM NaCl kezelésnél, míg a szubletális sóstressz nem okozott jelentős változást. Az exogén ACC kezelés, szubletális NaCl koncentráció mellett eleinte mérsékelte, majd kissé fokozta, míg 250 mM só jelenlétében drasztikusan megemelte a KAT specifikus aktivitását (24. ábra, B), az exogén ACC hiányában, a megfelelő NaCl expozícióban részesülő VT gyökerekhez képest. A VT gyökerekkel szemben, a *Nr* mutánsok fokozottabb KAT aktivitással reagáltak a 100 mM NaCl jelenlétére az 1. és a 24. órában, mely a letális kezelésnél később jelentkezett (24. ábra, B).

A 100 mM-os NaCl kezelés nem volt szignifikáns hatással a POD specifikus aktivitására a VT gyökerekben, ellentétben az exogén ACC kezelés, illetve a *Nr* mutáció hatásával, ahol a kezdeti serkentés később redukcióba fordult át (24. ábra, C). Letális sóstressz az idő függvényében fokozatosan emelkedő POD aktivitást indukált, amely serkentés kisebb mértékben, de az ACC-kezelt és a *Nr* gyökerekben is megfigyelhető.

A specifikus APX aktivitás a VT növények gyökerében kettős, 1 és 24 órai maximumot mutatott 100 mM NaCl jelenlétében, míg letális sóstressz hatására csak 24 óra múlva emelkedett meg szignifikánsan az aktivitás. Az exogén ACC fokozta a gyökér APX specifikus aktivitását a letális sókoncentráció hozzáadását követő első, míg a szubletális sóstressz alatti 6. órában (24. ábra, D). A *Nr* mutáció az APX specifikus aktivitásának csökkenését eredményezte az enyhébb sóstressz alatt rövidtávon, míg a 250 mM NaCl hozzáadását követő 6. órában erős aktivációt tapasztaltunk, mely a 24. órára lecsengett.

Mint azt említettük, a VT levelekben is megfigyelhetők napszakos ritmusok a mért enzimek specifikus aktivitásában, amelyet bizonyos enzimek esetében, időfüggő módon változtatott meg az exogén ACC kezelés és a *Nr* mutáció is, a legtöbb esetben serkentő hatással (25. ábra). Ez alól kivétel az APX specifikus aktivitás, ahol a megváltozott ET státusz, egyébként optimális körülmények között bizonyos mértékű gátlást eredményezett (25. ábra, D).

A sókezelések hatására a SOD aktivitás megemelkedett a VT levelekben, mely a szubletális sóstressz esetében a 6. óránál, míg a letális sókoncentráció jelenlétében a 24. órát követően mutatott maximumot. 100 mM NaCl-dal kombinálva az ACC számottevően nem befolyásolta a SOD működését a megfelelő sókezelésben részesített VT növények leveleihez képest (25. ábra, A). Ezzel szemben, az extra ACC a letális só-sokk 6. órájában fokozta, míg a

24. órában kissé mérsékelte a SOD aktivitást. A *Nr* mutáns levelek is hasonló tendenciát mutattak, bár a 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 24. órában, a SOD specifikus működés gyengülése esetükben jóval hangsúlyosabb volt.

Érdekes módon a levél specifikus KAT aktivitása csak a szubletális sóstressz alatt emelkedett meg az 1. órában, a 250 mM-os sókezelés 24. órájától viszont jelentősen gátlódott a kezeletlen kontrollhoz képest. A KAT specifikus aktivitást csak kis mértékben befolyásolta az exogén ACC szubletális só kezelés során (25. ábra B).

25. ábra SOD (A), KAT (B), POD (C), illetve APX (D) specifikus aktivitás VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdeciskos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben, a 100 mM ill. 250 mM NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. Átlag + SE, n = 3. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak P ≤ 0,05 szinten (SNK teszt).

Bár a *Nr* mutáns levelekben a 100 mM-os NaCl kezelés 6. órájában jelentősen aktívabb a KAT, 24 órát követően komoly visszaesést tapasztaltunk a megfelelő sókezelésben részesült VT növények leveleihez képest. Érdekes módon, az ACC kezeléssel kombinált 250 mM NaCl kitettség 1 óra múltán erőteljes KAT aktivitás serkentést váltott ki a levelekben, továbbá

esetükben időben később jelentkezett a letális sóstressz okozta KAT specifikus aktivitás gátlás, mely a *Nr* mutánsok leveleiben egyáltalán nem következett be (25. ábra B).

A sókezelésekre a VT levelek szignifikáns POD aktivitás növekedéssel reagáltak, amelyek maximuma az alacsonyabb sókoncentrációnál korábban, míg letális sóstressznél 24 óra múlva jelentkezett (25. ábra, C). Ezt az 100 mM-os NaCl kezelés során az exogén ACC enyhén, de szignifikánsan növelte a 6 óráig, míg a *Nr* levelekben a hatás tartósabb. Bár a letális sókezelés 1 órát követően tovább fokozta a POD működését a *Nr* levelekben, később a mutáció gátló hatásának bizonyul az enzim specifikus aktivitására.

A levél esetében a sókezelések a legjelentősebb ingadozást az APX aktivitásában okozták, melyre komoly hatással bírt a növények ET státusza. A VT növények leveleiben a 100 mM-os NaCl kezelés 6 óra után több mint 50%-os aktivitás esést eredményezett az APX specifikus aktivitásban (25. ábra, D), mely a *Nr* levelekben sokkal drasztikusabb mértékben, már 1 óra múltán megfigyelhető volt. Ennek ellenére, a 6 óránál tapasztalt, 100 mM-os NaCl általi gátlás kisebb mértékű volt a *Nr* mutánsban, még csekélyebb exogén ACC jelenlétében. Letális sóstressz során azonban mind a *Nr* mutáns levelekben, mind az ACC expozícióban részesülő VT növények esetében elmaradt az APX aktivitás só-indukálta fokozódása az 1 órás mintavételi időpontban. Ezzel szemben, a 250 mM NaCl okozta sóstressz 6. illetve 24. órájában, az exogén ACC jelenléte serkentő hatással bírt az APX működésére, bár a későbbi időpontban sokkal hangsúlyosabb, több, mint 100%-os növekedést detektáltunk, a megfelelő sókezelésben részesített, VT levelekhez viszonyítva.

5.3.4 A $O_2^{\cdot -}$ és a H_2O_2 lebontásáért felelős antioxidáns enzimek, valamint az *SIRBOH1* expresszió só-indukált válaszainak ET- és időfüggése

Ahogy az antioxidáns enzimek aktivitásában is megfigyelhető volt, az ET státusz kontroll körülmények között is befolyásolja a különböző izoenzimek génkifejeződését a gyökérben, még hozzá időfüggő módon (26. ábra).

A sókezelés gyors, és a hajtásnál erőteljesebb hatást gyakorolt a gyökér antioxidáns enzimjeinek génexpressziójára. A *Nr* mutáns gyökerekben a VT-nál erősebb *SiMnSOD* indukciót detektáltunk a sókezelések hatására, azonban ez 24 óra elteltével represszióba fordult át a letális NaCl koncentráció esetében (26. ábra). Az exogén ACC kezelés a szubletális sóstressz 6. óráját követően visszafogta, míg a 250 mM NaCl jelenlétében indukálta a *SiMnSOD* izoenzim expresszióját, a kizárólag só kezelést kapott VT gyökerekhez viszonyítva.

A KAT izoenzimeket kódoló gének esetében a sóstressz eltérő kinetika mellett okozott repressziót, illetve indukciót a különböző ET státuszú növényekben. Ez jó összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a KAT izoenzimek expressziója és aktivitása is jelentős napi

ritmust mutathat. Az *SIKAT1*-nél VT növények esetében indukció csak a kisebb sókoncentrációnál, 1 óra után történt. A *Nr* gyökerekben az 1 órás mintavételi ponton szintén erős *SIKAT1* indukció volt megfigyelhető, ami a sóstressz erősödésével fordított arányban változott (26. ábra). Ezzel szemben, 100 mM NaCl jelenlétében, az exogén ACC kezelés mellett is erős *SIKAT1* indukciót detektáltunk a VT gyökerekben. Míg a letális sókoncentráció a VT gyökerekben gátolta az *SIKAT1* kifejeződését a 6. órában, ez az ACC kezelés mellett enyhébb mértékben, ugyanakkor a *Nr* mutánsokban egyáltalán nem volt megfigyelhető.

Gyökér		SIMnSOD			SIKAT1			SIKAT2			SIKAT3			SIAPX1			SIAPX2			SIRBOH1														
Kezelés	Óra	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24												
0 mM NaCl	VT	bc	f	c	f	b	d	abc	c	a	c	d	e	ab	d	c	a	g	ab	c	c	f												
	VT + 10 μ M ACC	e	cd	b	de	d	a	f	ab	c	e	b	f	bc	b	a	c	cde	ed	d	b	bc												
	Nr	a	cd	e	a	c	f	a	b	d	b	cd	f	d	bc	d	d	ed	d	b	a	b												
100 mM NaCl	VT	c	c	c	a	c	c	d	b	b	e	b	bc	c	cd	bc	b	f	bc	b	c	ef												
	VT + 10 μ M ACC	b	de	d	b	b	de	bc	ab	c	a	cd	f	d	cd	d	d	e	d	c	b	de												
	Nr	c	b	a	c	c	b	ab	b	a	cd	bc	b	d	b	ab	ab	b	a	a	a	a												
250 mM NaCl	VT	f	ef	bc	g	f	d	e	b	f	f	d	c	a	bc	de	d	de	ab	cd	d	g												
	VT + 10 μ M ACC	bc	cd	bc	d	e	bc	c	c	e	d	b	a	c	bc	bc	b	c	ab	d	c	g												
	Nr	c	a	d	ef	a	e	e	a	e	e	a	de	e	a	e	e	a	e	b	a	cd												
Rel. expresszió (Log ₂)		$\geq(-4)$			(-3,99)-(-2,99) 3			(-2,99)-(-1,99) 2			(-1,99)-(-0,99) 1			(-0,99)-0			0			0-0,99			1-1,99			2-2,99			3-3,99			4 $\leq$		

26. ábra SOD, KAT és APX izoenzimiek, illetve az *SIRBOH1* gén relatív expressziója átlag értékeinek log₂ ábrázolása, VT és *Nr* mutáns (0 μ M ACC), valamint 10 μ M ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények gyökereiben, a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével, a hőtésképen megadott skála szerint. A piros színárnyalatok indukciót, a kékek repressziót jelölnek. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. A különböző betűvel jelölt cellák szignifikáns különbségeket mutatnak $P \leq 0,05$ szinten az adott időpontokon belül (Duncan teszt). A konkrét számadatok a 3. mellékletben találhatók.

Az *SIKAT2*-re az 1 órás mintákban elsősorban a gén alulműködése volt jellemző, ez erőteljesebb a letális sóstressznél a VT növények és a *Nr* mutáns esetében, illetve érdekes módon, az exogén ACC kezelés is így hatott a VT kontroll növényekben. A 6 órás mintavételnél a gén expressziója valamennyi kezelés esetén bár különböző mértékben, de növekedett, amely folyamat a 24. órára a represszió irányába fordult. Az exogén ACC *SIKAT2* indukáló hatása a 6. órában érvényesült legerőteljesebben, mely a sóstressz erősödésével elhalványult. Ennek ellenére a letális sóstressz során, az exogén ACC mérsékelte az *SIKAT2* repressziót, mely 24 óra után a *Nr* mutáns gyökerekben is hasonlóan alakult (26. ábra). A 100 mM-os NaCl kezelés

24 óra múltán a VT növényekben is represszálta az *SIKAT2* gént, mely érdekes módon nagyobb mértékűnek bizonyult az ACC kezelt gyökerekben, viszont a *Nr* mutánsokban elmaradt.

Az *SIKAT3* génre ugyancsak a sókezelés által rövid távon kiváltott repressziót követő későbbi indukció jellemző, melyet az exogén ACC a 100 mM-os NaCl kezelés esetében megfordított, illetve a *Nr* mutánsok esetében a VT gyökerekben megfigyelt, kezdeti represszió elmaradt (26. ábra). A letális sókezelés nagymértékben gátolta az *SIKAT3* expressziót 1 óra elteltével a VT gyökerekben, amit az ACC kezelés megakadályozott, majd a 6 órától fokozta a *SIKAT3* expressziót. A *Nr* gyökerekben, a VT-al ellentétben, a letális sóstressz 6. órájában figyeltünk meg *SIKAT3* aktivációt.

Mindkét APX gén esetében az expressziós maximumokat a kezeléstől függetlenül a fényperiódus közepére eső, 6 órás mintavételeknél kaptuk, az 1 órás és 24 órás mintákban pedig kezelésektől függően, néhány kivételtől eltekintve repressziót detektáltunk. Az *SIAPX1* expresszióját a szubletális sóstressz csupán kisebb mértékben befolyásolta (26. ábra). A 250 mM-os NaCl kezelés okozta 24 órás, *SIAPX1* represszió exogén ACC jelenlétében elmaradt. A *Nr* mutáció erősebb *SIAPX1* expressziót indukált mindkét típusú sóstressz során, 6 óra elteltével, mely a letális sóstressz esetében jóval nagyobb mértékűnek bizonyult. Ezzel szemben, a 250 mM-os NaCl kezelés többi időpontjában ellentétes hatást fejtett ki.

A sókezelés *SIAPX2*-t indukáló hatását a 6 órás mintavételkor az ACC kezelés, illetve a *Nr* mutáció tovább fokozta, bár az utóbbi sokkal jelentősebb mértékben (26. ábra). A *Nr* gyökerek *SIAPX2* expressziója az *SIAPX1*-hez hasonlóan alakult letális sóstressz során.

Az *SIRBOH1* expressziós változás jellegzetessége, hogy az mindvégig sokkal erőteljesebb a *Nr* gyökerekben, különösen a szubletális sóstressz esetén, és valamennyi mintavételnél a kísérlet végéig megmarad a gén felülreguláltsága (26. ábra). Míg a szubletális NaCl 1 óra elteltével indukálta az *SIRBOH1* expressziót VT gyökerekben, addig ez az ACC kezelés hatására elmaradt. A letális sóstressz jelentősen represszálta az *SIRBOH1* kifejeződését, mely a 6. órában mutatott minimumot, míg ACC kezelés mellett az 1. és a 24. órás mintavételi ponton erősebb repressziót detektáltunk, ám elmaradt a 6. órában megfigyelt expressziós gátlás.

A levél ET státusza szintén kihatott – a gyökér eseténél kisebb mértékben – a vizsgált antioxidáns izoenzim expressziójára stresszfaktor hiányában is, mely leginkább a korai időpontokban jelentkezik (27. ábra). A kloroplasztisz lokalizációjú *SICu/ZnSOD* kifejeződés sófüggő indukciót mutatott, ami a másik két izoenzim esetében kevésbé volt hangsúlyos (27. ábra). A sóindukálta *SICu/ZnSOD* expresszió a *Nr* mutáns, illetve az ACC kezelt VT növényekben sokkal enyhébb mértékű volt.

Az exogén ACC a sókezelések során kezdetben serkentette, majd a 24 óra elteltével represszálta a *SIFeSOD* expressziót, mely jóval erősebb a letális stressz során (27. ábra). Az utóbbi változás a *Nr* levelekben is hasonlóan játszódott le.

Az *SIMnSOD* ACC kezelés által indukált repressziója a sókoncentráció erősödésével egyenes arányban fokozódott. A 250 mM-os NaCl által kiváltott *SIMnSOD* represszió a VT növényekben a hatodik, a *Nr* levelekben a 24. órában volt megfigyelhető (27. ábra).

A 100 mM-os NaCl által, a VT levél *SIKAT1* expressziójában kiváltott változásokat nem lehetett megfigyelni ACC kezelés jelenlétében. A *Nr* mutáció okozta *SIKAT1* represszió tovább erősödött a sókezelések 24. óráját követően (27. ábra). A 250 mM-os NaCl indukálta *SIKAT1* felülregulációja a *Nr* mutánsokban későbbi időpontban volt megfigyelhető.

Levél	SIFeSOD			SIMnSOD			SICu/Zn SOD			SIKAT1			SIKAT2			SIKAT3			SIAPX1			SIAPX2			SIRBOH1									
Óra	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24							
Kezelés	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24							
0 mM NaCl	VT	e	c	a	d	b	b	d	cd	d	e	d	b	bc	d	e	b	g	d	d	d	a	de	d	a	cd	b	c						
	VT + 10 μM ACC	a	a	b	a	a	d	ab	d	d	c	e	b	b	cd	g	a	e	f	b	a	c	a	b	e	cd	bc	e						
	Nr	d	a	c	e	a	a	e	b	e	g	b	e	cd	e	c	c	f	de	bc	a	f	e	a	h	cd	c	c						
100 mM NaCl	VT	c	c	c	cd	c	c	a	f	b	a	g	a	d	bc	d	a	d	c	bc	e	cd	b	d	d	bc	f	d						
	VT + 10 μM ACC	a	c	d	bc d	b	e	c	bc	f	d	f	c	b	a	h	b	a	f	c	d	f	b	e	g	c	d	g						
	Nr	c	b	d	b	b	a	bc	d	c	g	bc	f	ab	d	a	d	g	de	a	c	c	bc	d	f	a	e	a						
250 mM NaCl	VT	c	d	d	cd	d	c	ab	a	a	bc	f	c	a	f	f	a	d	a	c	b	b	cd	c	b	d	d	b						
	VT + 10 μM ACC	a	c	f	bc	b	g	ab	b	b	b	c	d	b	b	i	a	b	e	d	b	e	bc	d	c	c	a	f						
	Nr	b	c	e	bc d	c	f	c	e	c	f	a	e	a	f	b	c	c	b	b	d	d	e	f	f	a	g	a						
Rel. expresszió (log ₂)		≥(-4)			(-3,99)-(-3)			(-2,99)-(-2)			(-1,99)-(-1)			(-0,99)-0			0			0-0,99			1-1,99			2-2,99			3-3,99			4≤		

27. ábra SOD, KAT és APX izoenzimek relatív expressziója átlag értékeinek log₂ ábrázolása VT és *Nr* mutáns (0 μ M ACC), valamint 10 μ M ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények leveleiben, a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével, a hőtérképen megadott skála szerint. A piros színárnyalatok ($1 \leq$) indukciót, a kék repressziót (≤ -1) mutatnak. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. A különböző betűvel jelölt cellák szignifikáns különbségeket mutatnak $P \leq 0,05$ szinten az adott időpontokon belül (Duncan teszt). A konkrét szám adatok a 4. mellékletben találhatóak.

Érdekes módon, az *SIKAT2* expresszió nem mutatott komolyabb sófüggőséget *Nr* mutáció vagy ACC kezelés hiányában, az előbbi jelenlétében azonban 24 óra elteltével indukálódott, míg az ACC okozta *SIKAT2* represszió felerősödött a 250 mM NaCl kezelés időartamának a végére (27. ábra).

Az *SIKAT3* fokozott expressziót mutatott a letális sóstressz 24. óráját követően, mely az ACC kezelés hatására a 6 órás mintavételi időpontban jelentkezett. A letális sóstressz indukálta *SIKAT3* kifejeződés a *Nr* levelekben hamarabb jelentkezett, mint a VT esetében (27. ábra).

A 100 mM-os NaCl kezelés már a 6. órától represszálta az *SIAPXI* expressziót a VT levélben, mely az ACC kezelt, valamint a *Nr* mutáns növényekben később jelentkezett. Ugyanakkor a letális sóstressz 24. óráját követően az *SIAPXI* erősebben represszálódott a két utóbbi csoport esetében (27. ábra).

A szubletális sókoncentráció által, a 24. órában okozott *SIAPX2* repressziót a vizsgált időpontokban nem befolyásolta a levelek ET státusza. A letális sóstressz során a *Nr* mutáció az *SIAPX2* expressziót is csökkentette a levélben, 24 óra elteltével (27. ábra).

A 100 mM-os NaCl jelenlétében, az *SIRBOH1* expresszióját a *Nr* mutáció az 1. és 24. órában indukálta, míg az exogén ACC kezelés az utóbbi időpontban gátolta. Letális sóstressz során az exogén ACC, valamint a *Nr* mutáció inkább represszálja az *SIRBOH1*-gyet (27. ábra)

5.3.4. A fotoszintézis és az összecukor-, valamint keményítőtartalmak só-indukált válaszainak ET- és időfüggése

Mivel a növekedési adatok nem mutattak szignifikáns különbséget a különböző ET státuszú növények sóstressz-érzékenysége között, ami az oxidatív stressz vonatkozásában az előző fejezetben leírtaknak megfelelően mindenképpen fennáll, ezért megvizsgáltuk növények fotoszintézisének gyors változását is a kezeléseket követő első 24 órában. Ez szintén alkalmas lehet a növények sóstressz-érzékenységének összehasonlítására.

Az exogén ACC kezelés enyhén, de szignifikáns módon fokozta a kezeletlen VT paradicsomlevelek A_N értékeit is az 1. és a 24. órás mérési időpontban (28. ábra, A). Bár a *Nr* levelek CO_2 fixációja jelentősen alacsonyabb mértékű, mint a VT növények esetében, a 24. órás mintavételi ponton ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

A gyökérzóna megemelkedett sókoncentrációja 1 óra alatt szignifikánsan csökkentette az A_N -t a VT levelekben. Míg a szubletális NaCl koncentráció mellett, az ACC-kezelt és a *Nr* növények még képesek voltak megtartani a fotoszintetikus aktivitásukat, addig ez letális sóstressz esetén már 1 óra után sem volt megfigyelhető (28. ábra, A). A 6. órára a megfelelő sókezelésben részesült VT értékektől való eltérések elhalványultak a 100 mM-os NaCl kezelés esetében, viszont a 24. órát követően az A_N szignifikánsan lecsökkent a *Nr* levelekben. Érdekes módon, míg eleinte a *Nr* mutánsok fotoszintézise válaszolt a legérzékenyebben a gyökér környezetében kialakuló, 250 mM NaCl okozta sokkhatásra, a 6. órára képes volt kissé jobban megőrizni a CO_2 asszimilációját, mint a másik két kísérleti csoport. 24 óra elteltével, a VT növények A_N értékeinek negatívba való átcsapása volt megfigyelhető, ellentétben az ACC

kezelt VT és a *Nr* mutáns levelekkel, melyek egy, a kezeletlen kontroll értékhez képest ugyan jóval kisebb, de mérhető CO_2 fixációs aktivitással rendelkeztek (28. ábra, A).

A g_{sw} változásai többnyire jól követték az A_N esetében megfigyelt tendenciákat, néhány kivétellel. Az exogén ACC kezelés képes volt jobban megőrizni a g_{sw} -t a sókezelések 1. óráját követően (28. ábra, B). A *Nr* mutánsok a VT-nál eleve alacsonyabb g_{sw} értékkel rendelkeztek, mely különbség gyakorlatilag eltűnt a 250 mM-os NaCl jelenlétében. A C_i/C_a arány esetében elmondható, hogy többnyire követte a g_{sw} -ben megfigyelt változásokat (28. ábra, C). Ez alól kivételt képez a letális sókezelést követő 6. illetve 24. óra, ahol a VT levelekben drasztikus emelkedést figyeltünk meg a C_i/C_a értékekben. Az ACC-kezelt növényekben, ugyanúgy, ahogy a *Nr* levelek esetében a 24 órás mérési időpontban a kezeletlen kontrollal megegyező értékeket detektáltunk. Fontos megjegyezni, hogy a *Nr* levelekben a C_i/C_a már jelentősen csökkent a 250 mM NaCl kezelés 6. óráját követően is.

28. ábra A CO_2 asszimiláció és a kapcsolódó paraméterek VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A: a nettó CO_2 asszimilációs ráta, A_N ; B: a sztóma vízgőzvezető képessége, g_{sw} ; C: az intercelluláris és az atmoszférikus CO_2 koncentráció aránya, C_i/C_a . A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, $n = 6$. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között $P \leq 0,05$ szinten (SNK teszt).

A PSII stabilitásának vizsgálata során nem tapasztaltunk számottevő csökkenést a levelek F_v/F_m paramétereiben a kísérlet során, kivéve az enyhe, de szignifikáns csökkenést a

24 órás, 250 mM-os NaCl kezelést követően a *Nr* mutánsok esetében (29. ábra, A). Az F_0 paraméter sem mutatott szignifikáns eltéréseket (29. ábra, B).

A két fotokémiai rendszer érzékenysége kisebb eltéréseket mutatott a különböző kísérleti csoportokban a sóstressz alatt. A szubletális mértékű NaCl kezelés szignifikánsan csökkentette a *Nr* növények $Y(II)$ értékeit már az 1. órától, illetve a letális só sokk a 6. órától, ami több, mint 60%-os eséssé alakult a 24. órát követően (30. ábra, A), míg a 100 mM-os NaCl koncentráció nem okozott számottevő $Y(II)$ redukciót a többi, vizsgált csoportban. Ezzel szemben, a 250 mM-os NaCl tápoldatbéli jelenléte szignifikánsan csökkentette a VT növények $Y(II)$ értékeit 6 órás kitettséget követően, melyet az exogén ACC kezelés sikeresen kivédett.

29. ábra A PSII állapotára vonatkozó klorofill *a* fluoreszcencia paraméterek alakulása VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A: a PSII maximális kvantumhatásfoka sötétadaptált levelekben (F_v/F_m); B: a sötétadaptált levelek minimális fluoreszcenciája (F_0). A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, $n = 5$. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között $P \leq 0,05$ szinten, ns = nem szignifikáns (SNK teszt).

A VT növények a letális sókoncentráció hatására szignifikáns $Y(NPQ)$ emelkedést mutattak a 6. órától, míg ez nem volt megfigyelhető a szubletális stressz esetén. A *Nr* mutánsok eleve magasabb $Y(NPQ)$ értékekkel rendelkeztek (30. ábra, B), mely a 100 mM-os NaCl kezelést követő 1. órában nem változott, míg a 250 mM-os NaCl kezelés esetében visszaesett a kontroll értékre. Ugyanakkor, a sóstresszes állapot kifejlődése során, a *Nr* levelek VT levelekhez képest nagyon erős $Y(NPQ)$ aktivációval reagáltak, mely a szubletális stressz során maximumot mutatott 6 órát követően, a letális sóstressz esetében viszont a 24. órára még tovább nőtt. Bár a 10 μM ACC jelenlétében szubletális stressz során nem tapasztaltunk jelentős $Y(NPQ)$ növekedést a VT levelekben, azonban az ACC kezelés kontroll szinten tartotta az egyébként lecsökkenő $Y(NPQ)$ -t a 6. órát követően, továbbá, a letális só sokk által növelt $Y(NPQ)$ mértékét is szignifikánsan visszafogta. Ezzel szemben, a 24. órában már nem okozott

eltérést a 250 mM NaCl által megemelt Y(NPQ) értékében. A Y(NO) esetében nem tapasztaltunk jelentős növekedést a kísérletek során (30. ábra, C).

A gyökérközegben jelen lévő, szubletális sókoncentráció szignifikánsan csökkentette a *Nr* mutánsok q_L értékét a sókezelt VT értékeihez képest már az 1. és a 24. órában, akárcsak a letális sóstressznél 6 óra elteltével (30. ábra, D). Míg a VT növények q_L értékeit az 1. és a 24. órában a sókezelések nem befolyásolták, addig a 6. órában bekövetkező, természetes q_L csökkenést a 250 mM NaCl megfordította, ugyanúgy, ahogyan az exogén ACC is önmagában és 100 mM NaCl jelenlétében. Ennek ellenére, az ACC kezelés enyhe, de szignifikáns q_L csökkenést okozott a hasonlóan kezelt VT kontrollhoz képest a letális sókoncentráció 1. órák mintájában, mely fennmaradt egészen a 24. óráig.

30. ábra A PSII aktivitásával és szabályozásával kapcsolatos klorofil *a* fluoreszcencia paraméterek VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdeciskos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben 1, 6, ill. 24 órák 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A: a PSII effektív kvantumhatásfoka fényadaptált levelekben, Y(II); B: a (fény)szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfoka, Y(NPQ); C: a szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfoka, Y(NO); D: valamint a fényadaptált PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciója, q_L . A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, n = 5. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között P ≤ 0,05 szinten (SNK teszt).

A Y(I) nem változott az ACC hiányában adott sókezeléseknél a 6. óráig, a VT ill. a *Nr* mutáns növények esetében. Az exogén ACC kezelés sem okozott szignifikáns változást a Y(I)-

ben a VT-hoz képest, sem önmagában, sem 100 mM NaCl kezeléssel kombinálva (31. ábra, A). A 24. órában viszont a letális hatású sókezelés szignifikánsan csökkentette a $Y(I)$ -t, mely a *Nr* mutánsok esetében már a 100 mM NaCl jelenlétében is megtörtént, csak ez esetben a stressz erőssége a csökkenés mértékét is növelte. Érdekes módon, az ACC kezelés itt tovább fokozta a letális só okozta $Y(I)$ redukciót.

31. ábra A PSI aktivitásával és szabályozásával kapcsolatos paraméterek VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdesíkos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövények leveleiben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A: a PSI fotokémiai kvantumhatásfoka fényadaptált levelekben, $Y(I)$; B: a PSI donor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka, $Y(ND)$; C: a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka, $Y(NA)$; D: valamint a PSI körüli ciklikus elektronáramlás kvantumhatásfokának többlete, $Y(CEF)/Y(II)$. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, n = 5. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak kezelések és az eltérő időpontok között $P \leq 0,05$ szinten (SNK teszt).

A $Y(ND)$ alakulása jól követte a PSII nem-fotokémiai kioltásában megfigyelt tendenciális változásokat (31. ábra, B). A legnagyobb növekményt a sókezelt, *Nr* mutánsok $Y(ND)$ értékeiben figyeltük meg, amely egyidejűleg sókoncentráció és időfüggést is mutatott. A $Y(NA)$ azonban szignifikánsan alacsonyabb értékeket vett fel az *Nr* mutánsokban már a 100 mM NaCl kezelés első órája után (31. ábra, C). Érdekes módon, ezt a jelenséget a letális

sóstressz esetében csupán a 6. órától kezdve sikerült megfigyelni, bár ez esetben a csökkenés drasztikusabb volt és tovább folytatódott az idő előrehaladtával.

A *Nr* mutánsokban a Y(NA) kezdeti állapota a kezeletlen VT-nál alacsonyabb, mely a VT napszakos Y(NA) fluktuációja miatt a későbbi időpontokban nem mutatkozott szignifikánsnak (31. ábra, C). A letális sóstressz 6. órájától megfigyelhető Y(NA) csökkenést az ACC kezelés szignifikáns mértékben megfordította a VT levelekben, ami a kísérlet végéig megmaradt.

32. ábra A levelek oldható cukor- (A) és keményítő tartalma (B) valamint a gyökök oldható cukor- (C), illetve keményítő tartalma (D) VT (fekete oszlopok) és *Nr* mutáns (ferdecsíkos, halványkék oszlopok) (0 μM ACC), valamint 10 μM ACC-vel kezelt VT (narancssárga oszlopok) paradicsomnövényekben 1, 6, ill. 24 órás 100 mM ill. 250 mM NaCl expozíciót követően. A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájától számítva. Átlag + SE, n = 3. „FT” = friss tömeg. A különböző betűvel jelölt értékek szignifikáns különbségeket mutatnak a kezelések és az eltérő időpontok között P ≤ 0,05 szinten (SNK teszt).

A *Nr* mutánsok a fotoperiódus korai óráiban szignifikánsan erősebb Y(CEF)/Y(II) szinteket mutattak (31. ábra, D). A szóban forgó paraméter a stresszhatás erősödésével egyenes arányú aktiválódást produkált a *Nr* mutánsokban, ami a szubletális NaCl koncentráció alkalmazása esetén az időben hamarabb jelentkezett. Érdekes módon, a VT növények esetében

csupán a letális só sokk 24 órás mintavételi időpontjában figyeltünk meg szignifikáns Y(CEF)/Y(II) indukciót, amit ráadásul az ACC kezelés kioltott.

A fotoszintézis termékei, az oldható cukrok és a keményítő, ami a fényszakaszban átmenetileg szolgál a redukált szénváz raktárjaként a kloroplasztisban, köztudottan napi ritmus szerint akkumulálódnak a levelekben. A gyökerekbe irányuló szénhidrát transzportot sok egyéb tényező mellett meghatározza a rendelkezésre álló asszimilátumok mennyisége is. A VT gyökerek oldható cukor-tartalmában kezdetben sóindukált csökkenést, majd a 6. órában, a 100 mM-os kezelés esetében emelkedést, majd ismét csökkenést tapasztaltunk (32. ábra, C).

Érdekes módon, a fényperiódus korai óráiban az exogén ACC kezelés szignifikáns redukciót okozott a gyökerek oldható cukor tartalmában, azonban a szubletális sókoncentráció okozta csökkenéseket az ACC kezelés megakadályozta, míg letális stressz során általában nem befolyásolta (32. ábra, C). A *Nr* gyökerek a fényperiódus elején (1. órás mintavétel) és közepén jellegzetes oldható cukor akkumulálódási mintázatot mutattak, ami a fényszakasz közepe táján, 6 óránál mutatott maximumot. Érdekes módon, a mutáns gyökerek esetében az oldható cukortartalomban bekövetkező változások só-függése kevésbé volt kifejezett. A 6. és 24. órában a hasonlóan kezelt VT értékekhez képest jelentős emelkedést mutattak a *Nr* gyökerekben letális sóstressz során, illetve a 100 mM-os NaCl kezelés 24. óráját követően.

