

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Paradicsom sóstressz akklimatizációjának javítása szalicilsav
előkezeléssel: a reaktív oxigénformák és a nitrogén-monoxid szerepe

Doktori (PhD) értekezés

Gémes Katalin

Témavezető:

Dr. habil. Tari Irma

Tanszékvezető egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

Szeged

2011.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	- 1 -
Rövidítések jegyzéke.....	- 4 -
1. Bevezetés.....	- 5 -
2. Irodalmi áttekintés.....	- 9 -
2.1 Stresszfolyamatok növényekben	- 9 -
2.2 A sóstressz.....	- 10 -
2.2.1 A sóstressz hatása a fotoszintetikus folyamatokra	- 15 -
2.3 Az oxidatív stressz.....	- 16 -
2.3.1 A reaktív oxigénformák szerepe és keletkezése.....	- 16 -
2.3.2 A nitrogén-monoxid (NO).....	- 19 -
2.3.3 NO és H ₂ O ₂ kölcsönhatása	- 20 -
2.3.4 Az etilén és szerepe az abiotikus stressz akklimatizációban	- 22 -
2.3.5 A poliaminok és szerepük az oxidatív stressz folyamatokban	- 26 -
2.3.6 Az ABS és az általa indukált H ₂ O ₂ és NO termelés.....	- 29 -
2.4 A szalicilsav (SA) fiziológiai hatásai növényekben.....	- 33 -
3. Célkitűzések	- 36 -
4. Anyagok, módszerek és a kísérletek kivitelezése	- 40 -
4.1. Intakt növényen végzett kísérletek	- 40 -
4.1.1 Növénynevelés, alkalmazott kezelések	- 40 -
4.1.2 Fotoszintetikus paraméterek meghatározása	- 40 -
4.1.2.1 Sztómakonduktancia mérése	- 40 -
4.1.2.2 A CO ₂ asszimiláció meghatározása a belső CO ₂ koncentráció függvényében	- 40 -
4.1.2.3 Fluoreszcencia indukció és CO ₂ asszimiláció meghatározása a fényintenzitás függvényében	- 41 -
4.1.2.4 A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása	- 42 -
4.1.2.5 Az összcukortartalom meghatározása	- 42 -
4.1.3 Hormonális állapot meghatározása	- 43 -
4.1.3.1 Etilénprodukción meghatározása gázkromatográffal	- 43 -
4.1.3.2 Poliaminok analízise HPLC-vel	- 43 -
4.1.4 Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása.....	- 44 -
4.1.4.1 Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1) aktivitás mérése	- 44 -
4.1.4.2 Kataláz (KAT) (EC 1.11.1.6) aktivitás meghatározása.....	- 44 -
4.1.5 A malondialdehid (MDA) tartalom meghatározása	- 44 -
4.1.6 ROS és NO, valamint az életképesség meghatározása	- 45 -
4.1.6.1 A O ₂ ⁻ felszabadulás detektálása	- 45 -
4.1.6.2 A H ₂ O ₂ tartalom kvantitatív meghatározása	- 45 -
4.1.6.3. A H ₂ O ₂ és ROS in situ detektálása.....	- 45 -
4.1.6.4 A NO fluoreszcens mikroszkópos detektálása	- 46 -
4.1.6.5 Az életképesség meghatározása	- 47 -
4.2 Mezofillum protoplasztokon, mint modellrendszeren végzett kísérletek	- 48 -
4.2.1 Protoplasztok izolálása paradicsom növények leveléből, majd a protoplasztok kezelése	- 48 -
4.2.2 A ROS és a nitrogén monoxid, valamint a protoplasztok életképességének meghatározása	- 50 -
4.2.2.1 A ROS felszabadulás detektálása	- 50 -
4.2.2.2 A NO felszabadulás meghatározása	- 50 -
4.2.2.3 Az életképesség meghatározása	- 51 -

4.3 Statisztikai analízis.....	- 51 -
5. Kutatási eredmények	- 52 -
5.1 A szalicilsav előkezelés hatásai: priming	- 52 -
5.1.1 Stresszrezisztencia markerek változása	- 52 -
5.1.1.1 A sztómakonduktancia változása	- 52 -
5.1.1.2 A szalicilsav előkezelés hatása a CO ₂ asszimilációs rátára az intercelluláris CO ₂ koncentráció, valamint a fényintenzitás függvényében.....	- 53 -
5.1.1.3 A klorofill a fluoreszcencia indukciós paraméterekben bekövetkező változások	- 55 -
5.1.1.4 A fotoszintetikus pigmentek mennyiségében bekövetkező változások	- 57 -
5.1.1.5 Az előkezelések hatása a szénhidrátok akkumulációjára	- 59 -
5.1.2 Hormonális állapot változása a szalicilsavval előkezelt növényekben	- 61 -
5.1.2.1 Az etilénprodukciónak változása	- 61 -
5.1.2.2 A poliaminok koncentrációjában bekövetkező változások	- 63 -
5.1.3 Oxidatív stressz	- 66 -
5.1.3.1 Az előkezelések hatása a ROS, valamint a NO keletkezésére és az életképességre.....	- 66 -
5.1.3.2 Lipidperoxidáció változása az előkezelések hatására	- 74 -
5.1.4 Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigénradikálok eltávolítása	- 74 -
5.1.4.1 A szuperoxid dismutáz (SOD) és a kataláz (KAT) aktivitásának változása.....	- 74 -
5.2 A sóstressz akklimatizáció folyamatai a szalicilsavval előkezelt növényekben	- 78 -
5.2.1 Stresszrezisztencia markerek változása az előkezelések hatására sóstressz alatt.....	- 78 -
5.2.1.1 A sztómakonduktancia változása	- 78 -
5.2.1.2 A CO ₂ asszimilációs ráta változása, az intercelluláris CO ₂ koncentráció, valamint a fényintenzitás függvényében	- 79 -
5.2.1.3 A fluoreszcencia indukciós paraméterekben bekövetkező változások.....	- 81 -
5.2.1.4 A fotoszintetikus pigmenttartalmakban bekövetkező változások	- 83 -
5.2.1.5 Az előkezelések hatása a szénhidrátok akkumulációjára	- 85 -
5.2.2 A szalicilsav előkezelés sóstressz akklimatizációt javító hatása a hormonháztartásra	- 85 -
5.2.2.1 Az etilénprodukciónak változása	- 85 -
5.2.3 Oxidatív stressz: akklimatizáció vagy sejtsejt az előkezelések hatására sóstressz alatt.....	- 86 -
5.2.3.1 Az előkezelések hatása a ROS, valamint a NO keletkezésére és az életképességre.....	- 86 -
5.2.4 Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigénradikálok eltávolítása	- 88 -
5.2.4.1 A SOD és a KAT aktivitásának változása sóstressz alatt.....	- 88 -
5.3 A szalicilsav indukált ROS és NO hatásának vizsgálata mezofillum protoplasztokon, mint modellrendszeren: gyors hatás	- 91 -
5.3.1 A szalicilsav előkezelések hatása a mezofillum protoplasztok ROS (H ₂ O ₂) és NO produkciójára, valamint az életképességre, valamint a NADPH oxidáz gátlásának hatása normál körülmények, illetve sóstressz alatt	- 91 -
5.3.2 A sóstresszel szembeni akklimatizációt elősegítő növekedésszabályozó anyagok hatása a paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS (H ₂ O ₂) és NO tartalmára, valamint az életképességre és a NADPH oxidáz gátlásának hatása az akklimatizációs folyamatokban.....	- 96 -
6. Eredmények értékelése.....	- 100 -
6.1 A SA előkezelés hatásai a priming alatt paradicsom növényben	- 100 -
6.1.1 A fotoszintetikus aktivitás szerepe az SA által indukált kémiai edzésben.....	- 100 -
6.1.2 Az etilén szerepe az akklimatizációban.....	- 101 -

6.1.3 A poliaminok akkumulációja az előkezelés alatt	- 101 -
6.1.4 ROS, vagy NO, esetleg mindkettő	- 102 -
6.2 A SA előkezelés sóstresszel szembeni akklimatizációt fokozó biokémiai mechanizmusai paradicsom növényben	- 104 -
6.2.1 A fotoszintetikus aktivitás változása SA előkezelt paradicsom növényekben sóstressz alatt.....	- 104 -
6.2.2 Az etilénprodukciónak változása az SA előkezelt növényekben sóstressz alatt....	- 105 -
6.2.3 A ROS és NO produkció szerepe a sóstressz akklimatizációban.....	- 106 -
6.3 A NO és ROS közötti interakciók tisztázása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok, mint modellrendszer segítségével: gyors hatás	- 107 -
7. Összefoglalás.....	- 111 -
8. Summary	- 116 -
9. Függelék	- 120 -
9. 1 Irodalomjegyzék.....	- 120 -
9. 2 Publikációs lista.....	- 141 -
9. 3 Köszönetnyilvánítás	- 146 -

Rövidítések jegyzéke

ABS	abszcizinsav
ACC	1-aminociklopropán-1-karbonsav
APX,	aszorbát peroxidáz
KAT	kataláz
NSC	nem szelektív kation csatorna
cPTIO	2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5- tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid
DAB	diamino benzidin
DAF-2DA	diamino-fluoreszcein diacetát
DAO	diamin oxidáz
DC- FDA	dikloro-fluoreszcein diacetát
DPI	difenilén jodónium
FDA	fluoreszcein diacetát
L-NAME, N ^G	nitro-L-arginin metal észter
NADPH	nikotinamid-adenindinukleotid-foszfát
NBT	nitroblue tetrazólium, tetrazólium kék
NPQ	a klorofill <i>a</i> fluoreszcencia nem fotokémiai kioltási paramétere
NR	nitrát reduktáz
PA	poliamin
PAO	poliamin oxidáz
PM	plazmamembrán
Put	putreszcin
qP	fotokémiai fluoreszcencia kioltás
ROS	„reactive oxygen species”, reaktív oxigénformák
RWC	relatív víztartalom
SA	szalicilsav
SOD	szuperoxid dizmutáz
SOS1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter a plazmamembránon
SOS2	Ser/Thre protein kináz
SOS3	kalmodulinszerű Ca ²⁺ -kötő fehérje
Spd	spermidin
Spm	spermin
VIC	voltage independent channel, feszültség független ioncsatorna

1. Bevezetés

A sóstressz világszerte az egyik legjelentősebb stresszféleség, a mezőgazdasági termelés egyik limitáló tényezője, ami a növényekben felborítja a szövetek ionhomeosztázisát és hiperozmotikus stresszt okoz. A paradicsom nagyüzemi termelése gyakran óriási üvegházakban, talajnélküli kultúrákban történik. Ezek a növények sokszor érzékenyebbek a különböző abiotikus (pl. sóstressz) és biotikus stresszhatásokra, mint a hasonló korú, talajban növekvő növények. A paradicsomtermelő országok közül egyes helyeken, pl. Spanyolországban és Izraelben, sokszor magas sótartalmú öntözővíz áll rendelkezésre. Ezért a paradicsom sóstressz rezisztenciájának fokozására komoly összegeket fordítanak. A sótolerancia eléréséhez az egyik lehetséges megoldást a termesztett növények védekező mechanizmusainak kémiai előkezeléssel történő indukálása jelentheti. Ilyen lehet a szalicilsavval (SA) történő exogén előkezelés. A külsőleg alkalmazott SA sóstresszel szembeni rezisztenciát fokozó hatásáról bebizonyosodott, hogy az nagymértékben függ a kezelés módjától, a növény fejlődési stádiumától és az alkalmazott koncentráció nagyságától. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján elmondható, hogy alacsonyabb SA koncentrációk alkalmazásával (10^{-7} M és 10^{-4} M) olyan edzési eljárás dolgozható ki, ami lehetővé teszi a sóstresszel (100 mM NaCl) szembeni rezisztencia kialakítását talaj nélküli kultúrákban nevelt paradicsom növényben (Szepesi és mtsai, 2009.). A korábbi kutatási eredmények alapján megállapítható, hogy a 10^{-4} M-os koncentrációjú, hosszú időtartamú SA előkezelés javítja a paradicsom sóstressz rezisztenciáját (Tari és mtsai. 2002.), a 10^{-7} M-os koncentráció nem hatásos, míg a 10^{-3} M-nál nagyobb SA koncentrációk a növények pusztulását okozzák. Az előkezelések hatására indukálódik az abszcizinsav (ABS) bioszintézis, de az ABS koncentrációja csak a 10^{-4} M-os SA előkezelést kapott növényekben marad tartósan magas. Az előkezelést követő sóstressz akklimatizáció során aktiválódnak az antioxidáns enzimek is, mint például az aszkorbát-peroxidáz (APX), a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz (KAT) valamint a glutation S-transzferáz (GST) (Szepesi és mtsai. 2009.). A sikeresen akklimatizálódó a 10^{-4} M SA-val előkezelt növények levelében megemelkedik a putreszcin (Put), gyökerekben a spermidin (Spd) és a spermin (Spm) szintje, ami által a halofita növényekre jellemző poliamin spektrum alakul ki (Szepesi és mtsai. 2009.).

Munkám során célom volt annak megállapítása, hogy milyen biokémiai és fiziológiai folyamatok állnak a széles koncentráció intervallumban alkalmazott SA előkezelések hátterében. Vizsgáltam, hogy az egyes SA előkezelések hogyan befolyásolják a különböző stresszrezisztencia markereket, a növekedésszabályozó anyagok közül az etilén és a

poliaminok szöveti koncentrációját, valamint a ROS és NO akkumulációját az előkezelések ideje, azaz a „priming” alatt és mindez miképp járul hozzá/hozzájárul-e a sóstresszel szembeni rezisztencia kialakításához, vagy ellenkező esetben a növényi egyedek pusztulásához.

A SA sóstressz akklimatizációt fokozó hatásának egyik oka az ozmotikus adaptáció kialakulása, mely szorosan összefügg a cukrok akkumulációjával. Mivel a cukrok akkumulációja szorosan kapcsolódhat a fotoszintetikus folyamatokkal, megnéztük, hogyan változnak az „edződés” alatt a fotoszintézissel kapcsolatos fiziológiai markerek és mindez hogyan járul hozzá a sikeres akklimatizáció kialakulásához. A SA magas koncentrációban (10^{-3} M SA) csökkentette a sztómakonduktanciát és ezáltal a CO_2 asszimiláció sebességét a kontrollhoz képest. Ezzel ellentétben a sztómakonduktancia átmeneti gátlása a 10^{-4} és a 10^{-7} M-os SA-val kezelt paradicsom növényeknél a 3 hetes előkezelés végére megszűnt a nevelési fényintenzitáson. A SA alacsonyabb koncentrációinál nem alakult ki különbség a fotoszintetikus pigmentek mennyiségében, illetve a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterekben sem az előkezelés ideje alatt. A sóstressz önmagában erőteljes sztómazáródást eredményezett, csökkentette a klorofill-*a*, a klorofill-*b*, valamint a karotinoidok mennyiségét, gátolta a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatait, csökkentette az összcukortartalmat és mérsékelte a CO_2 asszimiláció sebességét is. Ezzel szemben a 10^{-4} M SA-val előkezelt növényekben a sókezelt kontrollhoz képest növekedett a fotoszintézis hatékonysága, a fotoszintetikus pigmentek mennyiségének fokozásán, a sztómakonduktancia és a CO_2 asszimiláció sebességének növelésén keresztül, ami mellett az összcukor mennyiségének növekedése a növények gyökerében, a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult a sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ozmotikus adaptáció kialakulásához.

A különböző növekedésszabályozó anyagok, úgy mint az etilén és a poliaminok, koncentrációtól függően szabályozhatják az akklimatizációs folyamatokat. A SA magasabb koncentrációi közül a 10^{-3} M-os SA nagymértékben növelte a növények gyökerének etilénprodukción, putreszin és spermidin akkumulációját, ami ezen koncentráció esetében hozzájárult a növények gyökérszöveteinek elhalásához. Hosszú távon, az előkezelés ideje alatt a 10^{-4} M-os SA kismértékben megemelte az etilénprodukción a növények gyökerében, 100 mM-os sókitettség mellett azonban csökkentette azt, ezáltal is hozzájárulva a sikeres akklimatizáció kialakulásához.

A SA koncentrációtól függően oxidatív stresszt indukálhat. Az oxidatív stressz során keletkező reaktív oxigénformák koncentrációtól függően determinálhatják a növények

állapotát: elősegíthetik az akklimatizációs folyamatokat, vagy részt vehetnek a programozott sejthalál (PCD) kialakulásában. A SA ugyanakkor indukálhatja a NO szintézisét is, mely molekula szintén lehet toxikus, vagy védő hatású. Rövid távon a 10^{-3} M-os SA jelentősen növelte a növények levelének H_2O_2 tartalmát, valamint a gyökerek ROS és NO szintjét, és ezzel párhuzamosan csökkentette az apikális gyökérsejtek életképességét. Hosszú távon, az „edződés” alatt, a 10^{-4} M-os SA emelte az apikális gyökérsejtek ROS szintjét, a NO produkcióban azonban az előkezelés végére nem különböztek egymástól a kontroll és az előkezelt növények. Sókezelés hatására jelentősen megemelkedett a szövetek ROS (H_2O_2) és NO produkciója, az előkezelt növények, különösen a 10^{-4} M-os esetben azonban mind a NO, mind a H_2O_2 tartalomban a kontroll növényekéhez hasonlót mértünk.

A különböző kezelések hatására keletkező ROS (H_2O_2) és NO közötti interakciók modellezésére mezofill protoplasztokat használtunk, ahol egyrészt vizsgáltuk a különböző SA koncentrációk, a 100 mM-os NaCl, másrészt a sejthalál kivédésére szolgáló növekedésszabályozó anyagok, a poliaminok, ABS és az etilén prekursoraként szolgáló, PCD-t indukáló ACC hatását a protoplasztok életképességére, illetve azt, hogy hogyan függ ez össze a kezelések hatására a ROS (H_2O_2) és NO tartalomban mért változásokkal. Mivel a szakirodalomban utalást találtunk arra, hogy a NO és a H_2O_2 szoros kölcsönhatásban szabályozhatja a másik szöveti koncentrációját, megvizsgáltuk, hogy a ROS (H_2O_2) akkumulációja, majd ennek gátlása DPI-vel a sejtekben hogyan hat a NO produkcióra. Ugyancsak mértük, hogy ezen molekulák jelenlétében, illetve hiányában hogyan változik a sejtek életképessége. A 10^{-3} M-os SA, illetve sókezelés hatására mind a ROS (H_2O_2), mind a NO szintje szignifikánsan megemelkedett, és ezzel együtt a sejtek életképessége drámaian csökkent. DPI hatására azonban nőtt a sejtek vitalitása, és a ROS (H_2O_2) termelődésének gátlása mellett szignifikánsan mérséklődött a NO produkció is.

Az alacsony koncentrációjú SA kezelések (10^{-4} , 10^{-7} M) protoplasztok esetében is mérsékeltén megemelték a ROS (H_2O_2) produkciót, a sejtek életképessége azonban a kontrollhoz hasonló maradt. A SA kezelések sóstressz alatt csökkentették a sóindukált ROS és NO produkciót, és a kontrollhoz hasonló vitalitást eredményeztek.

A PA-ok hatása a sejtek életképességére, a ROS (H_2O_2) és a NO termelődésére különböző volt. A Put a protoplasztok életképességét nem befolyásolta, míg Spd és Spm esetében az életképesség a sejtek ROS (H_2O_2) tartalmával fordított arányosságban változott, azaz jelentősen csökkent a kontroll protoplasztokhoz képest. A NO szint a poliamin kezelések hatására szintén fokozódott, a kezelések mellé alkalmazott DPI azonban kontroll szintre mérsékelte a sejtek ROS (H_2O_2) és NO produkcióját. Az ABS csak átmenetileg csökkentette a

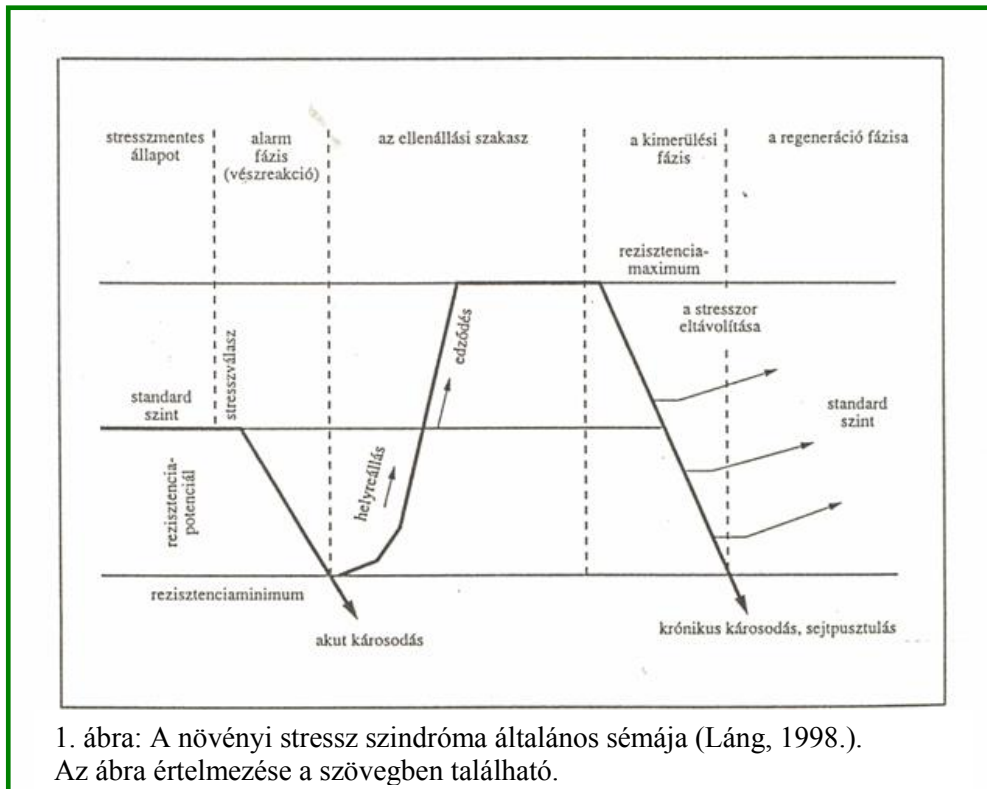
sejtek vitalitását, amivel párhuzamosan indukálta mind a ROS, mind a NO szintézisét. DPI hatására azonban a ROS (H_2O_2) és a NO mennyisége is csökkenő tendenciát mutatott.

Tudomásunk szerint jelen értekezés az első, mely kísérletesen igazolja a különböző hatást eredményező SA koncentrációk háttérében meghúzódó biokémiai és fiziológiai folyamatok idő függvényében történő összehasonlítását az előkezelések, azaz a „priming” alatt, ami lehetővé teszi azoknak a fiziológiai markereknek a kiemelését, amelyek meghatározóak lehetnek a sóstresszel szembeni sikeres akklimatizáció, vagy éppen a sejthalál kialakulása szempontjából.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Stresszfolyamatok növényekben

A stressz fogalmának meghatározására napjainkban is Selye János definícióját használjuk, amely szerint „az élő szervezetek valamennyi adaptációs reakciójának a stressz a foglalta, azaz a stressz egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, mely magában foglal minden nem-fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül” (Selye, 1956.). A stresszor a környezet azon eleme, ami a stresszt okozza, élettani alkalmazkodást eredményez. A stresszor hatására a szervezetben lezajló tünetegyüttes a stressz szindróma, amely egymást követő folyamatokból épül fel. Stresszmentes állapotban minden növény úgynevezett standard rezisztenciával rendelkezik. Amikor a növényt stressz éri, csökken a vitalitás, az anyagszere lebontó folyamatai dominálnak a felépítő jellegűek felett (Cannon-féle vészreakció), amely az ellenállás minimumának elérése, illetve túllépése esetén akut károsodáshoz vezethet. Amennyiben a növény rezisztencia-potenciálja lehetővé teszi, bekövetkezik a második fázis, a standard rezisztencia szintjének helyreállítása, majd növekedése, mely során fokozódik a növény ellenálló képessége, a növény ismét normális életműködést mutat. Abban az esetben, ha a növényt érő stresszhatás meghaladja a növény alkalmazkodó képességét, bekövetkezik a harmadik fázis: a kimerülés stádiuma, ami végső soron krónikus károsodáshoz, a növényi egyed pusztulásához vezethet (1. ábra).



Lichtenthaler (1996.) a stressz fogalmát pontosította, szerinte minden olyan körülmény vagy anyag, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére vagy fejlődésére, stressznek tekinthető. Növényi stresszhatást természetes vagy antropogén faktorok válthatnak ki. A természetes stresszorokon belül is megkülönböztethetünk biotikus (pl. rovarok, patogének, elicitorok, stb.), illetve abiotikus (pl. szárazság, alacsony hőmérséklet, só, stb.) faktorokat. Hatás alapján a növényt érő stressz lehet gyenge vagy erős stressz. A gyenge stressz aktiválhatja a sejttanyagcserét, hatását részben kompenzálja az akklimatizáció, az adaptáció, illetve a különböző javító mechanizmusok. A növényekre ilyen módon ható stimulatív stresszt eustressznek nevezzük. Ilyen a hatása például egyes anyagcsere gátlószereknek (pl. herbicideknek), amelyek alacsony koncentrációban serkentő hatásúak, míg nagyobb koncentrációban károsítják a sejttanyagcsere folyamatokat és végsősoron öregedést, programozott sejthalált (PCD) indukálnak. Az ilyen anyagok növénykárosító hatása a disztressz. Az eustressz és a disztressz között az átmenet folytonosnak tekinthető, és a kiváltó tényező koncentrációjával van kapcsolatban. Az erős stressz jelentős károkat okoz, ami végső soron a növényi egyed halálához is vezethet.

A növényeket sokféle környezeti stresszhatás éri, amelyek közül az egyik legfontosabb a sóstressz, azon belül is a NaCl által okozott stressz, amely limitálja a növények növekedését, illetve csökkenti a termés mennyiségét.

2.2 A sóstressz

Sóstresszről akkor beszélhetünk, amikor a környezet sókoncentrációja meghaladja a növények optimális növekedéséhez szükséges koncentrációértéket. A sóstressz hatásának Európában és a világban (Pitman és Lauchli 2002.) különösen a tengerparti és a tengerbe ömlő folyók torkolatánál élő/termesztett növények vannak kitéve, különösképpen amikor a dagály miatt az édesvízzel a sós víz keveredik. Beljebb a szárazföldre a sós víz az üledékrétegeken keresztül szivárog be, ahol az evaporáció és transzspiráció miatt a talajban megnő a sókoncentráció. A tengerparti területek mellett egyéb természetes élőhelyek is rendelkezhetnek magas sótartalommal, így a sós mocsarak, a száraz, felsivatagi vidékeken kialakuló, visszahúzódó felszíni vizek parti zónái (pl. Holt-tenger), valamint a mérsékelt égövi szikes területek.

Magyarországon a szikesedés közvetlen hatásának elsősorban a Duna-völgy és a Duna-Tisza közti Homokhátság van kitéve, míg a közvetett hatásoknak a Tiszántúl

(Hortobágy, Nagykunság, Körösvidék) és Tisza-Zagyvaszög. Mindezek miatt az Alföldön megkülönböztetett jelentősége van a további szikesedés eredményes megelőzésének, mivel itt folyik az ország élelmiszertermelésének jelentős hányada (Németh, 2005.).

A talajban lévő só kapcsán megkülönböztetjük a szalinitást, azaz az összes só nagy koncentrációját, és szodicitást, azaz a Na^+ többletet. A kifejezések gyakran relatívak, de különbségtételre azért van szükség, mivel bizonyos területeken magasabb lehet a Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} koncentrációja, mint a NaCl-é. Dolgozatomban sóstressz alatt a magas NaCl koncentrációt értem. A magas sókoncentráció, nemcsak a növényekre van hatással, hanem a talajstruktúrára is, mivel hatására csökken a talaj porozitása és vízpermeabilitása. A sós talajvíz és öntözővíz jól jellemezhető az elektromos konduktivitással, ami korrelál az ozmotikus potenciállal. A tiszta víz ugyanis rossz vezető, a magas sókoncentrációt tartalmazó vízben azonban fokozódik az elektromos konduktivitás és csökken az ozmotikus potenciál (Taiz és Zeiger, 2006.).

A növények a sótolerancia tekintetében több csoportba sorolhatóak. Az első csoportba tartozó halofiták, olyan sókedvelő növények, amelyek a 200-500 mM tartományba eső sókoncentrációt képesek tolerálni és ilyen nagy sókoncentráción növekedési optimumot mutatnak (pl. *Aster tripolium*). A második csoportba olyan halofiták és glikofiták tartoznak, amelyek közös jellemzője az erőteljes növekedésgátlás 200 mM-os NaCl oldaton, ezen koncentráció felett pedig a növekedés teljes megszűnése. A harmadik csoportba olyan glikofita növények tartoznak, amelyek számára mérgező a 80 mM-os vagy az annál nagyobb NaCl koncentráció, citoplazmájukban felborul az ionegyensúly, súlyos stressztüneteket mutatnak, illetve ezen koncentráció felett el is pusztulnak (Flowers és mtsai., 1997., Hasegawa és mtsai., 2000.).

A növények gyökereinek felszívási zónájában, ha magas a talaj(víz) sótartalma, akkor alacsonyabb az ozmotikus potenciál, ami csökkenti a vízpotenciált. A növények számára rendkívül fontos vízháztartás egyensúlyának felborulása a gyökér hidraulikus konduktanciáját és a levél felé történő xilémtranszportot is felborítja. Az alacsony vízpotenciál okozta alacsony turgor miatt a sejtmegnyúlás gátlódik és a növények növekedése redukálódik. Ehhez kapcsolódóan a sztómák záródása miatt a fotoszintézis hatékonysága és a széndioxid asszimiláció is csökken (Taiz és Zeiger, 2006.).

Az ozmotikus hatás mellett bizonyos ionok, mint például a Na^+ ion felhalmozódása a növényi sejtekben toxikus hatású. Stresszmentes állapotban a citoszol 100 mM K^+ és kevesebb, mint 10 mM Na^+ iont tartalmaz, ami megfelelő ionikus környezetet biztosít némely

enzim optimális működéséhez. Az ettől eltérő abnormális Na^+ és K^+ ion arány inaktiválja ezeket az enzimeket és gátolja a fehérjeszintézist (Taiz és Zeiger, 2006.).

A sóstressz által kiváltott primer hatás során a Na^+ ionok citoplazmába való belépése után megemelkedik a citoplazmatikus Na^+ ion koncentráció, ezáltal felborul az ionegyensúly (Zhu, 2001.), ami által a fehérjék dehidratálódnak és elvesztik natív konformációjukat. A Ca^{2+} ionra vonatkozó egyensúly felborulása során csökken a K^+/Na^+ felvétel szelektivitása azáltal, hogy megszünteti a Ca^{2+} gátló hatását a Na^+ ion citoplazmába való belépését is közvetítő kis affinitású K^+ transzporter fehérjére és a feszültségtől független K^+ csatornára (VIC, voltage independent channel) (Maathuis és Amtmann, 1999.).

Az élő sejtek számára az ionok homeosztázisa létfontosságú. Ha a növények a nátriummal szemben védtelenek, a celluláris ionhomeosztázis felborul. Sóstressz alatt a toleráns növények tipikusan magas K^+ és alacsony Na^+ szintet tartanak a sejtek citoplazmájában (Zhang és mtsai., 2007.). Ily módon az akklimatizáció során az elsődleges feladat a citoplazma ionegyensúlyának a helyreállítása, amely folyamat a Na^+ transzport szabályozásán keresztül valósul meg. A Na^+ belépése a gyökérsejtek citoplazmájába történhet az ún. nem szelektív kationcsatornán (NSC) keresztül (Amtmann és Sanders, 1999.), de a nagy affinitású K^+ transzporter fehérje (HKT1) is szállít Na^+ ionokat (Rubio és mtsai., 1995.). A Na^+ kizáródik a citoplazmából, ha a transzporterek K^+/Na^+ szelektivitása nagy, és a K^+ iont részesítik előnyben a Na^+ ionnal szemben (Rodríguez-Navarro és Rubio, 2006.). A citoplazma Na^+ ion tartalmát csökkentik azok a transzporter molekulák is, amelyek a sejt-kompartmentumok, így a vakuólum, illetve az apoplast felé aktív transzporttal pumpálják ki a Na^+ iont. Ezek az ún. Na^+/H^+ antiporter fehérjék, amelyek közül a plazmamembránban lokalizálódó fehérjét SOS1-nek nevezik, a vakuólum membránhoz kötött pedig NHX (NHE) transzporter családnak. A Na^+ ion transzport mechanizmusát molekuláris szinten legjobban a sóstresszre különösen nagy érzékenységet mutató *Arabidopsis* SOS (salt overly sensitive) mutánsok segítségével tanulmányozták (Zhu és mtsai., 1998.).

A Na^+ ion belépése a citoplazmába a plazmamembránon keresztül a sóstressz szenzorául is szolgál, aminek következtében megemelkedik a citoplazma Ca^{2+} ion koncentrációja. A jelet a kalmodulinszerű, SOS3 kalciumszenzor fehérje érzékeli, ezáltal aktiválódik és kötődik a SOS2 Ser/Thre protein kinázhoz. A SOS3 kötődése után aktiválódó SOS2 kináz foszforilálja, ezáltal aktiválja a SOS1-et, ami végül kijuttatja a Na^+ iont a citoplazmából.