A VT levelekben sókoncentráció-függő oldható cukor akkumulációt figyeltünk meg, ami a 250 mM-os kezelés 1. óráját, illetve a 100 mM-os NaCl hozzáadásának 24. óráját követően bizonyult a legkifejezettebbnek (32. ábra, A). Az exogén ACC az 1. órás mintavételi időponton növelte a VT levelek oldható cukortartalmát, azonban később, illetve szubletális sókoncentráció jelenlétében nem befolyásolta azt. Ezzel szemben, 250 mM NaCl-al kombinálva, az ACC kezdetben kissé visszafogta a só-sokk által indukált oldható cukor felhalmozódást, majd 6 és 24 órás inkubáció után növelte a VT levelekhez képest.

A *Nr* levelekben a fényperiódus korai óráiban magasabb oldható cukor tartalmakat figyeltünk meg, mint a VT kontrollban, melyet a 100 mM-os NaCl koncentráció tovább emelt, bár a 24. órában az ugyanilyen kezelésben részesült VT növényekhez képest mérsékeltebb oldható cukor felhalmozódást figyeltünk meg esetükben (32. ábra, A). A *Nr* mutánsok, csakúgy, mint az ACC kezelt VT növények, nem akkumuláltak több oldható cukrot a 100 mM NaCl-os kezelés 6. órájáig. Érdekes módon, míg a 250 mM NaCl 1 óra elteltével jelentősen csökkentette a *Nr* levelek oldható cukor akkumulációját, addig a sóstressz időbeli kifejlődésével szignifikáns fokozódást tapasztaltunk, ami a 24. órát követően meghaladta a VT értékének kétszeresét

A sóstressz intenzív keményítő akkumulációt okozott a gyökerekben 1 órát követően, érdekes módon a só koncentrációjával fordított arányban (32. ábra, D). Ugyanez a jelenség a

Nr és az ACC kezelt, VT gyökerek esetében nem volt megfigyelhető, bár a mutáns gyökerekben tapasztaltunk enyhébb növekedést a 250 mM-os só kezelés hatására. Az idő előrehaladtával, sófüggő változást (növekedést) a keményítő felhalmozódásban csupán a VT gyökerekben a szubletális stressz 6. órájában, valamint a *Nr* mutáns, illetve az ACC kezelt gyökerekben – az aktuális sókezelést kapott VT növényekhez képest – a letális sóstressz 6. órájában detektáltunk.

Az exogén ACC visszafogta a VT levelek fényperiódusnak megfelelő keményítő akkumulációját a 6. órában (32. ábra, B). A 100 mM-os sókezelés 1. óráját követően a VT levelekben szignifikáns keményítő tartalom csökkenést tapasztaltunk, mely az idő előrehaladtával mindkét sókoncentráció esetében megfigyelhetővé vált. A 100 mM NaCl okozta kezdeti keményítő tartalom fogyást az ACC kezelés megakadályozta, ahogyan a letális só stressz indukálta csökkenést is a 24. órában. Érdekes módon, megnövekedett keményítő felhalmozódás figyelhető meg a mutáns levelekben már kontroll állapotban is, melyre a 6. órában a VT-től eltérően kisebb befolyással bírt a gyökérben kialakult sóstressz, míg a 24. órára a NaCl koncentrációval egyenesen arányosan nőtt a keményítő tartalom a *Nr* levelekben.

6. Az eredmények értékelése

6.1.1. A gyökerkezelésként adott ACC többlet egy koncentrációs küszöbértéket meghaladva indukál szignifikáns ET emissziót, azonban ennek elérése nélkül is fiziológiai válaszokat vált ki.

A paradicsomgyökéren keresztül adagolt exogén ACC ET-né konvertálódik a hosszútávú kísérletek során. Alacsonyabb, 0,01 és 1,0 μM -os ACC koncentrációk enyhébb emelkedést okoztak a gyökerek ET-termelésében, mely általában mérsékelt erősségű stressz során figyelhető meg, míg a 100 μM -os ACC sokkal erősebb etilén emissziót indukált mindkét növényi részben (levél és gyökér), ami a súlyosabb stresszhatások velejárója. Az általunk kapott tendenciák jó egyezésben vannak a Wang és Arteca [228] által publikáltakkal, akik kb. 2,5 $\text{nL h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ET kibocsátást detektáltak a levelek, valamint kb. 6,0 $\text{nL h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ET termelést a gyökerek esetében 7 hetes paradicsomnövényeket vizsgálva (*S. lycopersicum* L. cv. Heinz) kontroll körülmények között. Ezzel szemben az ET-termelés 10-30 $\text{nL h}^{-1} \text{g}^{-1}$ értékre nőtt abiotikus stressz, oxigénhiányos állapot hatására. A szignifikáns fiziológiai hatás dacára az alacsonyabb ACC koncentrációk esetén a levelek ET-termelésének változása csekély, ami azt jelezheti, hogy ezekben a szövetekben az ACC az ET-től függetlenül is hathat [16, 137]. Ugyanakkor, az ezen szövetekben megjelenő, fiziológiailag aktív szintű, lokális ET akkumuláció kialakulása sem elvethető [229, 230]. Bár az exogén ACC hatása a növekedési paraméterekre elhanyagolható mértékű volt, a fokozott CO_2 asszimilációval összhangban a

hajtás száraz biomassa szignifikáns gyarapodását detektáltuk az alacsonyabb ACC koncentrációk esetében 7 napot követően. Az ACC kezelés által fokozott hajtásnövekedésről hasonló eredményeket talált Trujillo-Moya és Gisbert [231] paradicsomban.

A hosszútávú ACC kezelés jelentős hatást gyakorolt a paradicsomgyökerek és a -levelek iontartalmára is. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az ET kapcsolatban áll mind a K^+ deficienciával, mind a Na^+ toxicitással a K^+/Na^+ homeosztázis szabályozásán keresztül. Megemelkedett ET produkciót figyeltek meg *Arabidopsis*-ban K^+ hiány során, melyet a nagy affinitású K^+ transzporter, az *AtHAK5* megnövekedett expressziója követett ([191]. Ugyanakkor az exogén Ethephon alkalmazása indukálni képes a *HAK5* expresszióját teljes tápanyagellátás mellett is, mely arra enged következtetni, hogy az ET transzkripciós szinten szabályozhatja a káliumfelvételt [192]. Az exogén ACC kezelés is szabályozhatja az aktív káliumtranszportot a PM H^+ -ATPáz aktivitásának módosításán keresztül [232]. Sóstressz során, a hiányos ET-érzékeléssel rendelkező ET-receptor mutáns *Arabidopsis* (*etr1-3*) sokkal érzékenyebbnek bizonyult a többlet Na^+ hatásaival szemben, mint a vad típusú társa, mely a mutáns növény fokozott elektrolit-kieresztésében, csökkent K^+/Na^+ arányában és redukált PM H^+ -ATPáz aktivitásában nyilvánult meg. Mindemellett, a VT kallusz exogén ACC kezelését követően magasabb K^+/Na^+ arányt, intenzívebb PM H^+ -ATPáz működést, és ennél fogva stimulált sótoleranciát mutatott, amely nem volt megfigyelhető az ET-receptor mutáns kultúrákban [97]. Váratlan módon, a mi rendszerünkben a felsoroltakkal némileg ellentétes eredményeket kaptunk teljes tápanyagellátás mellett, külön indukált sóstressz hiányában. Kísérleteink azt mutatták, hogy az exogén ACC magas koncentrációban serkenti a Na^+ akkumulációt és csökkenti a K^+/Na^+ arányt, mellyel egyfajta gyenge ionikus stresszt generál a paradicsom szövetekben. Természetesen ez a változás a K^+/Na^+ arányban kisebb mértékű ahhoz képest, mely értéket 100-200 mM NaCl jelenlétében, hidropónikus kultúrában nevelt növényekben figyeltek meg. Mindazonáltal hasonló nagyságrendű változások voltak megfigyelhetőek más kísérletekben, például amikor homokos-agyagban nevelt paradicsomnövényeket alacsonyabb és magasabb NaCl koncentrációjú oldatokkal öntöztek csöpögtető öntözéssel egészen a gyümölcsérésig [233]. Az általunk tapasztalt kisebb csökkenés a K^+/Na^+ arányban edződést kiváltó hatású is lehet egy azt követő ozmotikus-/sóstressz akklimatizáció során, ennél fogva az ACC által okozott eustressznek tekinthető.

6.1.2. Az exogén ACC kezelés fokozta a H_2O_2 felhalmozódást, koncentráció-függő módon befolyásolja a NO és a ONOO⁻ akkumulációs mintázatát.

Korábbi tanulmányok feltárták, hogy az ET-szabályozott válaszok a ROF illetve RNF szintekben bekövetkező változásokkal párosulnak. Jóllehet, valamennyi ilyen reaktív molekula

fejthet ki toxikus hatást a növényi szövetekre a megfelelő koncentrációkban, azonban a ROF és RNF számos fiziológiai folyamatot szabályozó szignálként is funkcionálhat [324]. A ROF és RNF generálás ellenére a növények képesek voltak tolerálni a magas ACC (ET) koncentrációkat egy hétig, mely következtetés levonható abból, hogy a növekedési paraméterek kisebb száraztömeg-növekedésen kívül nem változtak szignifikánsan a kezelések hatására. A gyökércsúcsokban a ROF különböző fajtáinak akkumulációja monitorozható a járulékos gyökerek 1 cm-es apikális régióján belül. Itt a $O_2^{\cdot-}$ szintben bekövetkező változások nem bizonyultak szignifikánsnak, és a H_2O_2 -tartalom növekedése csupán a 100 μM -os ACC koncentráció esetében volt jelentős. Mivel a 7. napra a NO felhalmozódás gátlódott a 0,01 és a 1,0 μM -os ACC kezelések esetében, illetve a 100 μM ACC hatására sem lépte túl a kontroll tartományt, a gyökércsúcsi sejtek nem voltak kitéve nitroatív stressznek a kezelési intervallum ezen időpontjában. Ugyanakkor a tartós, 100 μM -os ACC által indukált H_2O_2 akkumuláció részt vehet a K^+ homeosztázist szabályozó ET szignalizációban, így a K^+ felvétel szabályozásában [192] vagy az effluxban szerepet játszó rendszerek aktiválásában [235-237].

Az alacsonyabb ACC koncentrációk a gyökércsúcsokhoz hasonló hatással voltak levelek $O_2^{\cdot-}$ és NO akkumulációjára, azonban enyhe, de szignifikáns módon fokozták a H_2O_2 mennyiségét. Ugyanakkor a 100 μM -os ACC koncentráció számottevő H_2O_2 termelést serkentő hatása mellett szignifikáns mértékű $O_2^{\cdot-}$ és NO tartalom növekedést, illetve a két molekula reakciójából keletkező $ONOO^-$ akkumulációt idézett elő, mely változások a levelekben nitro-oxidatív stressz kialakulásához is vezethettek [95].

6.1.3. A gyökérzónában mutakozó ACC többlet a koncentráció és az expozíciós idő függvényében serkentheti vagy gátolhatja a fotoszintézist és befolyásolja a két fotokémiai rendszer működését.

A szakirodalmi tudásbázist összegezve, az ET fotoszintézisre gyakorolt hatása ellentmondásos. Jóllehet az ET-nek közvetlen szerepet tulajdonítanak a fiatal/nem öregedő levelek fotoszintézisének szabályozásában, a legtöbb esetben a megnövelt ET tartalom gátló vagy semleges módon befolyásolta a fotoszintetikus aktivitást, például a leggyakrabban vizsgált paraméterként a nettó CO_2 asszimilációt. Eddig egyetlen növényfaj, a mustár esetében mutatták ki az ET serkentő hatását [46]. Az intakt paradicsomlevelekre permetezett exogén Etheponból felszabaduló ET extrém epinasztiát és a virágrügyek lehullását okozta, azonban 24 órát követően sem indukált szignifikáns változást a fotoszintetikus CO_2 fixációban, a fotorespirációban vagy a transzspirációs rátában. Ugyanakkor, befolyásolta a CO_2 asszimilátumok megoszlását a különböző szervek között [238].

Számos szerző foglalkozott az exogén forrásból (legtöbbször ET gáz vagy Ethephon permetezés által) megemelt ET-szint fotoszintézisre gyakorolt hatásával [59 63; 66], de a koncentráció és/vagy expozíciós intervallum-függő vizsgálatok aránya meglehetősen alacsony. Annak ellenére, hogy az ACC természetes úton jelen lehet a gyökér környezetében, mennyisége csökkenhet vagy növekedhet a talajoldatban, jelenlegi ismereteink szerint eddig csupán egyetlen tanulmányban használtak gyökérzetén keresztüli ACC adagolást, és vizsgálták a fotoszintézisre gyakorolt befolyását stresszmentes körülmények között, ahol a salátanövények 10 μM -os ACC kezelése csökkentette a CO_2 asszimilációt és a sztómakonduktanciát [239].

Kísérleteink során idő- és koncentrációfüggő változásokat detektáltunk a paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitásában. Kis ACC koncentrációk alkalmazását követően a kifejlett, nem öregedő levelek szignifikánsan magasabb A_N értékeket produkáltak 24 óra, illetve a 0,01 μM -os ACC hatására 48 óra elteltével. Mivel a g_{sw} alakulása a 100 μM -os ACC kezelés kivételével nem követte szorosan az A_N tendenciáját, a kisebb koncentrációk esetében nem-sztomatikus faktorok részvétele is feltételezhető az A_N szabályozásában. Bár a levélre permetezett Ethephon a koncentráció növekedésével egyenes arányban növelte a mustár növények CO_2 asszimilációját és RuBisCO aktivitását [240], a sztómakonduktanciára és az intercelluláris CO_2 koncentrációra is hasonló befolyással bírt, így az általunk tapasztaltakkal ellentétben sokkal inkább a CO_2 elérhetőségének javítását, mintsem a rendelkezésre álló CO_2 hasznosítási határfok növelését okozta az exogén ET donor kezelés.

Kísérleteinkben a magas ET szintek A_N -re gyakorolt negatív hatása főleg sztómalimitációból fakadhat az első két napon. 3 nappal a kezelés kezdete után azonban a 100 μM -os ACC a nem-sztomatikus limitáció nagyobb arányú hatását eredményezheti, amit a C_i/C_a arány hirtelen emelkedése sugall, ugyanakkor a sztomatikus faktorok visszanyerték fontosságukat az A_N szabályozásában a kísérlet végére.

Mivel sem az F_v/F_m , sem az F_0 paraméterekben nem tapasztaltunk konstans, szignifikáns csökkenést (F_v/F_m) illetőleg növekedést (F_0), kijelenthető, hogy az exogén ACC alkalmazása nem okozott irreverzibilis károsodást a PSII reakciócentrumokban.

A 0,01 μM ACC kezelés a $Y(I)$ fokozódását indukálta, ami fluktuáló A_N értékekkel társult a 3. naptól fogva. A kísérlet végére, ez az esemény a PSI akceptorának számító komponensek koncentrációinak az enyhébb csökkenését vonta maga után, amire a szignifikáns $Y(ND) \rightarrow Y(NA)$ váltás enged következtetni. Meglepő módon, a $Y(I)$ fokozódásával ebben az esetben nem párosult a $Y(II)$ kontrollhoz viszonyított szignifikáns növekedése. Mindemellett, a 0,01 és 1,0 μM ACC-vel történt kezelés első 2 napjában a PSI körüli ciklikus elektronáramlás (CEF-PSI) tranziens aktivációját figyeltük meg. A $Y(CEF)/Y(II)$ aránya a közelmúltban

bevezetett, sokkal kifejezőbb paraméter a CEF-PSI becslésére [213]. Habár némi marginális növekedés a $Y(I)$ értékeiben megfigyelhető $1,0 \mu\text{M}$ ACC hatására is a 4. naptól, ez sokkal kevésbé hangsúlyos $Y(ND) \rightarrow Y(NA)$ váltással, illetve a $Y(CEF)/Y(II)$ csupán marginális aktiválódásával társul. A fotoprotektív NPQ kialakításában játszott szerepe mellett a CEF extra ATP-t is szolgáltat a CO_2 fixációs folyamatoknak, továbbá beállítja az ATP/NADPH arányt, tehát alapvető szereppel rendelkezik az A_N fenntartásában stressz során [214].

Habár lényeges visszaesést tapasztaltunk a nem öregedő levelek $Y(II)$ és q_L értékeiben $100 \mu\text{M}$ ACC hatására, a $Y(I)$ csupán tranziens csökkenést mutatott. Mivel a $Y(NO)$ -ban pusztán marginális változásokat figyelhattunk meg – melyek valószínűleg a zárt PSII reakciócentrumok növekvő arányának köszönhetőek – elmondható, hogy a PSII károsodása 7 nap után elhanyagolható mértékű és a PSII által befogott extra energia sikeresen disszipálódott hő formájában a szignifikánsan megnövekedett NPQ folyamatok következtében vagy megkötődött az alternatív elektronakceptorok jóvoltából [242]. Az 5. napon a $100 \mu\text{M}$ -os ACC kezelés a $Y(CEF)/Y(II)$ számottevő erősödését indukálta, mely ezt a maximum értéket követően csökkenő tendenciát vett fel. A CEF-PSI képes elősegíteni a proton elektrokémiai potenciál grádiens (ΔpH) létrejöttét a tilakoidmembránokban, és ahogy már említésre került, az NPQ fokozásával megvédi a PSII-t a fotoinhibíciótól [243]. A $Y(NPQ)$ erősen ΔpH -függő paraméter, ugyanakkor a $Y(NPQ)$ és a $Y(CEF)/Y(II)$ maximum értékeik elérése után a ΔpH -függő violaxantin-deepoxidáció és a biztonságos, alternatív NPQ útvonalak önmagukban képtelenek voltak hatékonyan szabályozni a fotoszintetikus apparátust. Ez a reaktív molekulák növekvő képződéséhez vezetett, melyek kioltása sem zajlott hiánytalanul. A molekuláris oxigén a fotoszintetikus elektrontranszportlánc nagyon fontos akceptora, ami szélsőséges esetekben (pl. a kioltó mechanizmusok elégtelen funkciója mellett) káros mértékű $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumulációhoz vezethet. Bizonyos fokú stressz során fellépő szerkezeti ártalmak következményeként a tilakoidmembránok protonpermeabilitása megnőhet, ami a ΔpH és az NPQ elvesztéséhez vezethet [53]. Mivel a $100 \mu\text{M}$ -os ACC kezelés stimulálta a $\text{O}_2^{\cdot-}$, a H_2O_2 , a NO és az ONOO^- felhalmozódást 1 hét után, az így kialakuló nitro-oxidatív stressz elősegítheti a tilakoidmembránok károsodását és a ΔpH , valamint az NPQ csökkenését. Mindemellett, ezek a reaktív molekulák aktiválhatják az antioxidáns védelmi rendszereket is, ami hozzájárulhat egy abiotikus stresszhatással szembeni védelemhez is.

A cukrok (glükóz, fruktóz, szacharóz) és a cukoralkohol szorbitol mennyisége ACC koncentrációfüggő módon fokozódik a kezelt növényekben a kontrollhoz képest. A vizsgált cukortartalmak maximuma $0,01$ - $1,0 \mu\text{M}$ -os ACC kezelés esetében volt megfigyelhető. Ez jól egybeesik a CO_2 fixáció korai aktivitás-fokozódásában tapasztaltakkal és a száraz biomassza

gyarapodásával. Hasonló tendenciák fedezhetők fel a gyökér cukor-háztartásában egy nagyon fontos kivétellel. A szállított cukorforma, a szacharóz felhalmozódásában visszaesést detektáltunk az 1,0-100 μM -os ACC kezelések esetében. Ez azt sugallja, hogy az exogén ACC megváltoztatja a cukrok elérhetőségét és elosztását a növényi szervek között, ami jól összefügg Woodrow és mtsai. [238] etilénnel kapcsolatos megfigyeléseivel. Számos szerző úgy találta, hogy az oldható cukrok, mint a diszacharidok, a raffinóz családba tartozó oligoszacharidok és a fruktánok erősen kapcsolódnak a stressz-indukált ROF akkumulációhoz a növényekben [244]. Az oldható szénhidrátok, mint ozmoprotektánsok bioszintézise az ozmotikus stresszre adott válaszként is indukálódhat, így stabilizálva a sejtek membránjait. Alacsony koncentrációban, a cukrok szubsztrátként is szolgálhatnak a metabolikus enzimeknek, illetve stressz-indukált változásokat közvetítő szignál funkcióval is rendelkezhetnek. Néhány típusuk, mint a fruktóz, a galaktóz és a raffinóz családba tartozó oligoszacharidok, a fruktánok és a cukoralkoholok bizonyított vagy javasolt antioxidáns hatással bírnak [245-246]. Tehát a megnövekedett cukor- és szorbitoltartalom képes lehet kivédeni az oxidatív stressz egyes elemeit abiotikus stressz-akklimatizáció során.

Az újabb eredmények azt sugallják, hogy az ACC ET-független módon is befolyásolhatja a növények életfolyamatait [16, 17, 137-139], mely a mi rendszerünkben sem vethető el, különösen az iontranszport és a fotoszintetikus elektronáramlás esetében. Kísérleteink során csupán apró különbségeket detektáltunk a növényi szövetek ET-produkciójában alacsony ACC koncentrációk esetében, ezért további vizsgálatok szükségesek, hogy milyen arányban tulajdoníthatjuk az ACC direkt hatásának az általunk tapasztalt változásokat, ezen kutatások azonban nem képezik részét a jelen értekezésnek.

6.2.1. Az ET receptor mutáns *Never ripe* paradicsomgyökerek érzékenyebbek a sóstresszre: a gyökércsúcsok már szubletális stressz esetén is mutatják a sejthalál jellegzetes fiziológiai tüneteit

Magas sótartalom mellett a legnyilvánvalóbb biokémiai válasz a megemelkedett ROF felhalmozódás, így a *Nr* mutáns segítségével némi betekintést nyerhetünk abba, hogy mi a szerepe szövetek ET-érzékenységének a magas sókoncentrációk által indukált oxidatív stressz kialakulásában. Mindemellett szoros kapcsolat áll fenn az ET és más szignál molekulák, mint a ROF és RNF között [80, 247]. A VT gyökerekben a $\text{O}_2^{\cdot-}$ akkumuláció szoros sókoncentráció-függést mutatott, és inkább a letális NaCl kezelésre korlátozódott, míg a H_2O_2 felhalmozódás sokkal kifejezettebb volt szubletális sóstressz során. Ezzel szemben, a *Nr* gyökerekben a VT által tolerálható mértékű só-kitettség során bekövetkező, intenzívebb $\text{O}_2^{\cdot-}$ felhalmozása és csökkent H_2O_2 mennyiség arra enged következtetni, hogy az ET-érzékelés részleges vagy teljes

hiánya megváltoztatta a ROF akkumulációs mintázatát a járulékos gyökerekben, a H_2O_2 -ról a $\text{O}_2^{\cdot-}$ javára, már szubletális sóstressz során is. Szoros korrelációt találtak a $\text{O}_2^{\cdot-}$, a H_2O_2 tartalom és a fehérjekarboniláció között búkkmagvak öregedése során [248]. Mivel a H_2O_2 bizonyítottan a legfontosabb szignálmolekula, ami aktiválja az oxidatív stressz ellen védelmet nyújtó folyamatokat, hiányában az oxidatív stressz elleni védekezés nem teljes [249]. Mindezek tükrében elmondható, hogy a *Nr* gyökércsúcsokban megfigyelt változások hozzájárultak a mutáns fokozott sóstressz-érzékenységéhez. Ezek a folyamatok eltérhetnek a különböző genetikai háttérrel rendelkező *Nr* mutánsok esetén, hiszen a Micro-Tom (MT) paradicsom háttérbe introgresszált *Nr* mutációval bíró gyökerek enyhe H_2O_2 tartalom növekedést produkáltak mérsékelt erősségű, hosszabb távú sóstressz során. Mindemellett, a *Nr* gyökerek fokozott KAT, APX és glutation reduktáz (EC1.6.4.2) aktivitást mutattak kontroll körülmények között is. Ennek ellenére, ezen enzimek a SOD-dal együtt, a VT (MT) gyökerekhez hasonló mintázattal működtek az *Nr* mutánsok esetében is sóstressz alatt. Ez felveti lehetőségét a SOD-on kívüli, egyéb H_2O_2 generáló rendszerek jelenlétét a mutánsokban [250]. Így a *Nr* mutánsok Micro-Tom háttérben sótolerásabbnak bizonyultak az általunk vizsgáltaknál.

A ROF és RNF felhalmozódást kordában tartó egyéb mechanizmusok mellett a NO többlet hozzájárulhat olyan ROF formák kioltásához, mint a $\text{O}_2^{\cdot-}$, ugyanakkor szélsőséges esetben hozzájárulhat a PCD inicializáláshoz is. A különbség a szubletális és a letális sóstressz között a VT gyökerekben az, hogy a sóstresszt túlélő növények a stressz első 24 órájában tartós NO akkumuláció emelkedést mutattak, míg letális stressz esetében a NO szint növekedése csak az első órára korlátozódott. Ez a *Nr* mutáns genotípusban is hasonlóan történt, viszont esetében sokkal kifejezettebb NO produkció volt mérhető a sóstressz 1. órájában. Az utóbbi időben kiderült, hogy a kadmium stressz során fellépő, NO felhalmozódást a plazma membrán NADPH-oxidáz aktiválódása, illetve ezt követően a $\text{O}_2^{\cdot-}$ mennyiségének növekedése kíséri [251]. A szimultán H_2O_2 akkumuláció hiánya a kísérlet során azt sugallja, hogy inkább a $\text{O}_2^{\cdot-}$, mint a H_2O_2 működik együtt a NO-dal a PCD indukálásában [252]. Az általunk beállított rendszerben is hasonló változásokat figyeltünk meg a sóstressznek kitett paradicsomgyökerekben. A NO reagálhat a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -dal, melyből ONOO⁻ keletkezik, aminek akkumulációja a prekursorok termelődésétől függ. Bár ez a molekula a növényi sejtekre nem olyan erősen toxikus hatású, mint az állatokban [174], felhalmozódása sokkal intenzívebbnek bizonyult a *Nr* mutáns gyökércsúcsokban letális sóstressz során, jóllehet a VT növények esetében is tapasztaltunk marginális növekedést.

Az ET tehát szabályozhatja a PCD szignalizációt a VT növényekben [3]. Az ET-indukált kromatinfagmentáció és DNS-létrázódás megfigyelhető számos növényfajban és

növényi szervben [253], ahogyan mindkét genotípusban letális, illetve a *Nr* mutáns gyökerekben szubletális sóstressz során is. Azonban, míg letális stressz során a VT gyökerekben a DNS kontrollált, oligoszómális egységekbe történő fragmentációja (DNS létrázódás), addig a *Nr* mutánsok esetében általános DNS károsodás volt megfigyelhető.

Egyre több bizonyíték sugallja, hogy a magas H_2O_2 felhalmozódással asszociált PCD szabályozásában kaszpáz-szerű aktivitással rendelkező cisztein proteázok vesznek részt [247, 254]. Az osztály specifikus, irreverzibilis cisztein proteáz inhibitor, az E-64 segítségével a cisztein proteázok NaCl koncentrációfüggő módon növekvő képviselőjét tapasztaltuk az össz-proteáz aktivitásban, mely bár nem szignifikánsan, de nagyobb arányú volt a *Nr* gyökerekben. Az ET szabályozza a különböző cisztein proteáz gének expresszióját számos növényi szövetben, mint például a csicseriborsó csírázása [255], illetve a szegfűszeg szirmainak szeneszcenciája során [256]. A proteáz aktivitás hasonló mértékben növekedett mindkét genotípusban az emelkedő sókoncentráció függvényében, azonban a *Nr* gyökércsúcsokban ez mindenütt kissé erőteljesebb volt az általunk vizsgált körülmények között sóstressz alatt. Mivel bizonyos cisztein proteázok génjeinek indukciója megfigyelhető az etilén-inszenzitív, mutáns *etr1-1* ET receptort expresszáló, transzgenikus petúnia pártákban is [257], feltételezhető, hogy vannak specifikus cisztein proteázok, amelyek az ET szignalizáció hiányában is indukálódnak a *Nr* gyökerekben. Ugyanakkor, a proteázok az ET mellett a NO által is aktiválódhatnak. A Cd-indukált PCD során akkumulálódó NO fokozta a MPK 6-függő kaszpáz3-szerű aktivitást, ami a PCD végrehajtását eredményezte *A. thaliana* csíranövényekben [258].

A magas szalinitás okozta ionikus stressz mértékét erősen befolyásolja az ion-egyensúlyhiány, főleg a K^+/Na^+ arány a szövetekben. A Na^+ felvétele a citoszolba K^+ hiánnyal társul [259]. Monteiro és munkatársai [250] megfigyeléseivel szemben – akik nem tapasztaltak szignifikáns Na^+ akkumulációt az MT háttérű *Nr* mutánsok gyökér, illetve levél szöveteiben mérsékelt, hosszú távú sóstressz során – megnövekedett Na^+ felhalmozódást tapasztaltunk a VT és a *Nr* gyökerekben is mindkét NaCl koncentráció-hatására. A VT gyökerekkel ellentétben, a *Nr* mutáns sejtekben nagyobb arányú K^+ felvétel gátlást, vagy K^+ kiáramlást detektáltunk szubletális sóstressz során, ami szignifikáns mértékű K^+/Na^+ arány romlást okozott a szövetekben. A K^+ hiány befolyásolhatja a PCD iniciációját számos PCD-asszociált enzim aktiválásával, mint például a cisztein proteázok [185]. Az állati antiapoptotikus fehérje, a BCL-2 túl-expresszáltatása csökkentette a K^+ kiáramlást és represszálta a vakuoláris processzálo enzim – egy kaszpáz-szerű cisztein proteáz – kifejeződését, enyhítve a PCD-t rizsben [259].

6.3.1. Az exogén ACC előkezelés eltérő módon befolyásolja a levél és a gyökér ET produkcióját sóstressz során, a levelek ET státusza szabályozza a vízháztartást és a klorofilok lebomlását szupraoptimális sókoncentrációkon

A tolerálható és letális sóstressz eltérő mértékű ET produkciót indukált a gyökerekben és a levelekben, amelynek időbeli lefolyása is különbözött. A VT gyökerekben a sóstressz csak minimális ET produkció emelkedést váltott ki (100 mM NaCl, 6 óra). Érdekes módon, a letális sókoncentráció esetében nem detektáltunk szignifikáns ET produkció növekedést a VT gyökerekben, sőt, a magas koncentrációjú NaCl kezelés az idő előrehaladtával egyenesen gátolta az ET emissziót. Ezek a változások jó összefüggésben vannak a korábbi megfigyeléseinkkel, ahol egy másik paradicsomfajta – *S. lycopersicum* cv. Rio Fuego – gyökércsúcsi szegmenseiben is kimutattuk, hogy a szubletális sóstressz növeli, míg a letális sókoncentráció nagyon alacsony szintre csökkenti az ET produkciót [98].

A tolerálható mértékű, 100 mM-os és a PCD-t indukáló, 250 mM-os NaCl kezelés hatására a *Nr* mutáns gyökereinek esetében az ET kibocsátás fokozódása jóval hamarabb, már az első órában jelentkezett és tartósabbnak bizonyult, mint VT növényekben. Lanahan és munkatársai [28] szintén kimutatták, hogy az ET bioszintézis nem gátolt a *Nr* növényekben. A gyökérben, az exogén ACC kezelés sem váltott ki olyan mértékű ET emissziót 100 mM NaCl jelenlétében, mint amit a *Nr* mutánsok esetében tapasztaltunk az 1 órás mintavételi időpontban, de az ACC-indukált ET alacsony sókoncentráción végig mérhető volt, míg 250 mM NaCl-nál nem különbözött szignifikánsan a kezeletlen kontrolltól. A megfigyelt változások arra utalnak, hogy intakt ET jelátvitel – benne funkcionális *Nr* receptorral – szükséges a szubletális sóstressz során tapasztalható ET produkció kialakításához, melyben fontos szereplő lehet a hiánytalan, ET-függő, negatív visszacsatolási kör megléte [11], illetve az ACC elérhetősége is.

Az idő előrehaladtával az ET jelátvitel sérülése – legalábbis a *Nr* receptor funkciójának szerepe – és az ACC elérhetősége sincs szignifikáns behatással a 250 mM NaCl által okozott ET emisszió gátlásra a gyökérben, ami az ET bioszintézist meghatározó egyéb faktorok (pl. a nagy Na^+ ion koncentráció) felerősödését feltételezi. Paradicsom sejtszuszpenzióban a 250 mM NaCl által kiváltott ET produkciót sem lehetett fokozni exogén ACC hozzáadásával [188].

A gyökerekkel szemben mindkét sókoncentráció tápoldatbéli jelenléte már 1 óra elteltével intenzív ET emissziót váltott ki a VT levelekben, mely az idő előrehaladtával lecsengett, ugyanakkor a letális mennyiségű NaCl esetében a 24. órában megjelenő, újabb ET csúcs kapcsolatban állhat a levél szenescenciájának só indukálta beindításával [190, 260]. A gyökéren keresztül adagolt ACC (10 μM) már 1,5 órát követően a hajtásba jutott és ET produkciót váltott ki napraforgó csíranövényekben [119]. Ugyanakkor, paradicsom 100 mM-

os NaCl-dal történő kezelése során csupán 15 napon túl figyeltek meg emelkedést a xilém szabad ACC koncentrációjában [261]. Kísérleteink során csupán a 6. órában detektáltunk szignifikáns ET emissziót az ACC kezelés hatására a VT levelekben. Ez összhangban lehet azzal a megfigyeléssel, hogy napraforgó növények ^{14}C -ACC kezelése során a levélbe jutó radioaktív ACC mennyiségének a 2/3-a gyorsan ^{14}C -MACC-vé konvertálódott [119].

A gyökér környezetében jelenlévő ACC többlet szignifikánsan csökkentette a levélből felszabaduló ET mennyiségét a szubletális sókoncentrációval kombinálva, míg a 250 mM-os sókezeléssel kombinálva ellentétes hatást váltott ki az 1 órás mintavételi időpontban. 24 órát követően azonban, ezek a változások ellenkezőjükre fordultak. Az exogén ACC kezelés és a letális sóstressz együttesen mérsékelik az ET produkciót 24 órát követően, azonban ebben az esetben az ET bioszintézis szabályozása a résztvevő enzimeken kívül is megtörténhet.

A *Nr* mutáció kezdetben jelentősen csökkentette az ET-termelést sóstressz során a VT-hez viszonyítva, majd a sóstressz erősségével egyenes arányban fokozta 24 órát követően, ellentétben a VT levelekkel. Mindez azt mutatja, hogy a levél ET-termelésének merőben más az ET visszacsatolás általi szabályozottsága a kétféle erősségű sóstressz hatásának időbeni kinetikáját tekintve, mint a gyökér esetében, 24 órán belül. A rövidtávú *Nr* hatáshoz hasonlóan dohány levélkorongok nagy koncentrációjú H_2O_2 kezelése során az ET bioszintézis mutánsokban csökkent a stressz okozta, 2. ET csúcs és a sejthalál mértéke is csökkent [190].

Bár a növekedésgátlás, a friss- és száraztömeg-akkumuláció csökkenése a sóstressz legalapvetőbb hatásai közé tartoznak [154], azonban 24 órán belül a biomassa paraméterekben nem figyeltünk meg jelentős változást, jóllehet, az ebben az időpontban végbemenő folyamatok vezethetnek később az említett növekedésgátló hatások kialakulásához.

Ahogy várható volt, a vízpotenciál csökkent a VT levelekben sóstressz során a levélben, azonban ez a hatás szinte eltűnt az ACC kezelések hatására. A *Nr* mutánsok sokkal érzékenyebbek voltak a sóstresszre, mivel a Ψ_w és az RVT értékeik jelentősen csökkentek, különösen 250 mM-os NaCl kezelés hatására, ami azt jelezheti, hogy az ET-érzékelés szükséges a levélszövetek víztartalmának jobb megőrzéséhez magas sókoncentráció mellett. Korábban már sóstressz mentes állapotban kimutatták, hogy a paradicsomnövények ET-érzékenysége befolyásolja a vízháztartás egyensúlyát [135].

Mivel az exogén ACC kezelés kifejezetten növelte a növények vízpotenciálját, míg az ET jelátvitel hiánya csökkentette azt sóstressz alatt, a többlet ET jótékony hatású a sóstressz ozmotikus komponensével szemben. Más a helyzet az ionikus stresszel kapcsolatban. Az optimális K^+/Na^+ arány megőrzése sóstressz során alapvető fontosságú [150], amelynek csökkenése ionikus stresszt vált ki. A 100 mM-os NaCl kezelés, 24 óra elteltével enyhébb

ionikus stresszt okoz a levelekben, míg a letális sókoncentráció sokkal jelentősebbet. A sóstressz ugyanis NaCl koncentrációtól függően csökkentette a K^+ és növelte a Na^+ tartalmakat. A gyökerek esetében a K^+/Na^+ arány esésért a K^+ tartalom csökkenése, míg a levelekben inkább a Na^+ tartalom növekedése volt felelős.

A gyökerek Na^+ akkumulációs kapacitása 24 óra múltán 100 mM NaCl jelenlétében telítődött, ugyanakkor a kifejllett, nem öregedő levelek felé történő Na^+ transzport 250 mM NaCl kezelés esetében a szubletális sóstresszhez viszonyítva drasztikus mértékben megemelkedett. A *Nr* mutáció a gyökér mellett a levélben is szabályozza a K^+ tartalom megtartását a szubletális sóstressz 24. órájában, ezért e levelek komolyabb ionikus stresszben részesültek, mint a VT társaik. A letális sókoncentráció jelenlétében a *Nr* mutáció tovább csökkenti a K^+/Na^+ arányt, azonban a különbség nem szignifikáns a sókezelt VT gyökérhez képest. Az ACC kezelés szignifikánsan nem befolyásolta a gyökerek K^+ tartalmát a 24 órás sóstressz során, viszont fokozta a Na^+ transzportját a levélbe 100 mM-os NaCl jelenlétében, továbbá letális sóstressznél a K^+/Na^+ arány csökkenése is megfigyelhető volt.

A *Nr* mutánshoz hasonlóan, az exogén ACC kezelés hatását is vizsgáltuk a gyökércsúcsi sejtek életképességére. A szubletális sókezelés 24. óráját követően, az exogén ACC kezelés is okoz életképesség romlást a VT gyökércsúcsokban, míg a 250 mM NaCl jelenlétében már 1 órát követően csökkentette a gyökércsúcsi sejtek életképességét. Ezek alapján elmondható, hogy a sóstresszel kapcsolódó túlzott ET produkció a stressz mértékétől függően fejtheti ki káros hatásait. A gyökércsúcsok életképességének jelentős csökkenése azonban nem feltétlen vezet a növény pusztulásához. Egy hosszabb akklimatizációs folyamatban a hajtás alkalmazkodása után lehetőség van új járulékos gyökerek iniciációjára, ami a növényi egyed túlélését jelentheti. Másképp fogalmazva, a sóstressz akklimatizáció sikeressége optimális ET produkciót és funkcionális ET jelátvitelt igényel, ami azonban a gyökér és a levél esetében más folyamatok útján valósul meg.

A levélszeneszencia egyik velejárója a klorofilltartalmak csökkenése. Bár a magas ET produkciót sokszor a klorofill lebomlás serkentésével párosítják [46], a mi rendszerünkben, a sóstressz korai időszakában egy sokkal árnyaltabb kép rajzolódik ki. Sóstressz során a megfelelően szabályozott ET emisszió 24 órán belül nem okoz klorofillbomlást a letális stressz indukálta, 2. ET csúcs megjelenésével sem, sőt, az exogén ACC kezelés szubletális sóstressz során egyenesen fokozza a klorofill- és karotinoidtartalmakat. Ezzel szemben a *Nr* receptor mutáció – még ha a kontroll körülmények között magasabb klorofill *a* és *b* tartalmakat is okoz – sóstressz során az ET-érzékelés hiányosságai miatt sokkal hamarabb mutatja a klorofill lebomlást. Mindez jól mutatja az ET időben eltérő befolyását a pigmenttartalmakra.

6.3.2. A növények ET státusza szabályozza a ROF és RNF molekulák akkumulációját a sóstressz kialakulása során

6.3.2.1. A gyökér $O_2^{\bullet}$ tartalmának szabályozása sóstressz során

A reaktív oxigénformák kialakulása a legtöbb esetben a molekuláris oxigén elektronfelvételével létrejövő $O_2^{\bullet}$ keletkezésével indul. Maga a $O_2^{\bullet}$ fontos szerepet játszik a sóstressz akklimatizációban, így a $O_2^{\bullet}$ keletkezésében és kioltásában résztvevő enzimek ET státusztól függő szabályozása központi jelentőségű az oxidatív stressz kialakulásában.

A sóstressz okozta változások a vizsgált ROF és RNF tartalmakban a *Nr* mutáns gyökércsúcsok esetében már bemutatásra kerültek, azonban az exogén ACC által kifejtett hatások elemzésére még nem került sor. A szubletális sókoncentrációval történő kezelés 1. óráját követően az exogén ACC csökkenti a $O_2^{\bullet}$ akkumulációját, mely az *SIRBOH1* expresszió só általi indukciójának elmaradásával párosul. A későbbi időpontokban azonban az ACC jelentősen növelte a $O_2^{\bullet}$ akkumulációt a megfelelő sókezelésben részesült, VT növényekhez képest. Ezzel összhangban, az *eto1* knockout mutánsban megfigyelhető magas ET szintek stimulálták a gyökérsztélében lévő parenchima sejtek PM-NADPH oxidázát, mely RbohF függő ROF produkcióhoz vezetett és csökkentette a nettó Na^+ beáramlást a gyökérbe [146]. Rizs sejt kultúrában is megnőtt az *OsRBOHA* expressziója a 100 mM NaCl kezelést követő 1. órában [262]. *Arabidopsis* növények gyökereiben a PM-ben lokalizálódó NADPH oxidáz, az AtrbohF által megnövelt vaszkuláris ROF ($O_2^{\bullet}$) produkció korlátozta a Na^+ akkumulációját, így csökkentette a Na^+ transzportját a gyökérből a hajtásba, ahol így magasabb K^+/Na^+ arányt és sótoleranciát indukált [167]. Az ET tehát befolyásolja az Rboh-függő ($O_2^{\bullet}$) produkciót, így a belőle képződő H_2O_2 képződéséért is felel [73, 146]. Az általunk használt, Ailsa Craig paradicsomfajtába introgresszált *Nr* mutáció már stresszmentes körülmények között is növelte az *SIRBOH1* gén expresszióját, mely szubletális sóstressz során tovább fokozódott, ellentétben a VT gyökerekkel, ahol csak 1 órát követően tapasztaltunk indukciót.

Korábbi vizsgálatainkban [220] kimutattuk, hogy a ROF metabolizmusában szereplő enzimek aktivitása napszakos (cirkadián vagy diurnális) ritmust mutathat, mely az általunk végzett kísérletek során a növények stresszmentes állapotában is megfigyelhető volt. Annak ellenére, hogy több esetben is kimutatták, az ET hatással van az antioxidáns enzimek aktivitására sóstressz során levélben [168; 263- 265], vagy teljes csíranövényben [266], az ET kapcsolatát a gyökér antioxidáns enzimeivel rövidtávú – 24 órán belüli – sókezelés során eddig még kevés esetben vizsgálták.

Az exogén ACC a stressz erősségétől és az expozíciós időtől függően csökkenti a SOD specifikus aktivitását sóstressz alatt. A vizsgált időpontokban, az *SIMnSOD* expressziója nem

minden esetben követi a SOD aktivitás-béli változásokat az ACC kezelés esetében sem. A gyökér SOD specifikus aktivitásában, szubletális sóstressz során megfigyelt változások arra utalnak, hogy az exogén ACC kezelés, illetve az általa megemelt ET produkció 24 óra múltán gátolja a $O_2^{\bullet-}$ SOD általi lebomlását a gyökérben, mely mellett, a 6. órától fokozott $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció volt mérhető a gyökércsúcsokban.

100 mM NaCl jelenlétében, a *Nr* gyökércsúcsok korábban már ismeretett, megemelkedett $O_2^{\bullet-}$ tartalmának másik okozója – a megemelkedett *SIRBOH1* expresszió mellett – a SOD specifikus aktivitásának jelentős só-indukálta csökkenése, mely jól mutatja a *Nr* receptor és az ET fontosságát a SOD szabályozásában a sóstressz korai időszakában. Ugyanakkor, a *Nr* mutáns gyökerekben a VT-nál nagyobb fokú mitokondriális *SIMnSOD* expressziót detektáltunk a sókezelések hatására a 6. órától, ami azonban nem mutatkozott meg az összes SOD aktivitásban. A jelenség okozója lehet, hogy az egyéb, nem az *SIMnSOD* gén által kódolt izoenzimek expressziója, vagy aktivitása is megváltozhatott, ami csökkenést eredményezett a levélszövetek SOD specifikus aktivitásában [267], tehát 24 órán belül, az *SIMnSOD* jelentősége kisebb lehet a többi SOD izoenzimhez képest. Ugyanakkor, hosszútávú – 20 napon túli – sóstressz során megfigyelték, hogy a MT paradicsomfajta *Nr* mutánsban enyhén fokozódott egy MnSOD izoenzim aktivitása, azonban ennek hatását a teljes SOD specifikus aktivitásra nem vizsgálták [250].

Mindezen túl, az általunk tapasztalt változások mögött a SOD enzim poszttranszkripcionális módosítása is állhat. Bár a $ONOO^-$ tirozin nitráció útján blokkolhatja a SOD számos izoformáját [96], mint például a mitokondriális MnSOD izoenzimet *Arabidopsisban* [268], 100 mM NaCl jelenlétében a *Nr* mutánsokban nem tapasztaltunk szignifikáns emelkedést a gyökércsúcsok $ONOO^-$ akkumulációjában, így ezekben a szövetekben a nitroztatív stressz kialakulása nem valószínű. Mindazonáltal egyéb poszttranszkripcionális modifikációk is gátolhatják a SOD izoenzimek aktivitását, mint például a miRNS-ek mediálta transzlációs gátlás [269].

A gyökércsúcsok $O_2^{\bullet-}$ akkumulációja a letális sókoncentráció és az ACC kezelés kombinációja során felerősödik. Míg a VT és az ACC kezelt gyökerekben is represszálódott az *SIRBOH1* gén 250 mM-os NaCl alkalmazása során, a *Nr* mutánsokban indukciót tapasztaltunk az összes időpontban. Letális sóstressz során a SOD aktivitás a *Nr* mutánsban és az ACC kezelt, VT gyökerekben is hasonlóan redukálódik a 6. órától a VT-vel összehasonlítva, így az adott időpontokban az abszolút ET emisszió, illetve jelátvitel befolyása kisebbnek látszik. Fontos megjegyezni azt is, hogy az ACC előkezelés miatt, a letális sókezelést már egy módosult ET státuszú gyökér kapta, melynek hosszabb távú hatásai az antioxidáns rendszerekre a későbbi,

mérsékeltabb ET produkció ellenére sem elhanyagolhatóak, ahogy látható Wi és munkatársai [190] munkájában is a letális stressz által kiváltott antioxidáns válasz és az ET produkció kinetikájának összehasonlítása tekintetében.

A közelmúltban megjelent tudományos eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy az ACC egy ET-től függetlenül is működő szignálmolekula [16, 137]. Ugyanakkor e szövetekben a fiziológiailag hatásos, lokális ET akkumuláció is lehetséges [229, 230].

Összességében megállapítható, hogy a tolerálható sókoncentrációval szemben a 250 mM-os NaCl koncentráció jelentős $O_2^{\bullet-}$ akkumulációt eredményez, amit egyaránt fokoz az exogén ACC kezelés és az ET jelátvitel blokkolása a *Nr* mutánsban. Ez az akkumuláció a korai időpontokban a PM-kötött NADPH oxidáz indukciójának, illetve a SOD aktivitás idő függvényében kialakuló gátlásának tudható be a kérdéses mintákban. A megnövekedett $O_2^{\bullet-}$ tartalom hozzájárulhat a PCD indukcióhoz a gyökércsúcsokban.

6.3.2.3. A gyökér H_2O_2 akkumulációjának szabályozása sóstressz során

A szubletális és letális sóstressz a gyökércsúcsok H_2O_2 akkumulációs kinetikájában is alapvetően különbözik, hiszen letális stressz során az első H_2O_2 maximum később jelentkezik. Annak ellenére, hogy a kétféle erősségű sóstressz során az ACC megemelkedett $O_2^{\bullet-}$ akkumulációt váltott ki a gyökércsúcsokban a 6. órában, a só-indukálta, H_2O_2 felhalmozódást gátolta ebben az időpontban, míg 24 óra elteltével mindkét stressztípus esetében növelte.

Ahogy már említésre került, a H_2O_2 az egyik legfontosabb szignálmolekula az oxidatív stressz ellen védelmet nyújtó folyamatok aktiválásában [249]. Nyárfa kallusz sejtekben a só-indukált H_2O_2 termelés fokozta a sótoleranciát, a Na^+ szintek alacsonyan, míg a K^+ tartalom magasan tartásán keresztül [105]. A H_2O_2 akkumulációját előidéző folyamatok közül a 6.3.2.1. alfejezetben ismertetett SOD-ot, míg a H_2O_2 lebontásában résztvevő enzimek közül a KAT, a POD és az APX szerepét vizsgáltuk. A mi rendszerünkben, szubletális sóstressz során, a KAT aktivitás kis mértékben nőtt csak meg a VT gyökereiben 6 óra elteltével, ami később nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor az APX aktivitás az 1. és a 24. órát követően fokozódott. Eltérő sótűréssel rendelkező, tunéziai paradicsomfajták sókezelése gyorsan gátolta a toleráns és az érzékeny fajta gyökereiben a KAT aktivitást, amely az utóbbi esetében később helyreállt, ugyanakkor a közepes sótoleranciával rendelkező fajta gyökereiben csupán enyhe változások voltak megfigyelhetők. Az APX aktivitás az érzékeny fajtában 12 óra múltán lecsökkent, a közepes toleranciával rendelkező esetében nem változott, míg a toleráns növények gyökereiben megemelkedett. A POD aktivitás tendenciája is ehhez hasonlóan alakult [270].

A 100 mM-os NaCl kezelést követő 24. órában, a *Nr* és az ACC kezelt gyökerekben viszont a megfigyelt KAT aktivitás nem párosult a gyökércsúcsok H₂O₂ tartalmának csökkenésével, ami elmondható a letális koncentrációjú NaCl kezelés esetében is. Azonban, míg a *Nr* gyökerekben a KAT aktivitás növekedése az *SIKAT1* és az *SIKAT3* gének expressziós fokozódásával járt, az ACC kezelt gyökerekben mind három vizsgált KAT izoenzim gén represszáldott az említett időpontra.

A *Nr* gyökerekben 1. órát követően a VT-hoz képest csökkent H₂O₂ produkciót detektáltunk, melyhez a teljes gyökérben mért SOD aktivitás csökkenése és a KAT-, valamint a POD specifikus aktivitás növekedése is társult. Ebben az időpontban, az említett sókezelésben részesített *Nr* gyökerek *SIKAT1* indukciója a VT-nál kisebb mértékű volt, ugyanakkor a mutánsokban elmaradt az *SIKAT3* repressziója. A *Nr* mutáció az idő függvényében befolyásolta KAT aktivitást a MT paradicsomfajta gyökereiben hosszútávú sóstressz során is [250].

Szubletális sóstressz során, a KAT specifikus aktivitás növekedését vagy csökkenését az ACC kezelt növényekben a POD aktivitás ellentétes változása követte, mely feltételezi, hogy a két enzim aktivitása komplementálja egymást. Az Ailsa Craig háttérű, *Nr* mutáns gyökerekben gátlódott a POD aktivitás a 100 mM-os NaCl kezelést követő 6. és 24. órában, mely jó összefüggésben van a hosszútávú sóstressz során, MT háttérben tapasztaltakkal [250].

A 6 órás mintavételi időpontban, az exogén ACC és a tolerálható mennyiségű NaCl jelenlétében tapasztalt H₂O₂ tartalom csökkenés a gyökércsúcsokban a gyökér APX specifikus aktivitásának növekedésével párosult, mellyel együtt fokozódott az *SIAPX2* expressziója is.

A *Nr* mutáció a sókezelések korai óráiban van leginkább hatással az APX specifikus aktivitásra a gyökerekben, mely az ACC- és sókezelt VT növényekben is megfigyelhető, illetve hatásuk mibenléte stressz erősség- és időfüggő. A tolerálható mértékű NaCl kezelés 6. órájában, a *Nr* mutánsban jelentősen csökkent az APX aktivitás, ugyanakkor az *SIAPX1* és *SIAPX2* izoenzimiek expressziója erősen indukálódott. Az exogén NO képes befolyásolni a mitokondriális APX aktivitást, NO és aszkorbát koncentrációfüggő módon [271]. Az APX aktivitás ET jelátvitel általi, időfüggő szabályozása hosszútávú sóstressz során is megmutatkozott MT háttérű, *Nr* mutáns gyökerekben [250].

Hat óra elteltével a letális sókoncentráció és az ACC jelenlétében megfigyelt H₂O₂ tartalom változáshoz a gyökér csökkent SOD aktivitása is hozzájárulhatott. Az ACC jelenlétében történő, 250 mM-os NaCl kezelés esetében is elmondható, hogy – az 1. mintavételi időpontot kivéve – a POD a KAT specifikus aktivitás változásával fordított irányban módosult a gyökérben. Az exogén ACC megakadályozta a gyökér *SIKAT2* és *SIKAT3* izoenzimiek 250 mM-os NaCl okozta represszióját az 1. órában, fokozta az *SIKAT3* gén kifejeződését és

enyhítette a többi vizsgálat *KAT* gén expressziós gátlását is a későbbi időpontokban. Ez megemelkedett *KAT* aktivitást eredményezett, mely 6 óra elteltével a gyökércsúcsok H_2O_2 tartalmának csökkenésével is kapcsolatba hozható. Fontos megjegyezni, hogy mindez annak ellenére történt, hogy nem detektáltunk szignifikáns ET emisszió növekedést az ACC kezelt gyökerekben letális stressz során.

250 mM NaCl a VT paradicsomgyökerekben fokozta a POD aktivitást, melyet az 1. és 24. órában gátolt a *Nr* mutáció. Hasonlót figyeltek meg *ein3eill* mutáns lúdfűben is [266].

250 mM-os NaCl jelenlétében a *Nr* növények APX aktivitása szignifikánsan nőtt, ellentétben a szubletális sóstressz esetében megfigyeltekkel. Ezen túlmenően a citoszolikus *SLAPX1* és *SLAPX2* gének is erős expressziós aktiválódást mutattak. Az enzim citoszolikus vagy peroxisomális izoformáinak túlexpresszáltatása növelheti a sótoleranciát [272]. Bár az APX aktivitása megnőtt VT paradicsomban hosszútávú sóstressz során, a SOD által fokozott H_2O_2 szintek kordában tartásához csupán kis mértékben járult hozzá [168].

A stressz mértékével egyenes arányban a ROF akkumuláció toxikussá is válhat, mely oxidatív stresszhez vezet, így károsodhatnak a makromolekulák és a membránok is [105]. A túlzott ROF produkció K^+ kiáramláshoz vezethet, főleg a GORK és NSCC csatornákon keresztül, ami inicializálja a PCD-t [156].

A H_2O_2 akkumulációja a VT gyökércsúcsokban időben hamarabb következik be a tolerálható sókoncentrációnál, mint a 250 mM NaCl kezelés esetén, és a 24. órára mindkét mintában lecseng. A korai H_2O_2 akkumuláció lehetővé teszi olyan antioxidáns enzimek korai indukcióját és enzimatisz aktiválódását, mint az APX, míg a letális sókoncentrációnál a H_2O_2 lebomlásához a POD és a *KAT* aktivitás indukciója nagyobb mértékben járul hozzá, ami különösen az ACC kezelt mintákban és az *Nr*-ben jelentős. Ezekben a gyökércsúcsokban azonban az antioxidáns enzimek aktiválódásának ellenére a sóstressz hatására a sejtek életképessége visszafordíthatatlanul károsodik.

6.3.2.4. A gyökércsúcsok NO és a ONOO⁻ akkumulációjának exogén ACC okozta változásai eltérő erősségű sókezelések során

A VT gyökércsúcsokban a sókezelés megemelte a NO akkumulációt, ami 100 mM-os NaCl esetén egy tartós, viszonylag egyenletes emelkedés, míg a letális sóstressznél az 1. órára korlátozódik. A kétféle erősségű sóstressz által kiváltott NO akkumulálódási kinetikára az exogén ACC időben ellentétesen hatott, kis mértékű sóstressznél inkább gátolt, míg 250 mM NaCl-nál 24 óra múlva a sókezelt VT-hez képest jelentősen megemelkedett NO szinteket detektáltunk. Az *Nr* mutánsokban a NO csak az első órában akkumulálódott nagyobb

mértékben, mint a megfelelő, sókezelt VT gyökércsúcsokban. A magas NO szinteknek fontos szerepe lehet a védekezésben, hiszen sóstressz során a NO fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását [172, 176, 177], ugyanakkor a túlzott NO és $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció ONOO⁻ képződéséhez és az intenzív nitráció miatt nitrooxidatív stressz kialakulásához vezethet a növényekben [76]. Fontos tehát a $O_2^{\bullet-}$ / ONOO⁻ aránya is az adott szövet túlélése szempontjából.

A szubletális sókoncentráció jelenlétében, az ACC kezelés megemelt $O_2^{\bullet-}$ és csökkent NO akkumulációt okozott a gyökércsúcsokban. Szubletális sóstressz során, a ONOO⁻ két prekursorának megemelkedése nem okozott szignifikáns ONOO⁻ akkumulációt egyetlen időpontban sem, míg jelentősen fokozta szintézisét a letális sóstressz korai szakaszában. Bár a ONOO⁻ keletkezése nagyban függ a két prekursor szimultán képződésétől, a folyamatot a $O_2^{\bullet-}$ produkció szubcelluláris helye felé történő NO diffúzió határozza meg [273]. Az ET és a ONOO⁻ képződés kapcsolatáról sóstressz során nincs sok információnk, és ahogy már említésre került, a *Nr* mutáció nem is befolyásolja szignifikánsan az ONOO⁻ akkumulációt járulékos gyökerek apikális régiójában. Érdekes módon, még ha a szubletális sókoncentráció jelenlétében a ONOO⁻ felhalmozódás nem is változott, az ACC kezelés a molekula fokozott képződéséhez kedvezőtlen NO és $O_2^{\bullet-}$ akkumulációs mintázatot alakított ki [273]. Ezzel szemben a letális sóstressz során a NO tartalmakat az ACC kezelés a ONOO⁻ képződés indukciója útján is csökkenthette. Ezekben a mintákban lehetőség van a nitrooxidatív stressz kialakulására.

A gyökércsúcsokban mind az exogén ACC formájában indukált ET/ACC többlet, mind az ET jelátvitel blokkolása oxidatív, illetve nitrooxidatív stresszt váltott ki letális sóstressz alatt, amelynek hátterében eltérő mechanizmus áll. Bár mindkét esetben megemelkedett a $O_2^{\bullet-}$ és peroxinitrit akkumuláció, ez exogén ACC kezelés mellett erőteljesebb. Míg a $O_2^{\bullet-}$ akkumulációt az *Nr*-ben elsősorban a SOD gátlás okozza, a H_2O_2 elbontásához a mutánsban kisebb mértékben járul hozzá a KAT és rövid távon az APX, mint az ACC kezelt gyökerekben. Letális sóstressznél a gyökércsúcsok ET státuszának változása (exogén ACC, *Nr*) növeli a sóérzékenységet. Tolerálható sóstressznél azonban az exogén ACC kezelés eleinte jelentősen csökkenti a $O_2^{\bullet-}$ felhalmozódását, viszont nem csökkenti a H_2O_2 akkumulációt, ami mérsékeli az oxidatív stresszt, és ami lehetővé teszi olyan antioxidáns enzimek expressziójának indukcióját (*SIAPX2*) és aktivitásának emelkedését, mint az aszkorbát peroxidáz.

6.3.2.5. A levél $O_2^{\bullet-}$ akkumulációjának szabályozása sóstressz során

Szubletális NaCl koncentráció alkalmazása során a paradicsom kifejlett, nem öregedő leveleiben a $O_2^{\bullet-}$ mennyiségi változása periodicitást mutat, melyet nem befolyásolt sem a *Nr* mutáció, sem az exogén ACC kezelés. A sókezelések hatására azonban az 1 és 24 óras

időpontokban fokozódott a $O_2^{\bullet}$ akkumuláció. *Brassica juncea* rövid időtartamú sókezelése során az alacsonyabb és a magasabb sókoncentrációk is növelték a $O_2^{\bullet}$ mennyiségét a levelekben 12-, illetve 24 óra elteltével [274], melyet a legtöbb időpontban mi is megfigyeltünk.

A levélben a SOD specifikus aktivitása a gyökérhez képest némileg eltérő kinetikával válaszolt a sókezelésekre. Továbbá, míg a gyökérben nagyobb a szerepe az ET általi SOD szabályozásnak szubletális NaCl koncentráció jelenlétében (ACC, *Nr* mutáns), addig a levélben a vizsgált időpontokban nem, vagy csak néhány esetben fedezhető fel összefüggés.

Ugyanakkor elmondható, hogy a *Nr* mutáció és az ACC kezelés is hatott a SOD izoenzim expressziójára, viszont nem gyakorolt szignifikáns hatást az össz-SOD aktivitásra.

Ezzel szemben, a szuperoxid szintézisét katalizáló *SIRBOH1* indukálódik a mutánsban a 100 mM NaCl hozzáadását követő 1. óra után, melynek befolyása a $O_2^{\bullet}$ produkcóra nem tisztázott. Ezen túlmenően, az *SIRBOH1* represszálódott a szubletális sókoncentráció hozzáadását követő 6. órában a VT és a *Nr* mutáns levelekben, melyet az ACC kezelés megakadályozott. Ugyanakkor az *Nr* levelekben az említett gén kifejeződésében 24 óra elteltével ismét indukciót tapasztaltunk. Ez felveti a növény ET státuszának befolyását a levél $O_2^{\bullet}$ produkcójára szubletális sóstressz során, a szubcelluláris képződés lokalizációját tekintve.

A 100 mM-os NaCl által indukált kloroplasztikus *SiCu/ZnSOD* expressziót a *Nr* mutáció mérsékelte, míg represszálta a szintén kloroplasztikus *SIFeSOD* kifejeződést 24 órát követően. Az exogén ACC is inkább e két izoenzim expressziójára volt hatással 24 órán belül, ami jelzi az ET szerepét a kloroplasztikus ROF szintek befolyásolásában. A megfigyeléseinkkel összhangban, a MT háttérbe introgresszált *Nr* mutáció a hosszútávú, 100 mM-os NaCl kezelés során csökkentette a Cu/ZnSOD izoenzim aktivitását a levelekben a sókezelt, VT növényekhez képest [250]. Ennek megfelelően, brokkoliban az ERF1 gén (*BoERF1*) túlexpresszáltatása három napos sóstressz után növelte a SOD enzimek aktivitását a csíranövények leveleiben, mely csökkentette a $O_2^{\bullet}$ akkumulációt, valamint a sejthalál mértékét [275]. Ezen túlmenően a dohány exogén ACC kezelése során is mutattak ki változást a kloroplasztikus SOD izoenzim expressziójában [276].

A $O_2^{\bullet}$ akkumulációja a VT-ben kezdetben sokkal jelentősebb volt a letális sóstressz esetében, mint a tolerálható sókoncentrációnál. Érdekes módon a letális só-sokk esetében mind a *Nr* receptor defektusa mind az exogén ACC alkalmazása jelentősen csökkentette a sóindukált $O_2^{\bullet}$ felhalmozódást, mely ellentétben áll a gyökérben megfigyelttel, azonban a háttérben megbúvó folyamatok az idő függvényében változtak.

A SOD aktivitását a letális sóstressz már 1 óránál emelte a VT-ben, azonban a jelentős indukció 24 óránál következett be. Az enzim aktivitására a 6. óráig mind az ACC kezelés, mind

a ET receptor mutációja serkentőleg hatott a VT-hez képest, ami azonban a 24 órás mintában jelentős gátlásba csap át. Az 1 órás mintavételkor, a *Nr* mutáció és az ACC kezelés is fokozta a *SIFeSOD* kifejeződését a levélben, 250 mM NaCl jelenlétében, míg a 24 órás időpontban a *Nr* mutáció által gátolt SOD aktivitáshoz az *SIFeSOD* és a *SIMnSOD* gének repressziója társult. A 6 órás időpontban, az *SIRBOH1* gén is erősen represszáldott a mutánsokban, majd 24 óra után az ACC kezelés mellett is, ami befolyásolhatja a $O_2^{\bullet}$ mennyiségét.

Hasonlóan saját eredményeinkhez, a sóérzékeny borsólevelek mitokondriális MnSOD expressziója is csökkent a sóstressz során [277]. Ezzel szemben a rizs Cu/ZnSOD túlexpresszáltatása dohány kloroplasztiszokban sótoleranciához vezetett [278]. A rizs citoszolikus SOD izoenzimek expressziója azonban eltérő módon válaszolt a sókezelésre a növények hajtásában [279].

Mindazonáltal fontos következtetés, hogy erős sóstressz során a *Nr* mutánsok és az ACC kezelt, VT növények leveleiben, a 6. órában a $O_2^{\bullet}$ lebomlása fokozódik, addig a 24. órában az enzimatis lebonat és ezzel együtt a termelődés mérséklődése figyelhető meg. Mindkét változáshoz az ET-termelésnek a megfelelő sókezelte VT-hez képest mért csökkenése vagy a jelátvitelének zavara társítható, bár a két, különböző csoport $O_2^{\bullet}$ akkumulációjában részt vevő mechanizmusok hozzájárulása a megfigyelt változásokhoz eltérő lehet [75].

6.3.2.6. A levél H_2O_2 akkumulációjának szabályozása sóstressz során

100 mM-os NaCl jelenlétében a H_2O_2 felhalmozódás az 1 órás mintán kívül látszólag kevésbé változott, amit az ACC kezelés nem módosított szignifikánsan a levélben. Ugyanakkor, a *Nr* mutáció szerepe a szubletális sóstressz indukálta H_2O_2 akkumuláció fokozásában a 24. órában vált szignifikánssá.