További lehetőség a gyökér terhelésének mérséklésére a Na^+ ion hajtásba irányuló transzportja a xilémen keresztül. Az így hajtásba kerülő Na^+ ion a mezofillum sejtekben

azután hasonló transzporter fehérjék közvetítésével ugyanúgy kompartmentalizálódhat, mint a gyökérben. Ez egyben azt is eredményezi, hogy a mezofillum sejtek vakuólumában felhalmozódó Na^+ ion szervesen ozmotikumként is szolgál. Ez különösen a halofita karakterű növényekre jellemző, míg olyan glikofitákban, mint a paradicsom, a hajtásban sok Na^+ iont akkumuláló termesztett fajták inkább szenzitívnek bizonyultak (Juan és mtsai., 2005.). Ebben az esetben a nátrium akkumuláció az oxidatív stressz következtében a plazmamembrán szelektivitásának csökkenésével, ezt követően vízvesztéssel és vízpotenciál csökkenéssel, majd a levélöregedési folyamatok beindulásával járt. A vad paradicsomfajok között azonban kifejezetten halofita karakterű, Na^+ iont akkumuláló fajok is vannak, mint amilyen például *Solanum peruvianum* és a *Solanum pennellii* (Rus és mtsai., 1999.; Chen és mtsai., 2001.).

Az elsődleges hatások közé tartozik még a turgornyomás csökkenése miatt bekövetkező sejtmelegnyúlás gátlás, amihez a sztómazáródást követően kapcsolódik a fotoszintézis hatékonyságának illetve a széndioxid asszimilációnak a csökkenése.

A másodlagos hatások közül a legfontosabb a megnövekedett külső sókoncentráció miatt kialakuló ozmotikus stressz, melynek kivédése történhet a szervesen ozmotikumok koncentrációjának növelésével, illetve az úgynevezett kompatibilis ozmotikumok, mint például az alacsony molekulahatárú szénhidrátok (szacharóz, glükóz, fruktóz, trehalóz), cukoralkoholok (mannitol, szorbitol, ononitol, pinitol), szerves savak, aminosavak (pl. prolin), quaterner ammónium származékok (glicinbetain, β -alaninbetain, prolinbetain stb.) szintézisének aktiválásával és akkumulációjával (Szegletes és mtsai., 2000.; Rhodes és mtsai., 2002.).

A kompatibilis ozmotikumok olyan kompartmentumokban szolgálnak ozmotikumként, ahol a fehérjék szerkezete megőrzendő, így a citoplazmában, kloroplasztisban, mitokondriumban. Gyakran ozmoprotektív szerepük is van, tehát elősegítik a makromolekulák natív térszerkezetének fennmaradását azáltal, hogy helyettesítik a szorosan kötött vízmolekulákat a makromolekulák felszínén és antioxidánsként is funkcionálhatnak (Tari és mtsai., 2003.; Ashraf és Harris, 2004.).

Az ozmotikus stressz növényfajtól illetve fajon belül alfajtól vagy genotípustól függően indukálja ezen kompatibilis ozmotikumok bioszintézisében szereplő kulcsenzimek expresszióját, amely biztosítja az adott genotípus sikeres akklimatizációját a szélsőséges körülmények között. Ilyen kulcsenzim lehet például az aldo-keto reduktázok csoportja, amelyek ozmotikus stressz hatására fokozott expressziót mutathatnak illetve új izoenzimjeik expresszálnak. Működésük eredményeképpen cukoralkoholok szintetizálódnak, mint például az aldóz-6-foszfát reduktáz által katalizált reakcióban a szorbitol-6-P, amelyből a 6-os

helyzetű foszfátcsoport egy foszfatáz enzim által katalizált lehasítása után szorbitol keletkezik (Zhou és mtsai., 2002.).

Kimutatták, hogy a sótoleráns vad faj, a *S. pennellii* mind az enzimátikus, mind a nem enzimátikus antioxidáns kapacitását gyorsan és hatékonyan növelte a sókezelést követően (Shalata és mtsai., 2001.). Ennek egyik fontos eleme volt, hogy a sókezelés hatására a mitokondrium mátrixában kimutatható aszkorbát peroxidáz (APX) izoenzim aktivitása növekedett meg, szemben a *S. esculentummal*, ahol a só hatására az enzim membránköthetővé vált, a vad fajban viszont a mátrixban maradt (Mittova és mtsai., 2004.).

A másodlagos folyamatok között másik fontos elem az oxidatív stressz kialakulása, ami az abiotikus stresszorok nem-specifikus hatásaként jelentkezik, és melynek során reaktív oxigénformák (ROS) alakulhatnak ki, amelyek a továbbiakban egymásba átalakulhatnak.

A membránokat, nukleinsavakat, fehérjéket degradáló és inaktíváló ROS eltávolítása a sikeres akklimatizáció egyik legfontosabb feltétele. A membránlipidek peroxidációját, a proteinek oxidációját, az enzimgátlást, valamint a DNS és az RNS károsodását okozó, a kioltó mechanizmusokat túllépő oxidatív stressz programozott sejthalálhoz vezet. A sóstressz egyik közvetlen hatása a gyökér merisztematikus régiójában a sejtek elhalása. *Arabidopsis* növények gyökércsúcsában a sóstressz programozott sejthalált (PCD-t) okozott (Huh és mtsai., 2002.), és ugyancsak kimutatható volt a ROS által generált PCD dohány protoplasztokban (Lin és mtsai., 2006.).

A sóstressznek kitett növényekben jellegzetes változások történnek az idő függvényében laboratóriumi körülmények között. A gyors válaszreakciók általában a vízháztartásban bekövetkező változásnak tudhatók be és ugyancsak gyors változás következik be a levél és a gyökér növekedési sebességében is, míg az anyagcserében és a génexpresszióban bekövetkező hatások csak később jelentkeznek. A sóstressznek tehát van egy ionos és egy nem ionos komponense. Sóstressz hatására növekedésredukció figyelhető meg mind a hajtás, mind pedig a gyökér esetében, amit egy gyors helyreállítódás követ, majd ezután egy kissé alacsonyabb értéknél új steady state alakul ki (Yeo és mtsai., 1991.; Passioura és mtsai., 2000.). A növekedés csökkenésének második fázisa sóstressz esetén egybeesik a Na^+ hajtásban történő akkumulációjával, és kapcsolódik a károsító hatások megjelenésével.

Sóstressz során H_2O_2 és NO is termelődik a rezisztencia folyamatok aktiválására. A NO sóstressz alatt, mint másodlagos jelátviteli molekula növelte a plazmamembránköthött NADPH oxidáz enzim aktivitását, így, a $\text{O}_2^{\cdot-}$ átalakulása után közvetve részt vett a H_2O_2 termelés szabályozásában. A plazmamembrán (PM) H^+ -ATPáz aktivitását ugyanebben a

rendszerben a H_2O_2 és az NO is növelte, ami H^+ elektrokémiai potenciál grádiens fokozódást hozott létre. Ez hozzájárult az ion homeosztázis helyreállításához, végső soron pedig a sóstresszel szembeni rezisztencia kialakításához (Zhang és mtsai., 2007.).

A poliaminok spektruma változik a sóstressz alatt a különböző fajokban. A poliaminok, mint polikationok, membránvédő funkcióval rendelkeznek (Kim és mtsai., 2002.), fokozzák a legfontosabb antioxidáns enzimek aktivitását (Tang és Newton, 2005.), és mint antioxidánsok, közvetlenül is csökkentik az oxidatív stressz okozta károsodást (Yeo és mtsai., 1997.).

A sikeres akklimatizációban fontos szerepe van a stresszor hatására indukálódó génexpressziós változásoknak, amelyeket különböző stresszhormonok szintézisének fokozódása közvetíthet. Ezek közül az egyik legfontosabb az abszcizinsav (ABS). Szalicilsavval (SA) előkezelt paradicsom növényeinkben az ABS jelentős koncentrációnövekedését figyeltük meg a háromhetes előkezelést követően, mind a gyökérben, mind a hajtásban (Szepesi és mtsai., 2009.).

Ha az akklimatizáció sikeres, új steady state egyensúlyok mellett a növény növekedni kezd a stresszor jelenlétében, illetve a stresszor hatásának megszűnése után helyreállítja metabolikus folyamatait és növekedését.

2.2.1 A sóstressz hatása a fotoszintetikus folyamatokra

A sóstressz hatással van a metabolikus folyamatokra is. Sóstressz hatására gátlódtak a fotoszintetikus folyamatok szójababban (Kao és mtsai., 2003.). Tattini és mtsai. (1995.), kimutatták, hogy sókizáró fajokban a fotoszintézis gátlódása elsősorban a sóstressz ozmotikus komponensének volt betudható, nem pedig a levelekben kialakuló specifikus sóhatásnak. Amennyiben a NaCl bejut a plasztiszba, közvetlenül is gátolhatja a fotoszintézist a Calvin-ciklus enzimeinek gátlásával (Lovelock és Ball, 2002.).

Magasabbrendű növényekben a fotoszintetikus elektrontranszport a kloroplasztisz tilakoid membránrendszeréhez kapcsolt folyamat. Az elektrontranszportban 3 komplex: 2-es fotokémiai rendszer (PSII), 1-es fotokémiai rendszer (PSI) és a citokróm b_6/f vesz részt. A sóstressz növelte a NaCl akkumulációját kloroplasztban, ezáltal pedig mérsékelte a fotoszintetikus elektrontranszportot, és csökkentette a fotoszintézis hatékonyságát (Boyer, 1976.; Kirst, 1989.). Rizsben és mangrovében a sóstressz csökkentette a PSII aktivitását (Tiwari és mtsa., 1997.; Parida és mtsai., 2003.), még más esetben, gyapot és árpa növényeknél nem kaptak változást (Brugnoli és Björkman, 1992.; Morales és mtsai., 1992.).

Szenzitív genotípusokban, pl. paradicsomban (Lapina és Popov, 1970.), burgonyában (Abdullah és Ahmed, 1990.), illetve körtében (Hamada és El-Elany, 1994.) csökkent a klorofilltartalom sóstressz alatt, míg sótoleráns növényeknél növekedést tapasztaltak (Singh és mtsai., 1990.; Kulshreshtha és mtsai., 1987.). Rizsben sóstressz alatt növekedett a karotinoid tartalom (Misra és mtsai., 1997.), fekete köményben azonban csökkenést figyeltek meg (Hayar és mtsai., 1996.).

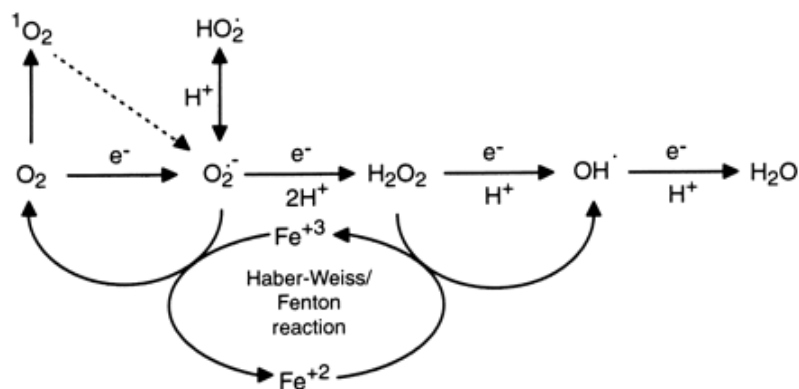
C3-as növényekben a CO₂ asszimilációt a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz (Rubisco) katalizálja. A sóstressz növelte a Rubisco oxigenáz, és csökkentette karboxiláz aktivitását (Sivakumar és mtsai., 2000.), ezzel szemben sótoleráns cianobaktériumban növekedett a Rubisco, ezáltal pedig a fotoszintézis hatékonysága sókitettséggel (Takabe és mtsai., 1988.).

2.3 Az oxidatív stressz

2.3.1 A reaktív oxigénformák szerepe és keletkezése

A különböző biotikus és abiotikus stresszorok hatására a növényekben különböző köztes és végtermékek jelenhetnek meg, amelyek az egyes biokémiai reakcióutak eltolódását eredményezhetik. Ezek közül az egyik leggyorsabban lejátszódó molekuláris szintű eltérést az oxidációs-redukciós állapot változása jelenti a szervezetben, amit összefoglaló néven oxidatív stressznek nevezünk. Az oxidatív stressz során indukálódik a plazmamembrán lokalizált NADPH-oxidáz enzim, amely működésének eredményeképpen szuperoxid gyökanion, ebből pedig különböző reaktív oxigénformák keletkeznek, melyek egymásba átalakulhatnak és nagy koncentrációban a növényi egyed pusztulásához vezethetnek (2. ábra).

A reaktív oxigénformák fiziológiás úton a molekuláris oxigén részleges redukciójával keletkezhetnek az élő, aerob szervezetekben. A reaktív oxigénformák, vagy másnéven aktív oxigéngyökök (ROS vagy AOS) közé tartoznak egyrészt különböző szabadgyökök, úgymint a szuperoxid gyökanion (O₂⁻), a hidroxil gyök (OH[•]) és a hidroperoxil gyök (HO₂[•]), melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, másrészt olyan molekulák, amelyek reakcióik során szabad gyök képzésére képesek, mint például a hidrogén peroxid (H₂O₂). Mások szabad gyököt nem képeznek, de rendkívül reakcióképesek, mint például a szinglet oxigén (¹O₂).



2. ábra. A molekuláris oxigénből származó reaktív oxigénformák interkonverziója (Vranová és mtsai., 2002.). (O_2 : molekuláris oxigén; 1O_2 : szinglet oxigén; $O_2^{\cdot-}$: szuperoxid gyökkanion; H_2O_2 : hidrogén peroxid; $HO_2^{\cdot}$: hidroperoxil gyök; $OH^{\cdot}$: hidroxil gyök; H_2O : víz). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

A reaktív oxigénformák kémiai tulajdonsága különböző. A $O_2^{\cdot-}$ autooxidációs reakciókban gyakran képződő, mérsékelten reakcióképes, rövid élettidejű forma, ami nem képes a membránokon keresztüli diffúzióra. A $HO_2^{\cdot}$ a $O_2^{\cdot-}$ protonált formája, lipidoldékonyabb. A $OH^{\cdot}$ a legreaktívabb, a Fenton (Fridovich, 1983.) és a Haber-Weiss (Freeman és Crapo, 1982.) reakcióban keletkezik és képes valamennyi biomolekulával reakcióba lépni (Vranová és mtsai., 2002.). A H_2O_2 a szuperoxid gyökkanion dizmutációjával keletkezik, viszonylag stabil molekula, amely az aquaporinok közvetítésével képes a membránokon keresztüli diffúzióra (Pastori és Foyer, 2002.).

A növényekben reaktív oxigénformák nagyon sok reakcióban, különböző sejtkompartimentumokban keletkezhetnek. A ROS egyik legfontosabb forrása a fotoszintetikus és a mitokondriális elektrontranszportlánc. A fotoszintetikus elektrontranszport során a 2. fotokémiai rendszerben keletkező szinglet oxigén mellett az 1-es fotokémiai rendszer (PSI) is hozzájárul a ROS kialakulásához. A PSI közvetlenül adhat át elektronokat a molekuláris oxigénnek, generálva ezáltal a $O_2^{\cdot-}$, majd az ebből keletkező H_2O_2 képződését a kloroplasztisban. A fotoszintetikus elektrontranszport végső elektronakceptora, a NADPH pool túlredukáltságának elkerülésére a C3-növényekben kialakult a fotorespiráció jelensége, amely a még mindig reaktív H_2O_2 képződéséhez vezet a peroxiszómákban. Ezenfelül H_2O_2 és egyéb AOS keletkezhet az apoplasztban a szuperoxid-dizmutáz, illetve az aminoxidázok működésének eredményeképpen, a peroxiszómában a fotorespiráció során, illetve a mitokondriális elektrontranszportban, különösen, ha az elektrontranszportlánc túlredukálódik.

Arabidopsis-ban a ROS akkumulációja sóstressz alatt a plazmamembránhoz kapcsolt NADPH oxidáz aktiválódásának az eredménye (Sakamoto és mtsai., 2008.), de a peroxiszómában lokalizált xantin-dehidrogenáz, illetve az aminoszavak (poliamin oxidáz (PAO), diamin oxidáz (DAO)) is hozzájárulhatnak a H_2O_2 kialakulásához (Kamada-Nbushada és mtsai., 2008.)

Az aktív oxigénformák kis mennyiségben a növény normális működése során is keletkeznek. Kis koncentrációban a reaktív oxigénformák fontos jelátvivő molekulák, szerepet játszanak a növények egyedfejlődésében, környezeti stresszhez való alkalmazkodásban, a védekezésben és a programozott sejthalálban. Egyes jelátviteli kölcsönhatásokban (pl. nitrogén-oxid, kalcium ionok és növényi hormonok) részt vesznek a fehérjék stabilitásának és a gének kifejeződésének a szabályozásában (Desikan és mtsai., 2001.; Laloi és mtsai., 2004.; Gechev és mtsai., 2006.). Szárazság idején a sztóma nyitódása és záródása az ABA által szabályozódik, mely kölcsönhat a H_2O_2 jelátviteli úttal (Leung és Giraudat, 1998.; Finkelstein és mtsai., 2002.).

Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, ha a reaktív oxigénformák olyan nagy mennyiségben keletkeznek és halmozódnak fel a növényben, hogy azokat a növény antioxidáns védőrendszere már nem képes eliminálni és így módon azok toxikus hatást váltanak ki, bekövetkezik a sejtalkotók oxidatív destrukciója. Általánosságban elmondható, hogy minden stressz rendelkezik oxidatív komponenssel. Ugyanakkor a növényt a környezetéből közvetlenül is érheti oxidatív stresszt okozó hatás. Az oxidatív stressz többnyire a kloroplasztiszokat károsítja, mert a bennük megtalálható fotoszintetikus pigmentek fotoszenzibilizátorként működve részt vesznek a reaktív oxigénformák előállításában. Így módon a növényeket érő ROS káros hatásának az egyik szemmel jól megfigyelhető jele a klorofill degradáció.

A reaktív oxigénformák által okozott oxidatív károsodással szembeni védelmet a növény antioxidáns rendszere jelenti, melynek enzimatis (pl. SOD, APX, KAT) és kismolekulájú, nem enzimatis elemi (pl. aszkorbinsav (Asc), glutation (GSH), karotinoidok) különíthetők el. A SOD formák különböző sejt-kompartimentumban található fémtartalmú enzimek, amelyek a O_2^- dizmutációját katalizálják hidrogén peroxiddá és oxigénné. Ezek az enzimek csaknem minden sejt-kompartimentumban, így az apoplaztban, a kloroplasztiszban, a mitokondriumban, a citoszolban és a peroxiszómában is előfordulnak (del Río és mtsai., 2002.). A kataláz a peroxiszómában, a glioxiszómában és a mitokondriumban fordul elő, a H_2O_2 vízzé és oxigénné történő átalakításában vesz részt.

A nem enzimatisz antioxiánsok közűl az aszkorbinsav közvetlenül reakcióba tud lépni a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel, valamint a H_2O_2 -ot aszkorbát-peroxidázzal vízzé tudja átalakítani a Halliwell-Ashada ciklusban. A karotinoidok szintén fontos szerepet töltenek be a nem-enzimatisz védekező mechanizmusokban, részt vesznek a kloroplasztisz belső membránrendszerének fotooxidatív stressz elleni védelmében, azáltal, hogy közömbösítik a gerjesztett klorofill molekulák által képzett szinglet oxigént, illetve megelőzik a szinglet oxigén képződését a klorofillok többlet energiájának átvételével. A glutation normál körűlmények között redukált formában (GSH) fordul elő a növényi sejtekben, oxidált formájának (GSSG) mennyiségi növekedése oxidatív stressz hatására következik be (Zechmann és mtsai., 2006). A GSH elektrondonorként funkcionál a dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR) reakciójához, ami az aszkorbátot regenerálja a dehidroaszkorbát redukcióján át az aszkorbát-glutacion ciklus részeként.

Az antioxiáns védőrendszer elemei optimalizálják a növény védelmét és túlélését azáltal, hogy információt szolgáltatnak a sejt redox állapotáról, valamint részt vesznek az abiotikus és biotikus stresszválaszhoz kapcsolódó génexpresszió szabályozásában.

2.3.2 A nitrogén-monoxid (NO)

A NO kis mólsúlyú, víz- és zsírolékony molekula. A NO termelődését növényekben elsőként Klepper és munkatársai figyelték meg 1975-ben (Klepper és mtsai., 1975.).

Az azóta eltelt több, mint három évtized alatt bebizonyosodott, hogy a NO növényekben számos fiziológiai folyamatban játszik szerepet: szabályozza a fejlődést, befolyásolja a hormonok hatását, közreműködik a programozott sejthalál (PCD) folyamatában, és az abiotikus stresszrezisztencia kialakításában, valamint a betegségekkel szembeni védekezés regulátora (Neill és mtsai., 2003.).

Már 1979-ben kimutatták, hogy a NO szerepet játszik a növények növekedésében is. A magas NO koncentráció (40-80 ppb) gátolta, míg az alacsony NO koncentráció (1-20 ppb) serkentette a paradicsom növények növekedését (Anderson és mtsai., 1979.).

Ugyanakkor a NO befolyásolhatja a növények öregedését is. Borsóban öregedést serkentő körűlmények között NO donorokkal megakadályozható az etilén bioszintézise (Leshem és mtsai., 1996.). Ugyanakkor *Arabidopsis* növényekkel végzett kísérletekben a nitrogén monoxiddal történő kezelés hatására megnövekedett etilénprodukción figyelték meg (Magalhaes és mtsai., 2000.). A virág öregedést késleltető hatása azonban egyértelműen bizonyított NO donorokkal, vágott virágok esetén (Leshem és mtsai., 2001.).

A NO hatással van a fotoszintetikus folyamatokra is, azáltal, hogy reverzibilisen gátolja az elektrontranszportot és ezáltal az ATP szintézist a színtestekben (Takahashi és mtsai, 2002.). A NO a Q_A és a Q_B közötti elektrontranszport gátlásával csökkentette a fotoszintetikus elektrontranszport hatékonyságát, illetve gátolta a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatait a fotokémiai kioltás (F_v/F_m) és a PSII maximális kvantumhasznosításának (Φ_{PSII}) csökkentésén keresztül borsó növények levelében is (Wodala és mtsai., 2008.).

A NO mindezek mellett a hyperszenzitív reakcióban (HR) és a PCD-ben is fontos szerepet játszik. A NO koncentrációtól függően lehet antioxidáns vagy citotoxikus hatású. Szója sejt kultúra patogénnel való kezelése gyors NO és H_2O_2 felszabadulásához vezetett (Delledonne és mtsai., 1998.).

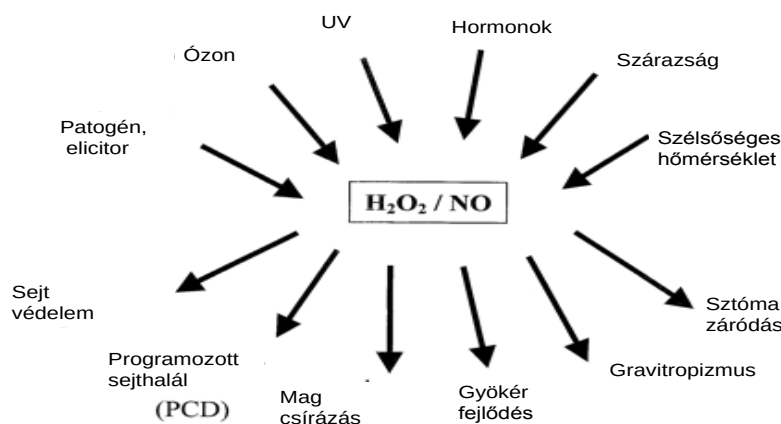
Dohányban az exogén NO indukálta a szalicilsav (SA) szintézisét. Valószínűsíthető, hogy a SA, a NO és a H_2O_2 a HR során egy komplex szignalizációs hálózatot alkotnak (Van Camp és mtsai., 1998.; Song és mtsai., 2001.).

A NO, mint szignalizációs molekula, tehát rendkívül sokrétű szerepet tölt be a növények életében.

2.3.3 NO és H_2O_2 kölcsönhatása

A NO és a H_2O_2 kulcsszerepet betöltő molekulák a növényekben a különböző stimulusokra adott védekező mechanizmusokban és a szignáltranszdukciós folyamatokban egyaránt (Bright és mtsai., 2006.). Emellett, mindkét molekula részt vesz különböző fejlődési folyamatokban, mint pl. a mag csírázása, gravitropizmus, sejtfal lignifikáció és gyökérfejlődés, jelezve azt, hogy szerepet játszanak az auxin és az ABS indukált endogén szignálokra adott válaszok szabályozásában (Desikan és mtsai., 2004.), (3. ábra). Mindkét molekula alkalmas, egymástól függetlenül is a patogenezissel kapcsolatos proteinek, pl. a PR-1 és a fenilalanin ammónia-liáz, a fenilpropanoid bioszintézis út sebességhatározó lépését katalizáló enzim expressziójának indukciójára (Neil és mtsai., 2002.). A NO és a H_2O_2 szabályozza a SA produkcióját (Chamnongpol és mtsai., 1998.; Durner és mtsai., 1998.) és a fitoalexinek bioszintézisét is (Dat és mtsai., 2000.; Romero-Puertas és mtsai., 2004.). Más, a stresszorok elleni védekezésben szerepet játszó gének függetlenül, vagy a NO, vagy a H_2O_2 hatására indukálódnak, ilyenek a glutation S-transzferáz és a jázmonsav bioszintézis út kulcsenzimek (del Rio és mtsai., 2004.; Foyer és mtsai., 2005.). Ezzel szemben egyes antimikrobiális flavonoidokat és peroxidázok expresszióját a NO szabályozza (Huang és

mtsai., 2002.; Modolo és mtsai., 2002.; Polverari és mtsai., 2003.), de a H_2O_2 nem (Vanderauwera és mtsai., 2005.). A hiperszenzitív reakcióban viszont szorosan együttműködnek (Zago és mtsai., 2006.; Desikan és mtsai., 2004.).

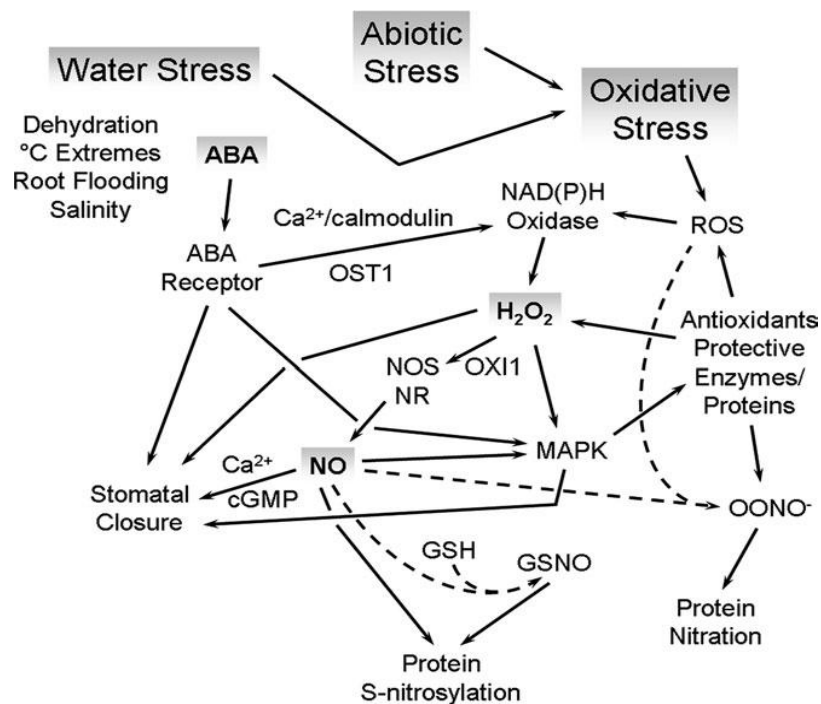


3. ábra. A H_2O_2 és a NO szerepe a sejt védekező mechanizmusaiban a különböző stresszorok és stimulusok esetén (Desikan és mtsai., 2004.). (H_2O_2 : hidrogén peroxid; NO: nitrogén monoxid). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

A NO szuperoxid gyökánnal történő reakciója peroxinitrit ($ONOO^-$) keletkezéséhez vezet, ami erős, oxidáló molekula (Delledonne és mtsai., 2001.). A NO hathat olyan enzimek aktivitására, amelyek a ROS szintet módosítják és fordítva, egyes reaktív oxigénformák befolyásolhatják a NO szintézisét. Lum és mtsai. (2002.) megfigyelték, hogy az exogén H_2O_2 NO termelést indukál a zárósejtekben és a *Phaseolus aureus* más sejtjeiben is. A kemilumineszcenciára épülő vizsgálatban, a H_2O_2 lényegesen megemelt egy nyilvánvalóan nitrogénmonoxid szintáz-szerű (NOS-szerű) aktivitást. Ezt a NO szintézist NOS inhibitorral lehetett gátolni. She és mtsai. (2004.) valamint He és mtsai. (2005.) szintén arról számoltak be, hogy a H_2O_2 NO szintézist indukál *Vicia faba* zárósejtjeiben és ebben az esetben is sikerült ezt a folyamatot NOS inhibitorral csökkenteni.

Búza csíranövényekben a NO megemelte a KAT aktivitását, ezáltal csökkentve a H_2O_2 koncentrációját nehézfém stressz alatt (Hu és mtsai., 2007.).

Zhang és mtsai. (2007.) kimutatták, hogy a NO termelés, amelyet az UV-B stimulál, a H_2O_2 -tól függ. Neill és mtsai. (2008.) bizonyították, hogy *Zea mays* levél mezofillum sejtjeiben az ABS és a H_2O_2 hatása, az antioxidáns rendszerek aktiválása a NO termeléstől függ, csökkenteni lehet cPTIO-val vagy L-NAME-val, a NO-t kioltó illetve NOS inhibitor vegyületekkel (4. ábra).



4. ábra. Az ABA és a ROS hatására indukálódó jelátviteli utak átfedése *Zea mays* levél mezofillum sejtekben szárazságstressz alatt (Neill és mtsai., 2008.). (ABA: abszcizinsav; ROS: reaktív oxigénformák; OST1: protein kináz; H_2O_2 : hidrogén peroxid; OXI1: protein kináz; NOS: nitrogén oxid szintáz; NR: nitrát reduktáz; NO: nitrogén monoxid; MAPK: mitogén aktivált protein kináz; OONO^- : peroxinitrit; GSH: redukált glutation; GSNO: S-nitrozo-glutation). Abiotikus stresszorok hatására indukálódik az abszcizinsav bioszintézise, mely a citoszólikus Ca^{2+} megemelkedésével aktiválja a NADPH oxidáz enzimet. Ennek eredményeképpen megemelkedik a H_2O_2 koncentrációja, melynek hatására indukálódik a NO szintézise. A NO koncentrációjának megemelkedése pedig sztómazáródást indukál. Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

A nitrát reduktáz (NR) és egy NOS-szerű fehérje egyaránt lehet az endogén NO-t szintetizáló enzim növényekben (Neill és mtsai., 2008). A H_2O_2 pedig az NR-t és a NOS-szerű enzimet aktiválva NO szintézist indukál, de ezt az útvonalat növényekben mindezidáig nem sikerült teljesen leírni. Lehetséges azonban, hogy ez a jelátvitel magában foglalja az OXI1 protein kinázt és a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ megemelkedését is (Neill és mtsai., 2008.).

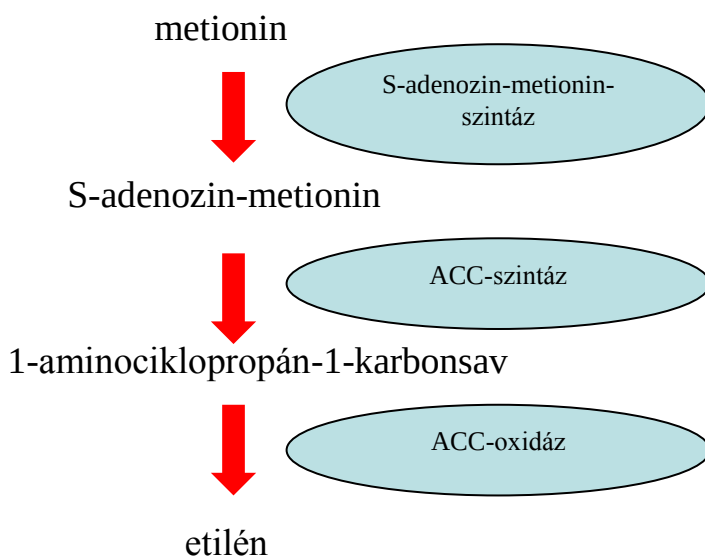
2.3.4 Az etilén és szerepe az abiotikus stressz akklimatizációban

Az etilén multifunkciós szignál molekula és mint növényi hormon szerepet játszik a növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában, serkenti az öregedés és a leválás folyamatát, illetve epinasztiát idéz elő (Köves és Nagy, 1997.). Gáz halmazállapotú anyag,

melyet a magasabbrendű növények valamennyi sejtje képes termelni. Az alap etilénprodukciónál általában nagyobb a fiatal, merisztematikus régiók, illetve az öregedő szervek esetében, mint a vegetatív szövetekben.

Az etilén prekursora a magasabbrendű növényekben a metionin. A bioszintézis kulcsvegyülete, az etilén közvetlen prekursora az 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav (ACC) a citoplazmában szintetizálódik (5. ábra). Az ACC-ből történő etilénképződést az ACC oxidáz (ACO) katalizálja. A vegetatív szövetek általában konstitutív ACC oxidáz expresszióval rendelkeznek, így az ACC-t *in vivo* rendszerekben gyakran használják etiléngenerátornak.

Az etiléntermelésben a hormonális szabályozás kulcsfontosságú szerepet játszik. Az etilénszintézist specifikus ACC szintáz gének indukciójával fokozzák a brasszinoszteroidok. Az ABS és a jázmonsav (JA) szintén serkenti az etilénprodukción, míg a SA és a NO, bár koncentrációtól függően, általában gátló hatású. A SA sebzés során megakadályozta az ACC-szintáz akkumulációját, és az ACC-oxidáz blokkolása által gátolta az etilénszintézist körte sejtszuspenzióban (Leslie és mtsai., 1988.). Borsóban öregedést serkentő körülmények között NO donorokkal az etilén bioszintézise szintén gátolható volt (Leshem és mtsai., 1996.).



5. ábra. Az etilén bioszintézise (Adams és Yang, 1979.). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

A gyümölcsök érése NO kezeléssel ugyancsak késleltethető (Leshem és Pinchasov, 2000.). Ugyanakkor *Arabidopsis* növényekkel végzett kísérletekben a nitrogén-monoxiddal történő kezelés hatására megnövekedett etilén produkciót figyeltek meg (Magalhaes és mtsai., 2000.).

Fokozott etilénszintézist indukálnak egyrészt az abiotikus stresszorok, úgy, mint a sebzés, hidegkezelés, szárazság, ársztás, ózon, nehézfémek, a biotikus stresszorok, de az etilénnek adaptív szerepe van a sóstressz akklimatizációban is (Ma és mtsai., 2006.). Tehát az etilén a legtöbb stresszválaszban szerepel. Általánosságban elmondható, hogy a stresszhatásra termelődő etilén indukálja a levél leválását, ezáltal csökkenti a párologtató felületet és gátolja a növekedést. Mindezek a stresszor hatásának az elkerülését szolgálják.

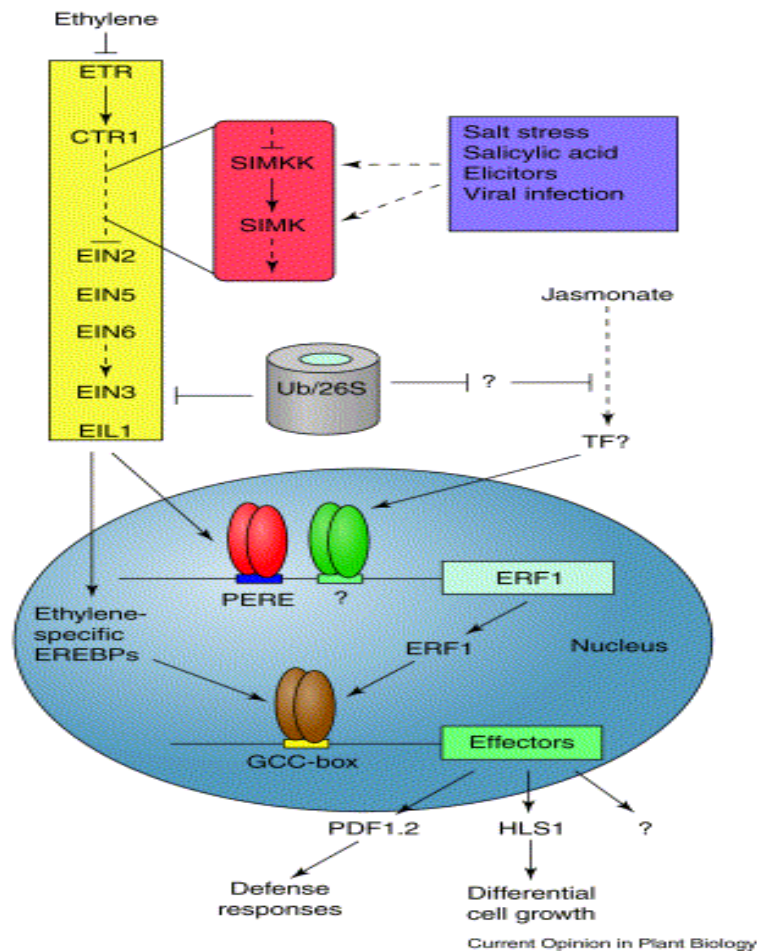
Az etilén koncentrációtól függően fokozhatja a növények stresszrezisztenciáját. Nagy koncentrációkban azonban PCD kialakulásához vezet. Az etilén fontos szerepet játszik a különböző PCD-t indukáló elicitorok, mint pl. a kamptotecin indukálta PCD kiváltásában azáltal, hogy serkenti a H_2O_2 produkciót (de Jong és mtsai., 2002.).

Kimutatták azt is, hogy az ózon indukálta etilénprodukciónak függ a SA-tól, és az etilén illetve a SA együttesen vesz részt az ózon indukálta PCD indukációjában (Rao és mtsai., 2002.).

Leggyakrabban az ACC tartalom és etilénprodukciónak a stresszor megjelenése előtt alacsony, azonban a stresszhatást követően gyorsan emelkedik. Hidegstressz hatására megnő az ACC-szintáz aktivitása, ezáltal pedig fokozódik a növény etilénprodukcióna (Wang és Adams, 1982.; Janowiak és Dörffling, 1995.). Az alacsony hőmérséklet közvetlenül és közvetve is hat az etiléntermelésre. Magasabbrendű növényekben az etilén ACC-ből szintetizálódik. Alacsony hőmérsékleten azonban az ACC inaktiválódik, ami által az ACC felhalmozódik (Etani és mtsai., 1987.). Alacsony hőmérsékleten a MACC (malonil-ACC) akkumulációját búza és kukorica növények esetében is leírták (Szalai és mtsai., 2000.; Macháková és mtsai., 1989.). Kukorica növények (*Zea mays* L.) esetében azt tapasztalták, hogy a 0,5 mM-os SA előkezelés csökkenést okozott az alacsony hőmérsékleti stressz alatt és nélkül is az ACC és a MACC koncentrációjában (Szalai és mtsai., 2000.).

Az etilén, mint hormonális jel érzékelésének mechanizmusát olyan *Arabidopsis* mutánsok segítségével tisztázták, amelyek etilénre adott válaszreakciói rendellenesek. A mutánsok egy része etilénre érzéketlen maradt, ezeket *etr* (*ethylene receptor 1*), illetve *ein* (*ethylene insensitive*) mutációknak nevezték el. A mutánsok másik csoportja pedig etilénmentes légkörben is olyan fenotípust mutatott, mintha etilénkezelést kapott volna. Ez utóbbi mutációt *ctr*-nek (*constitutive triple response*) nevezik. Az etilén-indukálta jelátvitel első lépése az etilén kötődése az endoplazmatikus retikulum membránban található, dimerizálódott, Cu^{+} iont tartalmazó receptorokhoz. A kötődés hatására a receptor deaktiválódik, ennek következtében pedig a CTR1 Ser/Thr kináz inaktiválódik. A jelátvitel további szakaszai pozitív regulátorokat kívánnak, ilyenek az EIN2, amely egy ismeretlen,

membránban lokalizálódó transzporter, az EIN3 és az EIL1, amelyek a primer etilén válaszgént aktiváló transzkripciós faktorok. Az újonnan szintetizálódó ERF1 transzkripciós faktor a szekunder válaszgének etilén-specifikus GCC elemeihez kötődik, és transzkripciót indukál. A MAPK rendszert (SIMK, SIMKK) számos biotikus (pl. vírusfertőzés), illetve abiotikus (pl. sóstressz, SA) tényező képes aktiválni, de ez az aktiváció függ az ETR receptor, illetve a CTR1 aktivációjától. Az etilén, a SA, az ozmotikus stressz, és a sóstressz jelátviteli útjai a SIMKK, SIMK szintjén átfedhetnek. Ezen kívül a JA által szabályozott transzkripciós faktor kötődhet az ERF1 promóteréhez, ezáltal aktiválva a génexpressziót. Így az ERF1 szerepet játszhat mind az etilén, mind a JA által indukált jelátvitelben. Az EIN3 az ERF1 primer etilén válaszgént aktiváló transzkripciós faktor. Az ERF1 fehérje a szekunder válaszgének promóterében a GCC boxszal kölcsönhatva szabályozza a génexpressziót, és megindítja a transzkripciót. Az etilén válaszgének (pl. PDF1. 2) kódolják azokat a fehérjéket, amelyek az etilén által indukált különböző védelmi reakciókban vesznek részt (Guo és mtsai., 2004.) (6. ábra).



6. ábra. Az etilén jelátvitel génexpressziós szabályozásának modellje (Guo és mtsai., 2004.). (ETR: etilén receptor; CTR1: szerin/treonin kináz; SIMK: sóstressz által indukált mitogén

aktivált protein kináz; SIMKK: SIMK kináz; EIN2, EIN5, EIN6: az etilén szignalizációs út pozitív regulátorai; EIN3, EIL1: transzkripciós faktorok; Ub/26S: proteoszóma; EREBPs: etilén válasz elemekhez kötődő proteinek; PERE: elsődleges etilén válasz elem; ERF1: az etilén válasz elemekhez kötődő proteinek egyik típusa; TF: jázmonsav által szabályozott transzkripciós faktor; JA: jázmonsav; GCC boks: a szekunder etilén válaszgének promóterének etilén-specifikus *cisz*-ható elemei; *PDF1.2: PLANT DEFENSIN1.2*, etilén válasz gén; *HLS1: HOOKLESS1*, etilén válasz gén). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

2.3.5 A poliaminok és szerepük az oxidatív stressz folyamatokban

A poliaminoknak ugyancsak fontos szerepük van a különböző abiotikus stresszorokkal szemben kialakuló akklimatizációban, így K^+ hiánynál, savstressz esetén, szárazságstressz, sóstressz, valamint hidegstressz hatására megemelkedik a poliaminok koncentrációja.

A poliaminok minden élő szervezetben előfordulnak. A baktériumokban és az állati szervezetekben már 50 éve ismert a jelentőségük, a növényekben betöltött szerepük vizsgálata viszonylag későn kezdődött meg.

A növényekben leggyakrabban előforduló poliaminok közé tartozik a diamin putreszcin (Put), a triamin spermidin (Spd) és a tetramin spermin (Spm).

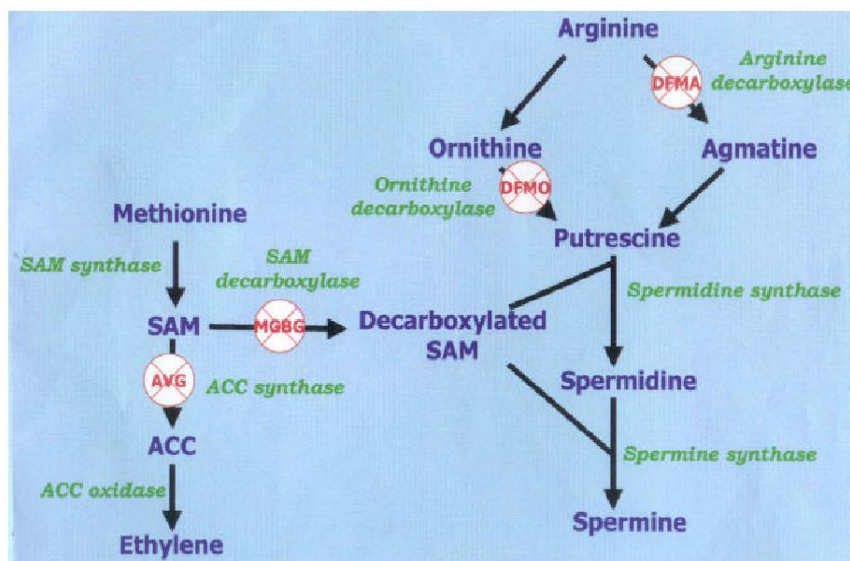
A poliaminok koncentrációja növényi szövetekben nagyobbak bizonyult, mint a növényi hormonok koncentrációja, így a poliaminok nem tekinthetők hormonoknak, azonban számos olyan metabolikus folyamatot szabályozhatnak közvetlenül vagy közvetve, amelyek végsősoron kihatással vannak a növények fejlődésére (Pandey és mtsai., 2000.).

A poliaminok fontos szerepet játszanak a sejtosztódásban. A Spd és a Spm a sejtciklus G_1 -S átmenetéhez szükséges, ugyanakkor a Put Spd-né való átalakulása kontrollálja a sejtosztódás sebességét.

A poliaminok lebontását aminoszázok végzik: a diamin oxidáz (DAO) és a poliamin oxidáz (PAO). A DAO a Put oxidálását végzi, a reakció során keletkezik 4-aminobutiraldehid, H_2O_2 , a reakció végterméke pedig az 1-pirrolin. A PAO a Spd-t és a Spm-t oxidálja el, a reakció során 1,3-diaminopropán (Dap) és H_2O_2 keletkezik. A Spd és a Spm gátolta a NADPH-oxidáz működését, ily módon pedig a O_2^- keletkezését, a Put pedig kivédte a PAO által generált H_2O_2 által indukált PCD kialakulását szőlő protoplasztokban (Papadakis és mtsai., 2005.). A PAO hatását tanulmányozták olyan transzgenikus dohány növényben is, ahol indukálták a PAO expresszióját és azt tapasztalták, hogy ez az expresszió kissé megemelkedett H_2O_2 koncentrációt eredményezett, ami indukálta az antioxidáns

mechanizmusokat, ezáltal hozzájárulva a sejtek túléléséhez valamint a növény normális növekedéséhez. Azonban mindez stressz körülmények között nem volt elég a növény túléléséhez (Moschou és mtsai., 2008.). A PCD a poliaminok keletkezésének és lebontásának arányától függ: amikor a poliaminok szintézise gyorsabb, mint a lebontása, akkor a PCD kivédhető, ellenkező esetben azonban PCD alakul ki (Moschou és mtsai., 2008.).

A poliaminok gátolják a szenescenciát az etilén bioszintézis gátlása által (Pandey és mtsai., 2000.). A Spd és a Spm prekursora megegyezik az etilén prekursorával, és ez nem más, mint az S-adenozin-metionin (SAM), (7. ábra). Megfigyelték paradicsomban, hogy a poliaminok gátolták a sebzés indukálta 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) szintáz transzkripcióját. A poliaminok, akárcsak a SA, speciálisan szabályozhatják az etilén bioszintézisét az ACC szintáz transzkripciójának szabályozásán keresztül. Számos megfigyelés azt mutatta, hogy a poliaminok késleltették az öregedés folyamatát növényi szövetekben az ACC szintáz enzim gátlása által (Lee és mtsai., 1997.; Hong és mtsai., 1996.). A poliaminok módosítani tudják az etilén bioszintézisét, és versengenek az etilénnel a rendelkezésre álló SAM megszerzéséért (Katoh és mtsai., 1987.). Bár a poliaminok elnyomhatják az etilén bioszintézist, és stabilizálhatják a membránokat, ez a hatás nem általánosítható. Megfigyelték, hogy a poliamin kezelés szegfűben stimulálhatja is az etilén szintézisét, felgyorsult öregedést eredményezve (Downs és mtsai., 1986.). Lee és mtsai. (1997.) azt találták, hogy a Spm levágott szegfű virágokban késleltette az öregedést, és a szíromlevelekben csökkentette az etilénprodukción, az ACC tartalmat, az ACC szintáz, valamint az ACC oxidáz aktivitását.



7. ábra. A poliaminok és az etilén bioszintézise közötti kapcsolat (Pandey és mtsai., 2000.).

(SAM: S-adenozil-metionin; ACC: 1-aminociklopropán-1-karbonsav; AVG: aminoetoxivinilglicin; DFMA: DL- difluormetil arginin; DFMO: DL-difluormetil ornitin; MGBG: metilglioxál-*bis*-guanilhidrazon). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

A poliaminok antioxidánsként is ismertek, a különböző poliaminok eltérő mértékben, de gátolhatják a NADPH oxidázt. Az abiotikus stresszorok által aktivált ROS kioltásával a poliaminok növelik a sejtek életképességét, és hozzájárulnak a sikeres akklimatizációhoz. A Put javítja az életképességet, csökkenti az O_2^- akkumulációt és elősegíti a sejtosztódást a stresszhatásnak kitett növényekben. Papadakis és mtsai. (2005.) kimutatták, hogy az exogén Put kezelés növelte az életképességet szőlő, illetve dohány protoplasztok esetében. A Put szintjének növekedése gátló hatású lehet a DNS metilációra, ami lehetővé teszi egyes speciális gének expresszióját (Martin-Tanguy és mtsai., 1996.). A Put fokozta a glutation oxidációját (Nagele és mtsai., 1994.), és szabályozta az antioxidáns enzimek aktivitását oxidatív stressz alatt (Podulso és Gurran, 1996.). A Put-nek kiemelt szerepe lehet a növény adaptációjában ózon által kiváltott oxidatív stressz esetén is (Navakoudis és mtsai., 2003.).

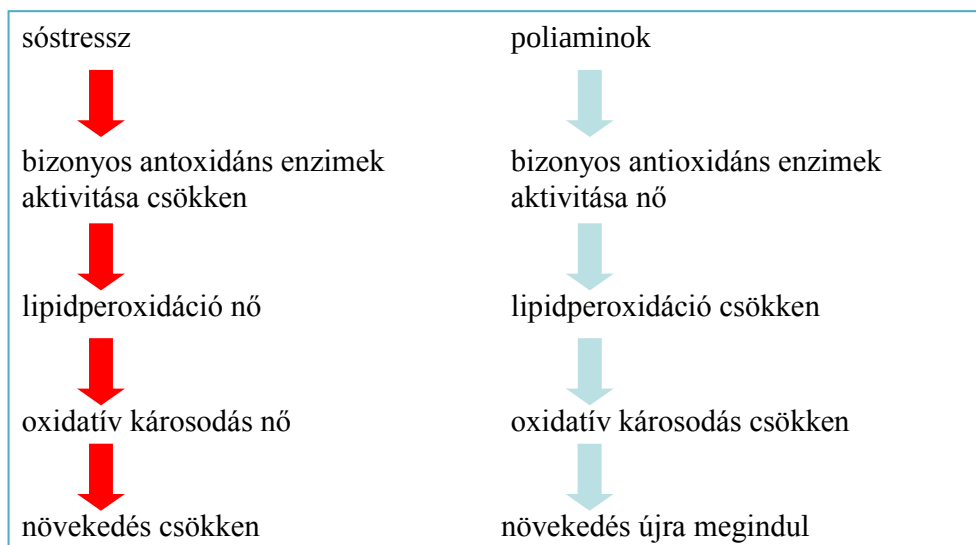
A Spd és az Spm a membránhoz kapcsolódó fehérjékkel asszociálhat. A H_2O_2 akkumuláció szempontjából a Spd és a Spm ellentétes hatású, mint a Put. Ezen sejtek jobban akkumulálták a H_2O_2 -ot a NADPH oxidáz aktivációja következtében (Ogata és mtsai., 1996.). A poliaminok endogén H_2O_2 tartalomra gyakorolt hatása azonban függött a növényi anyagtól, ugyanis más esetben protoplasztokban az exogén poliaminok csökkentették a O_2^- akkumulációt (Xing és mtsai., 1997.). Exogén poliaminok kifejtethetnek antioxidáns hatást is a ROS-kioltó enzimek aktiválásával (Bors és mtsai., 1989.).

Összegezve tehát, az antioxidáns poliaminoknak nemcsak a ROS-t kioltó aktivitásuk van, hanem a NADPH oxidázt is gátolhatják, amely koncentrációfüggő és korrelációban van a poliaminok amino-csoport számával.

Ugyanakkor Yamasaki és mtsai. (2006.) kimutatták, hogy a Spd és a Spm nagyon gyors NO akkumulációt indukált *Arabidopsis* csíranövényekben, míg Put esetében ez a hatás nem volt megfigyelhető.

A poliaminok spektruma változik a sóstressz hatására a különböző fajokban. A poliaminok só indukálta oxidatív stresszben betöltött szerepét többek között a virginiai fenyőben tanulmányozták. Azt tapasztalták, hogy a poliaminok csökkentették a sóstressz által indukált oxidatív károsodást a növényekben, azáltal, hogy megnövelték bizonyos antioxidáns enzimek aktivitását, és eközben lecsökkentették a lipid peroxidációt (8. ábra). A Put, a Spd és

a Spm megnövelte az APX, a GR és a SOD aktivitását, és ugyanakkor lecsökkentette a lipid peroxidációt (Tang és Newton, 2005.).



8. ábra. A poliaminok szerepe a só indukálta oxidatív stresszben (Tang és mtsai., 2005.). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

Fontos a Spd és Spm koncentrációjának megemelkedése a magas NaCl koncentrációnak kitett gyökerekben (Lin és Kao, 1995.). A *S. pennellii* hajtásában a sóstressz hatására a Put jóval korábban akkumulálódott és nagyobb koncentrációt ért el, mint a *S. esculentum*-ban, ez utóbbi jóval érzékenyebben reagált a sóhatásra (Santa-Cruz és mtsai., 1999.).

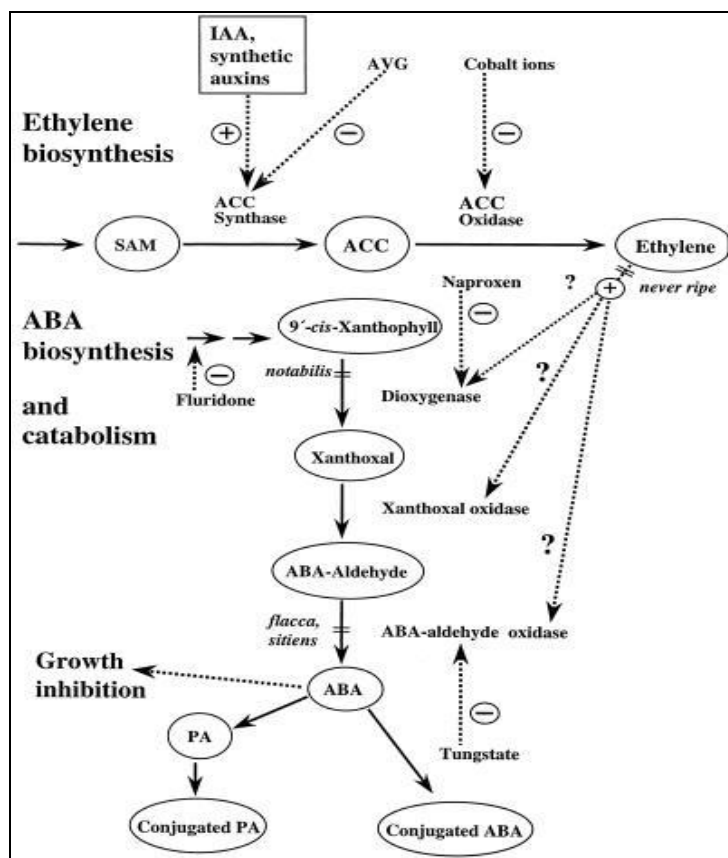
2.3.6 Az ABS és az általa indukált H_2O_2 és NO termelés

Az ABS, mint növényi hormon, fontos sejtfolyamatok szabályozója. Többek között serkenti az öregedési folyamatokat, gátolja a hajtás megnyúlásos növekedését. Ezenkívül védő szerepet játszik olyan abiotikus stresszel szemben, mint a szárazság, a só és a hideg stressz.

Az ABS bioszintézisének a szabályozása szoros kapcsolatban áll magukkal a stresszfolyamatokkal.

Az etilén közvetlenül hat az ABS bioszintézisére, a 9-*cisz*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCED), a xantoxal-dehidrogenáz és az abszcizinaldehid oxidáz (AAO) aktivitásának fokozásával, etilén hatására megnövekszik az ABS tartalom (Hansen és mtsai., 2000.) (9. ábra).

A poliaminok bioszintézisében résztvevő kulcsenzimek közül az arginin dekarboxiláz és a Spd szintáz (*Zmspd* 1,2) transzkripcionális szinten, ABS által szabályozódnak (Jiménez-Bremont és mtsai., 2007.).



9. ábra. Az etilén és abszcizinsav (ABS) bioszintézis közötti kapcsolat (Hansen és mtsai., 2000.). (IAA: indol ecetsav; AVG: aminoetoxivinil-glicin; SAM: S-adenozil-metionin; ACC: 1-aminociklopropán-1-karbonsav; ABA: abszcizinsav; PA: poliamin). Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

Az ionos és nem ionos ozmotikus stressz, illetve a szárazság következtében szintetizálódó ABS leggyorsabban kialakuló hatása a sztómák záródása, amit a hajtásnövekedés gátlása követ abban az esetben, ha a talaj víztartalma tovább csökken (Wilkinson és mtsai., 2002.). A talajban kialakuló szárazság, illetve a sóstressz hatására először a gyökérben fokozódik az ABS szintézis, és emelkedik meg az ABS koncentráció. Ezután a hormon a xilémen keresztül a hajtásba transzportálódik, majd vagy a levél apoplasztjába jut, vagy belépve a sejtekbe, a nagyobb pH-val rendelkező sejt-kompartimentumokban, pl. a megvilágított kloroplasztisban halmozódik fel. Stresszhatásra a xilémnedv pH-ja 6.0-ról 7.0 körülivé válik, és ezáltal az ABS nagyobb

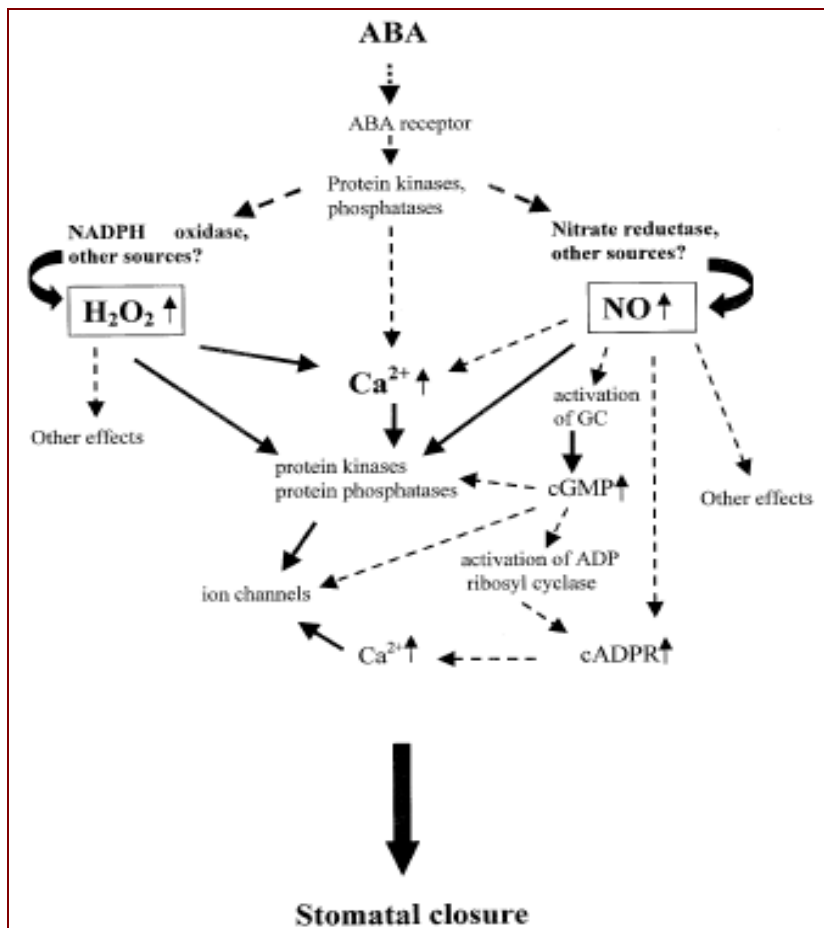
hányada marad az apoplaztban és jut el a sztóma zárósejtekig, ahol is sztómazáródást indukál.

Az ABS-indukált sztómazáródást a másodlagos jelátvivő, a citoszolikus szabad $[Ca^{2+}]$ szabályozza a zárósejtekben. Az ABS indukálta Ca^{2+} szint emelkedést a citoplazmában a plazmamembránban található Ca^{2+} csatornákon a külső térből beáramló Ca^{2+} okozza (Kwak és mtsai., 2003.).

Az ABS a sztómazárósejtekben indukálja mind a H_2O_2 , mind pedig a NO szintézisét. Farmakológiai adatok alapján az ABS és a H_2O_2 indukálta sztómazáródást egyaránt a mitogén aktiválta proteinkináz (MAPK) jelátviteli út szabályozza. A protein defoszforiláció is fontos szerepet játszik az ABS indukálta folyamatokban (Schroeder és mtsai., 2001.). Noha az még kérdéses, hogy a H_2O_2 pontosan milyen folyamatokat szabályoz, a NADPH oxidáz két alegységének (AtrbohD és AtrbohF) részvétele ebben az ABS szabályozta folyamatban igazoltnak tekinthető. A kettős mutánsok sztómazáródást mutattak, amelyet a külsőleg adott H_2O_2 segítségével lehetett korrigálni (Kwak és mtsai., 2003.; Desikan és mtsai., 2004.).

Az ABS a szignalizációban szerepet játszó tagok egy összetett hálózatát aktiválja, beleértve a G-proteineket, protein kinázokat, protein foszfatázokat, ROS-t, citoszolikus szabad kalcium szintet és ioncsatornákat (Irving, Gehring és Parish, 1992.; Hamilton és mtsai., 2000.; Schroeder és mtsai., 2001.; Wang és mtsai., 2001.; Bright és mtsai., 2006.; Gonuguta és mtsai., 2008.). A ROS fontos komponense az ABS indukálta jelátvitelnek. A H_2O_2 kezelés egyszerre eredményezte a citoszolikus Ca^{2+} koncentrációjának emelkedését és a kalmodulin gén expresszióját (Hu és mtsai., 2007.). *Arabidopsis*-ban az ABS indukálta sztómazáródást a flavin analóg difenilén jodóniummal (DPI), a NADPH oxidáz gátlószerével meg tudták szüntetni. A NADPH oxidáz által generált H_2O_2 hatására kalcium csatorna aktiválódott, mely a H_2O_2 szintézis szerepére utal az ABS indukált sztómazáródásban (Desikan és mtsai., 2004.).

Az ABS a sztóma zárósejtekben NO szintézist is indukál. Amennyiben a NO nincs jelen a rendszerben, úgy a sztómák nem záródnak, ezzel igazolva a NO szerepét ezen életfolyamat során (Garcia-Mata és Lamattina, 2002.). A H_2O_2 indukálta sztómazáródás a NO kioltásával gátolható, ugyanakkor mind az ABS, mind a H_2O_2 serkenti a zárósejtek NO szintézisét (Desikan és mtsai., 2004.) (10. ábra).



10. ábra. Az abszcizinsav (ABA) által indukált jelátviteli utak sztóma zárósejtekben (Desikan és mtsai., 2004.). (H_2O_2 : hidrogén peroxid, NO: nitrogén monoxid). Az egységes vonalak a kísérleti úton igazolt, a szaggatott vonalak pedig a feltételezett szignalizációs utakat szemléltetik. Az ábra bővebb magyarázata a szövegben található.

2.4 A szalicilsav (SA) fiziológiai hatásai növényekben

1828-ban Johann Buchner izolálta először a fűzfa barkájából a szalicint és annak glükozidját. A SA a növényi fenolvegyületek közé tartozó benzoésav származék, talajlakó mikróbák is képesek a szintézisére. A termesztett növények gyökérzetének rizoszférájában található mikroorganizmusok is képesek a szalicilsav bioszintézisére, pl. a kukorica, illetve a mungó bab rizoszférájában 31 és 141 μg SA-t találtak 100 g száraz talajban. A SA általában nem a környezetből kerül a növényekbe, hanem magukban a növényekben szintetizálódik.

Mivel a mikroorganizmusok, vagy a növények gyökere által exudált SA erőteljesen befolyásolja a növények növekedését, allelopatikus anyagnak tekinthető. Növekedésgátló hatása abban nyilvánul meg, hogy hat a növények vízháztartására. SA-val kezelt szója növények a kontrollnál alacsonyabb vízpotenciált és kisebb sztómakonduktanciát mutattak (Barkosky és Einhellig, 1993.). A SA növekedésgátlást és sztómazáródást idézett elő lóbabban is (Manthe és mtsai., 1992.), gátolta a plazmamembránban lokalizálódó H^+ -ATPáz aktivitását (Bourbouloux és mtsai., 1998.), valamint a K^+ , a Mg^+ és a Cl^- felvételét (Baziramakenga és mtsai., 1994.).

A vízháztartás mellett a SA a fotoszintézisre is hatással van. 100 μM -os SA kezelés árpában csökkentette a levél növekedését, a klorofill és fehérje tartalmakat, a fotoszintézis maximális sebességét, a Rubisco enzim aktivitását (Pancheva és mtsai., 1996.). Ezzel ellentétben a SA kezelés búzában fokozta a fotoszintetikus elektrontranszportot (Sahu és mtsai., 2002.), és előkezelésben alkalmazva feloldotta a fotoszintézisgátló herbicid, a paraquat által indukált gátlást a CO_2 fixációra (Ananieva és mtsai., 2002.).

A SA fontos szerepet játszik a biotikus, illetve az abiotikus stresszrezisztencia kialakításában. Dohánymozaikvírussal fertőzött, rezisztens dohány fajtában (*Nicotiana tabacum* cvar xanthi) megfigyelhető, hogy a SA koncentrációja jelentősen, kb. negyvenszeresére emelkedik. Mind a közvetlenül fertőzött, mind pedig a távolabbi levelekben a SA koncentrációjának a megemelkedése megelőzte a patogenezissel kapcsolatos (PR) fehérjék expresszióját. A PR proteinek expressziója kiváltható volt exogén SA kezeléssel is.