A VT növényekben a KAT és a POD aktivitás a kezelés után röviddel megemelkedik, ami a kísérlet végére lecseng, míg az APX aktivitás általában nem változik, csak a 6. órás mintában csökken. Eltérő sótűréssel rendelkező, tunéziai paradicsomfajták sós tápoldattal (150 mM NaCl) történő öntözése során a levelekben – a gyökérrel ellentétben – 6 és 12 órát követően alig változott a KAT aktivitás, mely a toleráns fajtát kivéve – ahol nőtt – az APX aktivitásról is elmondható. A POD aktivitás, bár 6 óránál enyhe maximumot mutatott, nem módosult számottevően 12 órán belül [270]. A levelek KAT és POD aktivitásában szubletális sóstressz során mi is hasonló megfigyeléseket tettünk. Ezen túlmenően, a VT levelekben, a 100 mM NaCl hozzáadását követő 1 óra elteltével indukálódott az *SIKAT1* expresszió, mely a 6. órában represszáldott. Az *SIKAT2* és *SIKAT3* expressziót nem befolyásolta ez a kezelés. Az általunk használt paradicsomfajtában azonban az APX aktivitás a VT-ben a 6 órás mintavételi

időpontban erősen lecsökkent, bár a vizsgált, citoszolikus APX gének – *SIAPX1* és *SIAPX2* – nem represszálódtak.

Érdekes módon, 6 órát követően a 100 mM-os NaCl és az ACC kezelés kombinált hatására a KAT specifikus aktivitása – dacára a fokozott *SIKAT3* expresszióknak – kissé mérséklődött. Viszont az ACC hatására a POD specifikus aktivitása jelentősen megemelkedett, továbbá mérséklődött az APX működésének sóindukálta csökkenése is. Az utóbbi jelenség a *Nr* levelekben is megmutatkozott, viszont esetükben a KAT specifikus aktivitása fokozódott a megfelelő sókezelésben részesített, VT levelekhez viszonyítva, mely az *SIKAT1* represszió elmaradásával hozható kapcsolatba.

A 100 mM-os NaCl kezelés 24. óráját követően, a *Nr* mutáció által fokozott H_2O_2 akkumulációban szerepet játszhat a KAT és az APX aktivitás csökkenése, valamint a SOD specifikus aktivitásának enyhe fokozódása. A jelenséget az *SIKAT1* erős repressziója kísérte, mely felveti az izoenzim kiemelt szerepét a folyamatban, mivel az *SIKAT2* expresszió szimultán fokozódása sem enyhítette az aktivitás csökkenését. Ugyanakkor ez nem zárja ki a gátló természetű poszttranszlációs módosítások szerepét a folyamatban.

Egy kisebb 6 órás emelkedést követően 24 óra elteltével az ACC és az *Nr* mutáció is gátolta az APX specifikus aktivitását. Ugyanitt a 100 mM NaCl represszálta az *SIAPX1* és -2 géneket a levélben, ami felelhet az *Nr* mutánsokban és az ACC-kezelt levelekben megfigyelt APX specifikus aktivitás csökkenésért. A *Nr* mutáció által erőteljesen gátolt APX aktivitás a 100 mM NaCl kezelés 24. óráját követően (a KAT aktivitás csökkenésével párhuzamosan) a H_2O_2 akkumuláció jelentős növekedésével járt a 24 órás időpont esetében. A *Nr* mutáns MT paradicsomlevelekben, 100 mM-os NaCl alkalmazásakor is csökkenést figyeltek meg a levél APX aktivitásában a 20. és a 36. napon [250].

A kísérleteink során vizsgált időpontokban, 100 mM NaCl jelenlétében, a levél POD aktivitását enyhén növelte a *Nr* mutáció, mely az 1. és a 24. órában bizonyult szignifikánsnak. Más esetben, a MT paradicsomfajta *Nr* mutáns genotípusában nem figyeltek meg változást a KAT specifikus aktivitásban hosszú távú, 100 mM NaCl kezelés során a VT levélhez képest, ugyanakkor a *Nr* mutáció fokozta a POD specifikus reakciót a 7. napon, amit később, a 20. és 36. napokon csökkentett [250].

A 250 mM-os NaCl tápoldatbéli jelenléte által indukált intenzív H_2O_2 felhalmozódást a kísérlet 1. órájában a *Nr* receptor mutációja vagy az exogén ACC kezelés első ránézésre kismértékben befolyásolta a levelekben. A későbbiekben mind az exogén ACC kezelés, mind az ET receptor mutációja jelentősen megemelte a H_2O_2 akkumulációt a VT kontrollhoz viszonyítva, ami az *Nr* mutánsokban a 24. óráig megmaradt.

Ugyanakkor az exogén ACC által fokozott ET produkció a letális sókezelés 1. óráját követően indukálta a KAT aktivitást, mely az APX működésének csökkenésével társult. A megfigyeltekben az *SLAPX1* és -2 expressziója valószínűleg kisebb szerepet játszott. Az *SLKAT1* expressziót rövid idő alatt, önmagában is fokozta az exogén ACC, mely a letális sókoncentráció hozzáadását 1 órával követően is látható volt, azonban ez nem különbözött a megfelelő sókezelést kapott VT levelektől.

Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a hirtelen megemelkedő ET produkció a vad típusú ET receptoron keresztül indukálta az *SLKAT1* izoenzim expresszióját a levélben az 1 órás mintavételkor. Az izoenzim kifejeződését később is befolyásolja a *Nr* mutáció és az ACC kezelés is, időfüggő módon.

A *Nr* levélben gátlódott az APX specifikus aktivitás a korai időpontokban, a megfelelő sókezelés során, viszont fokozódott a POD működés. A POD izoenzimek eltérő arányú expressziót mutattak kukorica hosszútávú sóstressze során [280]. Korábban megfigyelték, hogy a citoszolikus APX dupla mutánsok leveleiben az enzim hiányát egyéb antioxidáns enzimek kompenzálták [281], amire jó jelölt a POD.

A letális sókoncentráció jelenlétében, a *Nr* mutáns és az ACC kezelt paradicsomnövények leveleiben 6 óra elteltével megfigyelt erőteljes H_2O_2 akkumulációban kiemelt szerep jutott a fokozott SOD aktivitásnak. Bár mindkét csoportban megemelkedett a KAT és a POD – az ACC kezelt növényekben az APX is – specifikus aktivitása, a H_2O_2 felhalmozódást nem voltak képesek jelentősen mérsékelni. Az itt megfigyelt KAT aktivitás változásokhoz az *SLKAT1* és *SLKAT3* expresszió fokozódás társult. Tehát ez esetben a H_2O_2 képződésének mértéke túlnőtte az antioxidáns rendszerek kapacitását.

A letális NaCl kezelést követő 24. órában az exogén ACC jelenléte mérsékelte a SOD és a POD, viszont erősen indukálta az APX specifikus aktivitást, mely visszafogta a sóstressz indukálta H_2O_2 akkumulációt. Ez a hatás a citoszolikus *SLAPX1* és -2 izoenzim génnek repressziójával társult. Az APX specifikus aktivitásra vonatkozóan is hasonló megfigyelést tettek ACCD-t expresszáló rhizobaktériummal inokulált, sókezelésben részesített *Catharanthus roseus* növények leveleiben [282].

A *Nr* mutáció a 24 órás mintavételi időpontban erőteljesebben gátolta a POD működését, mint az exogén ACC kezelés. Ezt megerősítve, *Arabidopsis* csíranövényekben az *ein3eil1* mutáció csökkentette a POD aktivitását és transzkript szintjeit 3 napos sókezelést követően, így a növények nagyobb mértékű ROF akkumulációval és sóstressz hiperérzékenységgel rendelkeztek [266]. Ugyanakkor, a POD aktivitás csökkenése mellett a mutánsok leveleiben elmaradt a 250 mM NaCl indukálta gátlás a KAT specifikus aktivitásban,

mely az *SIKAT2* és *SIKAT3* expressziós fokozódásával társítható. Bár az *SIKAT3* sokkal nagyobb mennyiségben fejeződött ki a VT levelekben a letális sóstressz 24. óráját követően, mint a mutánsban, a 6. órában tapasztalható expressziós fokozódás a VT levelekben nem figyelhető meg. Érdekes módon, a szubletális sóstressz 6. óráját követő megfigyeléseink a POD aktivitás és az exogén ACC kapcsolatáról ellentétesnek bizonyultak Demir és Oztürk [265] tapasztalataival, a letális sóstressz 24. órájában megfigyeltek azonban jól illeszkednek az eredményeikhez, miszerint a levélre permetezett, exogén Ethephon mérsékeli, míg az ET hatás gátlása erősen csökkenti a POD aktivitást spenótlevélben, 5 órás sókezelést követően. A megfigyeléseink jól mutatják, hogy az ET mennyire komplex módon szabályozza a levél vizsgált enzimatikus antioxidánsainak aktivitását, valamint a ROF koncentrációját a kétféle erősségű sóstressz kialakulása során.

6.3.2.9. A levél NO és a ONOO⁻ akkumulációjának szabályozása eltérő erősségű sókezelések során

A szubletális sókoncentráció csökkenti, a letális növeli a levél NO akkumulációját az 1. órában a VT növényekben, melyre az exogén ACC kezelés és a *Nr* mutáció csupán kisebb befolyással bírt. Ugyanakkor a megváltozott ET státusz szerepe a levél NO produkciójának szabályozásában supraoptimális NaCl koncentrációk jelenlétében a 24. órában drasztikusan felerősödik. 100 mM NaCl kezelésnél mind exogén ACC, mind a mutáns ET receptor, az *Nr* jelenlétében, 250 mM NaCl-nél csak ACC előkezelés mellett kaptunk jelentős emelkedést a szöveti NO szintekben.

Az exogén ACC a NO felhalmozódás fokozása mellett a ONOO⁻ szintjét is növeli szubletális sóstressz a 24. óráját követően, mely összefügghet a megemelkedett ET produkcióval. Eddig csak lúdfűmagvakban figyelték meg, hogy az ACC alkalmazása tovább fokozta a sóindukált NO produkciót, mely kisebb mértékű volt az *ein3-1* mutánsban [197].

Érdekes módon, a *Nr* mutáns levelekben nem figyelhető meg növekedés a ONOO⁻ akkumulációban 250 mM-os NaCl kezelés alatt az első órában, holott megemelkedett O₂^{•-} és NO produkciót detektáltunk bennük, viszont jelentősen megemelkedik a ONOO⁻ szintje a 24. órás mintában. Ahogy már említésre került, a ONOO⁻ keletkezését a O₂^{•-} és a NO együttes lokalizációja szabja meg [273]. Továbbá a PRXR képes detoxifikálni a ONOO⁻-et [77]. A ONOO⁻ felhalmozódás csökkentheti a sejt O₂^{•-} tartalmát, így végső soron védheti a biomolekulákat az oxidációtól és megakadályozhatja a további ROF termelődést [96].

Az exogén ACC jelentősen megemelte a levél NO tartalmát a 250 mM-os NaCl kezelés 24. óráját követően is, amellett, hogy kissé visszafogta a sóindukált ET produkciót, és a ONOO⁻ tartalmát is csökkentette. Az eredményeink a szakirodalmi példákkal megerősítve jól

szemléltetik az ET szabályozó szerepét az említett ROF és RNF típusokra és antioxidáns enzimek aktivitására szubletális és letális sóstressz korai óráiban, továbbá rámutatnak az ET hatás vizsgálatakor az időbeni felbontás fontosságára, valamint az ET eltérő szerepére a levél és a gyökér ROF és RNF akkumulációs mintázatának a kialakulásában a sóstressz korai óráiban.

Összehasonlítva a tolerálható és sejthalált indukáló sóstressz hatását a levelekben megállapíthatjuk, hogy a letális sókoncentráció hatására jóval több $O_2^{\bullet-}$ akkumulálódik a szövetekben, mint szubletális sóstressz esetén, amit csökkent az exogén ACC előkezelés és az *Nr* mutáció. Ehhez hasonlóan a H_2O_2 is nagyobb mértékű felhalmozódást mutat a 250 mM NaCl-dal kezelt növényekben, amit a 6 órás mintavételnél mindkét kezelés, 24 óra után az *Nr* mutáció tovább fokoz. Ennek alapján a szövetek komoly oxidatív stressznek vannak kitéve. Rövid távon sem a NO sem a $ONOO^-$ szintek nem emelkednek drámaian a kezelések hatására. Szubletális sóstressznél az ACC kezelt VT-ben és az *Nr* mutánsokban megemelkedő NO inkább a sótoleranciát fokozza, míg kisebb nitroztatív stressz kialakulhat a megemelkedett $ONOO^-$ akkumuláció hatására a letális sókezelés 24. órájában, amit az exogén ACC mérsékel.

A nagy $O_2^{\bullet-}$ tartalmak kialakulásához a képződést elősegítő folyamatok, így a PM-kötött NADPH oxidáz aktivitásának emelkedése és a fotoszintetikus elektrontranszport is hozzájárulhatnak a levelekben. Ezzel szemben a SOD aktivitás gyors emelkedése a gyökérrel ellentétben mind a szubletális, mind a letális sóstressznél csökkenti a $O_2^{\bullet-}$ koncentrációt. Letális sóstressz során, a H_2O_2 ET státusz-függő akkumulációját a KAT és a POD, valamint az APX specifikus aktivitásának növekedése nem ellensúlyozta a 6. órában. Ugyanakkor ezen enzimek aktivitásának finomhangolása, különösen az APX esetében – melynek a korai aktivációja elmaradt az ACC kezelt/*Nr* növényekben – függ a levelek ET állapotától.

6.3.3. Az ET státusz befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást és a cukorháztartást paradicsomnövényekben sóstressz alatt

6.3.3.1. Az ET státusz hatása a sztómakonduktanciára és a nettó CO_2 asszimilációra szubletális és letális sóstressz alatt

A sóstressz csökkenti a sztómakonduktanciát és a fotoszintézist, egyrészt az ozmotikus komponens vízháztartásra gyakorolt kezdeti hatásán keresztül [162], másrészt a Na^+ és Cl^- ionok megzavarják nemcsak a sejt, hanem a kloroplasztisz ionhomeosztázisát is, mely szintén negatívan érinti a fotoszintetikus aktivitást [163, 166]. Mindez végső soron a biomasszatermelés csökkenéséhez vezet [154]. Sóstressz során a gyökérből a hajtásba történő szignalizációban kiemelt szerepe van az ACC-nek (így az ET-nek). Az ACC és néhány konjugált formája gyorsan transzportálható – akár percek alatt – a növények szöveiben, a xilémen és a floémen keresztül is [118]. A korai, gyökérből kiinduló hormonális szignálok

közül a citokininek és az ABA pozitívan, az ACC negatívan érintette a levélnövekedést, a kis xilém citokinin koncentráció vagy a nagy ACC tartalom szeneszcenciát indukált [283].

A tápoldathoz adott 100 mM-os NaCl rövid időn belül csökkentette a sztómakonduktanciát a VT paradicsomlevelekben, mely a 250 mM-os kezelés esetében jóval erősebbnek bizonyult. Ennek ellenére, a VT levelek fotoszintetikus CO₂ asszimilációjában a későbbi időpontokban volt megfigyelhető jelentős gátlás, mely sokkal drasztikusabbnak bizonyult a letális koncentráció esetében. Bár a RuBisCO nem túl sóérzékeny, a Na⁺ más CBC enzimek aktivitását csökkentheti, így a sóstressz közvetlenül is gátolhatja a fotoszintézist [163]. A NaCl kezelés paradicsomnövényekben egy hét után is szignifikánsan csökkentette a maximális CO₂ asszimilációt, a karboxilációs hatékonyságot és növelte a CO₂ kompenzációs pontot [205]. A supraoptimális sókoncentráció korai – néhány órától 1-2 napig tartó – hatásaira adott növényi válaszreakció rendkívül fontos, mivel a szénasszimiláció komplett megszűnése is bekövetkezhet órákon belül, a sótolerancia fenntartásához pedig szükség van a fotoszintetikus asszimilátumok nyújtotta energiára [284].

Az ET közvetlenül szabályozza a fotoszintézist fiatal/nem-szenescens levelekben és indirekt módon idősebb levelekben, elsősorban a szenescencia befolyásolásával [46]. Ennek ellenére az ET és a fotoszintézis kapcsolatát sóstressz során viszonylag kevés esetben vizsgálták. Az exogén ACC kezelés mérsékelte a sókezelések okozta ozmotikus sokk hatását, ami nemcsak a magasabb vízpotenciál értékekben, hanem a megnövekedett sztómakonduktanciában is megnyilvánult az első órai mintavételnél, mely a 100 mM-os NaCl koncentráció esetében a megfelelő sókezelésben részesített VT levelekhez képest csökkent, míg a 250 mM-os NaCl esetében a fokozott ET emisszióval párosult. A *Nr* mutánsokban stresszmentes állapotban is kisebb sztómakonduktanciát figyeltünk meg. Így a gyökérzóna sókezelése hatására a g_{sw} 100 mM NaCl esetében csak 24 óra múlva, míg a 250 mM NaCl-nál már az 1. órás mintavételnél is szignifikánsan csökkent a megfelelő sókezelt VT-hez képest a *Nr* mutánsok leveleiben. Az ET-inszenzitív *etr1-1* mutáns *Arabidopsis* levelek sztómái is csökkent vezetőképességgel rendelkeztek [46], tehát a normál sztómaműködéshez szükséges a funkcionális *Nr* receptor a paradicsomban is. A folyamatos ET expozícióban növekvő lúdfű növények, vagy a *ctr1-1* konstitutív ET válasz mutánsok, több sztómával rendelkeztek.

A nettó CO₂ fixáció követte a g_{sw} változásait a különböző ET státusszal rendelkező növényekben sóstressz alatt. Míg a szubletális sókoncentráció kisebb mértékű, addig a letális sóstressz korábban jelentkező és drasztikus csökkenést eredményezett a VT növények A_N értékeiben. A *Nr* levelek alapból kisebb CO₂ asszimilációs értékekkel rendelkeztek, melyet a 100 mM NaCl okozta stressz jelentős mértékében csökkentett a 24. órára. Ebben az időpontban,

a megfelelő sókoncentráció jelenlétében, az ACC kezelt növények A_N értékét vizsgálva arra következtethetünk, hogy a funkcionális *Nr* receptor hiánya nagyobb befolyással van a folyamatra, mint a megemelkedett ET produkció. A lúdfű ET-inszenzitív mutánsban (*etr1-1*) alacsonyabb RuBisCO aktivitást, illetve néhány fotoszintézis-asszociált gén, mint például a CAB (klorofill *a/b* kötő protein) és a RuBisCO kis alegység, csökkent mértékű expresszióját figyelték meg, ami arra utal, hogy az ET jelátvitel a fiziológiai hatásokon túlmenően elengedhetetlenül szükséges a kloroplasztisz struktúrájának kialakulásához is [46].

Mindezen túl, a sóstressz által indukált ET-termelés megemelkedése együtt jár a VT levélben a sztómazárás indukciójával, mely eltolódik, amennyiben a gyökeret ACC előkezelés után éri a stresszhatás. Yang és munkatársai [285] a búzanövényeket virágzásuk (anthesis) után 4 napig Ethephonnal permetezték. A kezelés végét követő 10. naptól a zászlós levelek CO_2 asszimilációja és sztómakonduktanciája megnőtt. Továbbá, hosszútávú, erős szárazságstressz során, az említett kezelés hozzájárult a zászlós levelek CO_2 asszimilációjának és sztómakonduktanciájának jobb megőrzéséhez, melyet magasabb ET produkció kísért. Érdekes módon, 24 óra elteltével, a 100 mM-os NaCl kezelés esetében intakt ET jelátvitel, így funkcionális *Nr* receptor szükséges a sztómák normális nyitottsági szintjének megőrzéséhez. Az ET képes gátolni a sötétség és az ABA indukált sztómazárást is [67, 68]. Mindez tovább erősíti az ET-nek, a stressz mértékének megfelelő sztómanyitottságot biztosító modulátorként betöltött funkcióját a paradicsomlevelekben. Hasonló megfigyeléseket tettek üvegházi körülmények között nevelt rizs hosszútávú sókezelése során. Az ET receptor gátló 1-MCP fotoszintézis serkentő hatása függött a fajta sóérzékenységétől is. Például a toleránsabb fajtában az 1-MCP magasabb sókoncentráción serkentette a fotoszintézist, míg az érzékeny fajtában kisebb sókoncentráción is [286]. A sóstressz csökkentette a mungóbab (*Vigna radiata L.*) nettó fotoszintézisét az ET produkció fokozásán keresztül [287].

A CO_2 asszimiláció mértéke és a C_i/C_a arány a szubletális sókezelést követően jól követte a sztómakonduktancia változásait, mely azt mutatja, hogy az ET, a 100 mM-os NaCl jelenléte okozta stresszállapot kifejlődése során, 24 órán belül elsősorban a CO_2 elérhetőségén keresztül befolyásolta a CO_2 fixációt. Ugyanakkor letális sóstressz során, a 6. órától a sztomatikus faktorokon kívül egyéb folyamatok CO_2 asszimilációt gátló hatása is felmerülhet, amire a C_i/C_a arány növekedése utal. Ez a *Nr* mutánsokban kisebb mértékben következett be.

A VT levelek megemelkedett C_i/C_a aránya a 250 mM NaCl kezelést követő 6. órában a sejtek CO_2 kibocsátásának megnövekedését mutatja a fogyasztás rovására, mely itt még egy minimális mértékű CO_2 fixációs aktivitással társul. Ez a változás a 24. órára még drasztikusabbá vált, hiszen a növény CO_2 kibocsátása túlnőtte a CO_2 fogyasztás mértékét, melyet a negatív A_N

értékek is mutatnak. Hasonló megfigyelést tettek búza levelek parakvát kezelése során, ahol a C_i növekedése az A_N és a RuBisCO tartalom csökkenésével társult. A parakvát a PSI akceptor oldalán elnyelt elektronokat az O_2 -re irányítja és így $O_2^{\bullet}$ -ot generál [288]. Ahogy már említésre került, a 250 mM-os NaCl a VT paradicsomlevelekben növelte az ET emissziót és erős $O_2^{\bullet}$ akkumulációt indukált, melyet a *Nr* mutáció, valamint az exogén ACC a 6. órában a $O_2^{\bullet}$ elbontásának serkentésével, míg a 24. órában feltehetőleg a $O_2^{\bullet}$ produkció gátlásával vagy SOD-független kioltásával csökkent. A fotoszintetizáló sejtek CO_2 -ot fogyasztanak, azonban a mitokondriális légzés és a fotorespiráció során CO_2 szabadul fel a sejtekben [289]. A mitokondriális légzés fenntartása alapvető, hogy kielégítse a sejtek ATP és egyéb metabolit szükségletét a sóstressz-válaszok kialakításában [290]. Rizsfajták hosszútávú sötétítésének összehasonlításakor megfigyelték, hogy a sóstressz koncentrációfüggő módon megnövelte a levelek sötétlégzése során kibocsátott CO_2 mértékét, mely az érzékenyebb genotípusokban meghaladta a kontroll állapotban fixált CO_2 mennyiség felét erős sóstressz során [291]. *Arabidopsis* kalluszkultúrák kétnapos kezelése 100 mM NaCl-dal növelte a légzés mértékét, mely *ein2-1* és az *etr1-3* mutánsokban nem következett be. Ugyanakkor magasabb sókoncentrációk jelentősen csökkentették a légzés által fogyasztott O_2 mennyiségét [292]. A fotorespiráció jelensége, mely a RuBisCO oxigenáz aktivitásának az eredménye, a már megkötött CO_2 -t szabadítja újra fel. Ennek ellenére, a fotorespiráció szintén fontos szabályozója a fotoszintézisnek, mivel elektronnyelő folyamat, mely megakadályozza az elektrontranszportlánc túlredukálódását és így a fotoinhibíciót. Különösen fontos ez a stresszfolyamatokban, melyek limitálják a fotoszintetikus CO_2 asszimilációt [57]. *Festuca pratensis* levelek szeneszcenciája során a többszörösére nőtt a fotorespiráció mértéke [293]. Gyapot növények 3 napos sókezelését követően szintén megemelkedett fotorespirációt figyeltek meg, mely $O_2^{\bullet}$ akkumulációval és a nettó fotoszintézis csökkenésével társult [294]. Ezzel szemben, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) növények sós öntözővízzel történő kezelése során két hét elteltével csökkent a fotorespiráció [295]. Bár ET kezelés hatására foszforilálódott néhány, a fotorespirációban is résztvevő enzim borsó mitokondriumokban, e módosítás szerepét a folyamatban még nem tisztázták [296]. A VT paradicsomlevelek fokozott CO_2 kibocsátása és csökkent CO_2 asszimilációja mellé a keményítőtartalom jelentős csökkenése is társul a letális sókezelés 6. és 24. óráját követően. Az ACC kezelés, illetve a *Nr* mutáció mindezeket mérsékelte.

Mint a 6.3.2. fejezetben láttuk, a különböző ET státuszú levelekben a különböző reaktív oxigénformák eltérő koncentrációban akkumulálódnak sóstressz alatt, amihez a fotoszintézis is hozzájárulhat. Másrészt ezek a molekulák közvetlenül szabályozhatják a fotoszintézist. Bár a

H₂O₂ már 10 µM-os koncentrációban is gátolhatja a – CBC tiol-modulált enzimjeinek oxidálásán keresztül – a CO₂ fixációt [297], a 250 mM-os sókezelés 6. órájában nem tapasztaltunk emelkedést a levél H₂O₂ koncentrációjában a VT levelekben, azonban az ACC kezelt és a *Nr* levelekben igen. *Brassica juncea* 24 órás időtartamú sókezelése során alacsonyabb és a magasabb sókoncentrációk is növelték a O₂^{•-} mennyiségét, azonban a PSII aktivitásának szignifikáns csökkenését csupán az utóbbi esetben figyelték meg [274]. A VT levelekben erős *SlCu/ZnSOD* génexpresszió indukciót is tapasztaltunk, mely közvetve jelezheti a kloroplasztisz-lokalizált enzim szükségességét. Bár a különböző sejt-kompartimentumokban képződő H₂O₂ pontos mennyiségének mérése nehezen megvalósítható [298], a megfigyeléseink alapján nem zárhatjuk ki a letális sókezelés indukálta O₂^{•-}, vagy H₂O₂ szerepét az A_N csökkenésében a 6. órában, melyben lényeges szerep jut az ET-nek. Fontos megjegyezni, hogy a fotoszintetizáló, C₃-as sejtekben a fotorespiráció peroxiszóma lokalizált, glikolát oxidáz reakciója az egyik leginkább szignifikáns H₂O₂ termelő folyamat [297].

A tapasztaltakat összevetve elmondható, hogy a letális sóstressz okozta fotoszintézis gátlás kialakulásához az első 24 órában a levél ET emisszió növekedése is hozzájárul, a funkcionális *Nr* receptor meglete pedig javítja a nettó CO₂ asszimilációt szubletális sóstressznél. Elsőként földimogyoró levelekben figyelték meg, hogy az exogén ET gáz gátolja a fotoszintézist [59]. Saját megfigyeléseinkkel ellentétben, saláta csíranövények 13 napig tartó, gyökéren keresztül történő, 10 µM-os ACC kezelése szignifikánsan csökkentette a fotoszintetikus CO₂ asszimilációt és a sztómakonduktanciát stresszmentes körülmények között [239]. Ez azt mutatja, hogy az ACC rövid távon más hatást gyakorol a fotoszintézisre, illetve, hogy ez a hatás különböző képpen jelentkezhet a fotoperiódus eltérő időszakában. Ezt a következtetést támasztja alá az is, hogy az ET felszabadulás kapcsolódhat a fotoszintetikus aktivitás változásához [122]. Fontos megjegyezni, hogy az ET részt vesz a stressz mértékének megfelelő válaszok kialakításában, a hormon mennyisége vagy éppen a jelátvitelének hiányossága ellentétes hatást válthatnak ki szubletális és letális stressz során a CO₂ asszimilációban. ET-inszenzitív (*etr1-1*) lúdfű fiatal leveleiben csökkent, míg az idősebb levelekben megemelkedett RuBisCO aktivitás tapasztaltak a VT növényhez viszonyítva [46] ami azt mutatja, hogy az ET eltérő fiziológiai környezetben ellentétesen hathat a CO₂ fixációra.

6.3.3.2. Az ET státusz hatása a klorofill a fluoreszcencia indukciós paraméterekre és a PSI aktivitásra szubletális és letális sóstressz alatt

Az F_v/F_M, F₀ és a Y(NO) klorofill fluoreszcencia paraméterekben nem tapasztaltunk jelentős változást a kísérlet során, mely arra enged következtetni, hogy a kezelések nem

növelték a fotoinhibíciót 24 órán belül [298, 299]. Paradicsomnövények 7 és 15 napos sókezelése során sem figyeltek meg csökkenést az F_v/F_m paraméterben, melyet nem befolyásolt az inokuláció egy ACCD enzimmel rendelkező baktériumtörzsszel [300].

A 100 mM-os NaCl kezelés nem befolyásolta a PSII és a PSI aktivitását az Ailsa Craig fajta VT leveleiben a kísérlet időtartama alatt, mely az ACC kezelt növényekben is hasonlóan alakult. Az Ailsa Craig fajtához hasonlóan egy hetes, 100 mM-os NaCl kezelés sem befolyásolta PSII maximális és effektív kvantumhatásfokát Fio Fuego fajtájú VT paradicsomlevelekben [205]. Az *etr1-1*, ET-inszenzitív *Arabidopsis* mutánsok alacsonyabb PSII aktivitással rendelkeztek [46], mely a paradicsom *Nr* mutánsok esetében csupán az 1 órás mintavételi ponton volt megfigyelhető. Ugyanakkor 100 mM NaCl hozzáadására a *Nr* mutánsok Y(II) értéke azonnali csökkenéssel válaszolt, mely nem regenerálódott a későbbi időpontokban sem. A jelenség háttérben a mutánsokban megfigyelhető erőteljesebb NPQ áll, melyet a 100 mM-os NaCl kezelés tovább fokoz a 6. órától. ET túltermelő, *eto1-1* és konstitutív ET válasz, *ctr1-3* *Arabidopsis* mutánsokban defektust mutattak ki az NPQ kialakulásában, mivel a mutációk represszálták az NPQ legnagyobb hányadát adó, energia-függő kioltáshoz kapcsolódó xantofill ciklus egyik kulcsenzimének, a violaxantin-deepoxidáznak (VDE) az expresszióját, valamint a gátolták az enzim aktiválódását – a transztilakoidális ΔpH csökkentéséből kifolyólag – magasabb fényintenzitásokon. A VDE expressziójának mesterséges megemelése a mutánsokban mérsékelte a fénystressz által fokozott fotoinhibíciót és a $O_2^{\bullet -}$ akkumulációt [301]. Letális sóstressz során, a *Nr* mutánsok a VT leveleknél nagyobb mértékű Y(NPQ) növekedéssel válaszoltak, mely kisebb Y(II) értékekhez vezetett.

A sókezelés indukálta, Y(II) csökkenéssel összhangban, a PSI donor oldali limitációja megnőtt a mutánsokban, ugyanakkor szimultán csökkent a Y(NA) mértéke, mely az erőteljesen aktiválódott CEF-PSI-nek köszönhető. Bár a letális sókezelést követő 6. és 24. órában ugyanez a VT levelekben is megfigyelhető, a változások mértéke viszont kisebb, szubletális stressz során pedig a mutánsokban leírt állapot nem alakul ki. Érdekes módon, a 250 mM-os NaCl kezelést követő első órában, a *Nr* mutánsokban nem jelentkeznek a többi esetben megfigyelt változások. Sóstressz során a *Nr* levelek jelentős mértékben megemelkedett, fényregulált NPQ értékeiért a CEF-PSI megemelkedése felelős. Ahogy már szóba került, a CEF képes elősegíteni a proton elektrokémiai potenciál grádiens (ΔpH) létrejöttét a tilakoidmembránokban és így a NPQ fokozásával megvédi a két fotokémiai rendszert a fotoinhibíciótól [243]. Ez további magyarázattal szolgál a Chen és Gallie [301] által, magasabb fényintenzitásokon megfigyelt, csökkent transztilakoidális ΔpH értékek kialakulására intenzív ET jelátvitellel rendelkező *Arabidopsis* mutánsokban, illetve megfigyeléseiket részben meg is erősíti az ellentétes ET

jelátviteli változással rendelkező, *Nr* mutánsokban tapasztalt, fokozott NPQ. Tehát az ET képes szabályozni a CEF-PSI működését a *Nr* receptoron keresztül sóstressz során.