Részen a szubletális oxidatív stressz generálásával, és ennek következtében a redoxregulált, antioxidáns enzimek expressziójának fokozásával hozzák összefüggésbe az SA-nak azon hatásait, amelyeket az abiotikus stresszorok hatásainak mérséklése kapcsán tapasztalhatunk. A SA előkezelés fokozta a növények rezisztenciáját az UV-B sugárzással és az ózonnal (Yalpani és mtsai., 1994.), a paraquattal (Ananieva és mtsai., 2004.), a hőstresszel

(Larkindale és Knight, 2002.), a hidegstresszel (Janda és mtsai., 1999.), a vízhiánnyal (Bezrukhova és mtsai., 2001.), a nehézfém stresszel (Mishra és Choudhury, 1999.) valamint sóstresszel szemben (Szepesi és mtsai., 2009.). Azonban az abiotikus stresszrezisztencia fokozásához szükséges SA koncentráció függ a növényfajtól, a kezelt szövet típusától, a kezelés módjától és időtartamától. A SA kis koncentrációban fokozta dohány növények hőtűrését, azonban a 0,1 mM koncentrációnak már nem volt védő hatása. A SA jelenlétének fontosságát az abiotikus stresszrezisztencia kialakításában SA bioszintézisben mutáns *NahG* transzgénikus növények segítségével bizonyították, amely növények bakteriális (*Pseudomonas putida*) eredetű szalicilát-hidroxiláz gént hordoznak és ezáltal képtelenek a SA felhalmozására, mivel a szalicilát-hidroxiláz enzim a szalicilsavat katekollá alakítja (Gaffney és mtsai., 1993.). Ezek a transzgénikus növények hőstressz esetén érzékenyebbek voltak a magas hőmérséklet okozta oxidatív károsodásra, mint a normál SA szinttel rendelkező, nem transzformált növények (Larkindale és Knight, 2002.).

Általánosságban elmondható, hogy alacsony koncentrációban a SA átmeneti oxidatív stresszt okoz a növénynek, ezáltal növelve a növény antioxidatív kapacitását (Knörzer és mtsai., 1999.), illetve indukálja egyes, a stresszor elleni védekezésben szerepet játszó anyagok, pl. a poliaminok szintézisét (Németh és mtsai., 2002.), magasabb koncentrációban azonban olyan mértékű oxidatív stresszt eredményez, melyet a növény már nem tud kivédeni és végső soron a növényi egyed pusztulását eredményezi.

A SA közvetlenül részt vesz a HR és a szisztematikus szerzett rezisztencia kialakításában. A HR a növények azon védekezése a kórokozókkal szemben, melynek során a fertőzés helye körül a sejtek „elhalásával” nekrotikus lézió alakul ki. A HR rezisztenciát indukál a fertőzött sejtek környezetében, ami, ha az egész növényre kiterjed, szisztematikus szerzett rezisztenciáról beszélhetünk. Az oxidatív robbanás jellemző a hiperszenzitív reakcióra. A HR következtében mind a fertőzés helyén, mind a távolabbi levelekben megindul a SA szintézise. A növény és a patogén közötti felismerési reakciót követően jelátvitel indukálódik, melynek hatására a NADPH-oxidáz enzim aktiválódik. A NADPH oxidáz működésének eredményeképpen O_2^- , majd végül H_2O_2 keletkezik. Ha sok ROS keletkezik, akkor a fertőzés helye körül PCD alakul ki, de ha ezen oxigénformákat a sejtek inaktiválni tudják, akkor akklimatizáció jön létre.

Az antioxidáns enzimek analízise során bebizonyosodott, hogy amíg a SA előkezelés nem okozott jelentős változást az APX (EC 1. 11. 1. 11.) és a SOD (EC 1. 15. 1.) aktivitásában, addig jelentősen növelte a KAT (EC 1. 11. 1. 6.), a GR (1. 6. 4. 2.) és a peroxidáz (EC 1. 11. 1. 7.) aktivitását kukoricában (Janda és mtsai., 1999.).

Ugyanakkor Rao és mtsai. (1997.) megfigyelték, hogy a SA előkezelés megnövelte a H_2O_2 koncentrációját *Arabidopsis thaliana*-ban, továbbá növelte a lipidperoxidációt, illetve a fehérjék oxidatív károsodását is. A SA előkezelés hatására bekövetkező H_2O_2 szintek megemelkedése összefüggésben volt a Cu, Zn-tartalmú SOD aktivitásának növekedésével, valamint a KAT és az APX gátlódásával.

Hosszantartó SA kezelés *Arabidopsis*-ban (Rao és mtsai., 1997.), illetve *Astragalus adsurgens* Pall. kalluszkultúrában (Luo és mtsai., 2001.) csökkentette az APX, illetve a KAT aktivitását, ezáltal megnövelve a H_2O_2 szintet. Később bebizonyosodott, hogy a SA katalázt gátló hatása csak egyes izoenzimek esetében érvényesül (Horváth és mtsai., 2002.). A KAT gátlása következtében megemelkedik a H_2O_2 koncentrációja és oxidatív stressz indukálódik, amely pedig biotikus stresszfolyamatokban HR kialakulásához vezet.

A HR programozott sejthalállal zárul, amely folyamathoz a NO is hozzájárul. Kimutatták, hogy a SA bizonyos koncentrációban indukálja a NO szintézisét *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben, amely szintén PCD kialakulásához vezethet (Zottini és mtsai., 2007.).

Ugyanakkor nemcsak a SA hatására nő meg a ROS mennyisége a sejtben, a ROS is okozhat SA felhalmozódást (León és mtsai., 1995.; Enyedi, 1999.). Ez utóbbi megfigyelés egy öngerjesztő szalicilsav-hidrogénperoxid ciklus hipotézishez vezetett, amely ciklus végső soron a ROS felhalmozódását és a sejt halálát eredményezi (Van Camp és mtsai., 1998.).

3. Célkitűzések

A SA allelopatikus anyag, mely gyökérexudátumon keresztül hat a növények növekedésére. Növekedésgátló hatása abban nyilvánul meg, hogy csökkenti a növények vízpotenciálját és sztómakonduktanciáját. Gyökérkezelésként történő alkalmazása egyrészt modellezi a természetes viszonyokat az alacsony koncentrációk esetében, míg a sóstressz akklimatizációt fokozó koncentrációk a paradicsom esetében hidropónikus nagyüzemi termesztés során alkalmazhatók lehetnek. Irodalmi adatok mutatják, hogy a SA a KAT bizonyos izoenzimeinek gátlásán keresztül növelheti a H_2O_2 koncentrációját, ami oxidatív stressz, végső soron pedig HR kialakulásához vezethet. A SA indukálhatja a NO szintézisét is, amely végső soron szintén HR-t okozhat biotikus stresszfolyamatok során.

Ugyanakkor a SA bizonyos koncentrációban fokozhatja a növények stresszrezisztenciáját mind biotikus, mind abiotikus stresszfolyamatokban. Tanszékünkön folyó korábbi kutatások eredményei igazolták az exogén SA előkezelés hatásosságát a sóstressz akklimatizációban (Tari és mtsai., 2009; Szepesi és mtsai., 2009). A külsőleg alkalmazott SA előkezelések közül a 10^{-4} M-os kezelés bizonyult alkalmasnak a sóstresszel szembeni rezisztencia kialakításában, abban az esetben, ha az előkezeléseket hosszú távon alkalmazták.

Szepesi és mtsai. (2009.) kísérleteikben megállapították, hogy a 10^{-7} M és a 10^{-4} M SA előkezelés paradicsom növényekben csak átmeneti zavart okozott a vízháztartási paraméterekben, és a vízpotenciál átmeneti csökkenése után a növények ozmotikusan adaptálódtak. Ugyancsak megemelkedett a növényekben a 10^{-4} M-os SA előkezelés hatására az ABS szintézisét katalizáló abszcizinaldehid oxidáz aktivitás, ami mind a gyökérben, mind a levelekben megemelkedett ABS tartalmat eredményezett. Az ozmotikus adaptáció és az ABS, mint stresszhormon koncentrációja egyfajta „priming”-nak, edzett állapotnak tekinthető, ami megkönnyítette az ezt követő sóstressz akklimatizációt, amit 100 mM NaCl alkalmazásával idéztek elő. A sikeresen akklimatizálódó 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növényekben a sóstressz alatt a vad halofita paradicsom fajokra jellemző poliamin spektrum, és a *S. pennellii*-re jellemző antioxidáns enzimaktiválódás következett be. Nem történt meg azonban a különböző hatást eredményező SA koncentrációk által kiváltott biokémiai és fiziológiai változások idő függvényében történő összehasonlító vizsgálata az előkezelések, a „priming” alatt, ami lehetővé teszi azoknak a tényezőknek a kiemelését, amelyek jelenlétében és/vagy hiányában fokozódik a növények edzettsége, sikeres, „priming” típusú hatás alakul ki, illetve indukálódik a PCD.

Munkám során célom volt a széles koncentrációintervallumban alkalmazott SA előkezelések háttérben húzódó biokémiai faktorok vizsgálata a priming, illetve az azt követő sóstressz alatt, mely intervallum magába foglalja a rezisztenciát fokozó és esetlegesen a növények pusztulását előidéző SA koncentrációkat.

Kísérleteimhez *Solanum lycopersicum* Mill. L. cv. Rio Fuego paradicsom növényeket és az esetleges interakciók tisztázásához modellrendszerként a növények leveléből izolált mezofill protoplasztokat használtam.

Kutatási célok:

1. A széles koncentrációintervallumban alkalmazott SA előkezelések hatásának vizsgálata az előkezelések alatt:

- Változik-e a hosszútávú előkezelés során az SA vízháztartásra gyakorolt hatásának alapját képező sztómakonduktancia?
- Változik-e a sztómalimitáció által is kontrollált fotoszintetikus aktivitás, a CO₂ asszimilációs ráta, a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paraméterek és a különböző fotoszintetikus pigmentek mennyisége, valamint az ozmotikus adaptáció kialakításában fontos szénhidrátok akkumulációja az SA előkezelések hatására?
- Mi a szerepe a fotoszintetikus aktivitás esetleges változásának a „priming” folyamatában?
- Van-e változás már az előkezelések során a sóstressz akklimatizációban is fontos szerepet betöltő poliaminok koncentrációjában, és hogyan kapcsolódik ez a poliaminok által is szabályozott etilénprodukciónak? Része lehet-e ez a „priming”-nak?
- Hogyan befolyásolja a SA előkezelés a reaktív oxigénformák mennyiségét és a NO tartalmat paradicsom növények gyökerében az idő függvényében? A ROS, vagy az NO játszik fontosabb szerepet az SA indukált edzettségi állapot kialakulásában?

Szükség van-e a ROS és/vagy az NO tartósan megemelkedett szintjére az előkezelés alatt a sóstressz akklimatizáció sikerességéhez?

- Hogyan hat a rövid, illetve a hosszú távú SA előkezelés a detoxifikációban szerepet játszó és a szövetek H_2O_2 tartalmát döntően meghatározó SOD és KAT enzimek aktivitására az idő függvényében?
- Hogyan változik a lipidperoxidáció mértéke az SA előkezelések hatására rövid, illetve hosszú távon?

2. A SA előkezelések akklimatizációt fokozó hatásának vizsgálata 100 mM-os NaCl által kiváltott sóstressz alatt:

- Van-e különbség a fényintenzitás és az intercelluláris CO_2 koncentráció függvényében felvett fotoszintetikus aktivitásban a kontroll és az SA-val előkezelt növények között?
- Miképpen befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a stresszrezisztencia markereket, a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paramétereket, a különböző fotoszintetikus pigmentek mennyiségét, a lipidperoxidáció mértékét, valamint az ozmotikus adaptáció kialakításában fontos szénhidrátok akkumulációját a sóstressznek kitett növényekben?
- Hogyan hat a hosszútávú SA előkezelés a stresszválaszban fontos szerepet játszó növekedésszabályozó anyagok közül az etilénprodukcióna sóstressz alatt? Mindez miképp járul hozzá a sóstresszel szembeni sikeres akklimatizációhoz?
- Hogyan befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a ROS és NO tartalmakat sóstressz alatt?
- Miképpen befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a detoxifikációban szerepet játszó SOD és KAT enzimek aktivitását sóstressz alatt?
- A teljes növény akklimatizációjában van-e szerepe annak, hogy a hajtásban és a gyökérben lejátszódó folyamatok különbözhetnek egymástól?

2. A reaktív oxigénformák és NO interakciójának vizsgálata mezofill protoplasztok, mint modellrendszer segítségével:

- A továbbiakban az SA hatását egy sejtszintű modellrendszeren, levél mezofillum sejtekből készült protoplasztokon vizsgáltam. Ezzel kiküszöböltem a sejtfal hatását, és könnyen detektálhatóvá váltak az egyes sejtekben lejátszódó intracelluláris változások. Ezen modellrendszer segítségével vizsgáltam, hogy a különböző koncentrációjú SA kezelések hogyan hatnak az intracelluláris ROS és NO keletkezésére, illetve a protoplasztok életképességére normál körülmények, illetve sóstressz alatt. Miképpen befolyásolják az akklimatizáció kialakítása szempontjából fontos növekedésszabályozó anyagok, így a Put, Spd, Spm, az ABS valamint a PCD-ben szerepet játszó növekedésszabályozó anyagok közül az etilént generáló ACC a protoplasztok NO és ROS tartalmát? Milyen hatással vannak az említett növekedésszabályozó anyagok a protoplasztok életképességére? Mi a szerepe a NADPH oxidáznak az egyes kezelések hatására indukálódó ROS és NO produkcióban?
- A fentiek figyelembevételével jelen munka célja a hosszútávú szalicilsav előkezelés sóstresszel szembeni akklimatizációt fokozó hatását előidéző folyamatok megismerése.

4. Anyagok, módszerek és a kísérletek kivitelezése

4.1. Intakt növényen végzett kísérletek

4.1.1 Növénynevelés, alkalmazott kezelések

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* L. cvar Rio Fuego paradicsom növényeket vizsgáltunk. A csíráztatás 3 napon keresztül sötétben, 26 °C- on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben majd vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek. A tápoldat összetétele a következő volt: 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM KCl és a mikroelemek (10^{-6} M MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-7}$ M ZnSO_4 , 10^{-7} M CuSO_4 , 10^{-7} M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10^{-5} M H_3BO_4), $2 \cdot 10^{-5}$ M Fe-EDTA, a tápoldat pH-ja 5,8 volt. A növényeket 12 órás nappali és 12 órás éjszakai periódus, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 55-60%-os relatív páratartalom mellett neveltük. A SA előkezelést a növények 3 hetes korától 7 hetes koráig végeztük 10^{-7} - 10^{-2} M-os koncentráció intervallumban. A sókezelés 6 hetes korban történt 100 mM-os NaCl alkalmazásával. A mintákat egyrészt az előkezelést követő 1 nap, 2 nap, 1 hét, 2 hét, 3 hét elteltével, másrészt a sókezelés megkezdése után 7 nappal vettük. A mérésekre használtuk a gyökereket és a csúcshoz legközelebb eső, de már kifejtett leveleket.

4.1.2 Fotoszintetikus paraméterek meghatározása

4.1.2.1 Sztómakonduktancia mérése

A sztómakonduktanciát a levelek adaxiális és abaxiális felszínének közepén steady-state porométerrel (PMR-2, PP Systems, UK) határoztuk meg.

4.1.2.2 A CO_2 asszimiláció meghatározása a belső CO_2 koncentráció függvényében

A CO_2 fixálás sebességének meghatározása hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln Nebraska-USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével történt. A mérőkamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk: 25°C, 65 ± 10 % nedvességtartalmú levegő, melynek áramlási sebessége $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. A mérésekhez a növények legfiatalabb, de már kifejtett csúcsi leveleit használtuk fel. A méréseket időfüggvényében (1., 2. nap, 1., 2., 3., és 4. hét) és az intercelluláris CO_2 koncentráció függvényében (50, 360, 400, 500, 700, 900, 1200, 1400, 1600 $\mu\text{mol/mol}$ (C_i)) végeztük. A CO_2 asszimiláció változását (A/C_i görbe) fényadaptált mintákon mértük. A külső

CO₂ koncentráció változása melletti CO₂ asszimiláció változás (A/C_i görbe) mérése során a mérést 360 μmol m⁻² s⁻¹ CO₂ koncentráción kezdtük, majd lépésenként lecsökkentettük 50 μmol m⁻² s⁻¹-ig, majd innen növeltük 1600 μmol m⁻² s⁻¹ CO₂ koncentrációig (Guóth és mtsai., 2009.). Az A/C_i görbe paramétereit exponenciális egyenlet ($y = Y_0 + a(1 - e^{-bx})$) segítségével határoztuk meg (Pfanzen és mtsai., 2007), ahol A_{max}= maximális asszimiláció (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) és CE= karboxilációs hatékonyság (mól CO₂ m⁻²s⁻¹) megfelel az A/C_i görbe kezdeti emelkedésének (von Caemmerer és Farquhar, 1981.).

4.1.2.3 Fluoreszcencia indukció és CO₂ asszimiláció meghatározása a fényintenzitás függvényében

A fluoreszcencia indukció kinetikai paramétereit és a CO₂ asszimiláció fényválasz görbéit, hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln Nebraska-USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével mértük. A mérőkamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk: 25°C, 65±10 % nedvességtartalmú 360 μmol/mól CO₂ tartalmú levegő, melynek áramlási sebessége 500 μmol m⁻² s⁻¹ volt. A mérésekhez a növények legfiatalabb, de már kifejlett csúcsi leveleit használtuk fel. A méréseket időfüggvényében (1. nap, 1., 2., 3., és 4. hét) és a fényintenzitás függvényében (50, 150, 300, 400, 500, 700, 1200, 1500 μmol m⁻² s⁻¹ (PAR) végeztük, miután a leveleket 10 percig sötétadaptáltuk. 8 perc megvilágítás minden fényintenzitáson elegendő volt a CO₂ asszimiláció egyensúlyi értékeinek eléréséhez. A 8 perces intervallumok végén a telítési fényimpulzusokkal történt a kioltási paraméterek meghatározása (Guóth és mtsai., 2009.). A fénygörbe paramétereit az $A = A_{\max} (1 - e^{-A_q(\text{PPFD} - L_{cp})})$ egyenlet segítségével határoztuk meg, ahol A_{max}= maximális asszimiláció, A_q= fotoszintetikus kvantumhasznosítás és L_{cp}= fénykompenzációs pont (PPFD A=0-nál) (Peek és mtsai., 2002; Brodersen és mtsai., 2008.). A mért klorofill fluoreszcencia értékekből (F_m, F_o, F_v, F_s, F_m', F_o') a következő, gyakran használt paramétereket határoztuk meg:

1. F_v/F_m (F_m - F_o/F_m), ami megadja a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítását, azaz a reakciócentrumok által begyűjtött összes energia fotokémiai munkára fordítható részét (Bilger és Schreiber, 1986.).
2. A második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítását (Φ_{PSII}), (Yield), ami a teljes energia az éppen nyitott reakciócentrumokban, fotokémiai munkavégzésre felhasznált része, azaz Φ_{PSII}= (F_m'-F_s)/(F_m') (Genty és mtsai., 1989.).
3. A fotokémiai kioltást (q_p), azaz q_p=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_o') (Bilger és Schreiber, 1986.).

4. A nem fotokémiai kioltási paramétereket (NPQ), azaz $NPQ = (F_m - F_m') / F_m$ (Bilger és Björkman, 1990.).

4.1.2.4 A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása

A klorofill és a karotinoid pigmenttartalmak meghatározásánál Sims és mtsai. (2002.) által kidolgozott módszert használtuk fel. A klorofilok kivonása két fázisban történt. 25 mg tömegű levélszövethez 1,5 ml 100%-os acetont adtunk hozzá, és 24 órán keresztül állni hagytuk. Ezután lecentrifugáltuk (15000 rpm, 15 perc, +4°C), majd a felülúszót félretéve, 1,5 ml 80%-os acetonnal ismét 24 órás extrakciónak vetettük alá a mintát. Az abszorpcióméréseket KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével végeztük. Az extraktumok pigmenttartalmait 470, 534, 643 és 661 nm-en mért abszorpciók alapján számítottuk ki a következő képletek alapján:

$$Kl\ a = 0.01261 * A_{661} - 0.001023 * A_{534} - 0.00022 * A_{643}$$

$$Kl\ b = 0.02255 * A_{643} - 0.00439 * A_{534} - 0.004488 * A_{661}$$

$$Kl\ a+b = Kl\ a + Kl\ b$$

$$\text{Karotinoidok} = (A_{470} - 17.1 * (Kl\ a + Kl\ b) - 9.479 * \text{antocianin}) / 119.26$$

$$\text{Antocianinok} = 0.0821 * A_{534} - 0.00687 * A_{643} - 0.002423 * A_{661}$$

A pigmentek mennyiségét mg g^{-1} friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.1.2.5 Az összcukortartalom meghatározása

Az összcukor mennyiségének meghatározására a Dubois-féle (1956.) fenol-kénsavas módszert használtuk. 1 g növényi mintát 10 ml desztillált vízben homogenizáltunk, majd 90 °C-on, 45 percig forraltuk. Hűtés után a mintákat centrifugáltuk, majd a méréshez a felülúszót használtuk. A méréshez 40 μl extraktumot, 360 μl desztillált vizet, 400 μl 1.8 %-os fenol oldatot és 2 ml kénsavat (100 %) mértünk össze. A mérőelegyet összerázva, 15 perc állás után 490 nm-en fotometráltuk (KONTRON Double-Beam spektrofotométer). Az összcukor mennyiséget szacharózzal készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg 20-250 $\mu\text{l/ml}$ koncentrációintervallumban. Az összcukor mennyiségeket g/g friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.1.3 Hormonális állapot meghatározása

4.1.3.1 Etilénprodukción meghatározása gázkromatográffal

A paradicsom növények etilénprodukciónját az idő függvényében mértük. Minden mintavétel alkalmával a növények gyökeréből és leveléből is 1 g mintákat vettünk (ügyelve arra, hogy ne sértsük meg közben az egyes leveleket), majd ezeket etilényűjtő csövekbe helyeztük, melyeket szilikon gumival ellátott kupakkal zártunk le légmentesen. A mérés megkezdése előtt a mintáinkat 1 órán át sötétben inkubáltuk. Az etiléntermelést Hewlett Packard 5890 Series II. típusú gázkromatográf segítségével, lángionizációs detektorral, alumínium-oxiddal töltött oszlopon határoztuk meg. A hélium vivőgáz áramlási sebességét $35 \text{ cm}^3 \text{ perc}^{-1}$, a hidrogénét $30 \text{ cm}^3 \text{ perc}^{-1}$, a levegőét $30 \text{ cm}^3 \text{ perc}^{-1}$ értékre állítottuk be. Az injektor 120°C , a kolonna 100°C , a lángionizációs detektor 160°C hőmérsékletű volt. A termelt etilén mennyiségét standard állapotú, ismert koncentrációjú etilénből készített kalibrációval történő összehasonlítás nmol g^{-1} friss tömeg h^{-1} értékben adtuk meg.

4.1.3.2 Poliaminok analízise HPLC-vel

A poliaminokat Flores és Galston (1982.) módszerével a Tari és Csiszár (2003.) által leírt protokoll szerint határoztuk meg. 1 g növényi szövetet folyékony N_2 -ben fagyasztottuk, és 10 ml 5%-os perklórsavban homogenizáltuk 0°C -on. Belső standardként $1 \mu\text{M}$ -os diaminohexánt adtunk a mintákhoz. Centrifugálás után (4°C , 20 perc, 15000 g), a felülúszót 2 ml 2 M NaOH-dal közömbösítettük, majd a poliaminokat 10 μl benzoil-kloriddal származékká alakítottuk. 30 perces inkubáció után a mintákhoz 1 ml telített NaCl-ot adtunk, majd a benzoil-poliaminokat 2×3 ml dietiléterrel extraháltuk. A szerves fázist szárazra pároltuk. A poliaminokat HPLC-n (JASCO HPLC system, Japán), reverz fázisú kolonnán (Apex octadecyl 5μ , $250 \times 4,6 \text{ mm}$), acetonitril:víz 45:55 (v:v) elegyével választottuk el, és UV detektor segítségével 254 nm-en azonosítottuk.

4.1.4 Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása

4.1.4.1 Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1) aktivitás mérése

A növényi szövetet (1g) folyékony N₂-ben fagyasztottuk, és jégen 4 ml extrakciós pufferben homogenizáltuk (1mM EDTA-t, 1 mM PMSF-et, 13 mM metionint és 1% PVPP-t tartalmazó 50 mM-os foszfát puffer, pH 7,0), majd 20 percen keresztül 12000 g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. A 3 ml-nyi reakcióelegy 50 µl enzimkivonatot, 50 mM-os tetrazólium-kéket (NBT) és 0,2 mM-os riboflavint tartalmazott. A 15 perc után keletkezett formazán extinkcióját 560 nm-en mértük. A SOD aktivitást az NBT riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukciójának gátlása alapján határoztuk meg (Dhindsa és mtsai., 1981.). Egy enzimegység azt az enzimmennyiséget jelenti, amely az NBT redukciójának 50%-os gátlását okozza fény jelenlétében. Az enzimaktivitást U g⁻¹ egységben adtuk meg.

4.1.4.2 Kataláz (KAT) (EC 1.11.1.6) aktivitás meghatározása

A növényi szöveteket 4 ml extraháló pufferrel (50 mM-os foszfát puffer, pH 7,0) jégen hűtött dörzsmozsárban eldörzsöltük. A tisztítási lépéseket 0-4°C-on végeztük. Centrifugálás után (10000 g, 30 perc, 4°C, Sorvall RC5B Plus típusú centrifuga) a felülúszóból dolgoztunk tovább. A növényi kivonat 100 µl-ét, 50 mM-os, 7,0-es pH-jú foszfát puffert, illetve 1%-os H₂O₂-ot tartalmazó, 3 ml térfogatú reakcióelegyben mértük. A H₂O₂ bomlását 240 nm-en, az 1. és a 2. perc között mért extinkcióváltozásból határoztuk meg. Egy enzimegység (U) az az enzimmennyiség, mely 1 µmól H₂O₂ elbontását katalizálja 1 perc alatt (Upadhaya és mtsai., 1985.). Az enzimaktivitást U g⁻¹ egységben adtuk meg.

4.1.5 A malondialdehid (MDA) tartalom meghatározása

A lipidperoxidáció bomlástermékeinek mérését, ami elsősorban a malondialdehid, tiobarbitursavas módszerrel végeztük. A 0,3 g friss levélszövetet 5 ml 0,1%-os triklórecetsavban (TCA) homogenizáltuk, és 12000 g-n, 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. Centrifugálás után 1 ml felülúszóhoz 4 ml 20%-os TCA-ban oldott 0,5%-os tiobarbitursavat adtunk, majd az elegyet 90 °C-on 30 percig inkubáltuk. A reakciótermék mérését 532 nm-en végeztük. A malondialdehid tartalmakat 155 mM⁻¹cm⁻¹ millimoláris extinkciós koefficiens felhasználásával számítottuk (Heath és Parker, 1968.).

4.1.6 ROS és NO, valamint az életképesség meghatározása

4.1.6.1 A $O_2^{\cdot-}$ felszabadulás detektálása

A SA kezelés, illetve sókezelés hatására megvalósuló $O_2^{\cdot-}$ felszabadulását paradicsom növények levelében és gyökerében vizsgáltuk. A $O_2^{\cdot-}$ detektálására egy erre alkalmas festéket, NBT-t használtunk. A leveleket és a gyökereket 3 mg/ml koncentrációjú NBT oldatban áztattuk 1 órán keresztül, fényen. Ezután eltávolítottuk az NBT oldatot, majd a mintákra 96%-os etanolt pipettáztunk, és főztük 15 percen keresztül, 90 °C-on. Az etanol eltávolítása után friss 96%-os etanolt pipettáztunk a mintákra. Az így előkészített mintákat ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk fénymikroszkóp üzemmódban. A felvételek készítésénél 5-szörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A $O_2^{\cdot-}$ kioltását a negatív kontroll készítésekor 1mM aszkorbáttal végeztük.

4.1.6.2 A H_2O_2 tartalom kvantitatív meghatározása

A SA, illetve a sókezelés hatására felszabaduló H_2O_2 tartalmakat Velikova (2000.) módszere alapján határoztuk meg. A friss növényi anyagot (200 mg) 700 µl 0,1%-os TCA-ban homogenizáltuk, majd centrifugálás után 0,5 ml felülúszóhoz hozzáadtunk 0,5 ml K-foszfátpuffert (10 mM, pH=7,0) és 1 ml kálum-jodid (KJ) (1M) oldatot. A reakciótermék mérését 390 nm-en végeztük 10 mM-os K-foszfátpufferrel szemben. A H_2O_2 tartalmakat kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg.

4.1.6.3. A H_2O_2 és ROS *in situ* detektálása

A H_2O_2 *in situ* detektálására egy erre alkalmas festéket, diamino-benzidint (DAB), a ROS *in situ* meghatározására pedig egy arra alkalmas fluoreszcens festéket, 2,7-diklorodihidrofluoreszcein-diacetátot (H_2DC -FDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használtunk. A leveleket és a gyökereket 2 mg/ml koncentrációjú DAB oldatban áztattuk 2 órán keresztül, miközben a mintákat folyamatosan rázattuk. Ezután leszívtuk a DAB oldatot, majd a mintákra 96%-os etanolt pipettáztunk, és főztük 15 percen keresztül, 90 °C-on. Majd friss, 96%-os etanolt pipettáztunk a mintákra a régi etanol eltávolítása után. A H_2DC -FDA festés alkalmazása során a gyökereket 15 percen keresztül festettük 37 °C-on 10 µM-os H_2DC -FDA alkalmazásával. Korábban kimutatták, hogy ez a festék alkalmas a H_2O_2

kimutatására, de inszenzitív nitrogén monoxidra (Myhre és mtsai., 2003.; Bi és mtsai., 2009.). A festés után 20 percen belül négyszer mostuk a gyökércsúcsokat 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav (MES, Reanal, Budapest, Magyarország) pufferrel (10^{-3} M, pH 6,15), majd mikroszkópos tárgylemezre helyeztük őket.

Az így előkészített mintákat ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A felvételek készítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A H_2DC -FDA-val festett minták esetében a ROS zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a pixel intenzitást 3 ponton: 0,5, 1.0 és 1.5 mm-es zónáknál, ami a ROS tartalommal arányos. A H_2O_2 kioltását a negatív kontroll készítésekor katalázzal (100 U), illetve aszkorbáttal (1 mM) végeztük. A detektált fluoreszcencia intenzitást az AxioVision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg.

4.1.6.4 A NO fluoreszcens mikroszkópos detektálása

A SA, illetve a sókezelés hatására történő NO felszabadulást paradicsom gyökércsúcsokban mértük. A gyökércsúcsokat NO-szenzitív fluoreszcens festékkel, a 4,5-diaminofluoreszcein-diacetáttal (DAF-2DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ($10\ \mu M$) festettük meg. A festés 20 percen keresztül $25 \pm 2\ ^\circ C$ -on, sötétben történt. A festés után 20 percen belül négyszer mostuk a gyökércsúcsokat 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav (MES, Reanal, Budapest, Magyarország) pufferrel (10^{-3} M, pH 6,15), majd mikroszkópos tárgylemezre helyeztük őket (Kolbert és mtsai., 2008.). Az így előkészített mintákat ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495\ nm$, a fluoreszcencia mérése $515\ nm$ -nél történt (Räthel és mtsai., 2003.). Az expozíciós idő mindig azonos volt, 1,21 s. A felvételek készítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A NO zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a pixel intenzitást 3 ponton: 0,5, 1.0 és 1.5 mm-es zónáknál, ami a NO tartalommal arányos. Ezzel a módszerrel a kimutatási határ $5\ nM$ DAF-2DA (Kojima és mtsai., 1998.). A detektált fluoreszcencia intenzitást az AxioVision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg. A festék alkalmazhatóságának igazolása céljából annak negatív kontrollját, 4-aminofluoreszcein-diacetátot (4AF-DA) (Calbiochem, San Diego, CA) használtuk $10\ \mu M$ koncentrációban. NO donorként $1\ mM$ S-nitrozo-N-acetilpenicilamin

(SNAP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kezelést alkalmaztunk. A NO kioltására negatív kontrollként 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxid-3-oxid (c-PTIO) vegyületet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmaztunk 1 mM koncentrációban.

4.1.6.5 Az életképesség meghatározása

Az élő és nem élő sejtek elkülönítésére 10 μ M fluoreszcein-diacetát (FDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) festéket alkalmaztunk. Az eljárás azon alapszik, hogy a fluoreszcein-diacetát apoláros molekula, amely könnyen áthatol a membránok lipidfázisán. Ezt a festéket az élő sejtek felveszik, majd az intracelluláris térben levő aspecifikus észterázok elhidrolizálják. Ezáltal a nem fluoreszcens FDA-ból fluoreszcens szabad fluoreszcein keletkezik, ami hidrófil karaktere miatt nem tud kiáramlani az ép sejtmembránnal rendelkező sejtéből. Ezzel szemben az elpusztult sejtek vagy nem hidrolizálják az FDA-t, mert enzimeik inaktiválódtak, vagy ha hidrolizálják is, abban az esetben a szabad fluoreszcein áramlik ki a sejtéből. Tehát ennek a festési eljárásnak az alkalmazásakor az élő sejtek mutatnak fluoreszcenciát, az elpusztult sejtek pedig nem. A gyökerek festése 5 percen keresztül, sötétben történt, majd 5 perces mosást alkalmaztunk a felesleges festék eltávolítása érdekében. A mikroszkópos megfigyelést ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük el. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, a fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai., 2003.). A felvételek készítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. Az expozíciós idő mindig azonos, 1.22 s volt. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A detektált fluoreszcencia intenzitást az AxioVision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg.

4.2 Mezofillum protoplasztokon, mint modellrendszeren végzett kísérletek

4.2.1 Protoplasztok izolálása paradicsom növények leveléből, majd a protoplasztok kezelése

Kontroll paradicsom növények csúcsához közeli, fiatal leveleit ollóval levágtuk. Szacharózos K3 oldatot (1. táblázat) tartalmazó Petri csészékbe 3-3 szép levelet gyűjtöttünk. A leveleket fonákkal felfelé helyeztük a Petri csészékbe, és éles szike segítségével 2-3 mm-es csíkokra vágtuk, a főeret pedig kivágtuk. Az ily módon elkészített leveleket áttettük másik, szacharózos K3-t tartalmazó Petri csészékbe fonákkal lefelé, és kb.10 percig tartottuk benne. Ezután leszívtuk a K3-t Pasteur pipetta segítségével és kb.10-15 ml 2 %-os, celluláz R-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) és 0,5 %-os macerozim R-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sejtfalbontó enzimeket tartalmazó 0,4 M-os szacharózos K3 oldatot (pH=5,5) pipettáztunk a Petri csészékbe. Másnap reggel Pasteur pipettával óvatosan összekevertük az enzimes levélkivonatot, majd átpipettáztuk steril acélszűrőn kis Erlenmeyer lombikokba. A lombikok tartalmát átpipettáztuk Wassermann csövekbe úgy, hogy a tetejükről 2-3 ml hiányozzon. Ezután egy pipettányi W5 mosóoldatot (2. táblázat) rétegeztünk rá és kupakkal lezártuk. Kis fordulaton 5 percig centrifugáltuk, a protoplasztok a 2 réteg között, gyűrűben gyűltek össze. Ezután a protoplasztokat a felső réteggel átszívtuk újabb Wassermann csövekbe, és ismét feltöltöttük W5 mosóoldattal. Ezt követően ismét a lehető legkisebb fokozaton kb. 5 percig centrifugáltuk őket, aminek a hatására a protoplasztok végül leülepedtek a csövek aljára. Végül a W5 oldatot leszívtuk és a mintákat feltöltöttük a kívánt térfogatra a paradicsom protoplasztok tárolására alkalmas pufferrel (525,6 mM mannitol, 12,5 mM Na-acetát, 5 mM CaCl_2). Ezt követően kezeltük meg a protoplasztokat egyrészt 10^{-7} M- 10^{-3} M SA oldatokkal, 100 mM-os NaCl-vel, valamint különböző növekedésszabályozó anyagokkal, így 10^{-5} M ABS-val, 10^{-5} M ACC-vel, 2,5 mM Put-nel, 2,5 mM Spd-nel, valamint 2,5 mM Spm-mel és a protoplasztok életképességét vizsgáltuk 2,5 illetve 5 óra elteltével. Mértük az egyes kezelések hatására bekövetkező változásokat a ROS és NO tartalmakban. A kezelésekre használt anyagokat a protoplasztok fenntartására használt pufferben oldottuk fel. A sókezelés hatásának tanulmányozásakor 100 mM-os NaCl kezelést adtunk a már izolált protoplaszt kultúrához, amivel együtt azonos ozmotikus koncentrációval csökkentettük az inkubáló oldat mannitol tartalmát. Ezzel egyidőben alkalmaztuk a SA kezelést is, melyek közül az előkísérletek során a növényeknél már hatásosnak bizonyult 10^{-4} M-os és kevésbé hatásos 10^{-7} M -os koncentrációkat választottuk ki. A közvetetten H_2O_2 -ot generáló NADPH oxidáz enzimet 10 μM -os difenilén jodóniummal (DPI) gátoltuk.

K3	mg/l	Törzs 10× töménység mg/l, 100 ml/ l
NaH ₃ PO ₄ ·H ₂ O	150	1500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	900	9000
KNO ₃	2500	25000
NH ₄ NO ₃	250	2500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	1340
KJ	0,75	7,5
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	20
H ₃ BO ₃	3	30
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	2,5
Na ₂ EDTA	74,6	746
FeCl ₃ ·6H ₂ O	27	270
Xilóz	0,25	2,5
Inozit	100	1000
Piridoxin	1	10
Nikotinsav	1	10
Thiamin (B1)	10	100
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,25

1. táblázat: A K3 oldat összetétele. 25 mg CoCl₂·6H₂O-t és 25 mg CuSO₄·5H₂O-t 100 ml-ben kell feloldani, ebből 1 ml megy a törzsoldatba. A K3 oldatot lefagyasztva tároljuk. Használat előtt a K3-hoz hozzáadjuk a szacharózt (0,4 M) és beállítjuk a pH-t (5,5).

	1000 ml	500 ml	200 ml
NaCl	9 g	4,5 g	1,8 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18,4 g	9,2 g	3,68 g
KCl	0,8 g	0,4 g	0,16 g
Glükóz	1 g	0,5 g	0,2 g

2. táblázat: A W5 mosóoldat összetétele. A W5 mosóoldatot a K3 oldathoz hasonlóan szintén lefagyasztva tároljuk. Használat előtt a pH-t 5,8-ra állítjuk.

4.2.2 A ROS és a nitrogén monoxid, valamint a protoplasztok életképességének meghatározása

4.2.2.1 A ROS felszabadulás detektálása

Az egyes kezelések hatására bekövetkező ROS felszabadulást paradicsom protoplasztokban egy arra alkalmas fluoreszcens festékkel 10 μM 2,7-diklorofluoreszcein-diacetáttal (DC-FDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) Ishikawa és Wagatsuma (1998.) módszerének segítségével detektáltuk. A festék zöld fluoreszcenciát mutató formája a ROS jelenlétét jelzi a sejtben. A festés 15 percen keresztül sötétben történt, 37 °C-os hőmérsékleten. Ezután 10 percen belül kétszer mostuk a protoplasztokat W5 pufferrel (Räthel és mtsai., 2003.), majd a mintákat tárgylemezre helyeztük és vizsgáltuk a protoplasztok általi ROS produkciót Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, a fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai., 2003.). Az expozíciós idő mindig azonos volt, 553 ms. A felvételek készítésénél negyvenszeres objektívet alkalmaztunk. A protoplasztokról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (Axiocam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A ROS zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a pixel intenzitást, ami a ROS tartalommal arányos. A ROS kioltását a negatív kontroll készítésekor katalázzal (100 U), illetve aszkorbáttal (1mM) végeztük. A detektált fluoreszcencia intenzitást az Axiovision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg.

4.2.2.2 A NO felszabadulás meghatározása

Az egyes kezelések hatására a mezofill protoplasztokban felszabaduló NO-ot 10 μM diamino-fluoreszcein diacetáttal (DAF-2-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) detektáltuk. A festés 30 percen keresztül történt, szobahőmérsékleten, sötétben. Ezután egyszer mostuk a paradicsom protoplasztokat, az azok tárolására alkalmas pufferrel (525,6 mM mannitol, 12,5 mM Na-acetát, 5 mM CaCl_2) 5 percen keresztül, majd vizsgáltuk a protoplasztok NO produkcióját Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, a fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai., 2003.). Az expozíciós idő mindig azonos volt, 3,01 s. A felvételek készítésekor negyvenszeres nagyítású objektívet alkalmaztunk. A protoplasztokról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (Axiocam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A NO zöld fluoreszcenciája alapján megmértük a pixel intenzitást, ami a

NO tartalommal arányos. Az értékelés minden esetben az Axiovision 4.6 nevű program segítségével történt. NO donorként 200 μ M S-nitrozo-N-acetilpenicilamin (SNAP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kezelést alkalmaztunk. A NO kioltására negatív kontrollként 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxid-3-oxid (c-PTIO) vegyületet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmaztunk 10 μ M koncentrációban.

4.2.2.3 Az életképesség meghatározása

Az élő és nem élő sejtek elkülönítésére 10 μ M fluoreszcein-diacetát (FDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) festéket alkalmaztunk. A festéket az egyes kezelések alkalmazása után 2,5 illetve 5 órával adtuk a protoplaszt kultúrákhoz, majd az 5 perces inkubáció után a felesleges festék eltávolítása érdekében 5 perces mosást alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyelést ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük el. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495$ nm, a fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai., 2003.). A felvételek készítésénél húszszoros objektívet alkalmaztunk. Az expozíciós idő mindig azonos, 773 ms volt. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (Axiocam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). A protoplasztok életképességének elemzése nagy teljesítményű számítógép segítségével, az Axiovision 4.6 nevű programmal történt.

4.3 Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok minden esetben három független biológiai ismétlés átlag-és szórásértékei. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket a varianciaanalízist követően a Duncan-féle teszttel állapítottuk meg. Az azonos betűvel nem jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ szinten. Más esetben a szignifikáns különbségek meghatározására ugyanezen program segítségével a Student-féle t -tesztet használtuk $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken.

5. Kutatási eredmények

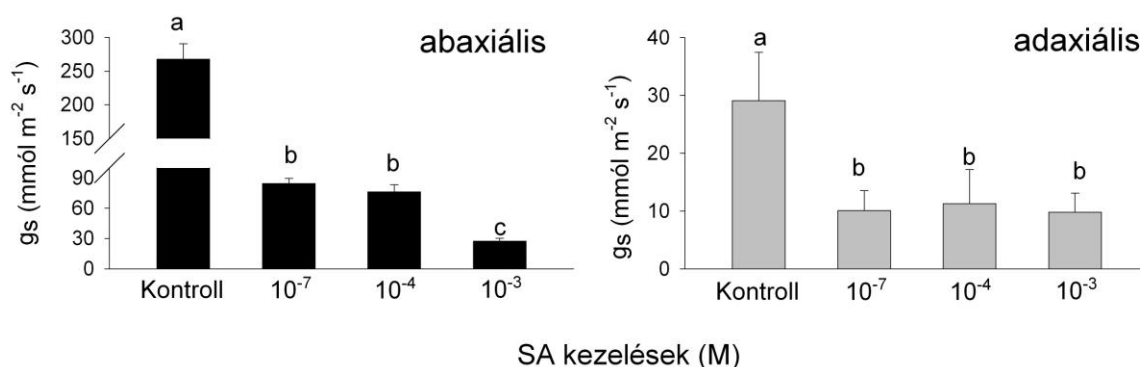
5.1 A szalicilsav előkezelés hatásai: priming

Jónéhány szerző az SA hatását 1-2 napos előkezelés mellett vizsgálja. Ezalatt még mérhető a letális koncentrációk hatása is. Ezért megnéztük, hogy mi a különbség az akklimatizációt, illetve PCD-t okozó koncentrációk között, illetve mi a jelentősége az előkezelés hosszának az SA abiotikus stressz akklimatizációt előidéző hatásában.

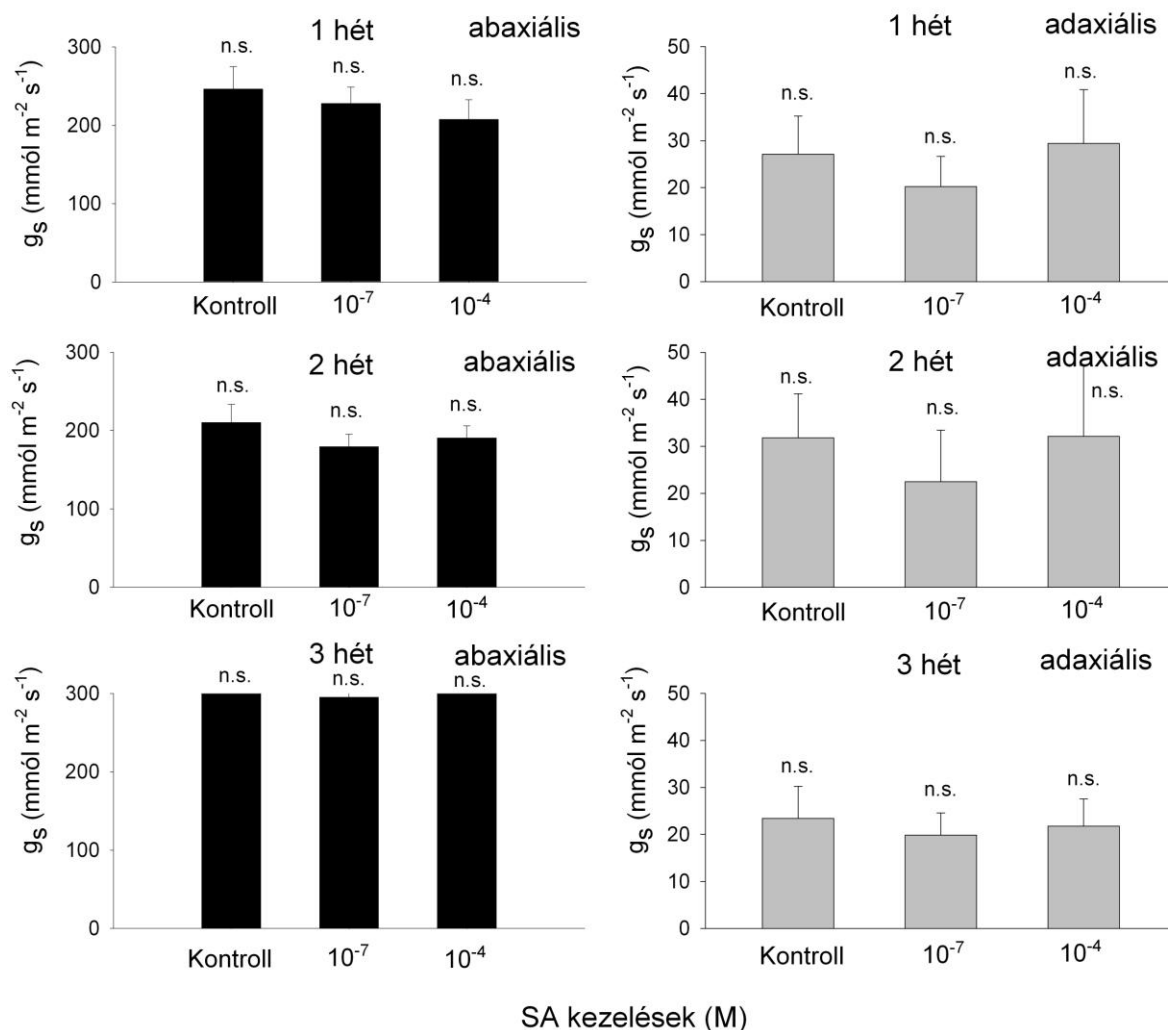
5.1.1 Stresszrezisztencia markerek változása

5.1.1.1 A sztómakonduktancia változása

A növényt érő stresszhatás tanulmányozásának egyik lehetséges útja a stresszrezisztencia markerek változásának nyomonkövetése. Stresszhatásra változik a sztómák nyitottsága, ami befolyásolja a CO₂ asszimilációt, azon keresztül pedig a fotoszintetikus folyamatok hatékonyságát. Az általunk alkalmazott valamennyi SA előkezelés szignifikánsan csökkentette a sztómakonduktanciát a levelek mindkét felszínén a kontrollhoz képest 1 napos kezelést követően, ami különösen megfigyelhető a 10⁻³ M SA esetében a levelek abaxiális felszínén (11. ábra). Az első hét végére a magasabb koncentrációban alkalmazott SA hatására (10⁻³ M SA) a növények elpusztultak, így sztómakonduktanciájuk mérhetetlenné vált. A SA alacsonyabb (10⁻⁴ M SA, 10⁻⁷ M SA) koncentrációi hosszú távon már nem okoztak szignifikáns változást a kontroll növények sztómakonduktanciájához képest sem a levelek abaxiális, sem pedig azok adaxiális oldalán (12. ábra).



11. ábra.: 1 napos SA kezelés hatása a sztómakonduktancia változására paradicsom növények leveleinek abaxiális és adaxiális felszínén. Kezelésként 15 ismétlés átlagát ábrázoltam (n=15). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



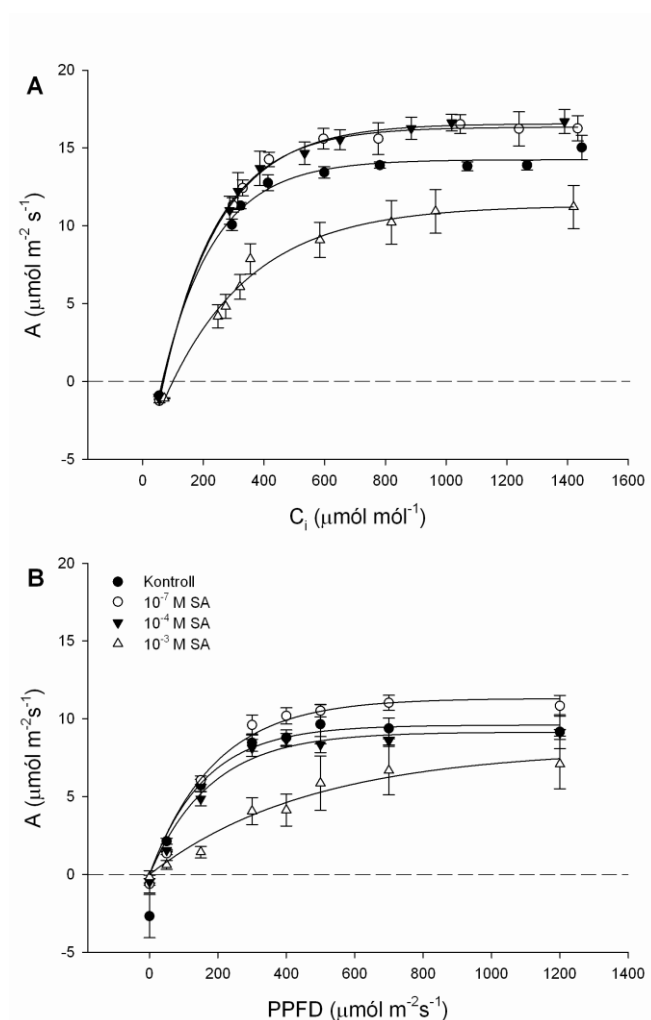
12. ábra.: Hosszútávú SA előkezelés hatása a sztómakonduktancia változására paradicsom növények leveleinek abaxiális és adaxiális felszínén. Kezelésenként 15 ismétlés átlagát ábrázoltam (n=15). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

5.1.1.2 A szalicilsav előkezelés hatása a CO₂ asszimilációs rátára az intercelluláris CO₂ koncentráció, valamint a fényintenzitás függvényében

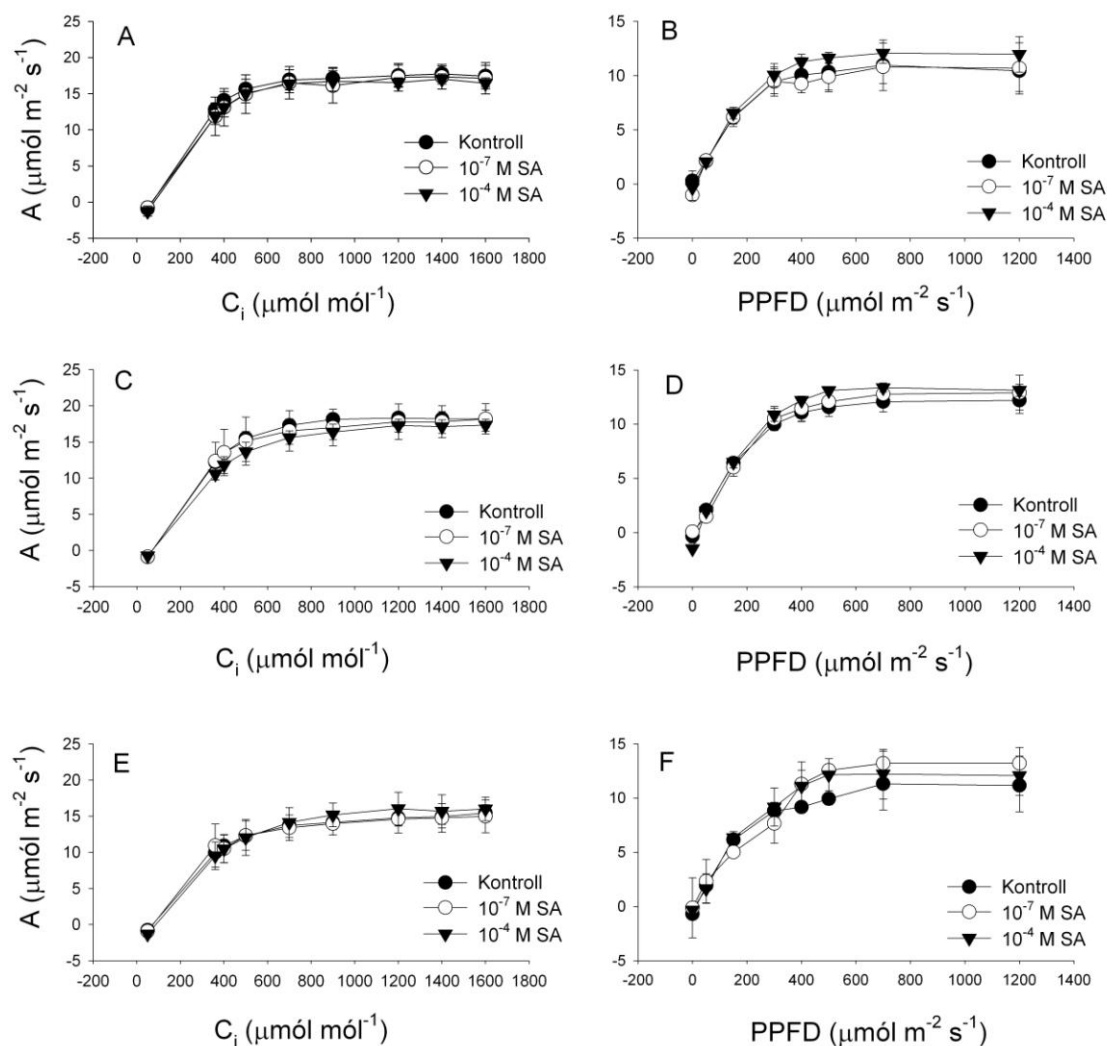
A 10⁻³ M SA előkezelés szignifikánsan csökkentette a CO₂ asszimilációs rátát mind az intercelluláris CO₂ koncentráció, mind pedig a fényintenzitás függvényében a kontroll növényekéhez képest, ami jó összhangban van ezen SA koncentráció sztómakonduktancia csökkentő hatásával (13. ábra A-B; 11. ábra).

Rövid távon (1. nap), magas fényintenzitáson a CO₂ asszimiláció hatékonyabbnak bizonyult a 10⁻⁷, illetve 10⁻⁴ M SA-val előkezelt növényeknél (13. ábra). Alacsony fényintenzitáson azonban sem rövid, sem hosszú távon nincs szignifikáns különbség a kontroll és a SA-val előkezelt növények között (13. és 14. ábra B.,D.,F.).

Az SA alacsonyabb koncentrációi (10⁻⁴ M és 10⁻⁷ M) hosszú távon nem gátolták a kontrollhoz képest a CO₂ asszimilációt a belső CO₂ koncentráció függvényében, amit jól tükröz, hogy sem a görbék meredeksége, sem a telítési értékek, sem pedig az X tengely metszéspontok vonatkozásában nincs szignifikáns különbség a kontroll és az előkezelt növények között (14. ábra A;C;E).



13. ábra.: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények CO₂ asszimilációjára az intercelluláris CO₂ koncentráció (A), illetve a fényintenzitás (B) függvényében (Átlag $\pm$ SE, n=4).



14. ábra.: 10^{-4} és 10^{-7} M SA előkezelés hatása paradicsom növények CO_2 asszimilációjára az intercelluláris CO_2 koncentráció (A; C; E), illetve a fényintenzitás (B; D; F) függvényében 1 (A; B), 2 (C; D), illetve 3 (E; F) hét előkezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=4).

5.1.1.3 A klorofill a fluoreszcencia indukciós paraméterekben bekövetkező változások

A különböző stresszorok hatását a fotoszintetikus apparátusra jól tükrözik a klorofill-a fluoreszcencia indukció mérésén alapuló módszerek. Az általunk használt SA koncentrációk egyike sem gátolta a fotoszintézis fényreakcióit sem rövid (3. táblázat), sem pedig hosszú távon (4. táblázat), amit jól tükröz a klorofill a fluoreszcencia indukciós paraméterek változatlansága. Az SA előkezelések egyike sem okozott szignifikáns különbséget a PS2 maximális (F_v/F_m), illetve effektív kvantumhasznosításában (Φ_{PS2}), a fotokémiai és a nem fotokémiai kioltás mértékében a kontroll növényekhez képest (3-4. táblázat).

3. táblázat: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek változására 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson.

Kezelések	F_v/F_m	q_p	Φ_{PS2}	NPQ
Kontroll	0.792±0.01 ^{ns}	0.493±0.04 ^{ns}	0.236±0.03 ^{ns}	1.445±0.12 ^{ns}
10 ⁻⁷ M SA	0.797±0.00 ^{ns}	0.518±0.03 ^{ns}	0.253±0.02 ^{ns}	1.459±0.03 ^{ns}
10 ⁻⁴ M SA	0.791±0.00 ^{ns}	0.449±0.01 ^{ns}	0.209±0.00 ^{ns}	1.502±0.04 ^{ns}
10 ⁻³ M SA	0.747±0.03 ^{ns}	0.490±0.06 ^{ns}	0.210±0.03 ^{ns}	1.325±0.20 ^{ns}

A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség. (Átlag±SE, n=4).

F_v/F_m : a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása

q_p : fotokémiai kioltás

Φ_{PS2} : a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása

NPQ: nem fotokémiai kioltás

4. táblázat: 3 hetes SA előkezelés hatása paradicsom növények klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek változására $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson.

Kezelések	F_v/F_m	q_p	Φ_{PS2}	NPQ
Kontroll	0.796±0.00 ^{ns}	0.481±0.09 ^{ns}	0.245±0.04 ^{ns}	1.225±0.03 ^{ns}
10 ⁻⁷ M SA	0.791±0.00 ^{ns}	0.530±0.08 ^{ns}	0.270±0.04 ^{ns}	1.301±0.03 ^{ns}
10 ⁻⁴ M SA	0.800±0.00 ^{ns}	0.523±0.05 ^{ns}	0.266±0.03 ^{ns}	1.296±0.07 ^{ns}

F_v/F_m : a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása

q_p : fotokémiai kioltás

Φ_{PS2} : a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása

NPQ: nem fotokémiai kioltás

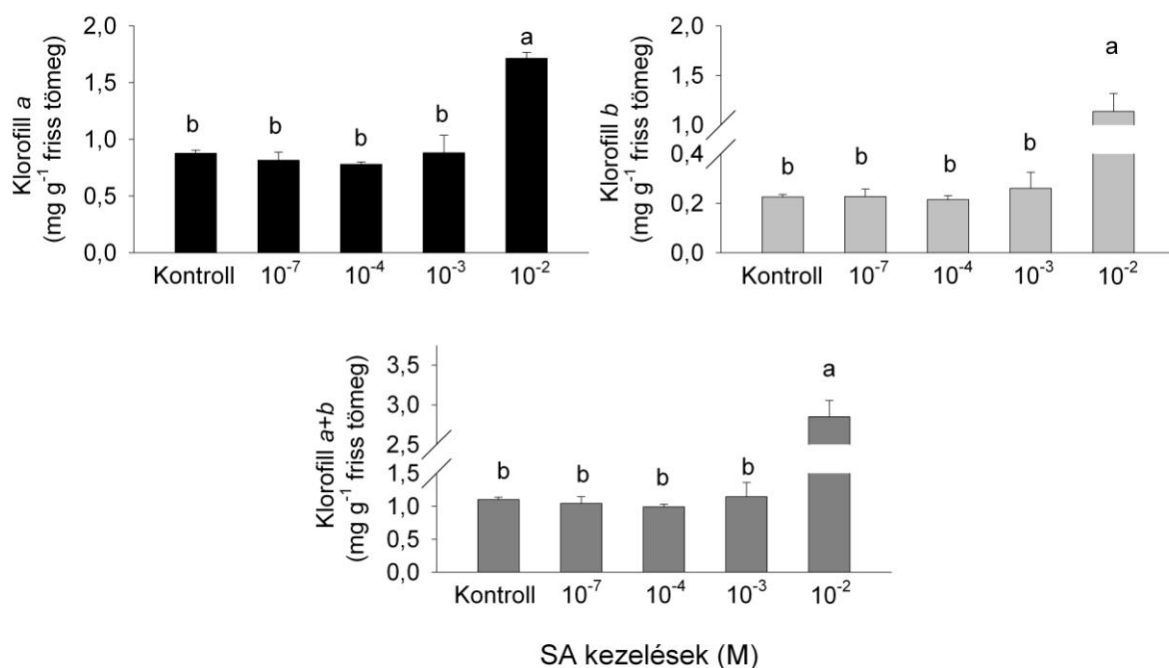
A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség. (Átlag $\pm$ SE, n=4).

5.1.1.4 A fotoszintetikus pigmentek mennyiségében bekövetkező változások

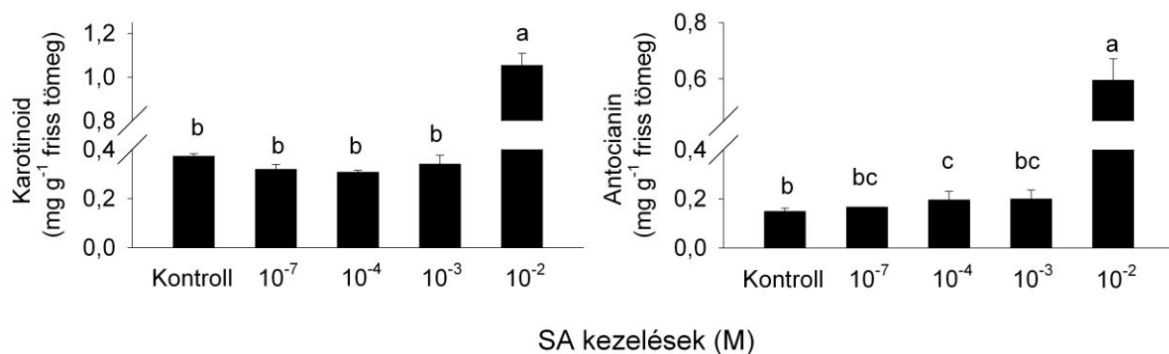
A fotoszintézis hatékonysága szorosan összekapcsolódik a fotoszintetikus apparátus struktúrájának és funkciójának az állapotával. 1 napos kezelést követően a 10^{-7} M, 10^{-4} M és 10^{-3} M SA-val előkezelt és a kontroll növények korofill *a*, illetve klorofill *b* tartalmukban nem különböztek egymástól. A 10^{-2} M SA előkezelés azonban szignifikánsan megnövelte mind a kl *a*, mind pedig a kl *b* tartalmat mind a kontroll, mind pedig az alacsonyabb koncentrációjú SA-val előkezelt növényekhez képest (15. a. ábra). Hosszú távon az SA alacsony koncentrációival előkezelt és a kontroll növények között nincs különbség a klorofill *a+b* tartalmat illetően (16. ábra).

A karotinoidok azon túl, hogy fénybegyűjtő járulékos pigmentek, az antioxidáns védekezési rendszer részét is képezik. Ha a karotinoidok mennyisége csökken, roncsolódnak a pigmentek és a növények fotoszintetikus működésében károsodás történik. Rövid távon az előkezelések közül a 10^{-2} M SA előkezelés szignifikánsan növelte a növények levelének karotinoid tartalmát (15.b. ábra). Az SA alacsonyabb koncentrációi azonban sem rövid, sem pedig hosszú távon nem okoztak szignifikáns változást a növények levelének karotinoid tartalmában a kontroll növényekhez képest (15.b.-16. ábra).

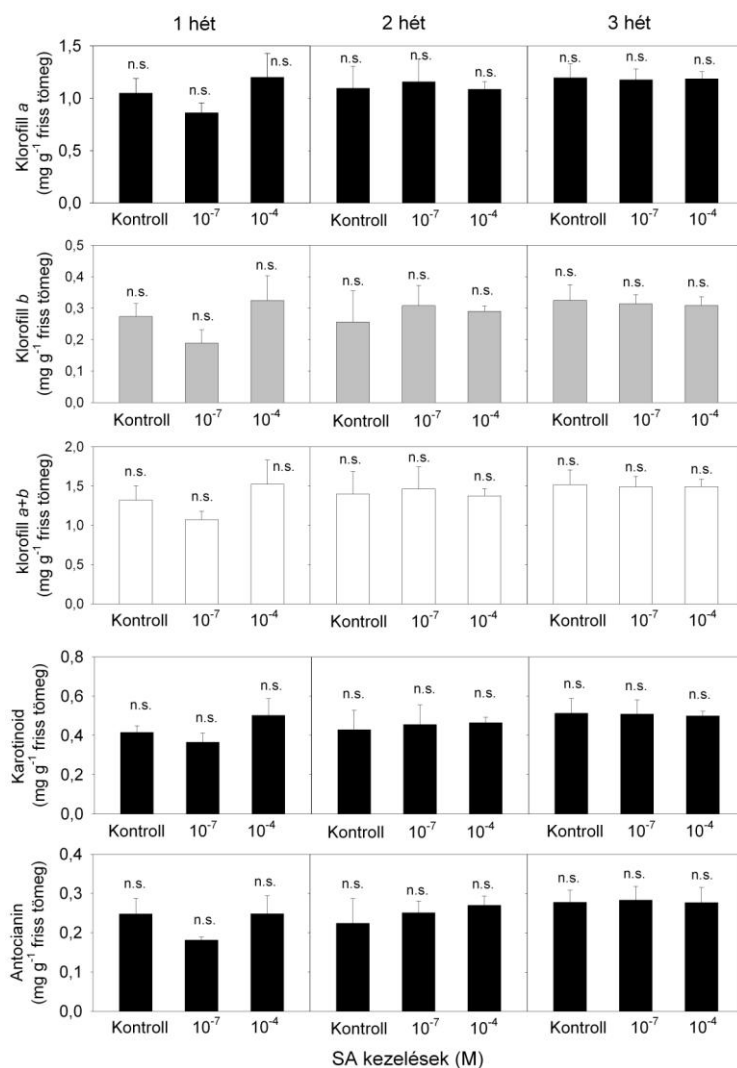
Az antocianinok, mint vízőldékony antioxidánsok szintén fontosak a növények védekezésében. Rövid távon a 10^{-2} M SA előkezelés szignifikánsan megemelte az antocianin tartalmat a növények levelében. A SA alacsonyabb koncentrációi közül a 10^{-4} M SA átmenetileg szintén növelte a növények levelének antocianin tartalmát a kontrollhoz képest, azonban hosszú távon már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és az előkezelt növények levelének antocianin tartalmában (15.b.-16. ábra).