Az exogén ACC kezelés során nem alakult ki a CEF-PSI, és így az NPQ indukciója a 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 6 óra elteltével, mely megakadályozta a Y(II) csökkenést, valamint a Y(ND) megemelkedését. A letális sókoncentráció által indukált CO₂ fixáció csökkenése azonban megnövelte a PSI akceptor oldali limitációját, ugyanakkor, ez nem okozott nettó változást a PSI aktivitásában. Ez az állapot hosszú távon fenntartva a PSI károsodásához is vezethet [302], melyet a Y(NO) enyhe megemelkedése is jelez. Mindazonáltal, a szóban forgó kezelés során megfigyeltek nem vezettek erős O₂[•] akkumulációhoz a levélben. Bár a letális sóstressz 24. órájára az ACC kezelt növényekben is nőtt a Y(CEF)/Y(II) és az NPQ, ez előbbi alulmaradt a csak 250 mM-os NaCl-ot kapott, VT növények leveleihez mérten, így a PSI aktivitásában is nagyobb arányú csökkenés következett be. A CEF-PSI aktivitása sóstressz során alapvető szerepet játszhat, mivel nemcsak extra ATP-t termel, hanem csökkenti a ROF képződést is [163]. A magas sókoncentráció 4 napot követően, a PSII mellett a PSI fotoinhibícióját is eredményezte görögyszéna levelekben, mely a PSI esetében az akceptor oldali változásokból fakadhat. Azonban, alacsonyabb sókoncentráción, illetve rövidebb expozíciós időt követően, a PSI limitációja a CO₂ fixáció gátlásából fakadó, csökkent NADPH fogyasztásból adódhat [303]. Az általunk tapasztaltak felvetik annak a lehetőségét is, hogy míg a *Nr* levelekben a letális sókezelés esetében az RBOH1-függő működés, addig az ACC kezelt növényekben a fotoszintetikus elektrontranszport játszhatott nagyobb szerepet a O₂[•] képződésében [302]. Természetesen, egyéb, általunk nem vizsgált faktorok is befolyásolhatják a O₂[•] termelődését – melynek ismert keletkezési pontjai az irodalmi áttekintés során már említésre kerültek – a vizsgált csoportokban, azonban a megfigyeltek azt sugallják, hogy az ACC kezelt és a *Nr* növények leveleiben a O₂[•] produkció különböző eredetű lehet. A *CitERF13* ET válasz transzkripciós faktor tranziens overexpresszáltatása dohánylevelekben szignifikánsan csökkentette a PSI és a PSII kvantumhatásfokát 2 nappal a *CitERF13*-at hordozó *Agrobacterium tumefaciens* szuszpenzióval történő infiltrálást követően. A PSI leszabályozása mögött ebben az esetben a PSII effektív kvantumhatásfokának NPQ-független csökkenése állt [72]. Tehát a két fotokémiai rendszer működése nagyban befolyásolt a növények ET státusza által, továbbá, a *Nr* receptor „kiesése” az ET-érzékelésből némileg más hatást gyakorol a PSI és PSII aktivitására a letális sóstressz korai időszakában, mint az exogén ACC kezelés okozta változások. Hosszú távú nehézfémstressznek kitett mustár növényekben, a levelek Ethephon kezelése mérsékelte a nikkel (Ni) és Zn okozta fotoszintézis gátlást a sztómakonduktancia, a RuBisCO aktivitás növelésén, valamint az NPQ csökkentésén keresztül, melyhez – a 250 mM-

os NaCl alkalmazása során tett megfigyeléseinkhez hasonlóan – az ET-termelés enyhe csökkenése társult a levelekben [304]. Ez tovább erősíti azt a feltételezést, hogy az ET hatása a fotoszintézisre erős sóstressz során függhet a prekursorok mennyiségétől is. Mindezen túl, a kísérleteink során nem figyeltünk meg jelentős változást a fényadaptált PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciójában, mely tovább erősíti a megfigyelést, hogy a sóstressz e korai időszakában elsősorban a CO₂ fixáció és így a PSI rendelkezik nagyobb érintettséggel, melyet jelentős mértékben befolyásol a *Nr* receptor és a gyökérszóna exogén ACC előkezelése, különösen a letális sókoncentráció esetében. Ezen túlmenően, míg a csökkent CO₂ asszimiláció és a PSI-CEF ebből fakadó túlérzékenysége hosszú távon hátrányt jelenthet szubletális sóstressz során a *Nr* növényeknek, addig letális sóstressz során a levelek fotoszintetikus aktivitásának megőrzése rövidtávon akár jobb túlélési esélyeket jelenthet. Az *SlETR5* homológ, *CcEIN4* (*Coffea canephora* EIN4) antiszensz konstrukciót expresszáló, tehát az ET jelátvitelben gátolt paradicsom csíranövények magas sókoncentráción jobb növekedési paraméterekkel rendelkeztek, valamint sikerebben őrizték meg a hajtás K⁺/Na⁺ arányát [305].

6.3.3.3. Az ET státusz hatása az oldható cukor- és a keményítő tartalomra szubletális és letális sóstressz alatt

A fotoszintézis ET státusz általi meghatározottságából következik, hogy az ET jelátvitel a fotoszintézis közvetlen termékeinek, az oldható szénhidrátoknak és a keményítőnek az akkumulációját is befolyásolja. A magas sókoncentrációjú talajokban a növényi szövetek, elsősorban a gyökér intercelluláris tereiben található sóoldatok ozmotikus potenciálja kibillentí az apoplast és szimplaszt közti vízpotenciál egyensúlyát, mely turgornyomás csökkenést és végül növekedésgátlást eredményez. Ebben a helyzetben a sejtek ozmotikus adaptációra való képessége határozza meg a túlélésüket [150]. Az ozmotikus adaptáció megtörténhet szervetlen ionok felvételével, ami közül a Na⁺ fiziológias koncentráció fölötti akkumulációja károsítja a fehérjék térszerkezetét, vagy kompatibilis ozmolitok akkumulálásával, melyek lehetnek egyszerű cukrok (pl. a glükóz, fruktóz), diszacharidok (pl. a szacharóz) vagy cukoralkoholok (pl. szorbitol). Feladatuk, hogy helyreállítsák a sejt ozmotikus potenciálját a metabolikus folyamatok gátlása nélkül. Továbbá ozmoprotektánsként védik a fehérjéket, a makromolekuláris aggregátumokat, a membránokat, illetve antioxidánsokként is funkcionálnak [152]. A CBC-ban keletkező glükózfoszfát átmenetileg a kloroplasztisban raktározódik keményítő formájában, ami a sötétperiódusban hidrolízis után biztosítja a szénforrást a metabolizmus számára.

A VT gyökerek oldható cukor tartalmában megfigyelhetőek napszakos eltérések, melyet megváltoztat a *Nr* mutáció és az exogén ACC kezelés. A 100 mM ill. 250 mM-os NaCl

hozzáadását követő 1. óra elteltével a VT gyökerekben az oldható cukrok mennyiség csökkent a kezeletlen kontrollhoz képest, ezzel szemben intenzív keményítő felhalmozódás volt megfigyelhető az oldható cukrok mennyiségének rovására. A 100 mM-os NaCl-dal kezelt *Nr* és az ACC gyökerekben ebben az időpontban az oldható cukrok akkumulációja nagyobb a VT-nél, keményítő felhalmozódás ugyanakkor nem változott. A VT és az ACC kezelt gyökerekben viszont szignifikáns mértékben megnőtt az oldható cukrok mennyisége a 6. órában. A 100 mM-os NaCl-dal szemben a letális sókoncentráció kisebb befolyással bírt a gyökerek oldható cukortartalmára. Általánosságban az is megállapítható, hogy a kezeletlen *Nr* kontrollal összehasonlítva a sókezelések enyhébb hatást gyakoroltak *Nr* gyökerek oldható cukor akkumulációjára, mint a többi mintánál. A gyökerek keményítő tartalmában később csupán apróbb változások voltak tapasztalhatók.

Az ET sokféle szinten szabályozhatja a szövetek oldható szénhidrát tartalmát. Közvetlenül hathat a glükóz transzportjára a növényekben [306]. Az ET kezelés képes szabályozni a szénhidrátok transzport formáját, a szacharóz szintéziséért és transzportjáért felelős gének expresszióját. Érdekes módon az ET felgyorsíthatja a cirkadián oszcillátort, hogy lerövidítse a cirkadián periódust, mely felborítható exogén szacharóz kezeléssel is [46].

A levelek oldható cukor és keményítő akkumulációja némileg eltérően alakult. A szubletális sókoncentráció, 24 órát követően intenzív oldható cukor felhalmozódást okozott a levelekben, mely ellentétesen alakult a gyökérben. A *Nr* mutáció mindkét esetben – az ACC kezelés csak a gyökérben – mérsékelte a hatást. A letális sókoncentráció nem emelte a levelek oldható cukor tartalmát a 24. órára, mely esetben a *Nr* mutáció és az exogén ACC kezelés kifejezetten serkentő hatásának bizonyult. –Az endogén ET megléte szükséges a szacharóz, raffinóz és sztachióz felhasználásához *Medicago sativa* L. szomatikus embriókban [307], ami összhangban van azzal, hogy az *Nr* mutánsok sóstressz alatt akkumulálják az oldható cukrokat mind a hajtásban, mind a gyökérben. Paradicsomnövények 100 mM NaCl kezelése ugyanakkor egy hét után csökkentette a szacharóz koncentrációt a gyökérben és a levélben, a glükóz és fruktóz tartalmat pedig csak a gyökérben, míg a hajtásban megnőtt a fruktóztartalom [205].

A *Nr* mutáns levelek a csökkent CO₂ fixáció ellenére sokkal magasabb keményítő tartalommal rendelkeztek, mint a VT társaik, mely arra enged következtetni, hogy az ET jelátvitel szerepet játszik a keményítő bioszintézis, lebontás és a fotoszintézis közti egyensúly kialakulásában. Ugyanakkor, rizs ETR2 RNSi (RNS interferencia) mutánsok internodulusaiban csökkent keményítő akkumulációt figyeltek meg az α -amiláz gén expressziójának fokozódása miatt [308], míg a magas ET emisszió gátolta a keményítő akkumulációt rizsben [286].

Steady state állapotban a fotoszintézis sebessége csökkenhet a citoszolikus anorganikus foszfát (P_i) és a kloroplasztikus trió-z-foszfátok cseréjének lassulása során. E körülmények között a fotoszintetikus termékek túlzottan akkumulálódnak a kloroplasztisban és a nem megfelelő P_i elérhetőség a belső keményítő raktározást favorizálja a fotoszintézis sebességének rovására. Hasonló jelenség történik a trió-z-foszfátok citoszolikus felhalmozódása során is. A sóstressz lecsökkenti a redukált szénváz-elvonó erőt a növényekben, ami a felhasználó szövetek növekedésének gátlását eredményezi, mely keményítő felhalmozódáshoz vezet a szövetekben [309]. A sóstressz első 24 órájában ez nem jelent szignifikáns száraz tömeg csökkenést saját kísérletünkben a paradicsomnövényekben. A CO_2 asszimiláció sókezelések okozta csökkenése a levél keményítőtartalmát is csökkenti, mely a *Nr* levelekben nem, vagy csak kisebb mértékben következett be, továbbá, a 24. órára mindkét sókoncentráció esetében nőtt. A letális sóstressz okozta változások a levelek keményítő akkumulációjában merőben eltérőek a csak sókezelést kapott VT, illetve az ACC kezelt, vagy *Nr* mutáns növényekben. Míg az utóbbi kettő esetében intenzív keményítő raktározás figyelhető meg a 24. órában, addig a VT levelekben e raktárak kimerülése látható, mely jó összhangban van az CO_2 asszimiláció változásaival. Amennyiben elégtelen mennyiségű keményítő szintetizálódik a fényperiódus során, a növényben szénéhezés léphet fel [309]. Szubletális sóstressz során azonban, a keményítő akkumuláció csökkenése leginkább az oldható cukrok mennyiségének növekedésével társul, mely pótolja a CO_2 asszimiláció csökkenéséből fakadó energiahányt, valamint növeli az ozmoprotektánsok mennyiségét [309]. A fotoszintézist limitáló környezetben a keményítő remobilizálása alapvető folyamat a szövetek redukált szénvázal történő ellátásának fenntartásához [310]. Azzal kapcsolatban, hogy a NaCl keményítő akkumulációt és ezzel társuló oldható cukor tartalom kimerülést okoz-e, vagy ennek a fordítottja igaz, ellentétes eredmények lelhetők fel a szakirodalomban. Például sóadaptált eukaliptusz hajtásban, keményítő és az oldható cukrok felhalmozódását is megfigyelték [311], ugyanúgy ahogy a *Nr* levelekben a sókezeléseket követő 24. órában. Bár a *Nr* mutánsok oldható cukor tartalma a letális sóstressz 24. órájára jelentősen megnőtt, a vízpotenciál értékeiket nem voltak képesek megtartani, mely egyéb, kompatibilis ozmolitok szükségességét jelzi. Hasonló megfigyelést tettek *Arabidopsis ein2-5* és *ein3-1* ET inszenzitív mutánsokban vízhiány során, ahol az oldható cukrok mennyisége nőtt a kezeletlen növényhez képest, de egyes ozmotikusan aktív szénhidrátok – mint a glükóz a fruktóz és a szacharóz – akkumulációja viszont szignifikánsan alacsonyabb volt. Ebben az esetben azonban a VT levelek oldható cukor felhalmozása jóval nagyobb mértékűnek bizonyult a mutánsokénál [99]. Továbbá, míg az ACC kezelt növények leveleiben, sóstressz során nem tapasztaltunk jelentős emelkedést az oldható cukor akkumulációban a többi kezeléshez

viszonyítva, addig e növények jóval hatékonyabban őrizték meg vízpotenciáljukat, így kisebb mértékű ozmotikus stresszben részesültek, mint a *Nr*, vagy a csak sókezelést kapott VT levelek. A megelőző fejezetekben tárgyaltuk, hogy az exogén ACC képes befolyásolni a levelek glükóz, fruktóz, szacharóz és szorbitol tartalmát is. Azonban feltételezhető, hogy az ACC-indukált ozmotikus adaptációban más, az oldható cukrokon kívüli komponensek is szerepet játszanak. Arabidopsis *ein2-5* és *ein3-1* mutánsokban a VT levelekhez viszonyítva csökkent a szacharóz tartalom sóstressz során, azonban a *ctr1-1* mutánsokban ez megnőtt, ami azt mutatja, hogy az egyes mono- vagy diszacharidok akkumulációjának ET általi szabályozottsága fajoként eltérhet [196]. Az exogén ACC később kisebb mértékben befolyásolta a VT levelek keményítőtartalmában megfigyelhető, sókezelés indukálta változásokat.

A citoplazma vízpotenciáljának csökkenése a víz kiáramlása miatt „zsugoríthatja” a sejten belüli teret, mely inaktíválhatja a fotoszintézist. Ez összefüggésben lehet más enzimatikus változással is. A fruktóz-1,6-biszfoszfát (FBP) például akkumulálódhat a kloroplasztisz sztrómában alacsony vízpotenciál esetében a csökkent FBPáz aktivitás miatt, így a fruktóz-6-foszfát mennyisége lecsökken, mely limitálja a fotoszintézist [284].

7. Összefoglalás

A paradicsomnövények etilén (ET) érzékenységet és ET státusztól függő sóstressz-válaszait kétféle megközelítésben vizsgáltuk. Tanulmányoztuk egyrészt a gyökérközegben, hidropónikus kultúrában alkalmazott exogén 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) koncentráció sorozat hatását paradicsomnövények legfontosabb fiziológiai folyamataira, amellyel választ szeretnénk volna kapni arra a kérdésre, hogy milyen hatást gyakorol a gyökérközegben, külső tényezők hatására megemelkedett ACC koncentráció azokra a mechanizmusokra, amelyek szerepet játszhatnak az indukált szerzett rezisztenciához hasonlóan egy ezt követő abiotikus stressz akklimatizáció folyamatának gyorsításában.

Második kísérlet sorozatunkban vizsgáltuk a szubletális (100 mM) és a letális (250 mM NaCl) sóstressz hatását különböző ET státuszú paradicsomnövények [vad típus (VT), 10 μ M ACC-vel előkezelt VT és ET receptor mutáns, *Never ripe* genotípus] sóstressz akklimatizációban szerepet játszó fiziológiai válaszaiban. Így tanulmányoztuk a vízháztartás, a fotoszintézis, valamint az oxidatív és nitroztatív stresszben szereplő különböző reaktív oxigén- (ROF) és nitrogénformák (RNF) keletkezését, a ROF kioltásában szerepet játszó enzimek aktivitását, valamint a kódoló gének expresszióját a különböző ET státuszú növényekben a sóstressz akklimatizáció során, amellyel választ szeretnénk volna kapni arra, hogy mi az ET szerepe a sóstressz-válasz korai időszakában.

Fontosabb megfigyeléseinket az 5. melléklet foglalja össze grafikus formában.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat fogalmaztuk meg:

- 1. A gyökérkezelésként adott ACC többlet egy koncentrációs küszöbértéket meghaladva indukál szignifikáns ET emissziót, ami a gyökerekben nagyobb mértékű, azonban ennek elérése nélkül is fiziológiai válaszokat vált ki.**
- 2. A gyökérszónában bekövetkező, nagyon enyhe ACC koncentráció emelkedés (0,01-1 μM) növeli a száraz biomassza gyarapodást a paradicsomnövények hajtásában, nitroztív stresszt gátló környezetet alakít ki a ROF és RNF molekulák akkumulálódási mintázatában, a gyökércsúcsokban és a levélben egyaránt.** Ugyanakkor a magas (100 μM) ACC koncentráció száraztömeg csökkenést, valamint a ROF és RNF felhalmozódását eredményez. Az exogén ACC kezelés tehát növényi szerv és koncentráció-függő módon fokozta a H_2O_2 felhalmozódást, valamint befolyásolta a NO és a ONOO^- akkumulációs mintázatát. Ugyanakkor a nagy koncentrációjú ACC kezelés sem okozta a növények pusztulását és az enyhe oxidatív stressz kedvező lehet az antioxidáns folyamatok aktiválásának elősegítésében.
- 3. Az exogén ACC jelenléte a gyökérszónában koncentráció és expozíciós idő függvényében serkentheti vagy gátolhatja a fotoszintézist és befolyásolja a két fotokémiai rendszer működését nem öregedő paradicsomlevelekben.** Az alacsony 0,01 és 1,0 μM -os ACC koncentrációk a kezelés utáni első két napon serkentőleg hatnak a nettó CO_2 fixációra, a 0,01 μM -os ACC szignifikánsan emeli a PSI kvantumhatékonyságát és megváltoztatja a nem fotokémiai kioltási profilját, míg a PSII-re gyakorolt hatása csekély. A 100 μM -os ACC kezelés kifejezetten gátolja a nettó CO_2 asszimilációt és a PSII effektív kvantumhatékonyságát, ezzel szemben a PSI kvantumhatásfoka kisebb érzékenységet mutat. **Az ACC kezelések – eltérő idő és intenzitásbeli lefolyással – indukálták a fényvédelmi folyamatokat, elsősorban a PSI ciklikus elektronáramlás (CEF-PSI) kapcsolt nem fotokémiai kioltás (NPQ) fokozásán keresztül.**
- 4. A K^+/Na^+ arányokban a 100 μM ACC kezelés hatására kialakuló csökkenés enyhe sóstressznek tekinthető, ami priming hatású is lehet egy azt követő ozmotikus-/sóstressz akklimatizáció során, ennél fogva az ACC által kiváltott eustresszként definiálható.** A 0,01-1,0 μM ACC növeli az oldható cukor és szorbitol tartalmakat, ami szintén hozzájárulhat egy ozmotikus komponenst is tartalmazó abiotikus stressztolerancia kialakításához.

5. **Az ET receptor mutációja a *Nr* paradicsomnövényekben fokozott érzékenységet eredményez a szupraoptimális sókoncentrációkkal szemben, a gyökércsúcsok már szubletális stressz esetén is mutatják a sejthalál jellegzetes fiziológiai tüneteit.** Ennek oka a gyökércsúcsokban a szubletális (100 mM) és letális (250 mM) NaCl kezelés által kiváltott ROF és RNF akkumuláció. A VT gyökércsúcsokban a $O_2^{\bullet}$ a letális sókoncentráció hatására akkumulálódott, míg a H_2O_2 megnövekedett akkumulációja a tolerálható sóstressz esetén alakult ki. Az ET jelátvitelben blokkolt *Nr* növényekben a VT növények számára még tolerálható, 100 mM NaCl koncentrációnál is magas $O_2^{\bullet}/H_2O_2$ arány alakult ki, ami kedvező a programozott sejthalál (PCD) indukciója szempontjából. A detektált ROF/RNF akkumuláció következtében a nitro-oxidatív stressz jelentősebb lehet a *Nr* gyökerekben már alacsony NaCl koncentrációnál is. Ez nagyobb elektrolit-kieresztésben, fokozott DNS degradációban és a proteolízis, valamint a cistein proteázok aktivitásának emelkedésében nyilvánult meg.

6. **Az ET sóstressz akklimatizációban betöltött szerepét különböző ET státuszú növényekben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *Nr* mutáció növelte a K^+/Na^+ arány csökkenésében megnyilvánuló ionikus stresszt, míg az exogén ACC kezelés jelentősen mérsékelte a levélszövetek vízpotenciáljának csökkenését sóstressz alatt, ami az só-indukált ozmotikus stressz csökkenésére utal.**

7. **A növények ET státusza szabályozza a ROF és RNF molekulák akkumulációját a sóstressz kialakulása során.** A gyökércsúcsokban mind az exogén ACC által indukált ET/ACC többlet, mind az ET jelátvitel blokkolása oxidatív, illetve nitrooxidatív stresszt váltott ki letális sóstressz alatt, amelynek hátterében eltérő mechanizmus áll. Bár mindkét esetben megemelkedett a $O_2^{\bullet}$ és $ONOO^-$ akkumuláció, ez exogén ACC kezelés mellett erőteljesebb. Míg a $O_2^{\bullet}$ akkumulációt a *Nr*-ban elsősorban a SOD gátlás okozza, a H_2O_2 elbontásához a mutánsban kisebb mértékben járul hozzá a KAT és rövid távon az APX, mint az ACC kezelt gyökerekben. Letális sóstressznél a gyökércsúcsok ET státuszának változása (exogén ACC, *Nr*) növeli a sóérzékenységet.

Tolerálható sóstressznél azonban az exogén ACC kezelés jelentősen csökkenti a $O_2^{\bullet}$ felhalmozódását rövid távon, viszont nem csökkenti a H_2O_2 akkumulációt, ami mérsékeli az oxidatív stresszt. A korai H_2O_2 akkumuláció a VT gyökércsúcsokban lehetővé teszi olyan antioxidáns enzimek korai expresszió indukcióját (*SlAPX2*) és enzimatisz aktiválódását, mint az APX, míg a letális sókoncentrációnál a H_2O_2 lebomlásához a POD és a KAT aktivitás indukciója nagyobb mértékben járul hozzá, utóbbi különösen az ACC kezelt mintákban és a *Nr*-ban jelentős. Ezekben a gyökércsúcsokban azonban az antioxidáns enzimek aktiválódásának ellenére a sóstressz hatására csökken a sejtek életképessége.

8. **A levelek 24 órán belül kisebb érzékenységet mutatnak a sóstresszel szemben, mint a gyökerek. Összehasonlítva a tolerálható és sejthalált indukáló sóstressz hatását a levelekben megállapíthatjuk, hogy a letális sókoncentráció hatására jóval több $O_2^{\bullet-}$ akkumulálódik a levélszövetekben is, mint szubletális sóstressz esetén, amit csökkent az exogén ACC előkezelés és a *Nr* mutáció.** Ehhez hasonlóan a H_2O_2 is nagyobb mértékű felhalmozódást mutat a 250 mM NaCl-dal kezelt növényekben, amit a 6 órás mintavételnél az ACC előkezelés és a *Nr* mutáció tovább fokoz, így a szövetek komoly oxidatív stressznek vannak kitéve. Rövid távon sem a NO sem a ONOO⁻ szintek nem növekedtek drámaian a kezelések hatására. Szubletális sóstressznél az ACC kezelt VT-ben és a *Nr* mutánsokban megemelkedő NO inkább a sótoleranciát fokozza, míg kisebb nitrozatív stressz kialakulhat a fokozott ONOO⁻ akkumuláció hatására a letális sókezelés 24. órájában, ezt azonban az exogén ACC mérsékeli.

A nagy $O_2^{\bullet-}$ tartalmak kialakulásához a képződést elősegítő folyamatok (PM-kötött NADPH oxidáz aktivitásának emelkedése, fotoszintetikus elektrontranszport) is hozzájárulhatnak. A SOD aktivitás gyors emelkedése a gyökérrel ellentétben a letális sóstressznél csökkenti a $O_2^{\bullet-}$ koncentrációt 24 óra múltán. Az ACC előkezelt és a *Nr* mutáns levelekben ugyanakkor a VT-hez képest csökkent $O_2^{\bullet-}$ akkumuláció figyelhető meg 24 óra elteltével, melyet azonban mérséklődött SOD specifikus aktivitás kísér, ami a $O_2^{\bullet-}$ generáló folyamatok csökkenésére utal. Letális sóstressz során, a H_2O_2 ET státusz-függő, korai akkumulációjáért az APX aktivitás csökkenése és a SOD aktivitás emelkedése okolható. Az intenzívebb SOD aktivitás generálta H_2O_2 felhalmozódást a KAT és a POD, valamint az APX specifikus aktivitásának növekedése sem volt képes ellensúlyozni a 6. órában, az ACC kezelt vagy a *Nr* levelekben. **A letális sóstressz korai óráiban a SOD és H_2O_2 bontó enzimek aktivitásának finomhangolása szabályozza a levél H_2O_2 tartalmát, mely nagyban függ a levelek ET állapotától.**

9. **Az ET státusz befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást és a cukorháztartást paradicsomnövényekben sóstressz alatt.** A 100 mM-os NaCl rövid időn belül csökkentette a sztómakonduktanciát a VT paradicsomlevelekben, mely a 250 mM-os kezelés esetében jóval erősebbnek bizonyult, de az ACC előkezelés mindkét esetben mérsékelte a sóstressz hatását. A nettó CO_2 asszimiláció mértéke és a C_i/C_a arány a szubletális sókezelést követően jól követte a sztómakonduktancia változásait, mely azt mutatja, hogy az ET tolerálható sókoncentrációnál 24 órán belül elsősorban a CO_2 elérhetőségén keresztül befolyásolta a CO_2 fixációt. Ugyanakkor letális sóstressz során, a sztomatikus faktorokon kívül egyéb folyamatok CO_2 asszimilációt gátló hatása is felmerülhet, amire a C_i/C_a arány növekedése utal. Érdekes, hogy az A_N csökkenése letális stressz esetén az ACC kezelt növények leveleiben vagy a *Nr*

mutánsokban kisebb mértékben következett be, mint a megfelelő sókezelést kapott VT növények esetében. **Az ET tehát részt vesz a stressz mértékének megfelelő válaszok kialakításában. A hormon mennyisége vagy éppen a jelátvitelének hiányossága ellentétes hatást válthatnak ki szubletális és letális stressz során a CO₂ asszimilációban.**

10. A sókezelések nem növelték a fotoinhibíciót 24 órán belül, mivel az F_v/F_m , F_0 és a $Y(NO)$ klorofill fluoreszcencia paraméterekben nem tapasztaltunk jelentős változást. A 100 mM-os NaCl kezelés nem befolyásolta a PSII és a PSI aktivitását az Ailsa Craig fajta VT leveleiben. Ugyanakkor 100 mM NaCl hozzáadására a *Nr* mutánsok $Y(II)$ értéke jelentős azonnali csökkenéssel válaszolt, melynek háttérében a mutánsokban megfigyelhető magas NPQ áll, melyet a 100 mM-os só kezelés tovább fokoz.

A letális sókezelés indukálta $Y(II)$ csökkenéssel összhangban, a PSI donor oldali limitációja megnőtt, ugyanakkor szimultán csökkent a $Y(NA)$ mértéke, mely az erőteljesen aktiválódott CEF-PSI-nek köszönhető, ami a *Nr* levelek esetében még tovább fokozódott mindkét sókoncentráció esetében. A 100 mM-os és 250 mM-os NaCl kezelést követően a *Nr* levelek jelentős mértékben megemelkedett, fényregulált NPQ értékeiért a CEF-PSI megemelkedése felelős. Az exogén ACC kezelés a 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 6 óra elteltéig gátolta a CEF-PSI növekedését és így a NPQ indukcióját, mely megakadályozta a $Y(II)$ csökkenést, valamint a $Y(ND)$ megemelkedését. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a PSII gátlását az exogén ACC kezelés késleltette, ugyanakkor a $Y(NA)$ szimultán megemelkedésével megnövelte az esélyét az elektronok O₂-re jutásának, illetve a PSI fotoinhibíciójának. **Az ET tehát képes szabályozni a CO₂ asszimilációt a sztómakonduktanciától függő és független módon, a fotoszisztémák kvantumhasznosítását és a fotoprotektív folyamatokat, így PSI-CEF működését a *Nr* receptoron és az ACC elérhetőségén keresztül sóstressz során. Mindezek alapján PSI-CEF fontos és eddig ismeretlen résztvevőként javasolható abban a folyamatban, mely során az ET represszálja a NPQ legnagyobb hányadát adó, energiafüggő kioltáshoz kapcsolódó xantofill ciklus egyik kulcsenzimének, a violaxantin-deepoxidáznak (VDE) az aktiválódását.**

11. A *Nr* mutáns levelek a csökkent CO₂ fixáció ellenére sokkal magasabb keményítő tartalommal rendelkeztek, mint a VT társaik, mely arra enged következtetni, hogy **az ET jelátvitel szerepet játszik a keményítő bioszintézis/lebontás és a fotoszintézis közti egyensúly kialakulásában.**

12. **Az ET státusz változására a levél és a gyökér eltérően reagált.** A gyökércsúcsok életképességét a sóstressz az ET státusztól függetlenül csökkentette, viszont mind az ACC előkezelt, mind a *Nr* gyökerek érzékenyebbnek bizonyultak a szubletális sóstresszre a VT-nál.

Ez azonban még nem okozza a növényegyedek pusztulását, mert a hajtás sikeres akklimatizációja esetén újabb járulékos gyökerek indukálódhatnak. A levelekben az exogén ACC a *Nr* mutációval ellentétben több esetben növelte a sztómakonduktanciát és rövid távon a nettó CO₂ asszimiláció mértékét, és a *Nr* mutációval szemben emelte a PSII kvantumhatékonyságát is, ami elősegítheti a hajtás adaptációját. **Ugyanakkor, letális sókoncentráció jelenlétében, a *Nr* mutáció rövidtávon okozhat pozitív hatást egyes fiziológiai folyamatokra, mint például a fotokémiai rendszerek hatékonyabb fényvédelme és megtartott CO₂ asszimilációs aktivitás. Ez azt mutatja, hogy a sikeres sóstressz akklimatizációt mind az ET többlet, mind az ET jelátvitel blokkolása gátolhatja szubletális sóstressz során, azonban eltérő kinetikával. Fontos azonban megjegyezni, hogy a különböző fiziológiai folyamatok finomszabályozottsága miatt ez nem közvetlenül vezet a növényegyedek pusztulásának fokozódásához. Ugyanakkor, csupán a *Nr* mutáció befolyásolta negatívan a levelek fotoszintetikus aktivitását szubletális sóstressz során a csökkent sztómakonduktancia és a túlérzékeny fényvédelmi mechanizmusok miatt. Eredményeink előrevetítik, hogy az ET tartalom vagy szignalizáció finomhangolása a stressz kifejlődésének bizonyos időpontjaiban, illetve az ET-termelés kinetikájának megváltoztatása jobban segítheti a sóstressz akklimatizációt.**

8. Summary

During our experiments, we investigated the ethylene (ET) sensitivity and the ET status-dependent salt stress responses of tomato plants using two different experimental designs. As a first approach, we applied different concentrations of exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) through the nutrient solution of hydroponically grown tomato plants to evaluate their effect on the most important physiological processes, which could possibly participate in the acclimation to a subsequent abiotic stress, as-an analogy for the inducible systemic resistance-mechanism.

As a second approach, we monitored the effects of sublethal (100 mM NaCl) and lethal (250 mM NaCl) salt stress on the acclimation mechanisms of tomato plants with different ET status [wild type (WT) plants pre-treated with 10 μ M ACC or ET receptor mutant, *Never ripe* genotypes], and compared their physiological responses to salt stress with WT plants of normal ET status. Therefore, we examined the water status parameters, photosynthetic activity, the accumulation of reactive oxygen- (ROF) and nitrogen forms (RNF) participating in oxidative and nitrosative stress in plant tissues or the activity and expression of ROF scavenging enzymes in plants of different ET status during the early stages of salt stress acclimation to evaluate the role of ET in these responses.

In accordance with our results, our conclusions are as follows:

- 1. Exogenous ACC applied through the root zone of WT tomato plants induced significant ET emission from the tissues especially in the roots, but only above a concentration threshold value. However, exogenous ACC induces physiological changes below this threshold as well.**
- 2. Small increases in root zone ACC concentrations (0.01-1.0 μ M) enhanced dry biomass production in the shoots of WT tomato plants. Furthermore, the pattern of ROF/RNF generated by these treatments was unfavourable for the development of nitrosative stress, in plant root tips or leaf tissues.** In contrast to low concentrations, the presence of high exogenous ACC concentration (100 μ M) in the root media induced a completely opposite response accompanied with enhanced ROF accumulation in the root apices and ROF/RNF accumulation in the leaves. In summary, exogenous ACC treatments induced enhanced H₂O₂ accumulation and affected the patterns of NO and ONOO⁻ accumulation in concentration- or organ type dependent manner. Nevertheless, despite of the observed changes, the plants did not die even under high ACC concentration, furthermore, the weak oxidative stress can activate the antioxidant processes.