15.a ábra.: 10⁻⁷ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ és 10⁻² M SA hatása a klorofill *a*, klorofill *b*, illetve klorofill *a+b* mennyiségének változására paradicsom növényben 1 napos kezelést követően (Átlag±SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



15. b ábra.: 10⁻⁷ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ és 10⁻² M SA kezelés hatása a karotinoid és az antocianin mennyiségének változására paradicsom növényben 1 napos kezelést követően (Átlag±SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

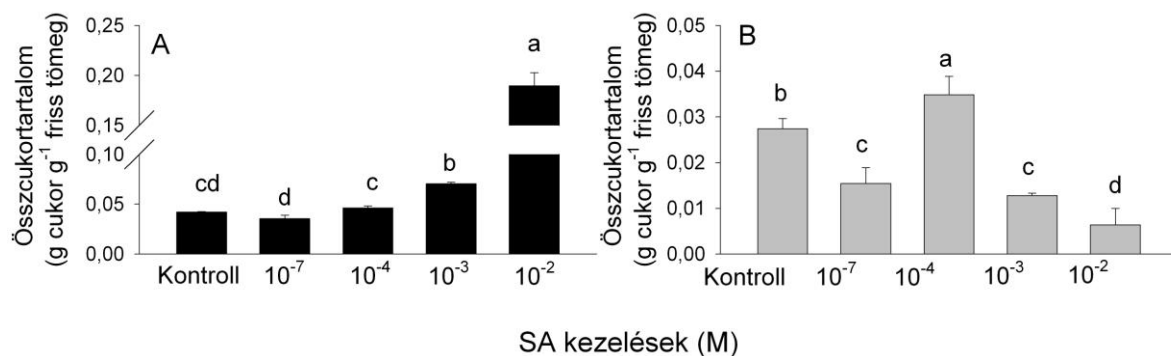


16. ábra.: Hosszútávú SA előkezelés hatása paradicsom növények klorofil-a, klorofil-b, klorofil a+b, karotinoid és antocianin tartalmára (Átlag $\pm$ SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

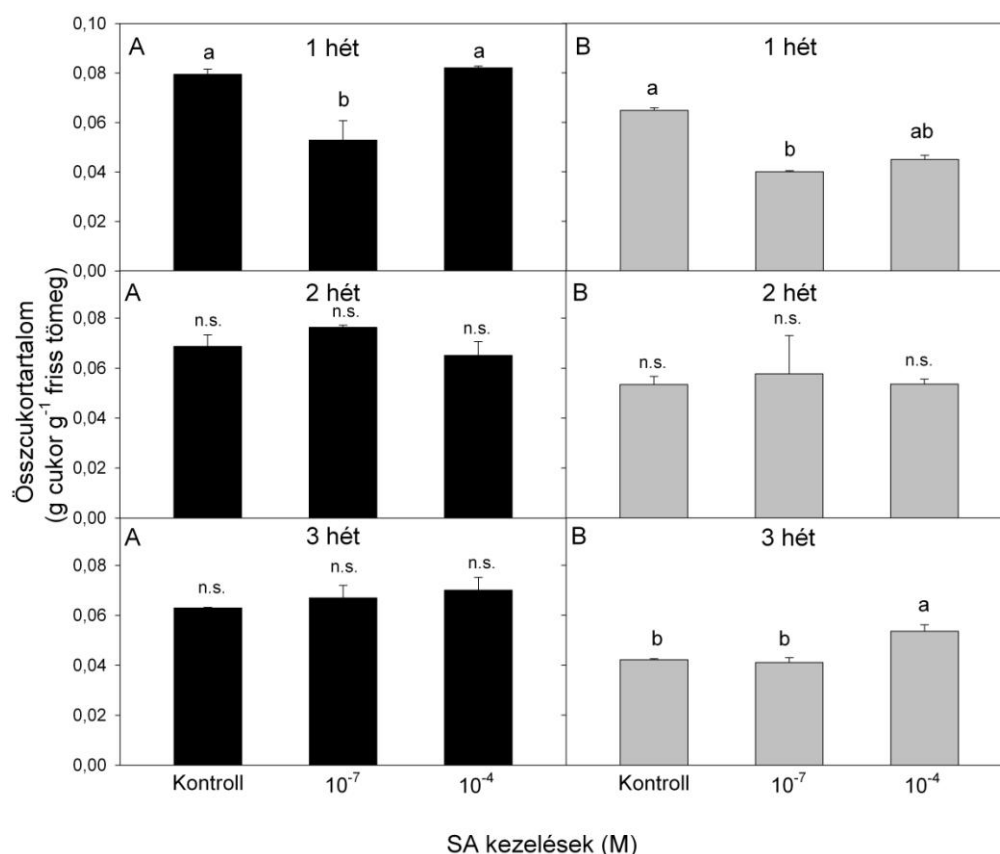
5.1.1.5 Az előkezelések hatása a szénhidrátok akkumulációjára

A cukrok, a fotoszintézis termékei, melyek mint kompatibilis ozmotikumok fontos szerepet játszanak a különböző stresszorokkal szembeni ozmotikus adaptáció kialakításában. Rövid távon a magasabb koncentrációban alkalmazott 10^{-2} M SA előkezelés gyökérben minimálisra csökkentette, míg levélben szignifikánsan, mintegy háromszorosára növelte az összecsukortartalmat a kontrollhoz képest. A 10^{-3} M és a 10^{-4} M SA előkezelés szintén megemelte, a 10^{-7} M SA pedig csökkentette az összecsukortartalmat a növények levelében, mely utóbbi koncentrációnál hosszabb távon növekedés serkentő hatású az SA. Gyökérben az

általunk alkalmazott előkezelések közül csak a 10^{-4} M SA előkezelés esetében tapasztaltunk növekedést, a többi koncentráció csökkentette a gyökerek összcukortartalmát (17. ábra). 1 hét előkezelést követően a SA mindkét alkalmazott koncentrációjában, főleg 10^{-7} M SA, csökkentette a gyökerek összcukortartalmát. A 3. hét végére a 10^{-7} M SA nem csökkentette, a 10^{-4} M SA előkezelés pedig növelte a növények gyökerének összcukortartalmát a kontrollhoz képest, mely utóbbinak az előkezelést követő sóstressz akklimatizációban különösen fontos jelentősége van (18. ábra).



17. ábra.: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) összcukortartalom változására (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



18. ábra.: Hosszútávú SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) összcukortartalom változására (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

5.1.2 Hormonális állapot változása a szalicilsavval előkezelt növényekben

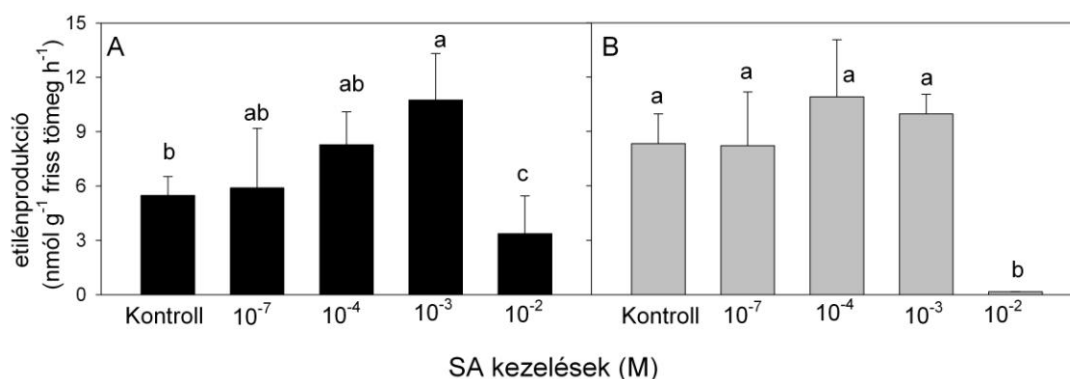
5.1.2.1 Az etilénprodukciónak változása

Az etilén, mint a legtöbb növekedésszabályozó anyag, koncentrációtól függően determinálhatja a növények állapotát: elősegítheti az akklimatizációs folyamatokat, vagy nagyobb koncentrációban részt vehet a PCD kialakításában.

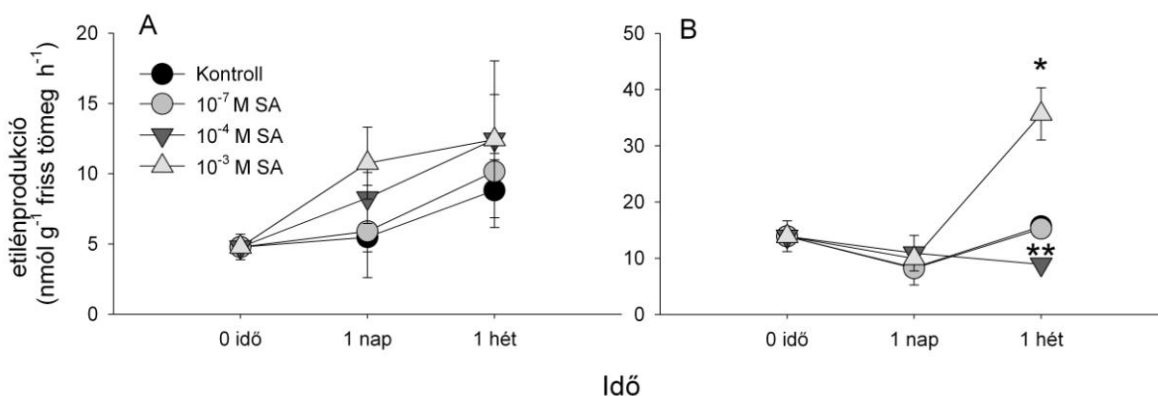
Rövid távon (1 nap kezelést követően) az általunk alkalmazott valamennyi SA kezelés, különösen a 10^{-3} M SA, fokozott etilénprodukción eredményezett paradicsom növények levelében. Ezzel szemben gyökérben egyik kezelés sem okozott szignifikáns változást a kontrollhoz képest. Kivételt képez ez alól a 10^{-2} M SA, amely szignifikánsan csökkentette az etilénszintézist mind a növények levelében, mind pedig azok gyökerében (19. ábra). 1 napos kezelést követően a 10^{-2} M SA-val előkezelt növények elpusztultak, etilénprodukción mérséklődött.

1 hét előkezelést követően a 10^{-3} M SA mintegy kétszeresére emelte a gyökerek etilénprodukciónak, mely időpontban ezek a növények el is pusztultak. A 10^{-7} M SA nem okozott szignifikáns változást az etilénprodukciónak, míg a 10^{-4} M SA szignifikánsan csökkentette azt a kontrollhoz képest a növények gyökerében (20. ábra).

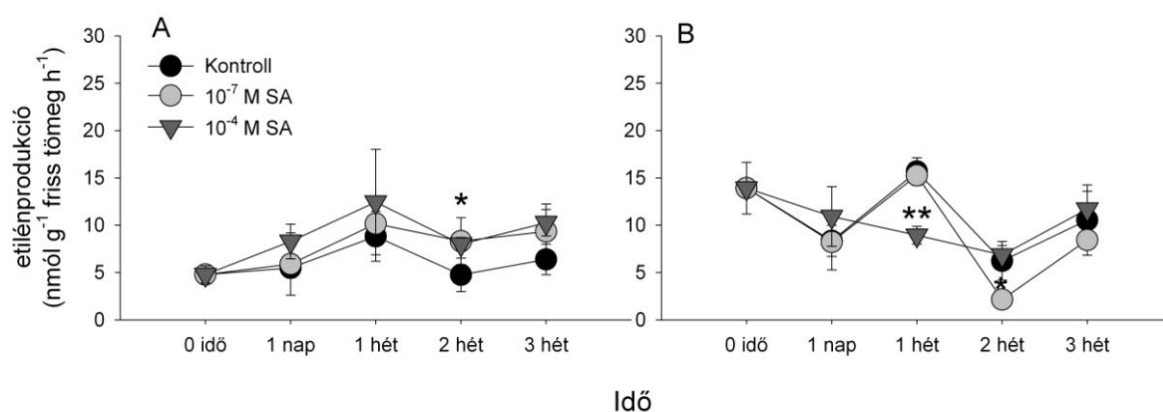
2 hét előkezelést követően, az előkezelések közül a 10^{-4} M SA átmenetileg növelte a növények levelének, a 10^{-7} M SA pedig átmenetileg csökkentette a növények gyökerének etilénprodukciónak, a 3. hét végére azonban az előkezelt és a kontroll növények etilénprodukciónak már nem különbözött egymástól (21. ábra).



19. ábra: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) etilénprodukciónak (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



20. ábra: Rövidtávú SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) etilénprodukciónak (Átlag±SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.



21. ábra: Hosszútávú SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) etilénprodukciónak (Átlag±SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.

5.1.2.2 A poliaminok koncentrációjában bekövetkező változások

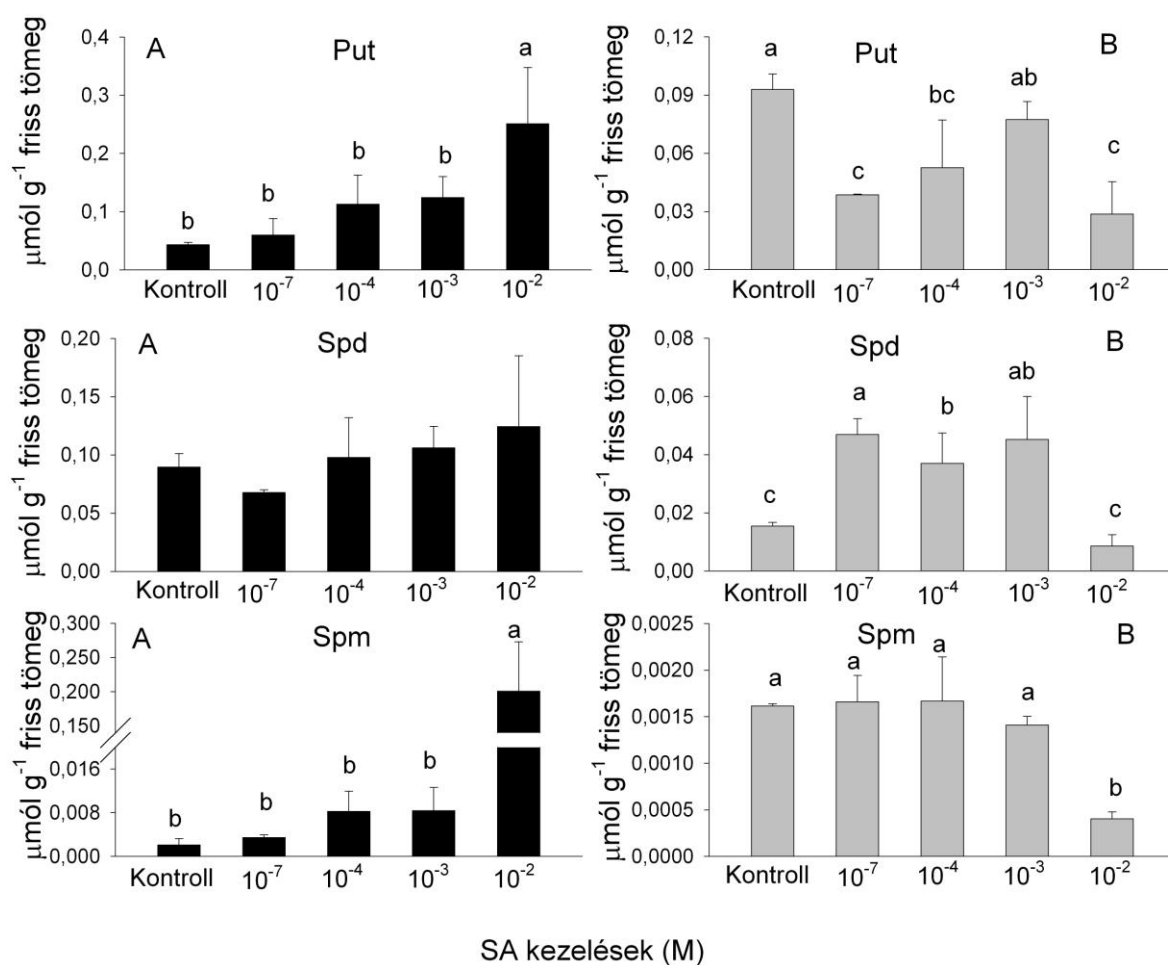
A stresszrezisztencia kialakítása szempontjából fontos az etilén mellett a poliaminok mennyiségének változása, hiszen megfelelő koncentrációban ezen növekedésszabályozó anyagok védő funkciót töltenek be a sejtekben azáltal, hogy mint polikationok anionos komponensekhez, úgy mint nukleinsavakhoz, fehérjékhez, foszfolipidekhez képesek kapcsolódni.

Mivel az etilén és a poliaminok bioszintézisében közös az, hogy prekursoruk, a SAM megegyezik, kíváncsiak voltunk arra, hogy az egyes SA előkezelések esetünkben miképpen módosítják, módosítják-e a poliamin tartalmakat rövid, illetve hosszú távon paradicsom növények levelében, illetve gyökerében.

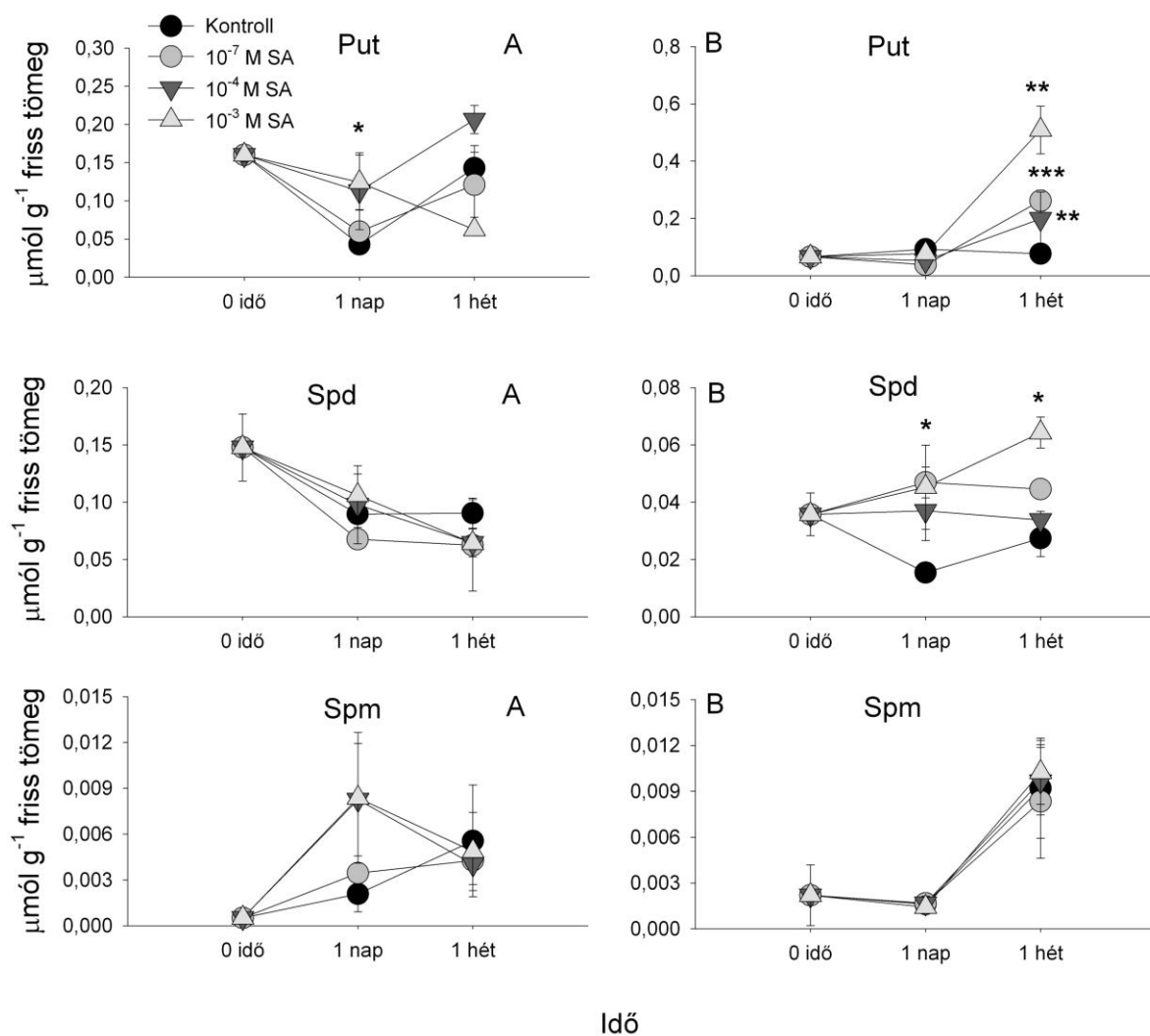
A poliamin tartalmak az etilénhez hasonlóan az előkezelés során is változtak az idő függvényében. 1 nap előkezelést követően a 10^{-2} M SA csökkentette az etilénprodukciónak a növények levelében (19. ábra.), azonban mintegy ötszörösére emelte a Put, illetve mintegy húszötszörösére a Spm koncentrációját (22. ábra). Az akklimatizáció kialakítása szempontjából fontos SA előkezelések (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) azonban rövid távon nem okoztak szignifikáns változást a növények levelének poliamin tartalmában a kontrollhoz képest (22. ábra). Gyökérben az SA előkezelések mindegyike átmenetileg csökkentette a Put szintet, ezzel szemben azonban növelte (10^{-7} M, 10^{-4} M és 10^{-3} M SA), illetve nem változtatta (10^{-2} M SA) a kontrollhoz képest a Spd koncentrációját (22. ábra).

1 hét előkezelést követően valamennyi SA koncentráció hatására fokozódott a növények gyökerének Put akkumulációja, mely különösen nagymértékű volt a 10^{-3} M SA előkezelés esetében, mely koncentráció esetén az etilénprodukciónban is extrém magas értékeket mértünk (20. és 23. ábra).

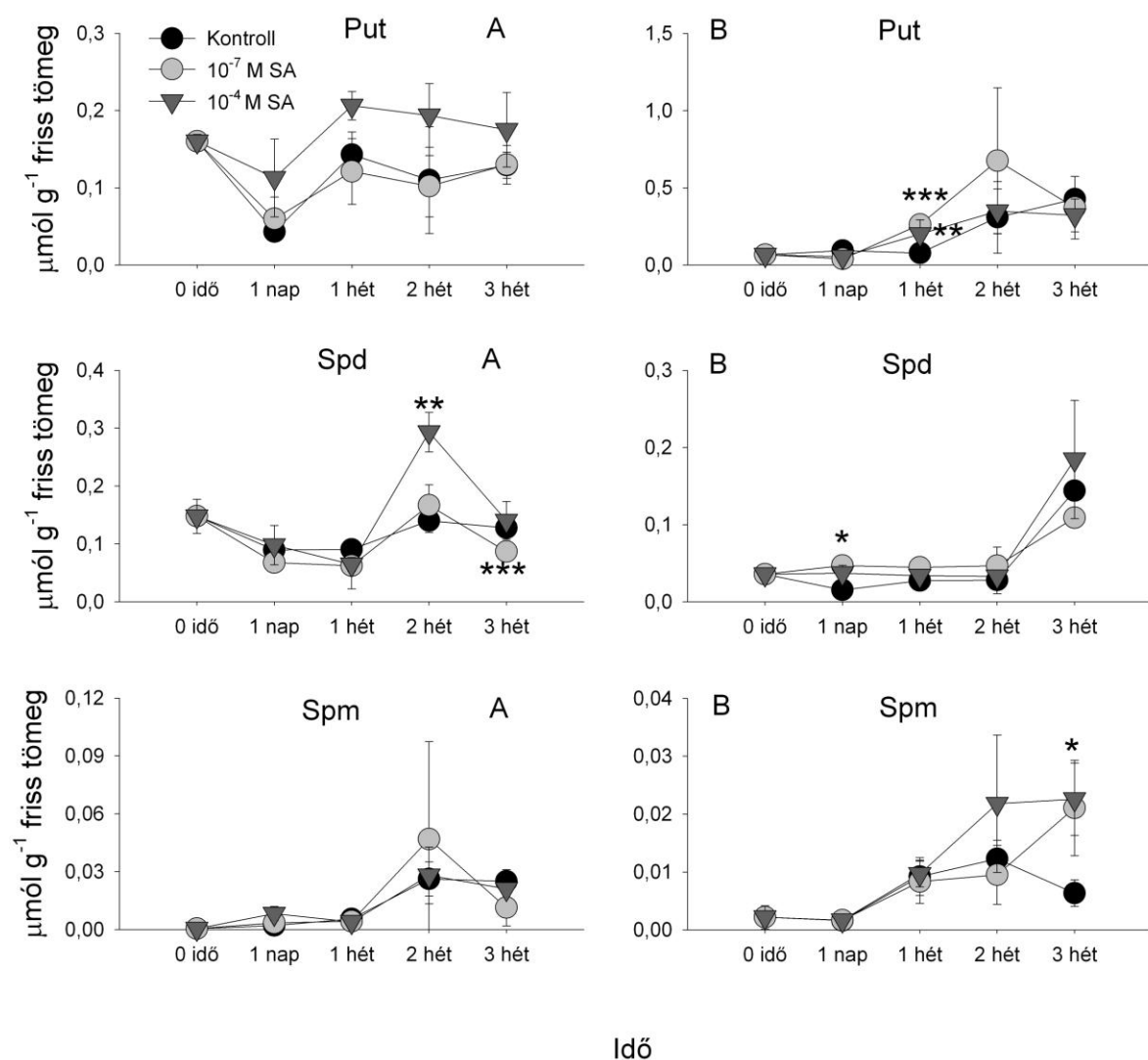
A 10^{-4} M SA előkezelés hatására a Put tartalom levélben végig magasabb volt, ami mellé ezen koncentráció esetében hozzájárult a Spd és a Spm mennyiségének növekedése is a növények gyökerében a 3 hetes előkezelés végére (24. ábra.).



22. ábra: 10^{-7} - 10^{-2} M SA hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) putreszcin, spermidin és spermin tartalmára 1 napos kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.



23. ábra.: Rövidtávú SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) Put, Spd és Spm tartalmára (Átlag $\pm$ SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.



24. ábra.: Hosszútávú SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) putreszcín, spermidin és spermin tartalmára (Átlag±SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.

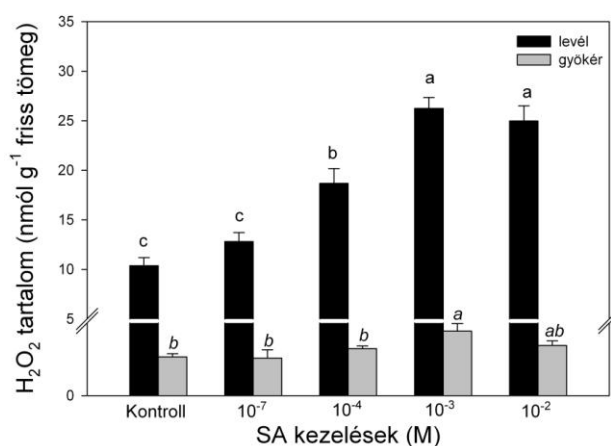
5.1.3 Oxidatív stressz

5.1.3.1 Az előkezelések hatása a ROS, valamint a NO keletkezésére és az életképességre

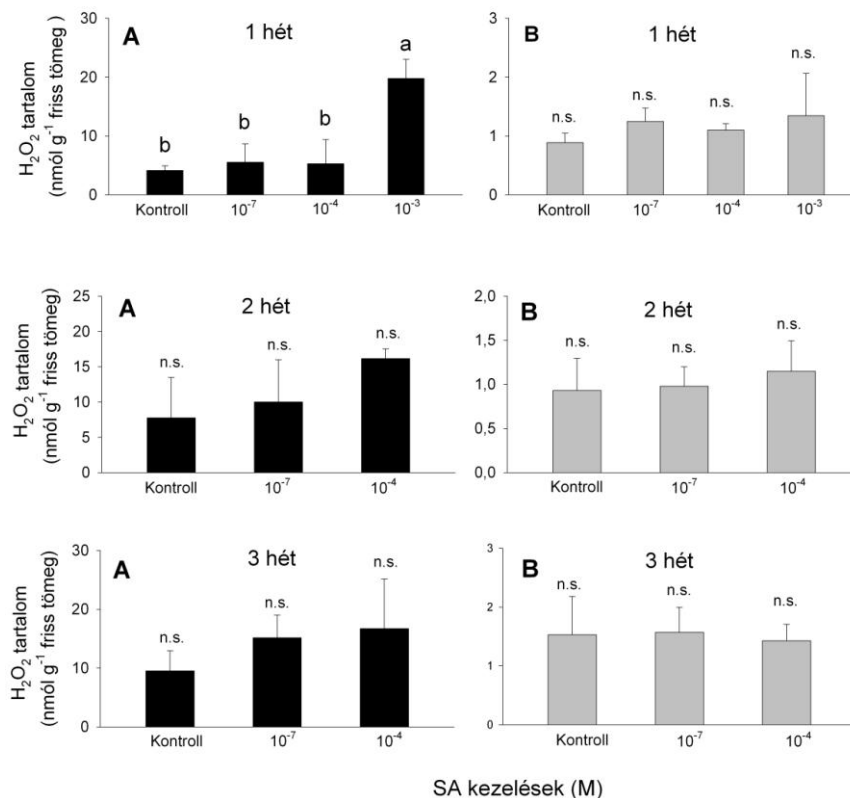
A H_2O_2 és a NO kulcsszerepet töltenek be a növényekben védekező mechanizmusokban és szignáltranszdukciós folyamatokban egyaránt. Emellett mindkét molekula együtt, vagy egymástól függetlenül részt vesz olyan folyamatok, mint például a PCD szabályozásában.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a SA által indukált oxidatív stressz során keletkező ROS és a NO miképpen járulnak hozzá az akklimatizációhoz, vagy ellenkezőleg, a növényi egyed pusztulásához paradicsom növényekben.

1 nap kezelést követően a 10^{-4} M SA, de különösen a 10^{-2} M és a 10^{-3} M SA, szignifikánsan megemelte a H_2O_2 tartalmat a növények levelében, míg gyökérben csak az SA magasabb koncentrációi (10^{-2} M és a 10^{-3} M SA) okoztak szignifikáns növekedést (25. ábra).