3. **The presence of exogenous ACC in the root zone could inhibit or stimulate photosynthesis and influence the activity of the photosystems in non-senescent tomato leaves in a concentration- and time dependent manner.** Lower concentrations of ACC (0.01 and 1.0 μM) enhanced the net CO_2 assimilation (A_N) after the 1st and 2nd days. **0.01 μM ACC significantly enhanced photosystem I (PSI) quantum efficiency and alter its non-photochemical quenching profile**, although the impact of this concentration on PSII efficiency was small. Furthermore, treatment with the very high, 100 μM ACC had a pronounced inhibitory effect on CO_2 assimilation and PSII quantum efficiency, however, PSI quantum efficiency showed smaller sensitivity. **Photoprotective processes could be induced by all ACC concentrations with different kinetics and intensity, mostly through the enhancement of the PSI cyclic electron flow (CEF-PSI)-dependent non-photochemical quenching (NPQ).**
4. **The small, but significant decrease in the K^+/Na^+ ratio caused by 100 μM ACC could be considered as weak salt stress, which might serve as a hardening effect in a putative subsequent osmotic/salt stress acclimation process. Thus, this could be defined as an ACC-induced eustress. 0.01-1.0 μM ACC enhanced soluble sugar and sorbitol contents, which may contribute to the development of tolerance to an abiotic stress possessing an osmotic component.**
5. **The mutation of the ET receptor in *Nr* tomato plants resulted in enhanced susceptibility to supraoptimal salt concentrations. Root apical segments showed typical physiological symptoms of cell death even under sublethal stress**, due to excess ROF and RNF accumulation in root tips caused by sublethal or lethal NaCl concentrations. In WT root tips, the accumulation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ occurred during lethal salt stress, and H_2O_2 accumulated in the presence of sublethal salt concentration. In contrast to WT, *Nr* root apices blocked in ET signalling showed higher $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ ratio even under 100 mM NaCl treatment, which is favourable for the induction of programmed cell death (PCD). Because of the detected ROF and RNF accumulation, the nitro-oxidative stress was more pronounced in *Nr* root apices even at 100 mM NaCl. This led to higher electrolyte leakage, enhanced DNA fragmentation, proteolysis and cysteine protease activity.
6. **Examining the role of ET in salt stress acclimation of plants with different ET status, it was concluded that the *Nr* mutation promoted ionic stress, which manifested in a decreased K^+/Na^+ ratio, while exogenous ACC prevented the salt induced loss in leaf water potential, thus, lowered osmotic stress under salt stress.**

7. ET status of plants controls the accumulation of ROF and RNF molecules during the development of salt stress. In root apices, both excess ET/ACC contents caused by exogenous ACC and the inhibition of ET signalling resulted in oxidative or nitro-oxidative stress under lethal salt stress, although the underlying mechanisms were different. Despite the observation, that the accumulation of $O_2^{\bullet-}$ and $ONOO^-$ was enhanced at both conditions, this was higher in the case of ACC-treated WT root tips. While the cause of $O_2^{\bullet-}$ accumulation in *Nr* roots was the inhibition of superoxide dismutase (SOD), the contribution of catalase (CAT) and – in the early hours – ascorbate peroxidase (APX) enzymes to the decomposition of H_2O_2 were less intensive in the mutant than in ACC-treated roots. In summary, under lethal salt stress, the change of ET status (exogenous ACC, *Nr* mutation) in root tips enhanced salt sensitivity. In contrast to this, under tolerable salt stress, exogenous ACC alleviated the accumulation of $O_2^{\bullet-}$ in the early hours, but not that of H_2O_2 , which in the end, helped to mitigate oxidative stress. Early H_2O_2 accumulation in root apices allows a faster induction of the expression and activity of antioxidant enzymes, as it can be seen in the case of *SLAPX2* or APX, respectively, while under lethal salt stress, the induction of CAT and guaiacol peroxidase (POD) specific activities contributed in H_2O_2 decomposition at a higher extent, which at certain time points were more significant in ACC-treated or *Nr* roots. At the same time, despite the activation of antioxidant enzymes, the cell viability in root apices was significantly reduced in these samples due to lethal salt stress.

8. The leaves showed lower sensitivity than the roots to salt stress within 24 hours. Comparing the tolerable and the cell death-inducing salt stress effects in the leaves, we could conclude that under the latter condition, much greater $O_2^{\bullet-}$ accumulation was detected, which could be reduced by exogenous ACC pre-treatment or *Nr* mutation. Similarly, higher H_2O_2 levels could be observed at 250 mM NaCl concentrations, which was further enhanced by both ACC treatment or *Nr* mutation after 6 hours, thus, these tissues were exposed to severe oxidative stress. In shorter time interval, dramatic increase in NO or $ONOO^-$ accumulation could not be observed during the treatments. Under sublethal salt stress, elevated NO levels in ACC-treated or *Nr* mutant plants rather enhanced salt tolerance, while slight nitrosative stress could be developed due to greater $ONOO^-$ accumulation after 24 hours under lethal salt stress, which was alleviated by exogenous ACC.

The processes, which facilitate the formation $O_2^{\bullet-}$, such as photosynthetic electron transport or plasma membrane (PM)-bound NADPH oxidase, might participate in developing high $O_2^{\bullet-}$ levels. The rapid enhancement of SOD activity – in contrast to the roots – decreases $O_2^{\bullet-}$ concentration under lethal salt stress after 24 hours. However, decreased $O_2^{\bullet-}$ accumulation

observed in ACC treated and the mutant leaves after 24 hours was paired with lower SOD specific activity compared to salt treated WT leaves, which indicates a decrease in $O_2^{\bullet -}$ generating processes.

Under lethal salt stress, decreased APX and enhanced SOD specific activity contributed to the early accumulation of H_2O_2 in ACC treated or *Nr* leaves. Later, in ACC treated or *Nr* leaves, neither CAT, POD nor APX could alleviate H_2O_2 accumulation generated by increased SOD specific activity in ACC treated/*Nr* leaf samples. **Thus, the fine tuning in SOD and H_2O_2 scavenging enzyme activity regulate H_2O_2 content of leaves during lethal salt stress, which is highly depends on ET status of leaves.**

9. **ET status influences photosynthetic activity and sugar homeostasis in tomato plants under salt stress.** 100 mM NaCl added to root media decreased stomatal conductance rapidly in WT tomato leaves, this response was stronger under lethal salt stress, however, ACC treatment mitigated this salt induced effect in both cases. Net CO_2 assimilation and C_i/C_a ratio were in good correlation with the changes in stomatal conductance under sublethal salt stress in all treatments, which showed that ET could control CO_2 fixation mostly by the availability of CO_2 in these samples. However, under lethal salt stress, besides stomatal factors, other processes could have been involved in the inhibition of CO_2 assimilation, as it is confirmed by the increase in C_i/C_a . Interestingly, the decrease in A_N or the increase in C_i/C_a were significantly lower in the leaves of ACC treated or *Nr* plants under lethal salt stress, compared to WT plants. **Thus, ET participates in the development of salt stress responses as a function of stress intensity. The amount of the hormone or the impairment of its signalling caused contrasting effects during sublethal and lethal salt stress in CO_2 assimilation.**

10. Salt treatments did not enhance photoinhibition in 24 hours, as it could be observed in F_v/F_m , F_0 and $Y(NO)$ chlorophyll fluorescence parameters. Treatment with 100 mM NaCl did not affect PSII and PSI activity in the leaves of Ailsa Craig tomato cultivar. However, in the presence of 100 mM NaCl, the $Y(II)$ values of *Nr* mutants decreased immediately, which is caused by higher, and more sensitive NPQ response in these plants.

In good accordance with the reduction in $Y(II)$ by lethal salt stress, the donor side limitation of PSI was enhanced with the simultaneous decrease in $Y(NA)$ due to elevated CEF-PSI, which was further enhanced in the mutants during both salt stresses. Therefore, the enhanced, light regulated NPQ values under salt stress were induced by increased CEF-PSI in *Nr* mutants.

Interestingly, until the 6th hour of 250 mM NaCl treatment, exogenous ACC inhibited the induction of CEF-PSI, and therefore the induction of NPQ, which prevented the decrease of $Y(II)$ or the consequent increase of $Y(ND)$. This shows that, exogenous ACC delayed the

decrease in PSII activity, but enhanced Y(NA), which governs the chance of a higher electron flow toward O₂, O₂^{•-} formation and PSI photoinhibition. **Thus, ET could regulate net CO₂ assimilation through stomatal or non-stomatal factors, the quantum efficiency of the photosystems and photoprotective mechanisms, including PSI-CEF operation due to *Nr* receptor and the availability of ACC under salt stress. Nevertheless, PSI CEF could be suggested as an important and unknown participant in the process, during which ET represses the activation of violaxanthin-deepoxidase – key enzyme in xanthophyll cycle – which highly contributes to the greatest NPQ subfraction, the energy dependent quenching.**

11. Despite the lower CO₂ fixation activity, *Nr* mutant leaves possess significantly higher starch content than WT leaves, which could lead to the conclusion, **that ET signalling helps to maintain the balance between starch metabolism and photosynthesis.**

12. **The response of roots and leaves to the change in ET status was different.** Cell viability in root apices was decreased by salt stress, and both ACC-treated and *Nr* mutant root tips were more sensitive to sublethal salt exposure than WT. However, this did not necessarily increase mortality of plant individuals, because after a successful acclimation process in the shoot, newly formed adventitious roots could be induced. In contrast to *Nr* mutation, exogenous ACC enhanced stomatal conductance and net CO₂ assimilation in a short time interval and increased the quantum efficiency of PSII, therefore, it promoted the adaptation of the shoot. **However, under lethal salt stress, *Nr* mutation or impaired ET signalling could induce positive changes in certain physiological processes, like more successful photoprotection and CO₂ assimilation. This indicates that under sublethal salt stress, both supraoptimal ET/ACC concentrations or the block in ET signalling decreases success of salt acclimation in the roots, but with different kinetics. It must be noted, that this was not necessarily led to plant decay because of fine regulation of physiological processes. However, only *Nr* mutation affected photosynthesis negatively under sublethal salt stress, due to oversensitive photoprotection and decreased stomatal conductance. Our results also anticipate that in certain time points of stress development, the fine tuning of ET contents or signalling, the alteration in the kinetics of ET production would help the salt acclimation process.**

9. Irodalomjegyzék

- 1 Light, K.M., Wisniewski, J.A., Vinyard, W.A., Kieber-Emmons, M.T., 2016. Perception of the plant hormone ethylene: known-knowns and known-unknowns. *J. Biol. Inorg. Chem.* 21, 715–728.
- 2 Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J.W., Voeseenek, L.A.C.J. (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends plant sci.* 11(4), 176.
- 3 Trobacher, C.P. (2009) Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany*, 87(8), 757. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics*. 6: 301-311.
- 4 Van Doorn W.G., Beers P.E., Dangl L.J., Franklin-Tong E.V., Gallois P., Hara-Nishimura I., et al. (2011): Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* 18(8), 1241.
- 5 Alagna, F., Kallenbach, M., Pompa, A., De Marchis, F., Rao, R., Baldwin, I.T., Bonaventure, G., Baldoni, L. (2015) Olive fruits infested with olive fly larvae respond with an ethylene burst and the emission of specific volatiles. *J Integr Plant Biol.* 58(4), 413-425.
- 6 Alazem, M. and Lin, N.-S. (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol. Plant Pathol.*, 16(5), 529.
- 7 Kazan, K., 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 20, 219–229.
- 8 Iqbal, N., Nazar, R., Khan, M.I.R., Khan, N.A., 2012. Variation in photosynthesis and growth of mustard cultivars: Role of ethylene sensitivity. *Sci. Hortic.* 135, 1–6.
- 9 Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chem Biol* 5, 301–307
- 10 Raskin, I. and Beyer, E.M. (1989) Role of Ethylene Metabolism in *Amaranthus retroflexus*. *Plant Physiol.* 90(1), 1.
- 11 Argueso, C.T., Hansen, M., Kieber, J.J., 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26, 92–105.
- 12 McDonnell, L., Plett, J. M., Andersson-Gunnerås, S., Kozela, C., Dugardeyn, J., Van Der Straeten, D., ... & Regan, S. (2009). Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiol. Plant.*, 136(1), 94-109.
- 13 Zhang, Z., Zhang, H., Quan, R., Wang, X. C., & Huang, R. (2009). Transcriptional regulation of the ethylene response factor LeERF2 in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco. *Plant Physiol.*, 150(1), 365-377.
- 14 Ruduś, I., Sasiak, M., Kepczyński, J., 2013. Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiol. Plant.* 35, 295–307.
- 15 Zemlyanskaya, E. V., Omelyanchuk, N.A., Ermakov, A.A., Mironova, V. V., 2017. Mechanisms regulating ethylene signal transduction in plants. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 7, 335–344.
- 16 Van de Poel B, Van Der Straeten D (2014) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front Plant Sci* 5, 640.
- 17 Shin K, Lee S, Song W-Y, Lee R-A, Lee I, Ha K, Koo J-C, Park S-K, Nam H-G, Lee Y, Soh M-S (2015) Genetic identification of ACC-RESISTANT2 reveals involvement of LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER1 in the uptake of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 56, 572–582.
- 18 Cara, B. and Giovannoni, J.J. (2008) Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Sci.*, 175(1–2), 106.
- 19 Shakeel, S.N., Gao, Z., Amir, M., Chen, Y.-F., Rai, M.I., Haq, N.U., Schaller, G.E. (2015) Ethylene Regulates Levels of Ethylene Receptor/CTR1 Signaling Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 290(19), 12415-12424.
- 20 Liu, Q., Wen, C.K., 2012. Cooperative ethylene receptor signaling. *Plant Signal. Behav.* 7(8), 1009-1013.
- 21 Lin, Z., Grierson, D., 2010. New perspective in ethylene signaling *Plant Signal. Behav.* 5:5, 545-549.
- 22 Mubarak, S., Hoshikawa, K., Okabe, Y., Yano, R., Tri, M.D., Ariizumi, T., Ezura, H., 2019. Evidence of the functional role of the ethylene receptor genes SlETR4 and SlETR5 in ethylene signal transduction in tomato. *Mol. Genet. Genomics* 294, 301–313.
- 23 Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., and Bouzayen, M. (2015). Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *PlantPhysiol.* 169(4), 2380-2390.
- 24 Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never ripe. *Science* 270, 1807-1809.
- 25 Rick CM, Butler L (1956) Phylogenetics of the tomato. *Adv Genet.* 8, 267-382.
- 26 Mata CI, Fabre B, Parsons HT, Hertog MLATM, Van Raemdonck G, Baggerman G, Van de Poel B, Lilley KS and Nicolai BM (2018) Ethylene Receptors, CTRs and EIN2 Target Protein Identification and Quantification Through Parallel Reaction Monitoring During Tomato Fruit Ripening. *Front. Plant Sci.* 9, 1626.
- 27 Tieman, DM, Taylor, MG, Ciardi, JA, Klee HJ (2000) The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5663–5668.
- 28 Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., Klee, H.J., 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6, 521-530.
- 29 Wang, J., Chen, G., Hu, Z., & Chen, X. (2007). Cloning and characterization of the EIN2-homology gene LeEIN2 from tomato: Full Length Research Article. *DNA seq.*, 18(1), 33-38.
- 30 Zhong S, Lin Z, Grierson D (2008) Tomato ethylene receptors-CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* 59, 965-972.
- 31 Zhong, S., Chang, C., 2012. Ethylene Signalling: The CTR1 Protein Kinase. In: McManus, M. T. (Ed.). *Annual plant reviews, the plant hormone ethylene*. 44, 147–168. John Wiley & Son

- 32 Liu, M., Pirrello, J., Kesari, R., Mila, I., Roustan, J. P., Li, Z., ... & Regad, F. (2013). A dominant repressor version of the tomato S 1-ERF. B 3 gene confers ethylene hypersensitivity via feedback regulation of ethylene signaling and response components. *Plant J.*, 76(3), 406-419.
- 33 Rai, M.I., Wang, X., Thibault, D.M., Kim, H.J., Bombyk, M.M., Binder, B.M., Shakeel, S.N., Schaller, G.E. (2015) The ARGOS gene family functions in a negative feedback loop to desensitize plants to ethylene. *BMC Plant Biol.*, 15(1), 1.
- 34 Wang, Y., Wang, Q., Gao, L., Zhu, B., Ju, Z., Luo, Y., Zuo, J., 2017a. Parsing the Regulatory Network between Small RNAs and Target Genes in Ethylene Pathway in Tomato. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13.
- 35 Wang, Y., Gao, L., Li, J., Zhu, B., Zhu, H., Luo, Y., Wang, Q., Zuo, J., 2018. Analysis of long-non-coding RNAs associated with ethylene in tomato. *Gene* 674, 151–160.
- 36 Yen, H.C., Lee, S., Tanksley, S.D., Lanahan, M.B., Klee, H.J., Giovannoni, J.J., 1995. The Tomato Never-ripe Locus Regulates Ethylene-Inducible Gene Expression and Is Linked to a Homolog of the Arabidopsis ETR1 Gene. *Plant Physiol.* 107, 1343–1353.
- 37 Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., ... & Ecker, J. R. (1999). RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell*, 97(3), 383-393.
- 38 Lacey, R.F. and Binder, B.M. (2014) How plants sense ethylene gas — The ethylene receptors. *J. Inorg. Biochemistry*, 133, 58-62
- 39 Lin, Z., Alexander, L., Hackett, R., Grierson, D., 2008. LeCTR2, a CTR1-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence. *Plant J.* 54, 1083–1093.
- 40 Gallie, D.R. (2015) Ethylene receptors in plants - why so much complexity? *F1000Prime Reports*, 7, 39.
- 41 Pirrello, J., Prasad, B. N., Zhang, W., Chen, K., Mila, I., Zouine, M., és mtsai. (2012). Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *BMC Plant Biol.* 12(1), 190.
- 42 Wang, F., Cui, X., Sun, Y., Dong, C.-H. (2013) Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Rep.* 32(7), 1099.
- 43 Klee, H.J., 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *J. Exp. Bot.* 53, 2057–2063.
- 44 Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., Bouzayen, M., Pirrello, J., 2018. Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant Sci.* 274, 137–145.
- 45 Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Petrova, A. A., Tikhonov, A. N., & Semenov, A. Y. (2017). Electron transfer through the acceptor side of photosystem I: Interaction with exogenous acceptors and molecular oxygen. *Biochemistry (Moscow)*, 82(11), 1249-1268.
- 46 Ceusters J, Van de Poel B (2018) Ethylene exerts species-specific and age-dependent control of photosynthesis. *Plant Physiol* 176:2601–2612
- 47 Baker, N. R., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J exp bot.* 55(403), 1607-1621.
- 48 Roach, T., & Krieger-Liszka, A. (2014). Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Curr Protein Pept Sci.* 15(4), 351-362.
- 49 Shikanai, T., & Yamamoto, H. (2017). Contribution of cyclic and pseudo-cyclic electron transport to the formation of proton motive force in chloroplasts. *Mol plant.* 10(1), 20-29.
- 50 Parry, M. A., Keys, A. J., Madgwick, P. J., Carmo-Silva, A. E., & Andralojc, P. J. (2008). Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J exp bot.* 59(7), 1569-1580.
- 51 Poór, P., Borbély, P., Czékus, Z., Takács, Z., Ördög, A., Popović, B., & Tari, I. (2019a). Comparison of changes in water status and photosynthetic parameters in wild type and abscisic acid-deficient sitiens mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Rheinlands Ruhm) exposed to sublethal and lethal salt stress. *Journal of Plant Physiol*, 232, 130-140.
- 52 Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., ... & Elsheery, N. I. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research*, 122(2), 121-158.
- 53 Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., ... & Losciale, P. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*, 132(1), 13-66.
- 54 Niyogi, K. K., Li, X. P., Rosenberg, V., & Jung, H. S. (2004). Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis?. *J exp bot.* 56(411), 375-382.
- 55 Ikeuchi, M., Uebayashi, N., Sato, F., & Endo, T. (2014). Physiological functions of PsbS-dependent and PsbS-independent NPQ under naturally fluctuating light conditions. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1286-1295.
- 56 Braun, D. M., Wang, L., & Ruan, Y. L. (2013). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J exp bot.* 65(7), 1713-1735.
- 57 Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., & Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1517-1529.
- 58 Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., & Noctor, G. (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J exp bot.* 63(4), 1619-1636.
- 59 Kays, S.J., Pallas, Jr J.E., (1980) Inhibition of photosynthesis by ethylene. *Nature* 285(5759), 51
- 60 Taylor, G. E., & Gunderson, C. A. (1986). The response of foliar gas exchange to exogenously applied ethylene. *Plant Physiol.* 82(3), 653-657.
- 61 Woodrow L, Grodzinski B, An Evaluation of the Effects of Ethylene on Carbon Assimilation in *Lycopersicon esculentum* Mill, *J exp bot*, Volume 40, Issue 3, March 1989, Pages 361–368,
- 62 Pallaghy, C. K., & Raschke, K. (1972). No stomatal response to ethylene. *Plant Physiol.* 49(2), 275.
- 63 Gunderson, C. a, Taylor, G.E., 1991. Ethylene Directly Inhibits Foliar Gas Exchange in *Glycine max*. *Plant Physiol.* 95,

- 64 Zacarias, L., & Reid, M. S. (1990). Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol Plant*. 80(4), 549-554.
- 65 Grbić, V., & Bleecker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*. 8(4), 595-602.
- 66 Khan, N.A. (2004) An evaluation of the effects of exogenous ethephon, an ethylene releasing compound, on photosynthesis of mustard (*Brassica juncea*) cultivars that differ in photosynthetic capacity. *BMC plant biol*. 4(1), 1.
- 67 Song, X., She, X., Wang, J. (2012a) Inhibition of abscisic acid-induced stomatal closure by ethylene is related to the change of hydrogen peroxide levels in guard cells in broad bean. *Australian J Bot*. 59(8), 781.
- 68 Song, X.G., She, X.P., Wang, J. (2012b) Inhibition of darkness-induced stomatal closure by ethylene involves a removal of hydrogen peroxide from guard cells of *Vicia faba*. *Russian J Plant Physiol*. 59(3), 372.
- 69 Song, X. G., She, X. P., Wang, J., & Sun, Y. C. (2011). Ethylene inhibits darkness-induced stomatal closure by scavenging nitric oxide in guard cells of *Vicia faba*. *Funct Plant Biol*. 38(10), 767-777.
- 70 Ge, X.M., Cai, H.L., Lei, X., Zhou, X., Yue, M., He, J.M. (2015) Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. 82(1), 138-150.
- 71 Wullschlegel, S. D., Hanson, P. J., & Gunderson, C. A. (1992). Assessing the influence of exogenous ethylene on electron transport and fluorescence quenching in leaves of *Glycine max*. *Envir exp bot*. 32(4), 449-455.
- 72 Xie, X. L., Xia, X. J., Kuang, S., Zhang, X. L., Yin, X. R., Yu, J. Q., & Chen, K. S. (2017). A novel ethylene responsive factor CitERF13 plays a role in photosynthesis regulation. *Plant Sci*. 256, 112-119.
- 73 Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J Bot.*, 2012.
- 74 Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Ann rev plant biol*. 69, 209-236.
- 75 Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 80, pp. 3-12). Academic Press.
- 76 Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., ... & Barroso, J. B. (2007). Nitrosative stress in plants. *Febs Letters*, 581(3), 453-461.
- 77 Corpas, F., & Palma, J. (2018). Assessing nitric oxide (NO) in higher plants: an outline. *Nitrogen*, 1(1), 12-20.
- 78 Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002): A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99, 16314-16318.
- 79 Moreau M., Lindermayr C., Durner J. Klessig D.F. (2010): NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiol Plant*. 138, 372-383.
- 80 Wang Y., Chen C., Loake J. G., Chu C. (2010a): Nitric Oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Prot cell*. 1, 133-142.
- 81 Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir S. I., Neill J. S., (2006): ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J*. 45, 113-122.
- 82 Sang J., Jiang M., Lin F., Xu S., Zhang A., Tan M. (2008): Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J. Integ. Plant. Biol*. 50, 231-243.
- 83 Bellin D. Asai S., Delledonne M., Yoshioka H. (2013): Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 26, 271-277.
- 84 Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., & Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 100182.
- 85 Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J exp bot*. 53(372), 1331-1341.
- 86 Feng K., Yu J., Cheng Y., Ruan M., Wang R., Ye Q. és mtsai., (2016) The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationship and expression patterns. *Fron. Plant. Sci*. 30, 1279.
- 87 Kuo W., Huang C., Shih C., Jinn T. (2013) Cellular extract preparation for superoxide dismutase (SOD) activity assay. *Bio-protocol*. 3, 811.
- 88 Podgórska A., Burian M., Szal B. (2017) Extra-Cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Front. Plant Sci*. 8, 1353.
- 89 Bayer E.M., Bottrill A.R., Walshaw J., Vigouroux M., Naldrett M.J., Thomas C.L., és mtsai., (2006) 90 O'Brien J.A., Daudi A., Finch P., Butt V.S., Whitelegge J.P., Souda P., és mtsai., (2012) A peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol*. 158, 2013-2027.
- 90 O'Brien J.A., Daudi A., Finch P., Butt V.S., Whitelegge J.P., Souda P., és mtsai., (2012) A peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol*. 158, 2013-2027.
- 91 Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J exp bot*. 61, 4194-4220.
- 92 Racchi M.L. (2013) Antioxidant defences in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*. 2: 340-369.
- 93 Najami N., Janda T., Barriah W., Kayam G., Tal M., Guy M., Volokita M. (2008) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: Its identification and characterization. *Mol. Genet. Genomics*. 279, 171-182.
- 94 Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A. (2005) Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 222(5), 926-932.
- 95 Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist*, 199(3), 633-635.
- 96 Lindermayr, C. (2018). Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Bio Med*. 122, 110-115.
- 97 Wang, H., Liang, X., Wan, Q., Wang, X., & Bi, Y. (2009). Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta*, 230(2), 293-307.

- 98 Poór, P., Borbély, P., Kovács, J., Papp, A., Szepesi, Á., Takács, Z., & Tari, I. (2014). Opposite extremes in ethylene/nitric oxide ratio induce cell death in suspension culture and root apices of tomato exposed to salt stress. *Acta Biol Hungarica*. 65(4), 428-438.
- 99 Cui, M., Lin, Y., Zu, Y., Efferth, T., Li, D., Tang, Z. (2015) Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. *J Plant Biol*, **58**(3), 193-201.
- 100 Chen, H. J., Huang, C. S., Huang, G. J., Chow, T. J., & Lin, Y. H. (2013). NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium and reduced glutathione mitigate ethephon-mediated leaf senescence, H₂O₂ elevation and senescence-associated gene expression in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *J Plant Physiol*. 170(17), 1471-1483.
- 101 Steffens, B., & Sauter, M. (2009). Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell*. 21(1), 184-196.
- 102 Kim, Y. S., Kim, H. S., Lee, Y. H., Kim, M. S., Oh, H. W., Hahn, K. W., ... & Jeon, J. H. (2008). Elevated H₂O₂ production via overexpression of a chloroplastic Cu/ZnSOD gene of lily (*Lilium oriental* hybrid 'Marco Polo') triggers ethylene synthesis in transgenic potato. *Plant cell rep*. 27(6), 973-983.
- 103 Sewelam, N., Kazan, K., Thomas-Hall, S. R., Kidd, B. N., Manners, J. M., & Schenk, P. M. (2013). Ethylene response factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS one*, 8(8), e70289.
- 104 Xia, X. J., Zhou, Y. H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., & Yu, J. Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J exp bot*. 66(10), 2839-2856.
- 105 Zhang, M., Smith, J. A. C., Harberd, N. P., & Jiang, C. (2016). The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant Mol Biol*. 91(6), 651-659.
- 106 Larkindale, J., & Huang, B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol*. 161(4), 405-413.
- 107 Kan, J., Che, J., Xie, H. Y., & Jin, C. H. (2011). Effect of 1-methylcyclopropene on postharvest physiological changes of 'Zaohong' plum. *Acta physiol plant*. 33(5), 1669-1677.
- 108 Golemic, E., Tokarz, K., Wielanek, M., & Niewiadomska, E. (2014). A dissection of the effects of ethylene, H₂O₂ and high irradiance on antioxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. *J Plant Physiol*. 171(3-4), 269-275.
- 109 Kumar, G. and Knowles, N.R. (2003) Wound-induced superoxide production and PAL activity decline with potato tuber age and wound healing ability. *Physiol Plant*. **117**(1), 108-117.
- 110 Lv, S. F., Jia, M. Z., Zhang, S. S., Han, S., & Jiang, J. (2019). The dependence of leaf senescence on the balance between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid synthase 1 (ACS 1)-catalysed ACC generation and nitric oxide-associated 1 (NOS 1)-dependent NO accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Biology*.
- 111 Freschi, L. (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front Plant Sci*. 4, 398.
- 112 Liu, G. H., Liu, J., Hou, L. X., Tang, J., & Liu, X. (2009). NO may function in the downstream of Ca²⁺ in ethylene induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *J mol cell boil*. 42(2), 145-155.
- 113 She, X., & Song, X. (2012). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* via reducing nitric oxide levels in guard cells. *New Zealand J bot*. 50(2), 203-216.
- 114 Gibbs, D. J., Isa, N. M., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., ... & Bassel, G. W. (2014). Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol Cell*. 53(3), 369-379.
- 115 Novikova, G. V., Mur, L. A., Nosov, A. V., Fomenkov, A. A., Mironov, K. S., Mamaeva, A. S., ... & Hall, M. A. (2017). Nitric oxide has a concentration-dependent effect on the cell cycle acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Front physiol* 8, 142.
- 116 National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=535, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Aminocyclopropanecarboxylic-acid> (accessed on July 22, 2019)
- 117 Peck, S.C., Pawlowski, K., Kende, H. (1998) Asymmetric responsiveness to ethylene mediates cell elongation in the apical hook of peas. *Plant Cell*. **10**(5), 713.
- 118 Nascimento, F.X., Rossi, M.J., Glick, B.R., Soto, M.J., 2018. Ethylene and (ACC) in Plant – Bact Interact. 9, 1–17.
- 119 Finlayson, S. A., Foster, K. R., & Reid, D. M. (1991). Transport and Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seedlings. *Plant Physiol*. 96(4), 1360-1367.
- 120 Vanderstraeten, L., & Straeten, D. Van Der. (2017). Accumulation and Transport of Acid (ACC) in Plants : Current Status, Considerations for Future Research and Agronomic Applications. *Front plant sci* 8, 1–18.
- 121 Munné-Bosch, S., López-Carbonell, M., Alegre, L., Van Onckelen, H.A. (2002) Effect of drought and high solar radiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid concentrations in *Rosmarinus officinalis* plants. *Physiol Plant*. **114**(3), 380.
- 122 Grodzinski, B., Boesel, I., Horton, R.F. (1982) The effect of light intensity on the release of ethylene from leaves. *J exp bot* **33**(6), 1185-1193.
- 123 Abeles FB, Heggstad HE (1973) Ethylene: an urban air pollutant. *J Air Pollut Control Assoc* 23, 517–521.
- 124 Dubois M, Van den Broeck L, Inzé D (2018) The pivotal role of ethylene in plant growth *Trends Plant Sci* 23, 311–323.
- 125 Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) Regulation of ethylene production by internal, environmental and stress factors. In: Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (eds) *Ethylene in plant biology*, 2nd edn. Academic Press, London, pp 54–262
- 126 Toon GC, Blavier J-FL, Sung K (2018) Measurements of atmospheric ethene by solar absorption FTIR spectrometry. *Atmos Chem Phys* 18:5075–5088.
- 127 Else M, Hall KC, Arnold GM, Davies WJ, Jackson MB (1995) Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants (accounting for effects of xylem sap flow rate on concentration and delivery). *Plant Physiol* 107:377–384

- 128 Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theoret Biol.* 190(1), 63–68.
- 129 Zaidi A, Khan MS, Ahmad E, Saif S, Rizvi A, Shadid M (2016) Growth stimulation and management of diseases of ornamental plants using phosphate solubilizing microorganisms: current perspective. *Acta Physiol Plant* 38, 117.
- 130 Edelman, N. F., & Jones, M. L. (2014). Evaluating ethylene sensitivity within the family *Solanaceae* at different developmental stages. *Hort Sci.* 49(5), 628–636.
- 131 Mensuali-Sodi, A., Panizza, M., Tognoni, F. (1995) Endogenous ethylene requirement for adventitious root induction and growth in tomato cotyledons and lavandin microcuttings in vitro. *Plant Growth Regul.* 17(3), 205.
- 132 De Cnodder, T., Vissenberg, K., Van Der Straeten, D., Verbelen, J.P. (2005) Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist.* 168(3), 541.
- 133 Leblanc, A., Renault, H., Lecourt, J., Etienne, P., Deleu, C., & Le Deunff, E. (2008). Elongation Changes of Exploratory and Root Hair Systems Induced by Aminocyclopropane Carboxylic Acid and Aminoethoxyvinylglycine Affect Nitrate Uptake and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* Transporter Gene Expression in Oilseed Rape. *Plant Physiol.* 146(4), 1928–1940.
- 134 Alarcon, M.V., Lloret, P.G., Iglesias, D.J., Talon, M., Salguero, J. (2009) Response of maize seedling roots to changing ethylene concentrations. *Russian J Plant Physiol.* 56(4), 488.
- 135 Calvo-Polanco, M., Ibort, P., Molina, S., Ruiz-Lozano, J. M., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., & Aroca, R. (2017). Ethylene sensitivity and relative air humidity regulate root hydraulic properties in tomato plants. *Planta*, 246(5), 987–997.
- 136 Fuhrer, J. (1985). Production and Release of Ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid in *Lemna minor* L. in the Dark and at Different Carbon Dioxide Compensation Concentrations. *J Plant Physiol.* 117(4), 307–317.
- 137 Yoon GM, Kieber JJ (2013) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a signalling molecule in plants. *AoB Plants* 5, plt017.
- 138 Xu S-L, Rahman A, Baskin TL, Kieber JJ (2008) Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signalling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3065–3079
- 139 Tsang DL, Edmond C, Harrington JL, Nühse TS (2011) Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent pathway. *Plant Physiol* 156:596–604
- 140 Yin, J., Zhang, X., Zhang, G., Wen, Y., Liang, G., & Chen, X. (2019). Aminocyclopropane-1-carboxylic acid is a key regulator of guard mother cell terminal division in *Arabidopsis thaliana*. *J exp bot.* 70(3), 963–972.
- 141 Pessarakli M., Szabolcs I. (1999): Soil Salinity and Sodicity as Particular Plant/Crop Stress Factors. In: Pessarakli M.(Ed.): Handbook of plant and crop stress. Second edition. Marcel Dekker. New York. 1-15.
- 142 Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Phys* 51, 463–499.
- 143 Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681.
- 144 FAO. 2005. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- 145 FAO (2008) FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush> [Verified 24 May 2010]
- 146 Kaleem, F., Shabir, G., Aslam, K., Rasul, S., Manzoor, H., Shah, S. M., & Khan, A. R. (2018). An Overview of the Genetics of Plant Response to Salt Stress: Present Status and the Way Forward. *Applied Biochem Biotech.* 186(2), 306–334.
- 147 Taiz L., Zeiger E. (2006) Plant Physiol. Fourth edition. Sunderland. Massachusetts.
- 148 Németh T. (2005): Talajvédelem: Országos Talajvédelmi Stratégia tudományos háttere. Bp. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium.
- 149 Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., & Hayat, S. (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *J Environ Biol.* 32(5), 667.
- 150 Isayenkov V.S. (2012): Physiological and Molecular Aspects of Salt Stress in Plants. *Cytology and Genetics.* 46:302–318.
- 151 Poór P. (2013): Sóstressz és szalicilsav indukálta élettani folyamatok összehasonlító vizsgálata paradicsomban: akklimatizáció vagy programozott sejthalál. Ph.D. Thesis. Biológia doktori iskola, 2013. Szeged.
- 152 Park, H. J., Kim, W.-Y., & Yun, D.-J. (2016). A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. *Molecules and Cells*, 39(6), 447–459.
- 153 Evangelou P.V., McDonald Jr. L.M. (1999): Influence of Sodium on Soils of Humid Regions. In: Pessarakli M.(Ed.): Handbook of plant and crop stress. Second edition. Marcel Dekker. New York. 17-50.
- 154 García-Sánchez F., Jofon J., Carvajal M., Syvertsen J.P. (2002): Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na⁺ and Cl⁻ accumulation in ‘Sunburst’ mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Sci.* 162, 705-712.
- 155 Munns R. (2002): Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239-250.
- 156 Isayenkov, S. V., Maathuis, F.J.M., 2019. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front. Plant Sci.*
- 157 Speer M., Kaiser W.M. (1991): Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. *Plant Physiol.* 97, 990-997.
- 158 Shabala S. (2009): Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *J. Exp. Bot.* 60, 709–712.
- 159 Cuin, T. A., Miller, A. J., Laurie, S. A., & Leigh, R. A. (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J exp bot.* 54(383), 657-661.
- 160 Cuin, T. A., Betts, S. A., Chalmandrier, R., & Shabala, S. (2008). A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *J exp bot.* 59(10), 2697-2706.
- 161 Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., ... & Gosti, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal*, 22(9), 2004-2014.

- 162 Stępień P., Kłobus G. (2006): Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol Plant.* 50, 610-616.
- 163 Bose, J., Munns, R., Shabala, S., Gilliam, M., Pogson, B., & Tyerman, S. D. (2017). Chloroplast function and ion regulation in plants growing on saline soils: Lessons from halophytes. *J exp bot*, 68(12), 3129–3143.
- 164 Noreen Z., Ashraf M., Akram A.N. (2012): Salt-induced regulation of photosynthetic capacity and ion accumulation in some genetically diverse cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.). *J. App. Bot. Food Q.* 85:91-96.
- 165 Juan M., Rivero R. M., Romero L., Ruiz J. M. (2005): Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 54, 193-201.
- 166 Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S. (2010): Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant. Physiol. Biochem.* 48, 16-20.
- 167 Jiang, C., Belfield, E. J., Mithani, A., Visscher, A., Ragoussis, J., Mott, R., ... Harberd, N. P. (2012). ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 31(22), 4359–4370.
- 168 Torre-González, A., Navarro-León, E., Albacete, A., Blasco, B., & Ruiz, J. M. (2017). Study of phytohormone profile and oxidative metabolism as key process to identification of salinity response in tomato commercial genotypes. *J Plant Physiol*, 216(March), 164–173.
- 169 Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science*, 181(5), 604-611.
- 170 Xie Y., Ling T., Han Y., Liu K., Zheng Q., Huang L., Yuan X., He Z., Hu B., Fang L., Shen Z., Yang Q., Shen W. (2008): Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots. *Plant Cell Environ.* 31, 1864-188.
- 171 Xu J., Yin H., Yang L., Xie Z., Liu X. (2011): Differential salt tolerance in seedlings derived from dimorphic seeds of *Atriplex centralasiatica*: from physiology to molecular analysis. *Planta*. 233, 859-871.
- 172 Liu Y., Wu R., Wan Q., Xie G., Bi Y. (2007): Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant Cell Physiol.* 48, 511-522.
- 173 Charrier A., Lelièvre E., Limami A.M., Planchet E. (2013): *Medicago truncatula* stress associated protein 1 gene (*MtSAP1*) overexpression confers tolerance to abiotic stress and impacts proline accumulation in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* 170, 874-877.
- 174 Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13454-13459.
- 175 Corpas, F. J., Carreras, A., Valderrama, R., Chaki, M., Palma, J. M., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2007). Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress*, 1, 37-41.
- 176 Zeng C.L., Liu L., Wang B.R., Wu M.X., Zhou Y. (2011): Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea* seedlings under NaCl stress. *Biol. Plantarum*. 55, 45-348.
- 177 Khan N., Siddiqui M., Mohammad M.H.F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide*. 27, 210-218.
- 178 Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q and Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* **224**, 545-55
- 179 Camejo D, Romero-Puertas Mdel C, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM, Lázaro JJ, Jiménez A and Sevilla F (2013) Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *J Proteomics* **79**,87-99.
- 180 Andronis EA and Roubelakis-Angelakis KA (2010) Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress. *Planta* **231**,437-448
- 181 Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, Ibeas JJ, Narasimhan ML, Bressan RA and Hasegawa PM (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**,649-659
- 182 Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lütz C and Lütz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *J Exp Bot* **60**,939-954.
- 183 Levitt J (1972) Responses of plants to environmental stresses. *New York, Academic Press* ISBN 0-12-445560-3 p569-665.
- 184 Whitlow TH, Bassuk NL, Ranney TG and Reichert DL (1992) An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. *Plant Physiol* **98**,198–205.
- 185 Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Sokolik A and Yurin V (2010) *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals, single-channel properties genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J Cell Sci* **123**,1468-1479.
- 186 Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., & Ahmed, F. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress, a review. *Plant growth regul.* 75(2), 391–404.
- 187 Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., & Tari, I. (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J Plant Physiol*, 166(9), 914–925.
- 188 Poór, P., Szopkó, D., & Tari, I. (2012). Ionic homeostasis disturbance is involved in tomato cell death induced by NaCl and salicylic acid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(3), 377–382.
- 189 Poór, P., & Tari, I. (2011). Ethylene-regulated reactive oxygen species and nitric oxide under salt stress in tomato cell suspension culture. *Acta Biol Szegediensis*. 55(1), 143–146.
Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83255186950&partnerID=40&md5=e10c96644cfe766c6104027359f3bc72>
- 190 Wi SJ, Jang SJ, Park KY (2010) Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Mol Cells* 30,37–49.
- 191 Jung J-Y, Shin R, Schachtman DP (2009) Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21,607–621
- 192 Schachtman DP (2015) The role of ethylene in plant responses to K⁺ deficiency. *Front Plant Sci* 6:1153.

- 193 Ryu, H., & Cho, Y. G. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *J Plant Biol*, 58(3), 147–155.
- 194 Trivellini, A., Lucchesini, M., Ferrante, A., Carmassi, G., Scatena, G., Vernieri, P., & Mensuali-Sodi, A. (2016). Survive or die? A molecular insight into salt-dependant signaling network. *Environ Exp Botany*, 132, 140–153.
- 195 Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 796–804.
- 196 Yang, L., Zu, Y. G., & Tang, Z. H. (2013). Ethylene improves Arabidopsis salt tolerance mainly via retaining K⁺ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na⁺ content. *Environ Exp Bot*, 86, 60–69.
- 197 Lin, Y., Yang, L., Paul, M., Zu, Y., & Tang, Z. (2013). Ethylene promotes germination of Arabidopsis seed under salinity by decreasing reactive oxygen species: Evidence for the involvement of nitric oxide simulated by sodium nitroprusside. *Plant Physiol Biochem*, 73, 211–218.
- 198 Sehar, Z., Masood, A., & Khan, N. A. (2019). Nitric oxide reverses glucose-mediated photosynthetic repression in wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Environ Exp Bot*, 161, 277–289.
- 199 Li, X., Pan, Y., Chang, B., Wang, Y., & Tang, Z. (2016). NO promotes seed germination and seedling growth under high salt may depend on EIN3 protein in Arabidopsis. *Front plant sci*, 6, 1203.
- 200 Cao, W.-H., Liu, J., He, X.-J., Mu, R.-L., Zhou, H.-L., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2007). Modulation of Ethylene Responses Affects Plant Salt-Stress Responses. *Plant Physiol*, 143(2), 707–719.
- 201 Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., ... Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J exp bot*, 59(11), 3039–3050.
- 202 Pérez-Alfocea, F., Ghanem, M.E., Gómez-Cadenas, A., Dodd, I.C., 2011. *Omics* of Root-to-Shoot Signaling Under Salt Stress and Water Deficit. *Omi. A J. Integr. Biol*, 15, 893–901.
- 203 Hussain, S., Zhong, C., Bai, Z., Cao, X., Zhu, L., Hussain, A., ... Jin, Q. (2018). Effects of 1-Methylcyclopropene on Rice Growth Characteristics and Superior and Inferior Spikelet Development Under Salt Stress. *J Plant Growth Regul*, 37(4), 1368–1384.
- 204 Abogadallah, G. M., Nada, R. M., Malinowski, R., & Quick, P. (2011). Overexpression of HARDY, an AP2/ERF gene from Arabidopsis, improves drought and salt tolerance by reducing transpiration and sodium uptake in transgenic *Trifolium alexandrinum* L. *Planta*, 233(6), 1265–1276.
- 205 Poór, P., Gémes, K., Horváth, F., Szepesi, Á., Simon, M. L., & Tari, I. (2011). Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biol*, Vol. 13, pp. 105–114.
- 206 Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G., Tugyi, N., Ördög, A., Gémes, K., és mtsai., 2013. Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, 32, 1913–1923
- 207 Lehotai, N., Pető, A., Bajkán, Sz, Erdei, L., Tari, I., Kolbert, Zs, 2011. *In vivo* and *in situ* visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiol. Plant* 33, 2199–2207.
- 208 Takács, Z., Poór, P., Szepesi, Á., & Tari, I. (2017). In vivo inhibition of polyamine oxidase by a spermine analogue, MDL-72527, in tomato exposed to sublethal and lethal salt stress. *Functi Plant Biol*, 44(5), 480–492.
- 209 Bournonville GCF, Diaz-Ricci JC (2010) Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochem Anal* 22:268–271
- 210 Sims, D. A., & Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote sensing of environment, 81(2-3), 337–354.
- 211 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 App Notes*, 1(1), 27–35.
- 212 Lei, Y., Zheng, Y., Dai, K., Duan, B., & Cai, Z. (2014). Different responses of photosystem I and photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery. *Trees*, 28(3), 923–933.
- 213 Zhang, G., Liu, Y., Ni, Y., Meng, Z., Lu, T., & Li, T. (2014). Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. *PLoS ONE*, 9(5), 1–12.
- 214 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal chem*, 28(3), 350–356.
- 215 Tari, I., Guóth, A., Benyó, D., Kovács, J., Poór, P., & Wodala, B. (2010). The roles of ABA, reactive oxygen species and nitric oxide in root growth during osmotic stress in wheat: comparison of a tolerant and a sensitive variety. *Acta Biol Hungarica*, 61(Supplement 1), 189–196.
- 216 Poór, P., Borbély, P. G., Bódi, N., Bagyánszki, M., & Görgényi Miklósné Tari, I. (2019b). Effects of salicylic acid on photosynthetic activity and chloroplast morphology under light and prolonged darkness. *Photosynthetica*, 57, 367–376.
- 217 Laurentin, A., & Edwards, C. A. (2003). A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Anal biochem*, 315(1), 143–145.
- 218 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(1-2), 248–254.
- 219 Rossano, R., Larocca, M., & Riccio, P. (2011). 2-D zymographic analysis of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) florets proteases: follow up of cysteine protease isotypes in the course of post-harvest senescence. *J Plant Physiol*, 168(13), 1517–1525.
- 220 Takács, Z., Poór, P., Borbély, P., Czékus, Z., Szalai, G., & Tari, I. (2018). H₂O₂ homeostasis in wild-type and ethylene-insensitive Never ripe tomato in response to salicylic acid treatment in normal photoperiod and in prolonged darkness. *Plant Physiol and biochem*, 126, 74–85.
- 221 Horváth, E., Brunner, S., Bela, K., Papdi, C., Szabados, L., Tari, I., & Csiszár, J. (2015). Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of Arabidopsis thaliana. *Funct Plant Biol*, 42(12), 1129–1140.

- 222 Gallé, Á. (2010). Búzafajták ozmotikus-és szárazságstressz alatti akklimatizációja, a glutation transzferázok szerepe a stresszválaszban (Doctoral dissertation, szte).
- 223 Rozen S., Skaletsky H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (szerk.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- 224 Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*. **25**: 402-408.
- 225 Lovdal T., Lillo C. (2009) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal Biochem*. **387**: 238-242.
- 226 Leclercq J., Adams-Phillips L.C., Zegzouti H., Jones B., Latche A., Giovanni J.J., Pech J.C., Bouzayen M. (2002) LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiol*. **130**: 1132-1142.
- 227 Kubis, S.E., Castilho, A.M.M.F., Vershinin, A.V., Heslop-Harrison, J.S., 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol. Biol.* **52**, 69-79.
- 228 Wang T-W, Arteca RN (1992) Effects of low O₂ root stress on ethylene biosynthesis in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Heinz 1350). *Plant Physiol* **98**:97–100
- 229 Beyer Jr, E. M., & Morgan, P. W. (1970). A method for determining the concentration of ethylene in the gas phase of vegetative plant tissues. *Plant Physiol*, **46**(2), 352.
- 230 Schierle, J., & Schwark, A. (1988). Asymmetric synthesis and concentrations of ethylene in the hypocotyl hook of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Physiol*, **133**(3), 325-331.
- 231 Trujillo-Moya C, Gisbert C (2012) The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. *Plant Cell Tiss Org Cult* **1**:11–41
- 232 Staal M, De Cnodder T, Simon D, Vandenbussche F, Van der Straeten D, Verbelen J-P, Elzenga T, Vissenberg K (2011) Apoplastic alkalization is instrumental for the inhibition of cell elongation in the *Arabidopsis* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiol* **155**, 2049–2055
- 233 Saranga Y, Zamir D, Marani A, Rudich J (1993) Breeding tomatoes for salt tolerance, variations in ion concentrations associated with response to salinity. *J Am Soc Hort Sci* **118**, 405–408
- 234 Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci* **211**, 77–91
- 235 Ashley MK, Grant M, Grabov A (2005) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot* **57**, 425–436
- 236 Demidchik D (2014) Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *J Plant Physiol* **171**, 696–707
- 237 Shabala S, Pottosin I (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant* **151**, 257–279
- 238 Woodrow L, Thompson RG, Grodzinski B (1988) Effects of ethylene on photosynthesis and partitioning in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *J Exp Bot* **39**, 667–684
- 239 Qin, L., He, J., Lee, S.K., Dodd, I.C., 2007. An assessment of the role of ethylene in mediating lettuce (*Lactuca sativa*) root growth at high temperatures. *J. Exp. Bot.* **58**, 3017–3024.
- 240 Iqbal N, Nazar R, Syeed S, Masood A, Khan NA (2011) Exogenously-sourced ethylene increases stomatal conductance, photosynthesis, and growth under optimal and deficient nitrogen fertilization in mustard. *J Exp Bot* **62**:4955–4963
- 241 Johnson NG (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim Biophys Acta* **1807**:384–389
- 242 Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. the basics. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**:313–349
- 243 Miyake C, Miyata M, Shinzaki Y, Tomizawa K (2005) CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves – relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol*. **46**, 629–637
- 244 Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Van Den Ende W, Cuypers A (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant Cell Environ* **36**, 1242–1255
- 245 Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* **147**, 1251–1263
- 246 Peshev D, Van den Ende W (2013) Sugars as antioxidants in plants. In: Tuteja N, Gill SS (eds) *Crop improvement under adverse conditions*. Springer, Berlin, pp 285–308
- 247 Poór, P., Kovács, J., Szopkó, D., Tari, I., 2013. Ethylene signaling in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma* **250**, 273–284.
- 248 Kalembe, E.M., Pukacka, S., 2014. Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Trees* **28**, 503-515.
- 249 Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., Gechev, T.S., 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 69.
- 250 Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Gratão, P.L., Carvalho, G., Tezotto, T., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A., 2011. Biochemical responses of the ethylene insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environ. Exp. Bot.* **71**, 306-320.
- 251 Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Deckert, J., Rucińska-Sobkowiak, R., Gzyl, J., Pawlak-Sprada, S., et al., 2012. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiol. Biochem.* **58**, 124-134.
- 252 Chmielowska-Bąk, J., Gzyl, J., Rucińska-Sobkowiak, R., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., 2014. The new insights into cadmium sensing. *Front. Plant Sci.* **5**, 245.

- 253 Byczkowska, A., Kunikowska, A., Kaźmierczak, A., 2013. Determination of ACC-induced cell-programmed death in roots of *Vicia faba* ssp. *minor* seedlings by acridine orange and ethidium bromide staining. *Protoplasma* 250, 121-128.
- 254 Yakimova, E.T., Kapchina-Toteva, V.M., Laarhoven, L.J., Harren, F.M., Woltering, E.J., 2006. Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 581-589.
- 255 Cervantes, E., Rodríguez, A., Nicolás, G., 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Mol. Biol.* 25, 207-215.
- 256 Jones, M.L., 2004. Changes in gene expression during senescence. In: Nood_en, L.D. (Ed.), *Plant Cell Death Processes*. Academic Press, San Diego California, pp. 51-67.
- 257 Jones, M.L., Chaffin, G.S., Eason, J.R., Clark, D.G., 2005. Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas. *J. Exp. Bot.* 56, 2733-2744.
- 258 Ye, Y., Li, Z., Xing, D., 2013. Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant Cell Environ.* 36, 1-15.
- 259 Kim, Y., Wang, M., Bai, Y., Zeng, Z., Guo, F., Han, N., *et al.*, 2014. Bcl-2 suppresses activation of VPEs by inhibiting cytosolic Ca^{2+} level with elevated K^+ efflux in NaCl-induced PCD in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 168-175.
- 260 Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A.N.A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant. Cell Environ.* 29, 1532-1544.
- 261 Albacete, A., Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., *et al.* & Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J exp bot*, 59(15), 4119-4131.
- 262 Ijaz, B., Formentin, E., Ronci, B., Locato, V., Barizza, E., Hyder, M.Z., Schiavo, F. Lo, Yasmin, T., 2019. Salt tolerance in indica rice cell cultures depends on a fine tuning of ROS signalling and homeostasis. *PLoS One* 14, 1-27.
- 263 Carvalho, R.F., Aidar, S.T., Azevedo, R.A., Dodd, I.C., Peres, L.E.P., 2011. Enhanced transpiration rate in the high pigment 1 tomato mutant and its physiological significance *Plant Biol.* 13(3), 546-550.
- 264 Takemura, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Karube, I., 2002. Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorhiza*. *Trees - Struct. Funct.* 16, 94-99.
- 265 Demir, Y., Oztürk, L., 2004. Influence of ethephon and 2,5-norbornadiene on antioxidative enzymes and proline content in salt-stressed spinach leaves. *Biol. Plant.* 47, 609-612.
- 266 Peng, J., Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., Zhu, H., Guo, H., 2014. Salt-Induced Stabilization of EIN3/EIL1 Confers Salinity Tolerance by Deterring ROS Accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10.
- 267 Wang, Q., Dodd, I.C., Belimov, A.A., Jiang, F., 2016. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na^+ accumulation. *Funct. Plant Biol.* 43, 161-172.
- 268 Holzmeister, C., Gaupels, F., Geerlof, A., Sarioglu, H., Sattler, M., Durner, J., Lindermayr, C., 2015. Differential inhibition of *Arabidopsis* superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *J. Exp. Bot.* 66, 989-999.
- 269 Dugas, D. V., Bartel, B., 2008. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol. Biol.* 67, 403-417.
- 270 Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D., Gorsane, F., 2016. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB Plants* 8.
- 271 Martí, M.C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J.J., Sevilla, F., Jiménez, A., 2011. Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Exp. Bot.* 62, 3863-3874.
- 272 Lázaro, J.J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., Martí, M. del C., Lázaro-Payo, A., Barranco-Medina, S., Sevilla, F., 2013. Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Front. Plant Sci.* 4, 1-20
- 273 Vandelle, E., Delledonne, M., 2011. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181, 534-539.
- 274 Mittal, S., Kumari, N., & Sharma, V. (2012). Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol and Biochem.* 54, 17-26.
- 275 Jiang, M., Ye, Z. hong, Zhang, H. juan, Miao, L. xiang, 2019. Broccoli Plants Over-expressing an ERF Transcription Factor Gene BoERF1 Facilitates Both Salt Stress and Sclerotinia Stem Rot Resistance. *J. Plant Growth Regul.* 38, 1-13.
- 276 Kurepa, J., Hérouart, D., Van Montagu, M., Inzé, D., 1997. Differential Expression of CuZn- and Fe-Superoxide Dismutase Genes of Tobacco during Development, Oxidative Stress, and Hormonal Treatments. *Plant Cell Physiol.* 38, 463-470.
- 277 Hernández, J.A., Corpas, F.J., Gómez, M., del Río, L.A., Sevilla, F., 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol. Plant.* 89, 103-110.
- 278 Badawi, G.H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, Kunisuke, Tanaka, Kiyoshi, 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci.* 166, 919-928.
- 279 Menezes-Benavente, L., Teixeira, F.K., Kamei, C.L.A., Margis-Pinheiro, M., 2004. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 166, 323-331.
- 280 Wang, M., Wang, Y., Zhang, Y., Li, C., Gong, S., Yan, S., Li, G., Hu, G., Ren, H., Yang, J., Yu, T., Yang, K., 2019. Comparative transcriptome analysis of salt-sensitive and salt-tolerant maize reveals potential mechanisms to enhance salt resistance. *Genes and Genomics* 1-21.
- 281 Bonifacio, A., Martins, M.O., Ribeiro, C.W., Fontenele, A. V., Carvalho, F.E.L., Margis-Pinheiro, M., Silveira, J.A.G., 2011. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell Environ.* 34, 1705-1722.

- 282 Karthikeyan, B., Joe, M.M., Islam, M.R., Sa, T., 2012. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis* 56, 77–86.
- 283 Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M. E., & Dodd, I. C. (2010). Hormonal regulation of source - sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Funct. Plant Biol.* 37(7), 592.
- 284 Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324–349.
- 285 Yang, Z., Wang, M., Sun, Ling, Lu, S., Bi, D., Sun, Le, Song, Z., Zhang, S., Zhou, S., Liu, J., 2014. The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants PLoS genetics, 10(3), e1004243.
- 286 Hussain, S., Bai, Z., Huang, J., Cao, X., Zhu, L., Zhu, C., Khaskheli, M.A., Zhong, C., Jin, Q., Zhang, J., 2019. 1-Methylcyclopropene Modulates Physiological, Biochemical, and Antioxidant Responses of Rice to Different Salt Stress Levels. *Front. Plant Sci.* 10, 1–18.
- 287 Khan, M.I.R., Asgher, M., Khan, N.A., 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 80, 67–74.
- 288 Sedigheh, H. G., Mortazavian, M., Norouzian, D., Atyabi, M., Akbarzadeh, A., Hasanpoor, K., & Ghorbani, M. (2011). Oxidative stress and leaf senescence. *BMC research notes*, 4(1), 477.
- 289 Scharte, J., Schön, H., Weis, E., 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell Environ.* 28, 1421–1435.
- 290 Che-Othman, M.H., Millar, A.H., Taylor, N.L., 2017. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C₃ plants. *Plant Cell Environ.* 40, 2875–2905.
- 291 El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Schmidhalter, U., 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 123.
- 292 Wang, H., Huang, J., Bi, Y., 2010c. Induction of alternative respiratory pathway involves nitric oxide, hydrogen peroxide and ethylene under salt stress. *Plant Signal. Behav.* 5, 1636–1637.
- 293 Kingston-Smith, A.H., Thomas, H., Foyer, C.H., 1997. Chlorophyll a fluorescence, enzyme and antioxidant analyses provide evidence for the operation of alternative electron sinks during leaf senescence in a stay-green mutant of *Festuca pratensis*. *Plant, Cell Environ.* 20, 1323–1337.
- 294 Wang, P., Du, Y., Zhao, X., Miao, Y., & Song, C. P. (2013). The MPK6-ERF6-ROS-responsive cis-acting Element7/GCC box complex modulates oxidative gene transcription and the oxidative response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 161(3), 1392–1408.
- 295 Killi, D., Haworth, M., 2017. Diffusive and Metabolic Constraints to Photosynthesis in Quinoa during Drought and Salt Stress. *Plants* 6, 49.
- 296 Hodges, M., Dello, Y., Keech, O., Betti, M., Raghavendra, A.S., Sage, R., Zhu, X.G., Allen, D.K., Weber, A.P.M., 2016. Perspectives for a better understanding of the metabolic integration of photorespiration within a complex plant primary metabolism network. *J. Exp. Bot.* 67, 3015–3026.
- 297 Foyer, C.H., Shigeoka, S., 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 93–100.
- 298 Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E., 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* 79, 209–218.
- 299 Murchie, E.H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983–3998.
- 300 Win, K.T., Fukuyo, T., Keiki, O., Ohwaki, Y., 2018. The ACC deaminase expressing endophyte *Pseudomonas* spp. Enhances NaCl stress tolerance by reducing stress-related ethylene production, resulting in improved growth, photosynthetic performance, and ionic balance in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 127, 599–607.
- 301 Chen, Z., Gallie, D.R., 2015. Ethylene Regulates Energy-Dependent Non-Photochemical Quenching in Arabidopsis through Repression of the Xanthophyll Cycle. *PLoS One* 10, 1–41.
- 302 Huang, W., Yang, Y. J., & Zhang, S. B. (2019). Photoinhibition of photosystem I under fluctuating light is linked to the insufficient ΔpH upon a sudden transition from low to high light. *Environ Exp Bot.* 160, 112–119.
- 303 Zaghdoudi, M., Msilini, N., Govindachary, S., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., Carpentier, R., 2011. Inhibition of photosystems i and II activities in salt stress-exposed Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 105, 14–20.
- 304 Khan, M. I. R., & Khan, N. A. (2014). Ethylene reverses photosynthetic inhibition by nickel and zinc in mustard through changes in PS II activity, photosynthetic nitrogen use efficiency, and antioxidant metabolism. *Protoplasma*, 251(5), 1007–1019.
- 305 Manaa, A., Mimouni, H., Wasti, S., Gharbi, E., Terras, A., Ahmed, H. Ben, 2014. Characterization of transgenic Arabidopsis and tomato plants antisensed for the ethylene receptor gene CcEIN4 under NaCl stress. *J. Plant Interact.* 9, 539–549.
- 306 Brown, H. D., Jackson, R. T., & Dupuy, H. J. (1964). Transport of sugar in Allium: effects of inhibitors and ethylene. *Nature*, 202(4933), 722.
- 307 Kępczyńska, E., & Zielińska, S. (2013). The role of endogenous ethylene in carbohydrate metabolism of *Medicago sativa* L. somatic embryos in relation to their regenerative ability. *J plant growth regul* 32(1), 191–199.
- 308 Wuriyanghan, H., Zhang, B., Cao, W. H., Ma, B., Lei, G., Liu, Y. F., ... & Cao, Y. R. (2009). The ethylene receptor ETR2 delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *The Plant Cell*, 21(5), 1473–1494.
- 309 MacNeill, G.J., Mehrpouyan, S., Minow, M.A.A., Patterson, J.A., Tetlow, I.J., Emes, M.J., (2017). Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* 68, 4433–4453.

- 310 Krasensky, J., Jonak, C., (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks 1–16.
- 311 Keiper FJ, D.M. Chen, L.F. De Filippis (1998). Respiratory, Photosynthetic and Ultrastructural Changes Accompanying Salt Adaptation in Culture of *Eucalyptus microcorys*. *J. Plant Physiol.* 152, 564–573.

10. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10037573

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

- Borbély P., Bajkán Sz, Poór P, Tari I (2019) Exogenous 1-amiocyclopropane-1-carboxylic acid controls photosynthetic activity, accumulation of reactive oxygen or nitrogen species and macroelement content in tomato in long-term experiments. *Journal of Plant Growth Regulation*. 1-17. **IF: 2,179** (2018)
- Péter Poór, Judit Kovács, Péter Borbély, Zoltán Takács, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2015) Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant *Never ripe* and wild type tomato roots *Plant Physiol and Biochemistry* 97:pp. 313-322. **IF: 2,756**
- Nyilvános idézők összesen: 14 Független: 10 Független: 4

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

- Poór, Péter; Borbély, Péter; Czékus, Zsolt; Takács, Zoltán; Ördög, Attila; Popović, Boris; Tari, Irma (2019) Comparison of changes in water status and photosynthetic parameters in wild type and abscisic acid-deficient *sitens* mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Rheinlands Ruhm) exposed to sublethal and lethal salt stress *Journal of Plant Physiology* 232, pp. 130-140, 11 p. **IF: 2,825**
- Poór P, Borbély P., Bódi N, Bagyánszky M, Tari I (2019) Effect of salicylic acid on photosynthetic activity and chloroplast morphology under light and prolonged darkness. *Photosynthetica* 57, 367-376. **IF: 2,365**
- Zoltán Takács; Péter Poór; Péter Borbély; Zsolt Czékus; Gabriella Szalai; Irma Tari (2018) H₂O₂ homeostasis in wild-type and ethylene-insensitive *Never ripe* tomato in response to salicylic acid treatment in normal photoperiod and in prolonged darkness *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, pp. 74-85. **IF: 3,404**
- Poór P, Takács Z, Patyi G, Borbély P., Becsik O, Szekeres A, Tari I (2018) Dark-induced changes in the activity and the expression of tomato hexokinase genes depend on the leaf age. *South African Journal of Botany*, 118, 98-104. **IF: 1,504**
- Poór P, Ördög A, Czékus Z, Borbély P., Takács Z, Kovács J, Tari I (2018) Regulation of the key antioxidant enzymes by developmental processes and environmental stresses in the dark. *Biologia Plantarum* 62, pp 201-210. **IF: 1,384**
- Poór P, Borbély P., Kovács J, Papp A, Szepesi Á, Takács Z, Tari I (2014) Opposite extremes in ethylene/nitric oxide ratio induce cell death in cell suspension culture and in root apices of tomato exposed to salt stress. *Acta Biologica Hungarica* 65:pp. 428-438. **IF: 0,589**

Összesített IF: 17,007

Egyéb folyóiratcikkek:

- Orbán Cs., Csajbók Cs., É. Hegedűs N., Borbély P. (2015): Alteration of peroxidase activity, chlorophyll content and antioxidant-capacity of corn salad (*Valerianella locusta*) during storage. *BioTechnology: An Indian Journal*. 11(2):66-70.

A doktori disszertációhoz kapcsolódó konferencia közlemények:

- Borbély Péter; Poór Péter; Hegedűs Dóra; Tari Irma (2019) Oxidatív stresszválasz kialakulása különböző etilén státuszú paradicsomban sóstressz alatt In: Poór Péter; Blázovics Anna (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa: Program és összefoglalók Szeged, Magyarország: Szegedi Tudományegyetem, (2019) p. 26
- Borbély Péter, Poór Péter, Tari Irma (2018) Az etilén prekursor, 1-aminociklopropán-1-karbonsav hatása paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitására Hazai Fotoszintézis-kutatók Találkozója 2018. november 7-9. Mátrafüred (előadás)
- Borbély P., Czékus Z, Hegedűs D, Kurtulus G, Péter P, Tari I. (2017) Az etilén szerepe a reaktív oxigén- és nitrogénformák akkumulációjának szabályozásában sóstressznek kitett paradicsomnövényekben. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 9. Kongresszusa, 2017. aug. 25-26., Gödöllő, Absztraktgyűjtemény 25. old. (előadás)
- Péter Borbély, Zoltán Takács, Orsolya Csíkos, Péter Poór, Irma Tari (2017) Exogenous ACC treatment affects photosynthetic activity and related parameters of tomato plants by a concentration dependent manner. A Magyar Növénybiológiai Társaság 12. kongresszusa, Szeged, 2017. aug. 30-szept. 1. (poszter)
- Péter Borbély, Péter Poór, Gábor Patyi, Irma Tari (2015) Effect of Ethylene Precursor ACC Pre-Treatment on Photosynthesis Under Salt Stress In: Jian-kang Zhu, Alisher Touraev (szerk.) Plant Abiotic Stress Tolerance III: Programme and Abstracts. Konferencia helye, ideje: Bécs, Ausztria, 2015.06.29.p. 63 (poszter)

Egyéb közlemények, posztterek, konferencia közlemények

- Marschall Marianna, Borbély Péter (2018) Újranedvesedés alatti fényvédelmi és regenerációs mechanizmusok háttérfolyamatainak, komponenseinek vizsgálata kiszáradástűrő és kiszáradásérzékeny mohafajokban. Hazai Fotoszintézis-kutatók Találkozója 2018. november 7-9. Mátrafüred (előadás)
- Marschall, M; Borbély, P ; Pné-Kónya, E ; Sütő, Sz: Background processes and the components of photoprotection and regeneration under rehydration in desiccation-tolerant and desiccation-sensitive bryophytes Paper: 29 , 1 p. In: Plant Biology Europe 2018 Conference : Photosynthesis Diversity Copenhagen, Dánia (2018) p. 1 (poszter)
- Zalán, Czékus; Orsolya, Csíkos; Dóra, Hegedűs ; Péter, Borbély ; Attila, Ördög ; Péter, Poór: Investigation of dark modulated endoplasmatic reticulum (ER) stress in tomato plants p. 116 In: Tamás, László; Zelenyánszki, Helga (szerk.) Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book, Szeged, Magyarország: JATEPress Kiadó, (2018) (előadás)
- Poór Péter, Czékus Zalán, Borbély Péter, Takács Zoltán, Tari Irma: Növényi antioxidáns enzimek szalicilsav kezelést követő etilénfüggő szabályozása sötétben In: Mézes Miklós (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság IX. Kongresszusa és az MTA ÉKB Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. 2017.08.25 Gödöllő, Magyarország. (előadás)
- Marschall M, Borbély P, Sütő Sz (2017) Újranedvesedés alatti fényvédelmi és regenerációs mechanizmusok háttérfolyamatainak, komponenseinek vizsgálata kiszáradástűrő és kiszáradásérzékeny mohafajokban In: Györgyey János (szerk.) A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa. 72 p. 2017.08.30. Szeged, Magyarország. (előadás)
- Kovács J, Poór P, Borbély P, Czékus Z, Tari I (2017) Sóstresszre adott válaszreakciók paradicsomban: nitrogénmonoxid, reaktív oxigénformák és proteolízis indukciója abszcizinsav hiányos paradicsom mutánsokban. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 9. Kongresszusa, 2017. aug. 25-26., Gödöllő, Absztraktgyűjtemény 24. old. (előadás)
- Poór Péter; Zoltán, Takács ; Péter, Borbély ; Zalán, Czékus ; Irma, Tari (2017) Ethylene dependent changes in hydrogen-peroxide homeostasis after salicylic acid treatment in tomato p. 21 In: Andreas, Bachmair; Alisher, Touraev (szerk.) International Conference Plant Molecular Physiology: Programme and Abstracts (2017) 2017.02.23 (poszter)
- Poór Péter, Judit Kovács, Ágnes Szepesi, Péter Borbély, Gábor Patyi, Irma Tari (2016) Salt stress-induced oxidative stress in ethylene signaling mutant, Never ripe tomato. HUSBR/1203/221/173 „PLANTTRAIN”: Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society. Closing Conference. 2016.05.23. Novi Sad, Serbia. (előadás)
- Zoltán Takács, Zalán Czékus, Péter Poór, Péter Borbély, Irma Tari (2016) Effect of light on the salicylic-induced oxidative stress in tomato. HUSBR/1203/221/173 „PLANTTRAIN”: Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledgebased society. Closing Conference. 2016.05.23. Novi Sad, Serbia (előadás)
- Péter Poór, Zoltán Takács, Péter Borbély, Zalán Czékus, Gábor Patyi, Irma Tari (2016) Involvement of ethylene in hydrogenperoxide metabolism in the leaves of salicylic acid treated tomato. Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress. 2016.06.26 Prága, Csehország (poszter)
- Péter Poór, Zalán Czékus, Gábor Patyi, Péter Borbély, Judit Kovács, Zoltán Takács, Irma Tari: Investigation of Salt Stress-induced Changes in Water Status, Photosynthetic Parameters and Cysteine Protease Activity in Wild Type and Abscissic Acid-Deficient Sitiens Mutant of Tomato (*Solanum Lycopersicum* cv. Rheinland Ruhm). In: Andreas Bachmair, Klaus Palme, Alisher Touraev (szerk.) Programme and Abstracts: Plant Model Species: Fundamentals and Applications. 2016.02.04. Bécs. Ausztria. p.23. (poszter)
- Tari Irma, Borbély Péter, Csiszár Jolán , Horváth Edit , Poór Péter, Szepesi Ágnes , Takács Zoltán (2016) Szalicilsav kémiai edzés hatása a paradicsom sóstressz toleranciájára In: Rajnai Zoltán, Fregán Beatrix , Marosné Kuna Zsuzsanna (szerk.) Tanulmánykötet a 7. BBK előadásaiból. 1-2. kötet . 1159 p. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország , 2016.05.19 -2016.05.20. Budapest: Óbudai Egyetem, Bánki Donát Gépész és Biztonságtechnikai Mérnöki Kar, 2016. pp. 407-416. (ISBN:978-615-5460-97-5) (előadás és kiadvány)
- Poór, P., Kovács, J., Borbély, P., Takács, Z., Szepesi, Á., Tari, I. (2015) Sóstressz indukált változások a reaktív oxigén és nitrogénformák akkumulációjában etilénreceptor mutáns *Never ripe* és vad típusú paradicsomban. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VIII. Kongresszusa, Budapest, 2015. november 5-6. Absztraktfüzet, pp. 32.
- Péter Poór, Attila Ördög , Barnabás Wodala , Péter Borbély , Ionel Samfira , Monica Butnariu , Dóra Hegedűs , Katalin Szabó , Attila Pécsváradi , Irma Tari (2015) Effect of Salinity Stress on Ion Accumulation and on the Photosynthetic Activity of a New Energy Plant, *Phalaris arundinacea* Cultivars. In: Alapi Tünde,

- Ilisz István (szerk.) Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and Environmental Problems . 445 p. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország , 2015.09.28 Szeged: Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2015. p. 392-4.(ISBN:978-963-306-411-5) (poszter és kiadvány)
- Péter Poór, Zoltán Takács, Péter Borbély, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2015) Light and Darkness Modulate the Oxidative Burst And Enzymatic Antioxidant Systems In Salicylic Acid-Treated Tomato Leaf In: Laura De Gara, Massimo Delledonne (szerk.) 12th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from model systems to field. Konferencia helye, ideje: Verona, Olaszország, 2015.06.24-2015.06.26.p. 111. (poszter)
- Ágnes Szepesi, Péter Borbély, Ágnes Hurton, Zoltán Takács, Szabolcs Tóth, Izabella Kovács, Christian Lindermayr, Irma Tari (2015) Polyamine catabolism under salt stress: inhibiting diamine oxidase by aminoguanidine. In: Irma Tari, Dániel Benyó Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society: Opening Conference, BOOK OF ABSTRACTS. 2015.04.20 Szeged, Magyarország, Szeged: p. 12. 1 p. (előadás)
- Tari Irma , Borbély Péter , Csiszár Jolán , Gémes Katalin , Horváth Edit , Kovács Judit ,Poór Péter, Szepesi Ágnes, Takács Zoltán (2014) Sóstressz tolerancia fokozása szalicilsavval paradicsomban: az abszcizinsav szerepe. In: Fodor F (szerk.) Paál Árpádtól a molekuláris növénybiológiáig: Tudományos ülés Paál Árpád születésének 125. és intézetigazgatói kinevezésének 85. évfordulója alkalmából. Konferencia helye, ideje: Budapest , Magyarország, 2014.12.16 Budapest: ELTE Biológiai Intézet Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, 2014. pp. 55-59. (ISBN:978-963-284-561-6) (előadás és kiadvány)
- Poór Péter, Kovács Judit, Borbély Péter Gábor, Takács Zoltán, Szepesi Ágnes, Tari Irma (2015) Exogén NO hatása a sóstressz indukált fiziológiai válaszreakciókra paradicsomban. Magyar Tudomány Ünnepe, Az MTA SZAB Biológiai Szakbizottság ünnepi tudományos ülése, Reprezentatív előadások a biológiai munkabizottságok kutatási területeiről. 2014. november 26: Szeged. Magyarország. (előadás)
- Péter Borbély, Péter Poór, Judit Kovács, Zoltán Takács, Gábor Patyi, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2015) Exogenous sodium nitroprusside alleviates salt-induced changes in photosynthesis of tomato leaves. In: Györgyey J (szerk.): 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology: Book of Abstracts.: MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged, Magyarország, p. 61. 2014.09.27. (poszter)

11. Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Borbély Péter Gábor Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Borbély P, Bajkán Sz, Poór P, Tari I (2019) Exogenous 1-amiocyclopropane-1-carboxylic acid controls photosynthetic activity, accumulation of reactive oxygen or nitrogen species and macroelement content in tomato in long-term experiments. *Journal of Plant Growth Regulation*. 1-17.
Szeged, 2019. szeptember 23.

Dr. Görgényi Miklósné Dr. *Habil.* Tari Irma
egyetemi docens
SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

Péter Poór, Judit Kovács, Péter Borbély, Zoltán Takács, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2015) Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant *Never ripe* and wild type tomato roots *Plant Physiology and Biochemistry* 97: pp.313-322.
Szeged, 2019. szeptember 23.

Dr. Poór Péter
egyetemi adjunktus
SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

Dr. Görgényi Miklósné Dr. *Habil.* Tari Irma
egyetemi docens
SZTE-TTIK Növénybiológiai Tanszék

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanárnőnek, aki MSc. szakdolgozó korom óta végtelen türelemmel támogatott és tanított, továbbá, hogy korábbi tanszékvezetőként lehetőséget teremtett a Ph.D. munkám elvégzéséhez! Segítsége és szakmai tudása felbecsülhetetlen a közös publikációk és a doktori disszertáció elkészítése során.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Fehér Attilának, hogy tanszékvezetőként lehetővé tette a disszertációmhoz szükséges munka befejezését a Növénybiológiai Tanszéken! Támogatása és pozitív hozzáállása nélkülözhetetlen a disszertáció elkészüléséhez.

Köszönöm Dr. Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának, hogy segítséget nyújtott a Ph.D. munkám folytatásához a Növénybiológiai Tanszéken.

Köszönöm Dr. Poór Péter mindennemű támogatását, mellyel elősegítette a laboratóriumi kísérletek és a disszertációm elkészülését.

Köszönöm Bécs Attiláné minden segítségét, mellyel megkönnyítette a laboratóriumi munkát, valamint külön köszönöm a fáradhatatlan segítségnyújtását a kísérletekhez használt növények nevelése során. Külön köszönettel tartozom Dóri Erikának, Kapásné Török Évának, Porkoláb Erzsébetnek és Tandari Máriának a mintafeldolgozások és egyéb, laboratóriumi munkák során nyújtott szakszerű segítségét!

Köszönöm Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolánnak, Dr. Pécsváradi Attilának, Dr. Gallé Ágnesnek, Dr. Horváth Editnek, Dr. Szepesi Ágnesnek és Dr. Ördög Attilának, hogy mindig fordulhattam hozzájuk szakmai tanácsért!

Köszönöm Ph.D.-s társaimnak, Molnár Árpádnak, Czékus Zalánnak, Bakacsy Lászlónak, Dr. Németh Editnek, Dr. Bela Krisztinának, Riyazzudinnek, hogy segítségükkel minden technikai akadály legyőzhető volt és hogy személyiségükkel jókedvet varázsoltak a legkeményebb napokba is!

Köszönöm a szorgalmas szakdolgozóinknak, Hegedűs Dórának, Csíkos Orsolyának, Patyi Gábornak és Gamze Kurtulusnak minden segítségét!

Köszönöm továbbá a Növénybiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, hogy bármilyen formában segítették a munkám előrehaladását!

Köszönöm a NAIK-ÖVK munkatársainak, Dr. Jancsó Mihálynak és Dr. Penczi Andrásnak az ICP-MS mérések elvégzését, valamint az SZTE Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak a plate reader használatának lehetővé tételéért!

Legnagyobb köszönettel pedig szüleimnek, páromnak és a barátaimnak tartozom, akik minden helyzetben mellettem álltak! Támogatásuk nélkül képtelenség lett volna idáig eljutnom.

A dolgozat megvalósításához hozzájárultak az **OTKA K101243** és a **HUSRB/120/221/173 PLANTTRAIN IPA** pályázatok.

13. Mellékletek

1. melléklet A qRT-PCR analízishez használt oligonukleotid primer párok

Gén neve	Rövidítés	Azonosító	Írány	Szekvencia (5'-3')
Elongációs faktor 1 α	<i>SLEF1α</i>	Solyc06g005060	Forward Reverz	GGAACCTTGAGAAGGAGCCTAAG CAACACCAACAGCAACAGTCT
18S riboszomális RNS	<i>SI18SrRNS</i>	GQ280796	Forward Reverz	CGGAGAGGGAGCCTGAGAA CCCGTGTTAGGATTGGGTAATTT
Mangán-szuperoxid-dizmutáz	<i>SIMnSOD</i>	Solyc06g049080	Forward Reverz	TTCTCTTGGCTGGGCTATTG AGCACCTTCTGCGTTCATCT
Réz/cink-szuperoxid-dizmutáz	<i>SICu/ZnSOD</i>	Solyc01g067740	Forward Reverz	CCGACAAGCAGATTCCTCTC TCATGTCTCCCTTTCCAAG
Vas-szuperoxid-dizmutáz	<i>SIFeSOD</i>	Solyc06g048410	Forward Reverz	ATCCCTCCTCCTTATCCAATG GACATACGCCCTGTGATGC
Kataláz 1	<i>SIKAT1</i>	Solyc12g094620	Forward Reverz	GATGATGTTTGTCTCCCAACG AATGTGCTTTCCCTCTTTGT
Kataláz 2	<i>SIKAT2</i>	Solyc02g082760	Forward Reverz	AACAACCTCCCCGTCTTCTTC TTAGGATTTGGCTTCAGAGCA
Kataláz 3	<i>SIKAT3</i>	Solyc04g082460	Forward Reverz	CCCTATTCCTCCTCGTGTCTT TGTAATGTTCTCCTGGCTGCT
Aszkorbát-peroxidáz 1	<i>SIAPX1</i>	Solyc06g005160	Forward Reverz	CTGGTGTTGTTGCTGTTGAAG GCTCTGGCTTGTCTCTCTG
Aszkorbát-peroxidáz 2	<i>SIAPX2</i>	Solyc06g005150	Forward Reverz	CTGGTGTTGTTGCTGTTGAAG GGTGGTTCTGGTTTGTCTCT
NADPH-oxidáz (RBOH1)	<i>SIRBOH1</i>	Solyc08g081690	Forward Reverz	TGGGGATGACTACTTGAGCA AAGCCTCGGAAACACTCG

Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és a Sol Genomics (<http://solgenomics.net/>) adatbázisok segítségével azonosított szekvenciákra a Primer 3 szoftverrel [223] terveztünk primereket, melyek génspecificitását az NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) használatával ellenőriztük.

2. melléklet 1 hetes, 0,01, 1,0 és 100 μM ACC kezelésnek kitett paradicsom hajtások morfológiai változásai

3. melléklet SOD, KAT és APX izoenzimek, illetve az *SIRBOH1* gén relatív expressziója a gyökérben.

Gyökér		<i>SIMsOD</i>			<i>SIKAT1</i>			<i>SIKAT2</i>			<i>SIKAT3</i>			<i>SLAPX1</i>			<i>SLAPX2</i>			<i>SIRBOH1</i>		
Kezelés	Óra	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24
0 mM NaCl	VT	0,00 ± 0,1 ^{bc}	0,00 ± 0,0 ^f	0,00 ± 0,1 ^c	0,00 ± 0,2 ^f	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,3 ^{bc}	0,00 ± 0,7 ^c	0,00 ± 0,1 ^s	0,00 ± 0,3 ^c	0,00 ± 0,3 ^d	0,00 ± 0,1 ^c	0,00 ± 0,1 ^{ab}	0,00 ± 0,8 ^d	0,00 ± 0,2 ^c	0,00 ± 0,1 ^s	0,00 ± 0,0 ^g	0,00 ± 0,0 ^{ab}	0,00 ± 0,5 ^c	0,00 ± 0,4 ^c	0,00 ± 0,1 ^f
	VT + 10 µM ACC	-0,76 ± 0,0 ^c	0,83 ± 0,0 ^{cd}	0,69 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,0 ^{de}	-2,27 ± 0,2 ^d	1,96 ± 0,1 ^a	-3,51 ± 0,3 ^f	2,05 ± 0,1 ^{ab}	-1,95 ± 0,1 ^c	-1,78 ± 0,0 ^e	1,22 ± 0,1 ^b	-1,59 ± 0,0 ^f	-0,30 ± 0,1 ^{bc}	2,71 ± 0,5 ^b	1,18 ± 0,5 ^a	-0,87 ± 0,1 ^c	3,30 ± 0,0 ^{de}	-0,73 ± 0,5 ^{cd}	-2,37 ± 0,4 ^d	1,04 ± 0,2 ^b	1,97 ± 0,1 ^{bc}
	Nr	0,70 ± 0,0 ^a	1,01 ± 0,0 ^{cd}	-1,69 ± 0,1 ^e	3,80 ± 0,1 ^a	-0,69 ± 0,1 ^c	-1,06 ± 0,0 ^f	0,34 ± 0,1 ^a	1,48 ± 0,1 ^b	-2,70 ± 0,1 ^d	0,69 ± 0,1 ^b	0,43 ± 0,1 ^{cd}	-1,89 ± 0,1 ^f	-1,17 ± 0,2 ^d	1,82 ± 0,1 ^{bc}	-1,02 ± 0,1 ^d	-1,28 ± 0,1 ^d	3,53 ± 0,1 ^{cd}	-1,15 ± 0,0 ^d	1,72 ± 0,6 ^b	1,72 ± 0,1 ^a	2,45 ± 0,1 ^b
100 mM NaCl	VT	-0,16 ± 0,0 ^e	1,19 ± 0,1 ^c	0,13 ± 0,2 ^e	3,48 ± 0,2 ^a	-0,48 ± 0,0 ^e	0,93 ± 0,1 ^c	-0,98 ± 0,1 ^d	1,30 ± 0,1 ^b	-1,30 ± 0,0 ^b	-1,29 ± 0,2 ^e	1,13 ± 0,1 ^b	1,47 ± 0,1 ^{bc}	-0,45 ± 0,2 ^e	0,73 ± 0,5 ^{cd}	0,17 ± 0,2 ^{bc}	-0,51 ± 0,1 ^b	1,87 ± 0,4 ^f	-0,35 ± 0,0 ^b	1,87 ± 0,0 ^b	-0,36 ± 0,2 ^c	0,39 ± 0,2 ^{cd}
	VT + 10 µM ACC	0,26 ± 0,0 ^b	0,63 ± 0,0 ^{cd}	-0,88 ± 0,2 ^d	3,06 ± 0,2 ^b	0,09 ± 0,1 ^b	-0,42 ± 0,3 ^{de}	-0,20 ± 0,1 ^{bc}	1,68 ± 0,2 ^{ab}	-2,23 ± 0,2 ^c	1,49 ± 0,0 ^a	0,41 ± 0,0 ^{cd}	-1,36 ± 0,1 ^f	-1,14 ± 0,1 ^d	0,84 ± 0,4 ^{cd}	-0,86 ± 0,1 ^d	-1,40 ± 0,0 ^d	2,92 ± 0,1 ^c	-1,24 ± 0,0 ^d	-0,56 ± 0,4 ^c	0,86 ± 0,3 ^b	0,95 ± 0,0 ^{de}
	Nr	-0,12 ± 0,2 ^c	2,03 ± 0,0 ^b	1,49 ± 0,0 ^a	1,25 ± 0,0 ^c	-0,42 ± 0,2 ^e	1,39 ± 0,1 ^b	0,20 ± 0,1 ^{ab}	1,49 ± 0,0 ^b	-0,45 ± 0,1 ^a	-0,42 ± 0,1 ^{cd}	1,02 ± 0,1 ^{bc}	1,82 ± 0,2 ^b	-0,85 ± 0,1 ^d	2,41 ± 0,2 ^b	0,65 ± 0,0 ^{ab}	-0,21 ± 0,2 ^{ab}	4,49 ± 0,1 ^b	0,54 ± 0,0 ^a	3,54 ± 0,0 ^a	2,38 ± 0,1 ^a	3,67 ± 0,2 ^a
250 mM NaCl	VT	-1,12 ± 0,0 ^f	0,34 ± 0,2 ^{cd}	0,27 ± 0,2 ^{bc}	-0,80 ± 0,0 ^b	-4,26 ± 0,0 ^f	-0,17 ± 0,2 ^d	-1,53 ± 0,0 ^e	1,29 ± 0,1 ^b	-4,52 ± 0,1 ^f	-2,87 ± 0,0 ^f	0,02 ± 0,1 ^d	1,02 ± 0,1 ^c	0,26 ± 0,1 ^a	1,56 ± 0,1 ^{bc}	-1,12 ± 0,2 ^{de}	-1,40 ± 0,0 ^d	2,99 ± 0,0 ^{de}	0,26 ± 0,1 ^{ab}	-1,24 ± 0,2 ^{cd}	-2,13 ± 0,2 ^d	-1,53 ± 0,6 ^a
	VT + 10 µM ACC	0,11 ± 0,3 ^{bc}	1,02 ± 0,0 ^{cd}	0,28 ± 0,2 ^{bc}	0,75 ± 0,0 ^d	-3,86 ± 0,0 ^f	1,22 ± 0,2 ^{bc}	-0,48 ± 0,2 ^c	0,33 ± 0,1 ^c	-3,50 ± 0,3 ^c	-0,76 ± 0,0 ^d	1,34 ± 0,5 ^b	2,40 ± 0,0 ^a	-0,45 ± 0,1 ^c	1,92 ± 0,2 ^{bc}	0,55 ± 0,0 ^{bc}	-0,43 ± 0,1 ^b	3,87 ± 0,3 ^c	0,00 ± 0,1 ^{ab}	-2,03 ± 0,7 ^d	-0,32 ± 0,4 ^c	-2,07 ± 0,4 ^a
	Nr	-0,10 ± 0,0 ^c	3,96 ± 0,2 ^a	-1,18 ± 0,1 ^d	0,26 ± 0,1 ^{cd}	0,74 ± 0,2 ^a	-0,63 ± 0,1 ^e	-1,66 ± 0,1 ^e	2,41 ± 0,1 ^a	-3,81 ± 0,0 ^a	-1,37 ± 0,4 ^e	2,23 ± 0,1 ^a	0,00 ± 0,4 ^{de}	-2,98 ± 0,0 ^a	4,28 ± 0,0 ^a	-1,65 ± 0,0 ^a	-2,23 ± 0,1 ^e	5,74 ± 0,1 ^a	-1,87 ± 0,0 ^a	1,45 ± 0,1 ^b	1,83 ± 0,2 ^a	1,37 ± 0,4 ^{cd}

Relatív expressziós szintek log₂ értékének ábrázolása, VT és Nr mutáns (0 µM ACC), valamint 10 µM ACC-vel kezelt VT paradicsomnövények gyökereiben, a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. Átlag ± SE, n=3). A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. A különböző betűvel jelölt cellák szignifikáns különbségeket mutatnak P ≤ 0,05 szinten az adott időpontokon belül (Duncan teszt).

4. melléklet SOD, KAT és APX izoenzimek, illetve az *SIRBOH1* génnek relatív expressziója a levélben.

Kezelés	Levél Óra	SIFeSOD			SIMnSOD			SICwZnSOD			SIKAT1			SIKAT2			SIKAT3			SIAPX1			SIAPX2			SIRBOH1		
		1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24	1	6	24
0 mM NaCl	VT	0,00 ± 0,0 ^a	0,00 ± 0,2 ^c	0,00 ± 0,1 ^a	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,1 ^a	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^{bc}	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,0 ^a	0,00 ± 0,1 ^b	0,00 ± 0,1 ^g	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,1 ^d	0,00 ± 0,1 ^{de}	0,00 ± 0,1 ^a	0,00 ± 0,0 ^d	0,00 ± 0,1 ^a	0,00 ± 0,0 ^{cd}	0,00 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,1 ^c
	VT + 10 µM ACC	1,71 ± 0,1 ^a	1,12 ± 0,0 ^a	-0,44 ± 0,1 ^b	1,00 ± 0,0 ^a	0,29 ± 0,0 ^a	-0,68 ± 0,1 ^d	1,15 ± 0,1 ^{ab}	-0,19 ± 0,1 ^d	0,12 ± 0,1 ^d	1,00 ± 0,0 ^c	-0,21 ± 0,0 ^c	0,12 ± 0,0 ^b	0,06 ± 0,0 ^b	0,12 ± 0,1 ^{cd}	-1,25 ± 0,0 ^b	0,63 ± 0,1 ^a	0,51 ± 0,0 ^a	0,73 ± 0,1 ^b	1,14 ± 0,0 ^a	-0,96 ± 0,0 ^a	0,96 ± 0,1 ^a	0,66 ± 0,1 ^b	-1,25 ± 0,0 ^a	-0,08 ± 0,2 ^{cd}	-0,07 ± 0,1 ^{bc}	-1,37 ± 0,0 ^a	
	Nr	0,44 ± 0,0 ^d	1,31 ± 0,0 ^a	-0,78 ± 0,0 ^a	-0,56 ± 0,1 ^e	0,25 ± 0,0 ^a	0,22 ± 0,0 ^a	-0,30 ± 0,2 ^e	0,23 ± 0,1 ^b	-0,33 ± 0,1 ^a	-1,58 ± 0,1 ^g	0,53 ± 0,0 ^b	-2,92 ± 0,0 ^a	-0,21 ± 0,1 ^{cd}	-0,27 ± 0,0 ^a	0,66 ± 0,1 ^c	-0,55 ± 0,1 ^c	0,31 ± 0,0 ^f	0,55 ± 0,0 ^{bc}	1,20 ± 0,0 ^a	-1,76 ± 0,0 ^a	-0,22 ± 0,0 ^a	0,92 ± 0,0 ^a	-2,11 ± 0,0 ^a	-0,11 ± 0,0 ^{cd}	-0,26 ± 0,0 ^a	0,09 ± 0,1 ^c	
100 mM NaCl	VT	0,64 ± 0,0 ^c	-0,23 ± 0,1 ^c	-0,89 ± 0,1 ^c	0,15 ± 0,0 ^{cd}	-0,63 ± 0,1 ^c	-0,49 ± 0,1 ^c	1,43 ± 0,1 ^a	-1,19 ± 0,1 ^f	1,01 ± 0,0 ^b	1,62 ± 0,1 ^a	-1,07 ± 0,1 ^g	0,64 ± 0,0 ^a	-0,25 ± 0,1 ^d	0,23 ± 0,0 ^{bc}	0,23 ± 0,1 ^d	0,90 ± 0,1 ^a	0,74 ± 0,1 ^d	0,50 ± 0,0 ^a	-1,06 ± 0,1 ^{bc}	-1,05 ± 0,1 ^d	0,60 ± 0,1 ^b	-0,03 ± 0,1 ^d	-1,04 ± 0,0 ^d	0,28 ± 0,1 ^{bc}	-1,68 ± 0,0 ^a	-0,30 ± 0,0 ^d	
	VT + 10 µM ACC	1,65 ± 0,1 ^a	-0,22 ± 0,0 ^c	-1,88 ± 0,0 ^d	0,27 ± 0,0 ^{bd}	0,08 ± 0,0 ^b	-1,52 ± 0,0 ^a	0,78 ± 0,0 ^c	0,08 ± 0,0 ^{bc}	-0,78 ± 0,0 ^a	0,61 ± 0,1 ^d	-0,62 ± 0,1 ^f	-0,46 ± 0,0 ^a	0,08 ± 0,0 ^b	0,55 ± 0,1 ^a	-1,48 ± 0,0 ^b	0,02 ± 0,0 ^b	0,30 ± 0,1 ^c	-0,09 ± 0,0 ^d	-1,65 ± 0,0 ^f	0,61 ± 0,0 ^b	-0,29 ± 0,0 ^a	-1,64 ± 0,0 ^g	0,27 ± 0,1 ^c	-0,70 ± 0,0 ^d	-1,74 ± 0,1 ^g		
	Nr	0,78 ± 0,0 ^c	0,39 ± 0,0 ^b	-1,87 ± 0,1 ^d	0,53 ± 0,0 ^b	0,10 ± 0,0 ^b	0,27 ± 0,0 ^a	1,00 ± 0,0 ^{bc}	-0,23 ± 0,1 ^d	0,42 ± 0,0 ^a	-1,47 ± 0,0 ^g	0,36 ± 0,0 ^g	-3,40 ± 0,0 ^a	0,25 ± 0,0 ^{ab}	-0,05 ± 0,1 ^d	1,65 ± 0,0 ^a	-1,03 ± 0,1 ^d	0,13 ± 0,1 ^g	-0,13 ± 0,0 ^{ab}	1,18 ± 0,0 ^a	0,27 ± 0,0 ^a	-1,01 ± 0,0 ^a	0,53 ± 0,0 ^{bc}	0,00 ± 0,1 ^d	-1,44 ± 0,0 ^f	1,07 ± 0,1 ^a	-1,30 ± 0,1 ^e	1,03 ± 0,1 ^a
250 mM NaCl	VT	0,77 ± 0,0 ^c	-0,71 ± 0,1 ^d	-1,68 ± 0,0 ^d	0,15 ± 0,1 ^{cd}	-1,01 ± 0,1 ^b	-0,51 ± 0,1 ^c	1,27 ± 0,1 ^{ab}	1,01 ± 0,0 ^a	3,07 ± 0,1 ^a	1,15 ± 0,1 ^{bc}	-0,55 ± 0,1 ^f	-0,51 ± 0,0 ^a	0,38 ± 0,1 ^a	-0,84 ± 0,0 ^f	-0,78 ± 0,0 ^f	0,58 ± 0,1 ^a	0,70 ± 0,0 ^d	2,05 ± 0,0 ^a	0,32 ± 0,1 ^c	0,66 ± 0,1 ^b	-0,60 ± 0,0 ^a	0,26 ± 0,2 ^{cd}	0,34 ± 0,1 ^c	-0,18 ± 0,1 ^b	-0,24 ± 0,0 ^d	-0,65 ± 0,1 ^d	0,53 ± 0,0 ^b
	VT + 10 µM ACC	1,63 ± 0,1 ^a	-0,10 ± 0,2 ^c	-2,94 ± 0,0 ^f	0,35 ± 0,1 ^{bc}	0,05 ± 0,1 ^b	-2,19 ± 0,1 ^g	1,20 ± 0,1 ^{ab}	0,26 ± 0,1 ^b	1,05 ± 0,0 ^b	1,29 ± 0,1 ^b	0,21 ± 0,0 ^c	-1,68 ± 0,2 ^a	0,09 ± 0,0 ^b	0,35 ± 0,0 ^b	-2,97 ± 0,1 ⁱ	0,82 ± 0,2 ^a	1,42 ± 0,1 ^e	-0,32 ± 0,1 ^a	-0,01 ± 0,2 ^d	0,68 ± 0,0 ^b	-1,48 ± 0,1 ^e	0,34 ± 0,2 ^{bc}	0,04 ± 0,0 ^d	-0,87 ± 0,1 ^c	0,23 ± 0,3 ^c	0,40 ± 0,0 ^a	-1,58 ± 0,1 ^f
	Nr	1,01 ± 0,0 ^b	-0,17 ± 0,1 ^c	-2,54 ± 0,0 ^e	0,27 ± 0,2 ^{bd}	-0,49 ± 0,1 ^c	-1,91 ± 0,0 ^f	0,77 ± 0,0 ^c	-0,62 ± 0,0 ^a	0,46 ± 0,1 ^c	-0,89 ± 0,0 ^f	1,05 ± 0,1 ^a	-2,82 ± 0,0 ^a	0,48 ± 0,2 ^a	-1,01 ± 0,1 ^f	1,06 ± 0,1 ^b	-0,53 ± 0,1 ^c	1,18 ± 0,1 ^b	1,57 ± 0,0 ^a	-0,15 ± 0,1 ^d	-1,19 ± 0,0 ^d	-0,19 ± 0,1 ^e	-0,52 ± 0,1 ^f	-1,41 ± 0,0 ^f	0,78 ± 0,2 ^a	-2,18 ± 0,0 ^e	1,12 ± 0,1 ^a	

Relatív expressziós szintek log₂ értékének ábrázolása, VT és Nr mutáns (0 µM ACC), valamint 10 µM ACC-vel kezelt VT paracitommónócyek leveleiben, a 100 mM ill. 250 mM-os NaCl hozzáadását követő 1, 6, ill. 24 óra elteltével. Átlag ± SE, n=3). A kísérlet kezdő időpontja a VT növények ACC kezelése 1. órájának leteltétől számítva. A különböző betűvel jelölt cellák szignifikáns különbségeket mutatnak P ≤ 0,05 szinten az adott időpontokon belül (Duncan teszt).