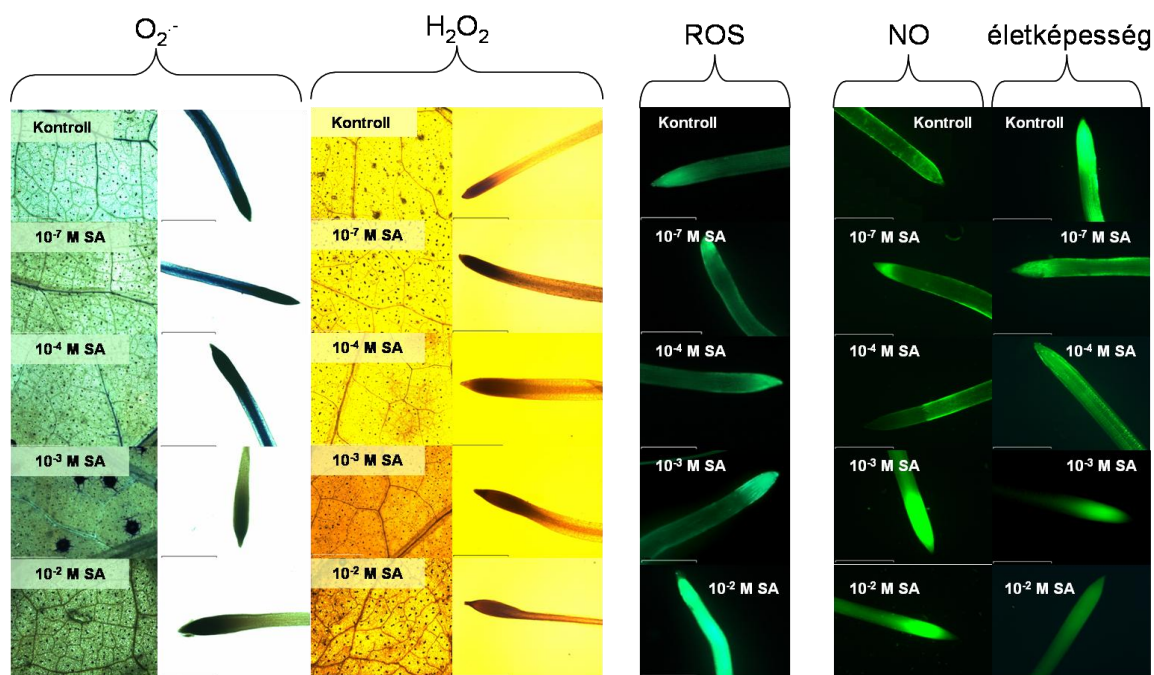


25. ábra: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének H_2O_2 tartalmára. Kezelésként 5 ismétlés átlagát ábrázoltuk ($n=5$). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

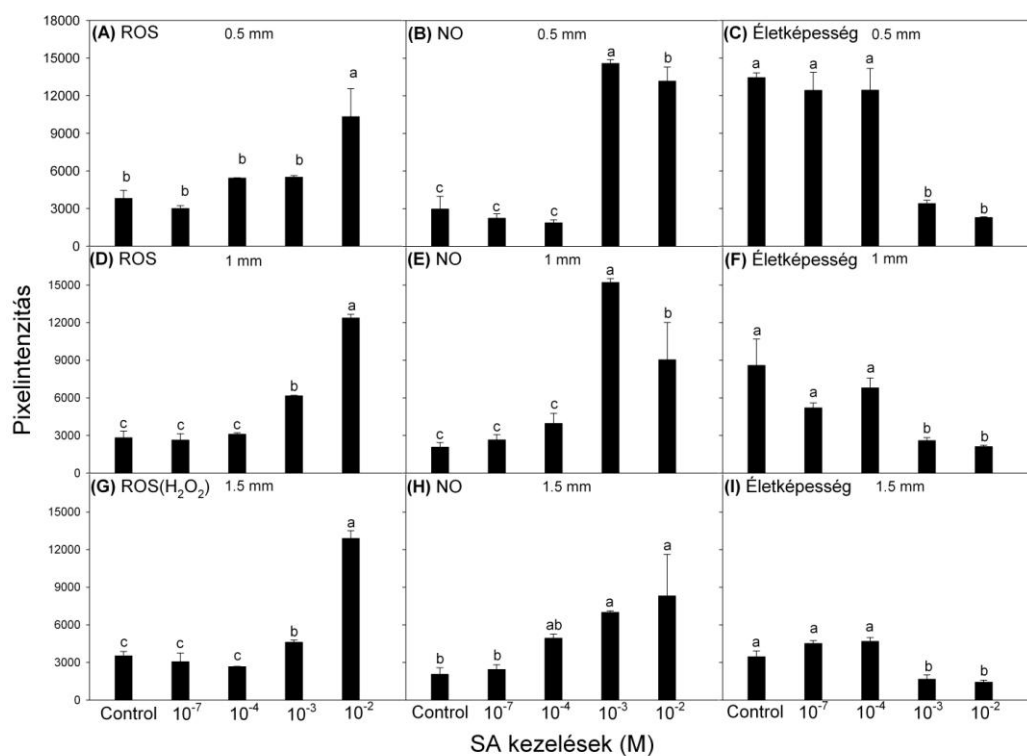


26. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) H₂O₂ tartalmára 1, 2, illetve 3 hét előkezelést követően. Kezelésenként 5 ismételts átlagát ábrázoltuk (n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

Magas koncentrációban (10^{-3} M SA, 10^{-2} M SA) a kezelések csökkentették a gyökerek O₂⁻ termelését (27. ábra), ugyanakkor szignifikánsan és nagymértékben megemelték a gyökér apikális sejtjeinek ROS és NO produkcióját, amivel párhuzamosan jelentős mértékben csökkentették a sejtek vitalitását (27. és 28. ábra). A SA alacsonyabb koncentrációi közül a 10^{-4} M SA mérsékelten megemelte a gyökerek csúcsi zónájának NO szintjét, viszont a kontroll gyökerekhez hasonló ROS produkciót eredményezett. Ezzel szemben a 10^{-7} M SA-val kezelt és a kontroll növények sem a ROS, sem pedig az NO akkumuláció mértékében nem különböztek egymástól (27. ábra, 28. ábra A., D., G., B., E. és H.). A SA magasabb koncentrációi már 1 nap után szignifikánsan csökkentették a gyökerek életképességét, míg az alacsonyabb koncentrációk a kontroll gyökerekhez hasonló vitalitást eredményeztek (28. ábra C., F., I.).



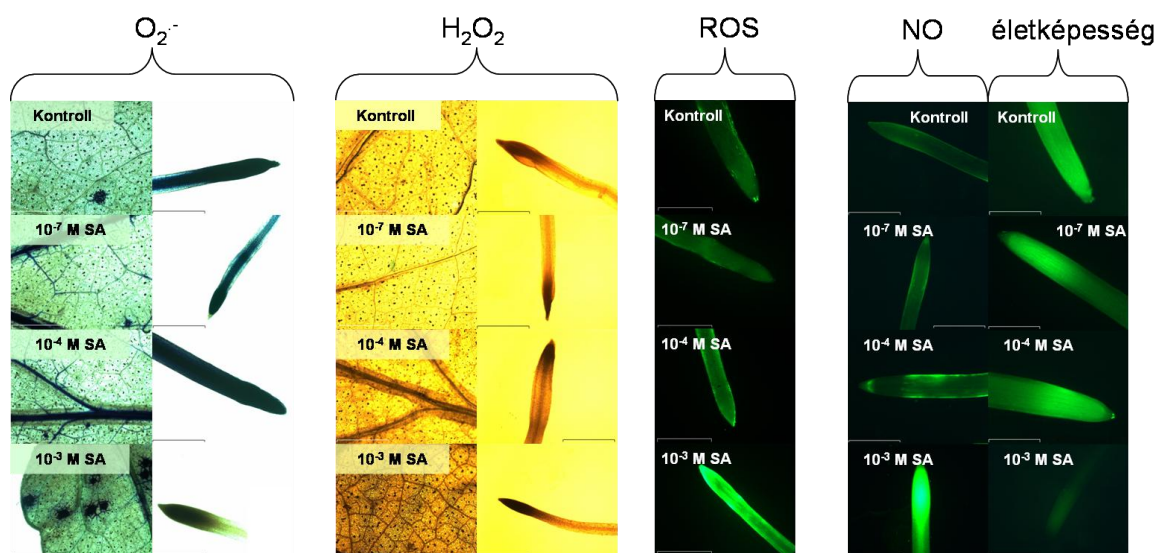
27. ábra: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre (Átlag $\pm$ SE, n=9). Mérce=1 mm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter felhasználásával készítettük (10-es filter: exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm).



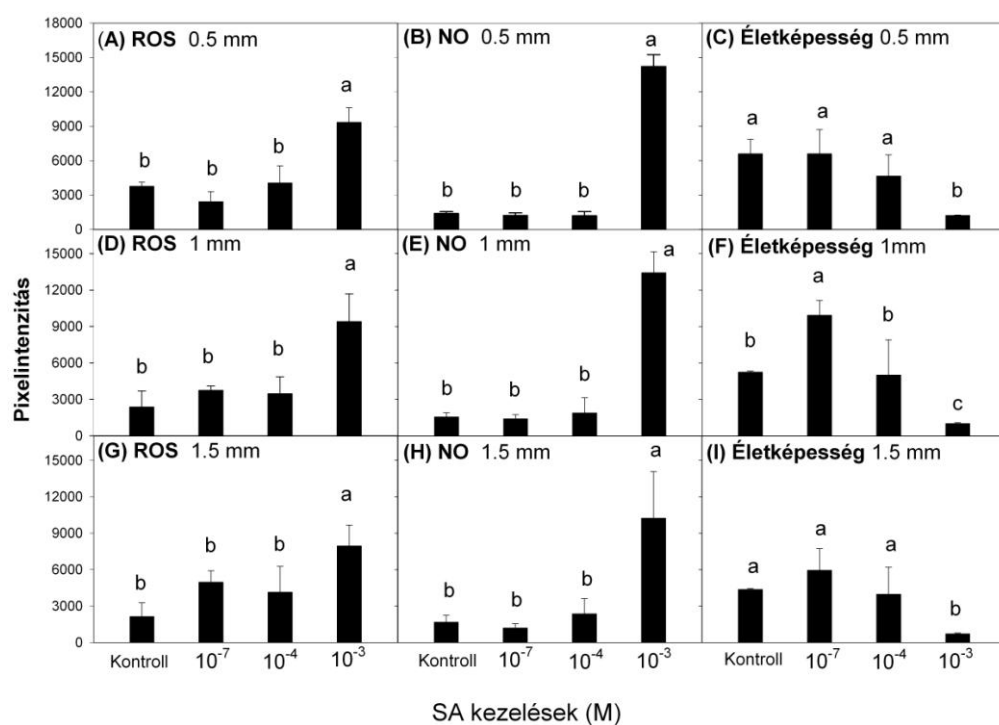
28. ábra: 10^{-7} - 10^{-2} M SA hatása paradicsom növények gyökerének ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 1 napos kezelést követően. (Átlag $\pm$ SE, n=9). A különböző betűvel

jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A 10^{-3} M SA által generált kezdeti, gyors és nagymértékű H_2O_2 akkumuláció a növények levelében, valamint ROS és NO produkció a gyökerek apikális sejtjeiben 1 hét előkezelést követően is tartósan és nagymértékben megmaradt, és tovább csökkent az apikális sejtek életképessége (26., 29. és 30. ábra.). Ezzel szemben a 10^{-4} M SA által indukált kezdeti H_2O_2 produkció mérséklődött az egyhetes előkezelés végére és a kontrollhoz hasonló szintet mutatott a növények levelében. Hasonló módon csökkent a gyökerek NO szintje is, így az egyhetes előkezelés végére a kontroll és a 10^{-4} M SA-val előkezelt növények sem a ROS, sem pedig az NO szintjükben nem különböztek egymástól (26., 29. és 30. ábra.).

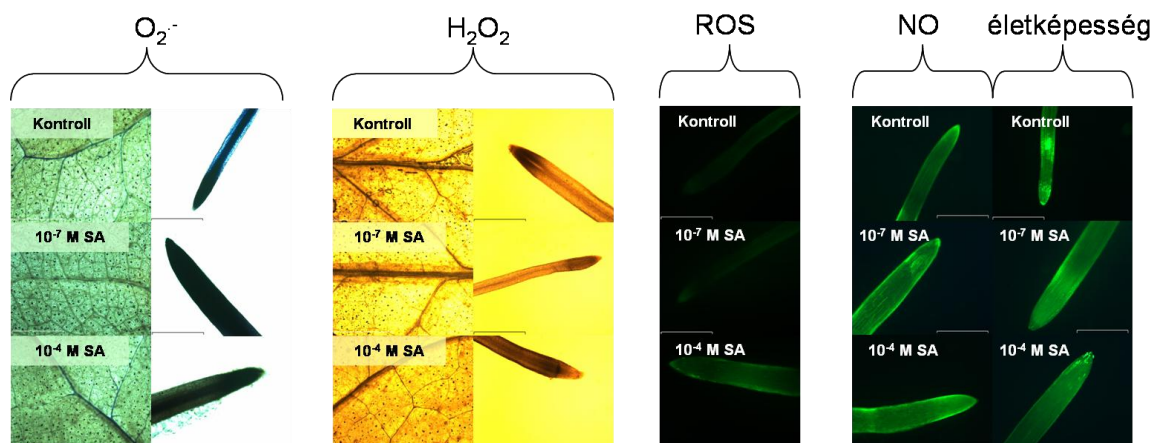


29. ábra: 1 hetes SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre (Átlag $\pm$ SE, n=9). Mérce=1 mm.

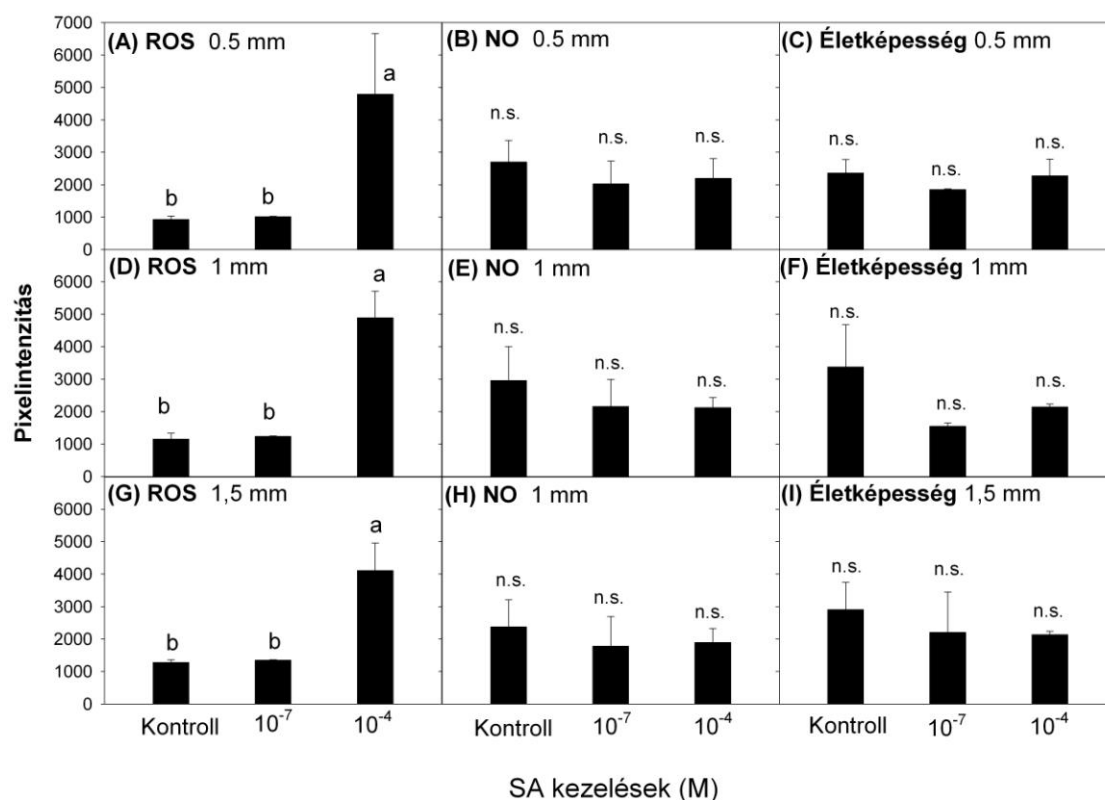


30. ábra: 10^{-7} - 10^{-3} M SA előkezelés hatása paradicsom növények gyökerének ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 1 hét után. (Átlag $\pm$ SE, n=9). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

2 hét előkezelést követően a 10^{-4} M SA fokozta a ROS akkumulációját, viszont nem változtatta a NO szintet, illetve az életképességet a kontrollhoz képest a növények gyökerében (31-32. ábra.).

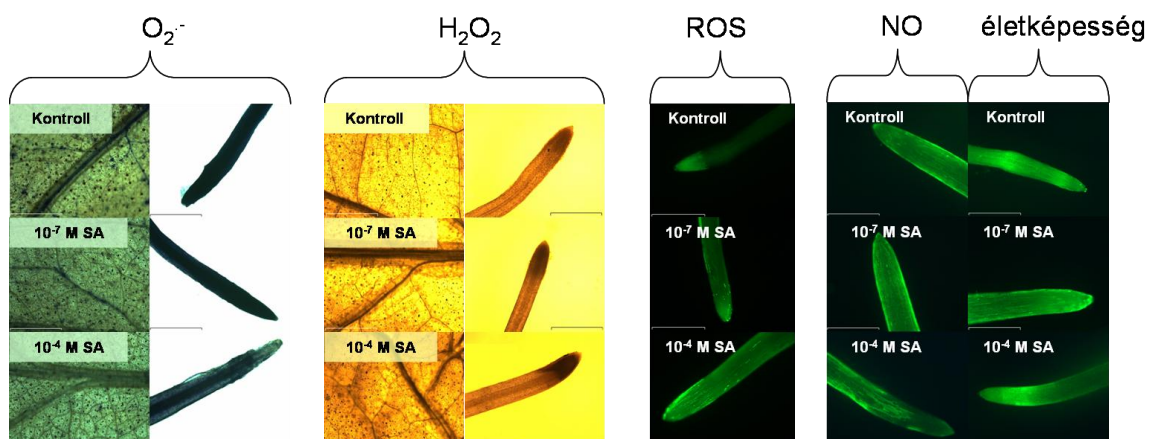


31. ábra: 2 hetes SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének O_2^- , H_2O_2 , ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre (Átlag $\pm$ SE, n=9). Mércse=1 mm.

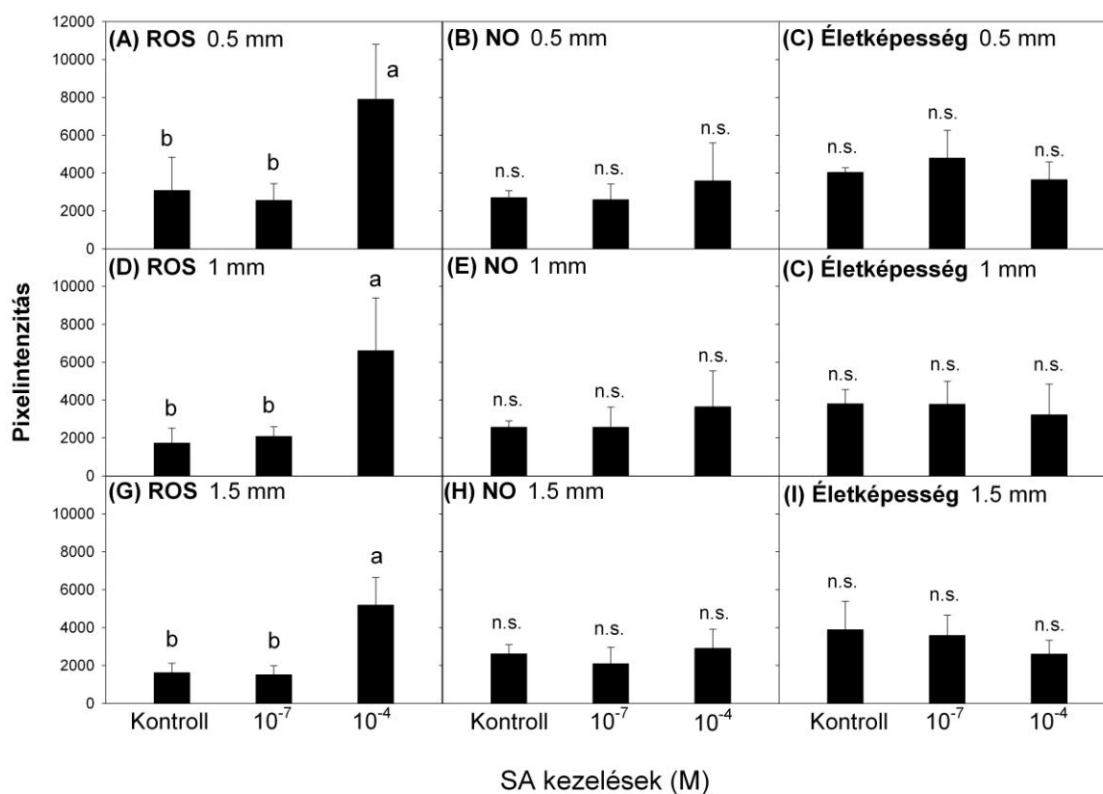


32. ábra: 10^{-7} és 10^{-4} M SA előkezelés hatása paradicsom növények gyökerének ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 2 hét után. (átlag $\pm$ SE, n=9). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

Hosszú távon a 10^{-4} M-os és 10^{-7} M-os szalicilsavval előkezelt és a kontroll növények H_2O_2 produkciójukban szignifikánsan nem különböztek egymástól (26. ábra). A 10^{-4} M-os SA hatására fokozódott azonban az apikális gyökérsejtek ROS produkciója, az NO produkcióban, illetve a gyökérsejtek vitalitásában azonban a kontroll és az SA előkezelt növények nem különböztek egymástól a 3 hetes előkezelés végére (33-34. ábra).



33. ábra: 3 hetes SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének O_2^- , H_2O_2 , ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre (Átlag $\pm$ SE, n=9). Mércse=1 mm.

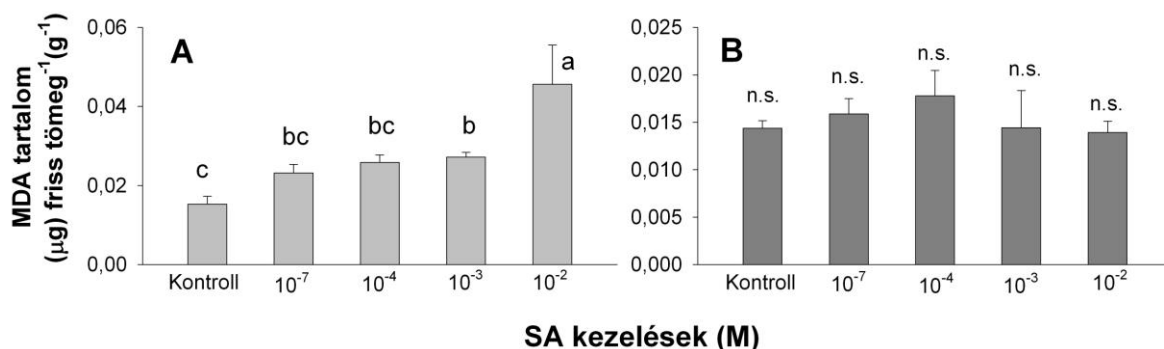


34. ábra: 10^{-7} és 10^{-4} M SA előkezelés hatása paradicsom növények gyökerének ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 3 hetes előkezelést követően. (Átlag $\pm$ SE, n=9). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

5.1.3.2 Lipidperoxidáció változása az előkezelések hatására

A lipidperoxidáció, mint rezisztenciamarker, az oxidatív stressz mértékének fontos indikátora, melynek mértékére a reakció végtermékeként keletkező malondialdehid (MDA) tartalmának változásából következtethetünk.

Kísérletünk során azt vizsgáltuk, hogy az általunk különböző koncentrációban alkalmazott SA koncentrációk hogyan befolyásolják a lipidperoxidáció mértékét paradicsom növények levelében, illetve gyökerében 1 nap kezelést követően. Megfigyelhető, hogy az általunk alkalmazott előkezelések közül az SA magasabb koncentrációi (10^{-3} M és a 10^{-2} M SA) jelentősen fokozták a lipidperoxidáció mértékét a növények levelében, míg az SA alacsonyabb koncentrációi (10^{-7} M és a 10^{-4} M SA) a kontrollhoz hasonló MDA tartalmat eredményeztek. Gyökérben nem volt szignifikáns változás az előkezelt és a kontroll növények MDA tartalmában (35. ábra).



35. ábra: 1 napos SA kezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) MDA tartalmára. Kezelésenként 5 ismétlés átlagát ábrázoltuk ($n=5$). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség a kontroll és az SA előkezelt növények MDA tartalma között.

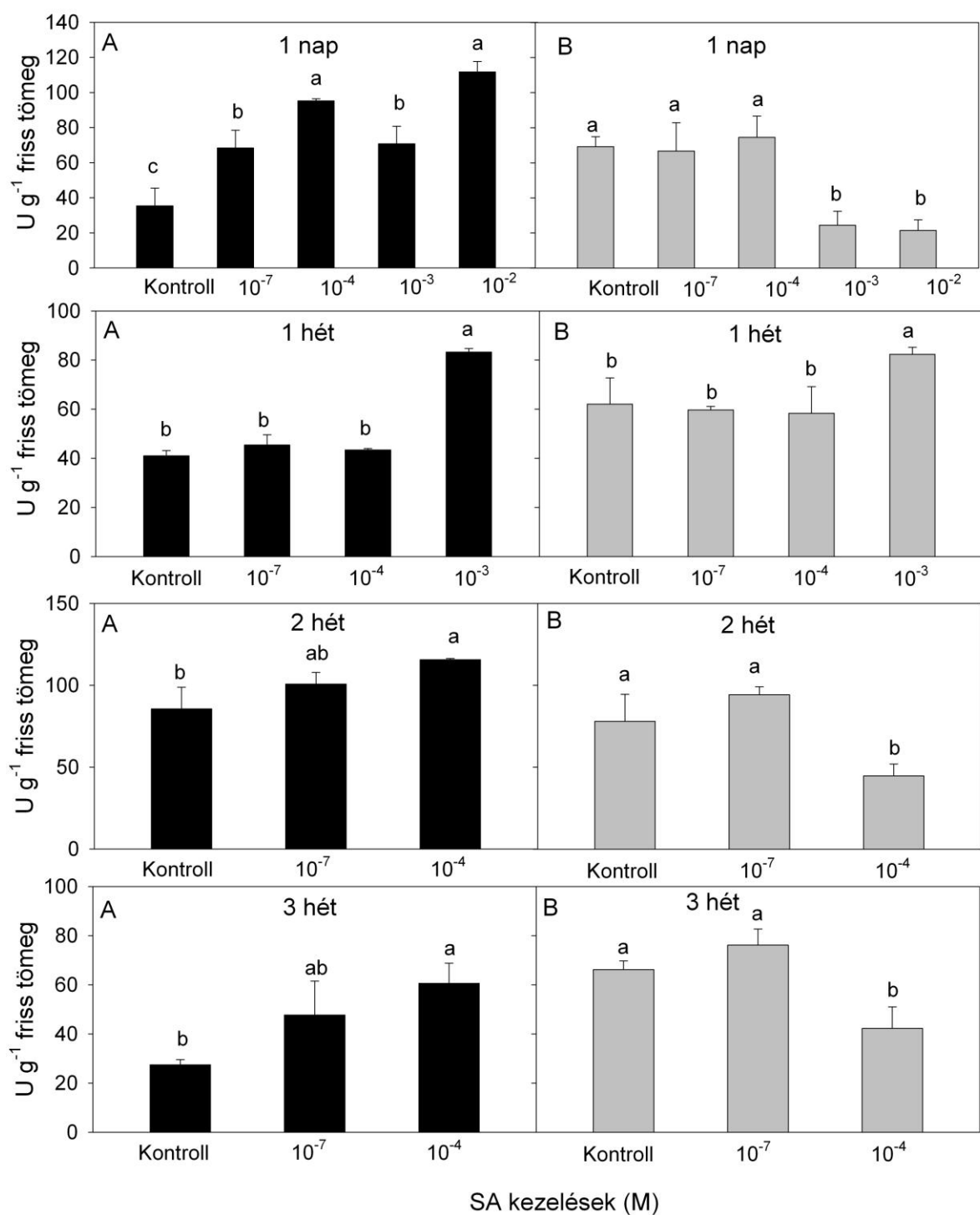
5.1.4 Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigéngyökök eltávolítása

5.1.4.1 A szuperoxid dizmutáz (SOD) és a kataláz (KAT) aktivitásának változása

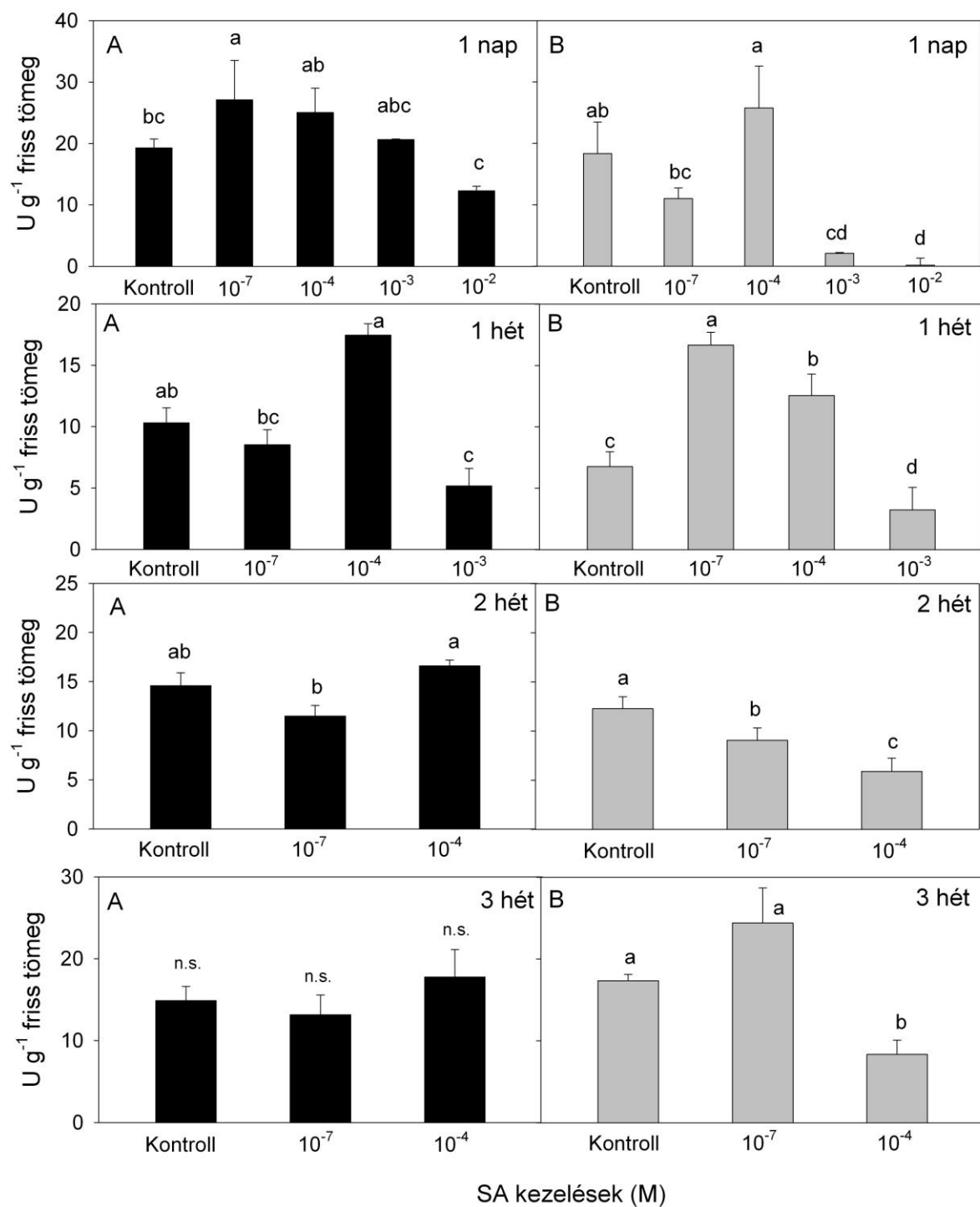
A reaktív oxigénformák mennyiségét a sejtekben összetett antioxidáns védekező mechanizmusok szabályozzák. A SOD különböző izoenzimek az oxidatív károsodás elleni védelem első vonalát alkotják, a szuperoxid gyökanion átalakítását végzik hidrogén peroxiddá. Ugyanakkor a KAT az egyik legfontosabb enzim, amely a sejtekben keletkező H_2O_2 lebontását végzi.

A hajtásban 1 nap után, minden vizsgált SA koncentrációnál szignifikánsan nőtt a SOD aktivitása, ami tartósan megmaradt a 10^{-3} M SA, illetve átmeneti csökkenés után a 10^{-4} M SA esetében. Gyökérben rövid távon csak a letális koncentrációk (10^{-3} M és 10^{-2} M SA) csökkentették a SOD aktivitását, mely csökkenés hosszú távon a 10^{-4} M SA esetében is megfigyelhető volt (36. ábra.).

Az SA kezelések közül a 10^{-7} M SA szignifikánsan növelte, míg a 10^{-4} M, a 10^{-3} M SA nem változtatta, a 10^{-2} M SA pedig kismértékben csökkentette a KAT aktivitását 1 nap után. A 10^{-3} M SA azonban hosszabb távon csökkentette, a 10^{-4} M SA pedig nem változtatta az enzim aktivitását a növények levelében a kontrollhoz képest. Gyökérben az SA magasabb koncentrációi tartósan csökkentették, az alacsonyabb koncentrációk pedig kezdeti növekedés után, hosszú távon szintén csökkentették (10^{-4} M SA), vagy nem változtatták (10^{-7} M SA) a KAT aktivitását a kontrollhoz képest (37. ábra.). A kapott eredmények összhangban vannak a ROS (H_2O_2) tartalom mérés során kapott eredményekkel. A SA magas koncentrációi esetén a SOD aktivitásának fokozódása és a KAT aktivitásának gátlása levélben a H_2O_2 nagymértékű és tartós akkumulációjához vezetett (25. és 27. ábra). Fokozódott a ROS produkció gyökérben (27. és 28. ábra) is, a 10^{-3} M és 10^{-2} M SA kezelés jelentős mértékű KAT gátlásának eredményeképpen. 1 hét előkezelést követően a 10^{-4} M SA gyökérben növelte a KAT aktivitását, ami által átmenetileg csökkentette az apikális gyökérsejtek ROS produkcióját (29. és 30. ábra). Hosszú távon a 10^{-4} M SA a SOD aktivitásának fokozásával levélben és változatlan KAT aktivitás mellett hozzájárult a H_2O_2 tartalmának növeléséhez, ami a 3 hetes előkezelés végére már nem volt szignifikáns (26. ábra). Gyökérben 10^{-4} M-nál hosszú távon nem emelkedett meg a SOD aktivitás, viszont a KAT jelentős gátlása hozzájárulhatott a gyökércsúcsok mérsékelten emelkedett ROS szintjéhez (31-34. ábra).



36. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) SOD aktivitásának változására. Kezelésenként 3 ismétlés átlagát ábrázoltuk ($n=3$). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



37. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) KAT aktivitásának változására. Kezelésenként 3 ismétlés átlagát ábrázoltuk (n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség a kontroll és az SA előkezelt növények között.

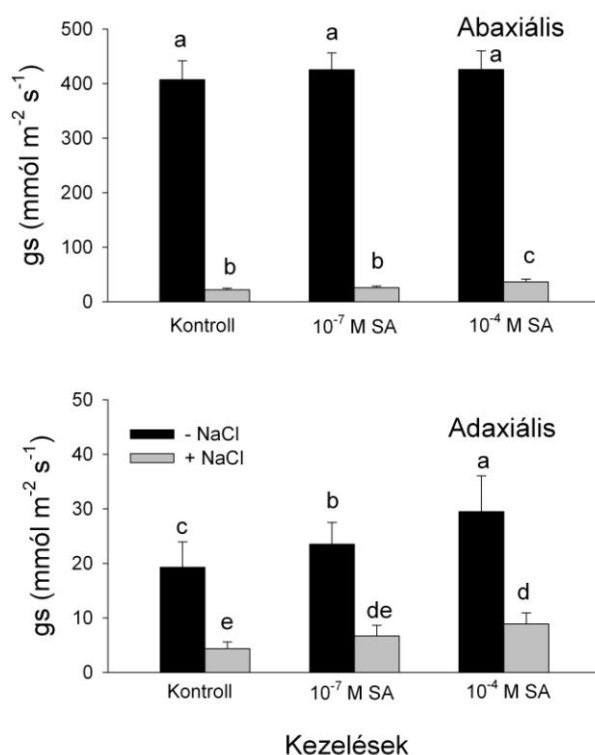
5.2 A sóstressz akklimatizáció folyamatai a szalicilsavval előkezelt növényekben

5.2.1 Stresszrezisztencia markerek változása az előkezelések hatására sóstressz alatt

5.2.1.1 A sztómakonduktancia változása

Mint ahogy azt az előzőekben láthattuk, az általunk hosszútávú kísérletekhez használt SA előkezelések (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) átmenetileg csökkentették a sztómakonduktanciát paradicsom növények levelében, azonban ez a gátló hatás már az előkezelések 1. hetére megszűnt a nevelési fényintenzitáson és egészen a 3. hét végéig a kontrollhoz hasonló maradt mind a levelek abaxiális, mind pedig azok adaxiális oldalán (11-12. ábra).

A 4. hét végére az előkezelések, különösen a 10^{-4} M SA, önmagukban is szignifikánsan növelték a sztómák nyitottságát a levelek adaxiális oldalán, míg az abaxiális oldalon a kontroll és a SA előkezelt növények sztómakonduktáciája nem különbözött egymástól. A 100 mM NaCl-val kiváltott sóstressz erőteljes sztómazáródást eredményezett a levelek mindkét felszínén mind a kontroll, mind pedig az SA előkezelt növényekben. Ugyanakkor a 10^{-4} M SA előkezelés hatására a növények sztómakonduktáciája sóterhelés mellett nagyobb volt, mint a sókezelt kontroll és a 10^{-7} M SA-val előkezelt növények esetében (38. ábra).



38. ábra.: 10^{-7} M és 10^{-4} M SA előkezelés hatása a sztómakonduktancia változására paradicsom növények leveleinek abaxiális és adaxiális felszínén 1 hetes, 100mM-os NaCl

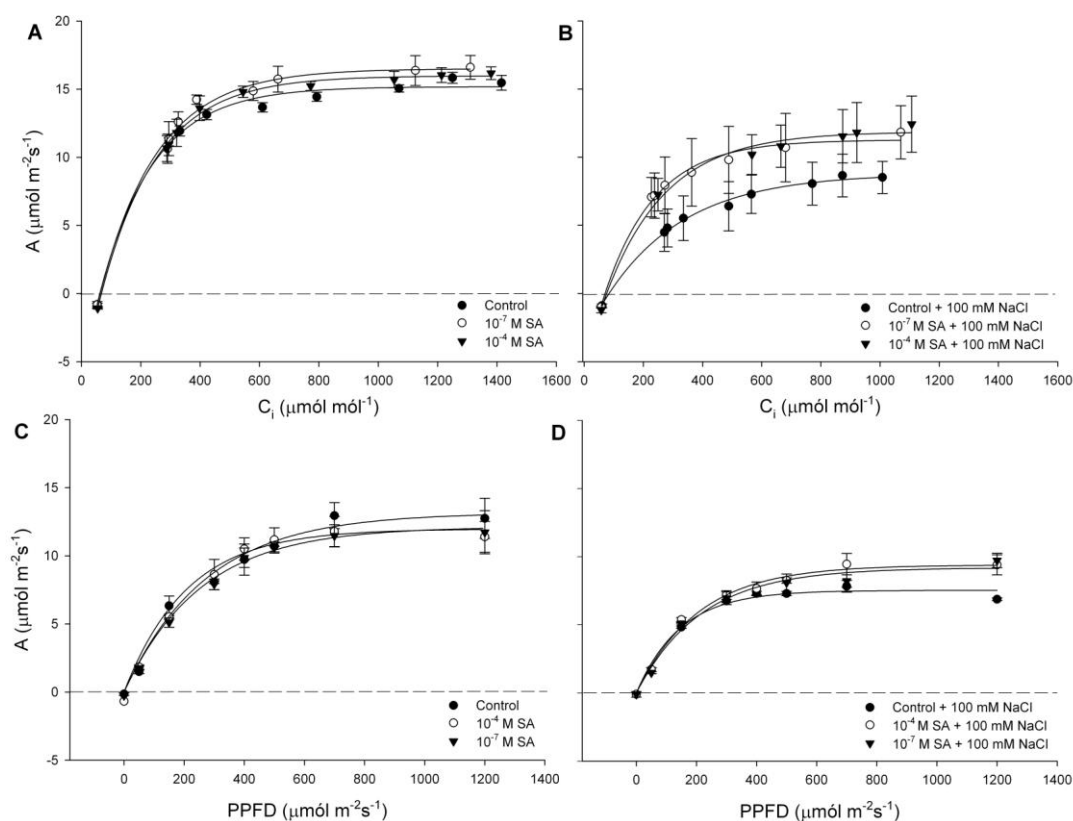
kezelést követően. Kezelésenként 15 ismétlés átlagát ábrázoltam (n=15). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.2.1.2 A CO₂ asszimilációs ráta változása, az intercelluláris CO₂ koncentráció, valamint a fényintenzitás függvényében

A széndioxid diffúzióját és ennek következtében fixációját a sztómazáródás limitálja. A CO₂ asszimilációban sem rövid, sem pedig hosszú távon nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és az SA előkezelte növények között sem az intercelluláris CO₂ koncentráció, sem pedig a fényintenzitás függvényében (13-14. ábra).

100 mM-os NaCl-val kiváltott sókezelés hatására csökkent a CO₂ asszimiláció sebessége, azonban az előkezelések, különösen a 10⁻⁴ M SA, növelték a CO₂ fixáció hatékonyságát a sókezelte kontrollhoz képest mind az intercelluláris CO₂ koncentráció függvényében, mind pedig alacsony fényintenzitáson (39. ábra).

Sóstressz alatt mindkét SA előkezelés növelte az A_{max} értékét, a karboxiláció hatékonyságát (CE), valamint csökkentette a CO₂ kompenzációs pontot a sókezelte kontrollhoz képest (5. táblázat). A fényintenzitás függvényében az A_{max} értéke magasabb volt az SA előkezelte növényekben sóstressz alatt a sókezelte kontrollhoz képest, melynek eredményeképpen ezek a növények hatékonyabban hasznosították a fényenergiát 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson (6. táblázat).



39. ábra.: 10⁻⁴ és 10⁻⁷ M SA előkezelés hatása paradicsom növények CO₂ asszimilációjára az intercelluláris CO₂ koncentráció (A; B), illetve a fényintenzitás (C; D;) függvényében 1 hetes sókezelést követően (Átlag±SE, n=5).

5. táblázat: A/C_i görbe paramétereinek változása sókezelést követően 10⁻⁴ és 10⁻⁷ M-os SA-val előkezelt paradicsom növények leveleiben.

Kezelések	A _{max} (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	CE (mól CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	C _{cp} (μmol CO ₂ m ⁻¹)
Kontroll	15.18±0.32 ^a	0.047±0.000 ^a	69.06±2.45 ^b
Kontroll+100 mM NaCl	9.01±1.06 ^b	0.026±0.006 ^b	106.69±5.83 ^a
10 ⁻⁷ M SA	16.44±1.07 ^a	0.048±0.002 ^a	69.98±6.43 ^b
10 ⁻⁷ M SA+100 mM NaCl	10.89±2.29 ^{ab}	0.044±0.005 ^a	76.26±6.30 ^b
10 ⁻⁴ M SA	15.97±0.40 ^a	0.048±0.002 ^a	78.31±3.40 ^b
10 ⁻⁴ M SA+100 mM NaCl	11.59±1.98 ^a	0.043±0.005 ^a	85.23±7.43 ^b

A_{max} = maximális CO₂ asszimilációs sebesség (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹);

CE= karboxilációs hatékonyság (mól CO₂ m⁻² s⁻¹);

C_{cp}= CO₂ kompenzációs pont (μmol CO₂ m⁻¹).

A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. (Átlag $\pm$ SE, n=5)

6. táblázat: A fénygörbe paramétereinek változása sókezelést követően 10^{-4} és 10^{-7} M-os SA-val előkezelt paradicsom növények leveleiben $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson.

Kezelések	A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Q (mól CO_2 mól $^{-1}$ foton)	Rd ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Lcp ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Kontroll	13.27 $\pm$ 1.49 ^a	0.044 $\pm$ 0.006 ^a	0.36 $\pm$ 0.15 ^a	7.74 $\pm$ 2.37 ^a
Kontroll+100 mM NaCl	7.52 $\pm$ 0.20 ^c	0.033 $\pm$ 0.000 ^b	0.07 $\pm$ 0.02 ^b	2.29 $\pm$ 0.78 ^b
10^{-7} M SA	12.60 $\pm$ 2.19 ^{ab}	0.038 $\pm$ 0.001 ^a	0.25 $\pm$ 0.04 ^a	6.62 $\pm$ 0.06 ^a
10^{-7} M SA+100 mM NaCl	9.59 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.036 $\pm$ 0.001 ^a	0.33 $\pm$ 0.12 ^a	8.98 $\pm$ 3.18 ^a
10^{-4} M SA	11.97 $\pm$ 1.25 ^{ab}	0.041 $\pm$ 0.001 ^a	0.48 $\pm$ 0.04 ^a	12.04 $\pm$ 1.45 ^a
10^{-4} M SA+100 mM NaCl	8.97 $\pm$ 0.75 ^{bc}	0.037 $\pm$ 0.001 ^a	0.28 $\pm$ 0.02 ^a	7.61 $\pm$ 0.88 ^a

A_{max} = maximális CO_2 asszimilációs sebesség ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

Q= kvantum hasznosítás (mól CO_2 mól $^{-1}$ foton);

Rd= sötétlégzés ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

Lcp= fény kompenzációs pont ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. (Átlag $\pm$ SE, n=5)

5.2.1.3 A fluoreszcencia indukciós paraméterekben bekövetkező változások

Sókezelés hatására mind a nevelési ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mind pedig annál magasabb ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fényintenzitáson csökkent az effektív kvantumhasznosítás, a fluoreszcencia kioltásban pedig nagyobb volt az NPQ, azaz a hődisszipáció aránya, mint a fotokémiai folyamatoké. Sóstressz alatt az SA előkezelések mindkét fényintenzitáson hatékonyabbá tették a fotoszintézis fényreakcióit, amit jól tükröz az F_v/F_m értékének változatlansága, az effektív kvantumhasznosítás növekedése, illetve a hődisszipáció mértékének csökkenése a sókezelt kontroll növénykéhez képest (7-8. táblázat).

7. táblázat: SA előkezelés hatása paradicsom növények klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek változására sóstressz alatt 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson.

Kezelések	F_v/F_m	q_p	Φ_{PS2}	NPQ
Kontroll	0.802±0.00 ^{ns}	0.567±0.00 ^a	0.302±0.00 ^a	1.171±0.05 ^c
Kontroll+100 mM NaCl	0.802±0.00 ^{ns}	0.365±0.00 ^d	0.195±0.01 ^d	1.584±0.18 ^a
10 ⁻⁷ M SA	0.802±0.00 ^{ns}	0.518±0.00 ^b	0.262±0.01 ^{bc}	1.361±0.00 ^{abc}
10 ⁻⁷ M SA+100 mM NaCl	0.808±0.00 ^{ns}	0.480±0.01 ^c	0.235±0.00 ^c	1.530±0.01 ^{ab}
10 ⁻⁴ M SA	0.800±0.00 ^{ns}	0.563±0.01 ^a	0.287±0.01 ^{ab}	1.325±0.05 ^{bc}
10 ⁻⁴ M SA+100 mM NaCl	0.805±0.00 ^{ns}	0.510±0.00 ^b	0.255±0.00 ^c	1.458±0.08 ^{ab}

F_v/F_m : a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása

q_p : fotokémiai kioltás

Φ_{PS2} : a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása

NPQ: nem fotokémiai kioltás

A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség. (Átlag±SE, n=5)

8. táblázat: SA előkezelés hatása paradicsom növények klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek változására sóstressz alatt 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson

Kezelések	F_v/F_m	q_p	Φ_{PS2}	NPQ
Kontroll	0.802±0.00 ^{ns}	0.330±0.00 ^a	0.161±0.00 ^a	1.447±0.07 ^{ns}
Kontroll+100 mM NaCl	0.802±0.00 ^{ns}	0.217±0.03 ^d	0.098±0.00 ^c	1.647±0.22 ^{ns}
10 ⁻⁷ M SA	0.802±0.00 ^{ns}	0.281±0.00 ^{bc}	0.133±0.00 ^b	1.540±0.04 ^{ns}
10 ⁻⁷ M SA+100 mM NaCl	0.808±0.00 ^{ns}	0.247±0.00 ^{cd}	0.115±0.00 ^{bc}	1.558±0.13 ^{ns}
10 ⁻⁴ M SA	0.800±0.00 ^{ns}	0.315±0.02 ^{ab}	0.149±0.01 ^{ab}	1.527±0.01 ^{ns}
10 ⁻⁴ M SA+100 mM NaCl	0.805±0.00 ^{ns}	0.274±0.01 ^{bc}	0.130±0.00 ^b	1.608±0.07 ^{ns}

F_v/F_m : a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása

q_p : fotokémiai kioltás

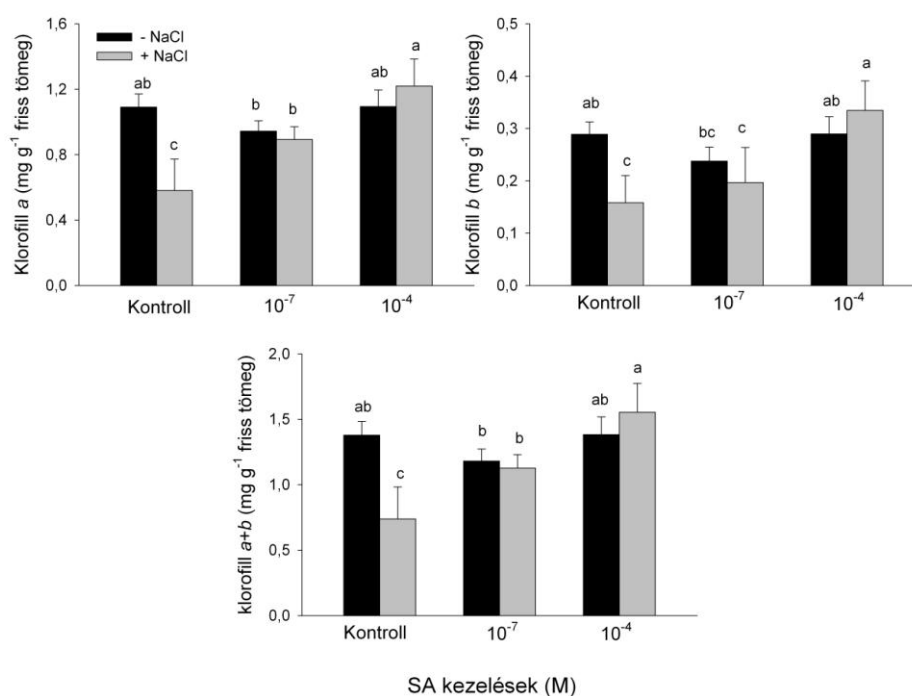
Φ_{PS2} : a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása

NPQ: nem fotokémiai kioltás

A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség. (Átlag $\pm$ SE, n=5)

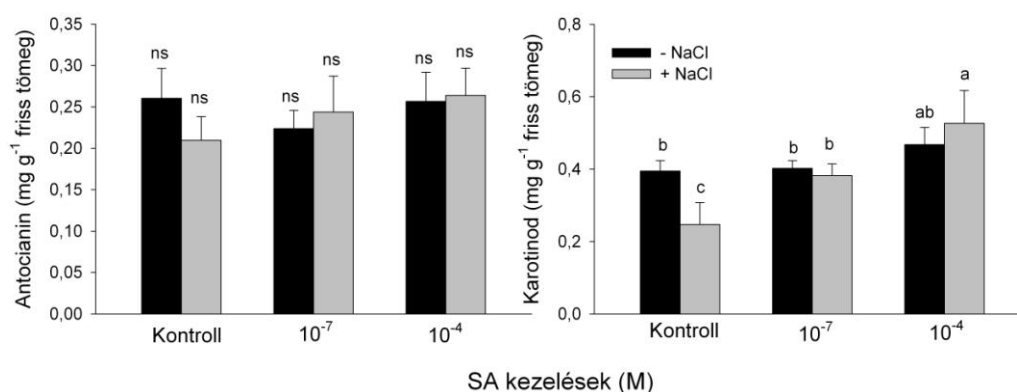
5.2.1.4 A fotoszintetikus pigmenttartalmakban bekövetkező változások

Sóstressz hatására csökkent pigmenttartalmakat mértünk a növények levelében, a hosszútávú SA előkezelés, különösen a 10^{-4} M-os, azonban szignifikánsan megemelte a *kla*, a *klb*, és a *kla+b* tartalmakat a sókezelt kontroll növényekhez képest (40. ábra).



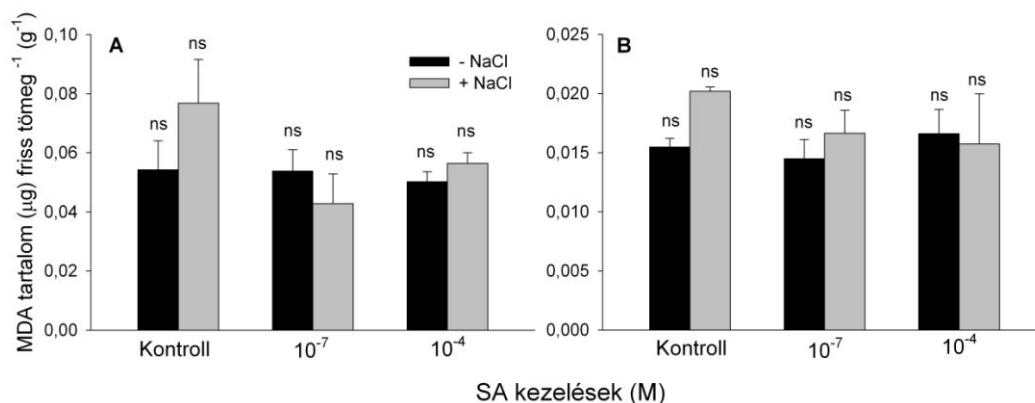
40. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények *kla*, *klb*, valamint *kla+b* tartalmára 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelés után. (Átlag $\pm$ SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Sótoleráns paradicsom genotípusoknál az antioxidáns karotinoidok és antocianinok mennyiségének változása, a lipidperoxidáció mértékének alakulása fontos fiziológiai markernek tekinthető. Az egyhetes sókezelés a kontrollhoz képest szignifikánsan lecsökkentette a karotinoid tartalmat, az előkezelt növényekben, különösen a 10^{-4} M SA esetében azonban ez a tendencia megfordult. Az antocianin tartalom változása azonban nem volt számottevő. Így a karotinoidok valószínűleg hatékonyabb antioxidánsok, mint az antocianinok a sóstressznek kitett paradicsom növényeknél (41. ábra).



41. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények antocianin, valamint karotinoid tartalmára 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelés után. (Átlag $\pm$ SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

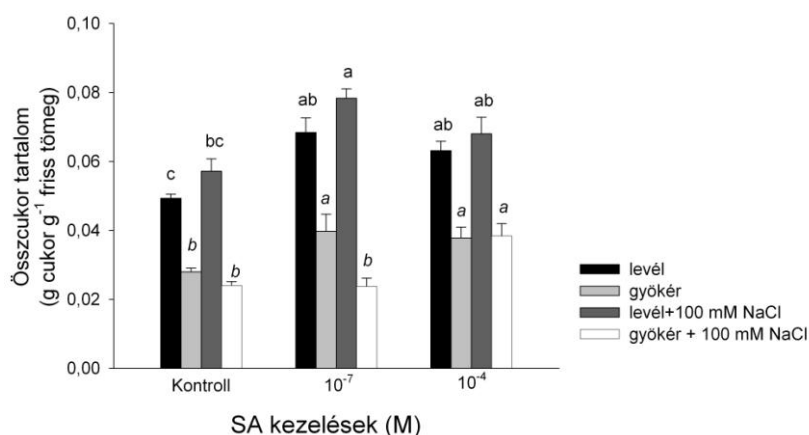
Sóstressz hatására fokozódott a lipidperoxidáció mértéke, amit az SA előkezelések kismértékben csökkentettek a sókezelt kontrollhoz képest, ez a csökkenés azonban nem volt szignifikáns. (42. ábra).



42. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) MDA tartalmára 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelés után. (Átlag $\pm$ SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

5.2.1.5 Az előkezelések hatása a szénhidrátok akkumulációjára

A fotoszintézis termékei, a cukrok akkumulációja a paradicsomnál adaptív jellegű tulajdonság a sóstressz akklimatizációban. Hosszú távon az általunk alkalmazott SA előkezelések jelentősen megnövelték az összcukortartalmat paradicsom növények levelében és gyökerében egyaránt a kontroll növényekhez képest. Sókezelés hatására mind a kontroll, mind az SA előkezelt növények levelében megnőtt az összcukortartalom. Ezzel szemben gyökérben a sóstressz, illetve a 10^{-7} M SA előkezelés nem változtatta, a 10^{-4} M SA azonban növelte az összcukortartalmat 100 mM-os sókitettség mellett is (43. ábra).

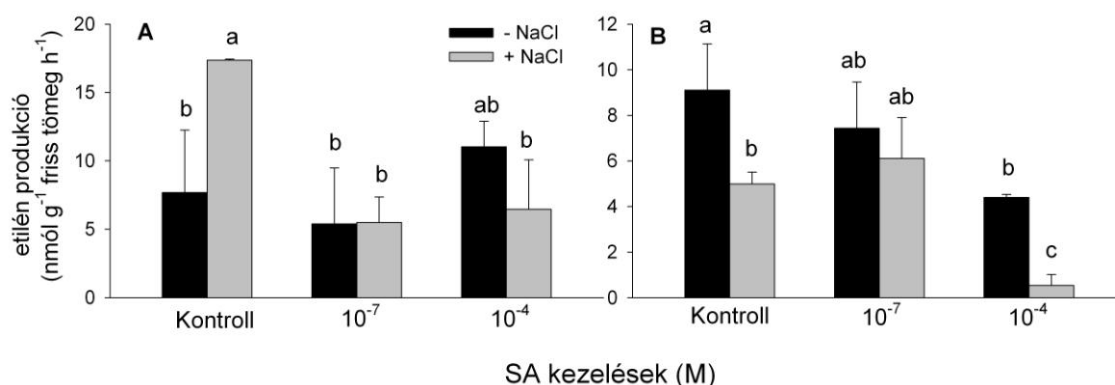


43. ábra: 10^{-7} és 10^{-4} M SA előkezelés hatása paradicsom növények összcukortartalmának változására sóstressz alatt (Átlag $\pm$ SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.2.2 A szalicilsav előkezelés sóstressz akklimatizációt javító hatása a hormonháztartásra

5.2.2.1 Az etilénprodukciónak változása

Az előkezelések közül a 10^{-7} M SA nem befolyásolta, a 10^{-4} M SA azonban kismértékben növelte az etilénprodukciónak a növények levelében a kontrollhoz képest. 100 mM-os sókitettség alatt jelentősen fokozódott az etilénprodukciónak paradicsom növények levelében, amit azonban az SA előkezelések mérsékeltek sóstressz alatt. Gyökérben sóstressz hatására mérséklődött az etilén szintézise, a 10^{-4} M SA előkezelés pedig tovább csökkentette azt a sókezelt kontroll növények etilénprodukciónakához képest (44. ábra).



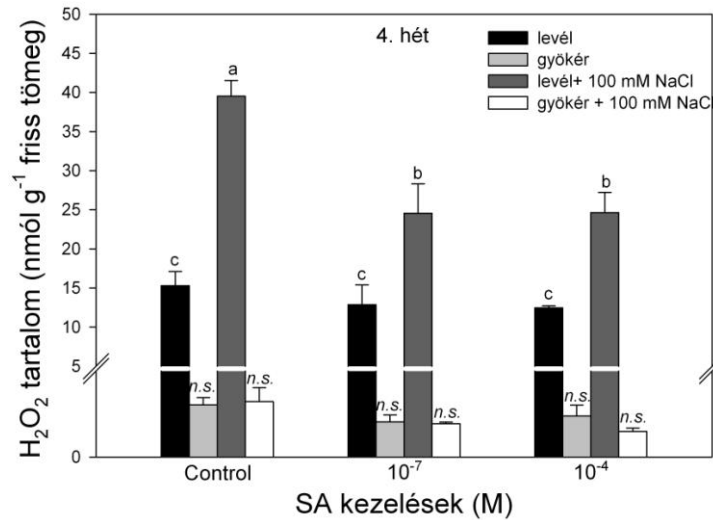
44. ábra: 10^{-7} és 10^{-4} M SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) etilénprodukcijára sóstressz alatt (Átlag $\pm$ SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.2.3 Oxidatív stressz: akklimatizáció vagy sejthalál az előkezelések hatására sóstressz alatt

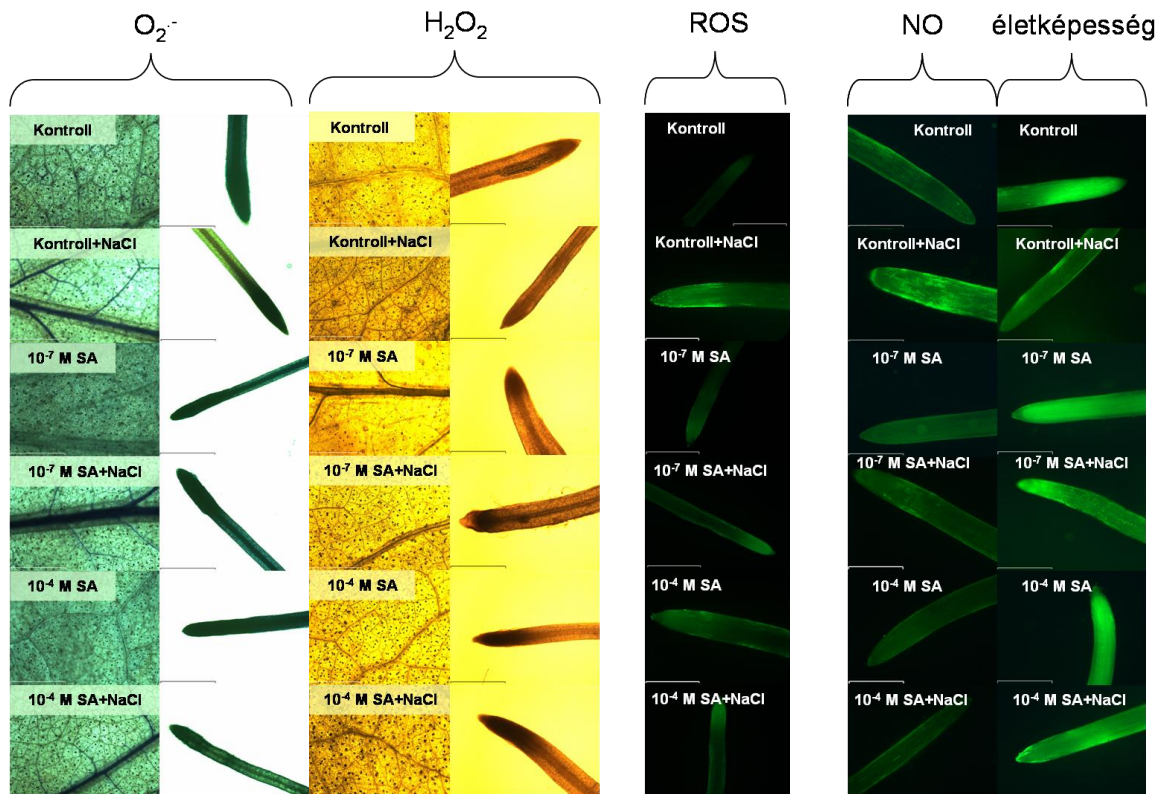
5.2.3.1 Az előkezelések hatása a ROS, valamint a NO keletkezésére és az életképességre

A SA előkezelés a 4. hét végére önmagában nem fokozta szignifikánsan a H_2O_2 akkumulációját a kezelést nem kapott kontroll növényekhez képest. A sóstressz indukálta H_2O_2 produkció jelentősen csökkent az SA előkezelt növények levelében, gyökérben azonban nem volt szignifikáns különbség a kontroll és az előkezelt növények H_2O_2 akkumulációjában sóstressz alatt (45-46. ábra).

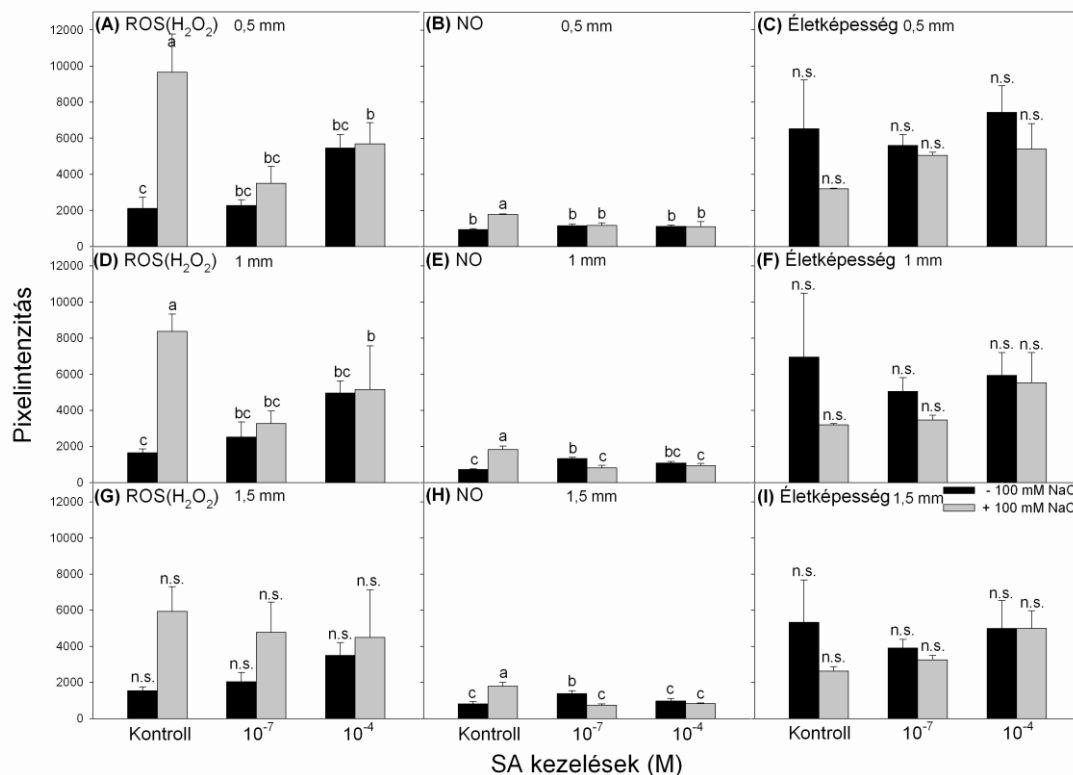
A ROS a gyökér apikális zónáiban kissé eltérő mintázatot mutatott, mint a H_2O_2 az intakt gyökérben. A 10^{-4} M SA előkezelés szignifikánsan megemelte a ROS szintet a gyökér apikális szegmensekben, ami 100 mM-os sókitettség mellett szignifikánsan csökkent a sókezelt kontrollhoz képest. Hasonló tendencia mutatkozott a NO produkciót illetően is, a SA előkezelések csökkentették a 100 mM NaCl által indukált NO produkciót. Sókezelés hatására csökkent az apikális gyökérsejtek életképessége, a SA előkezelések azonban javították a sejtek vitalitását 100 mM-os sókitettség mellett is (46-47. ábra).



45. ábra: 4 hetes SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének H₂O₂ tartalmára sóstressz alatt. Kezelésenként 5 ismételtes átlagát ábrázoltuk (n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.



46. ábra: 10⁻⁷ és 10⁻⁴ M SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének O₂⁻, H₂O₂, ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=9). Mércse=1 mm.

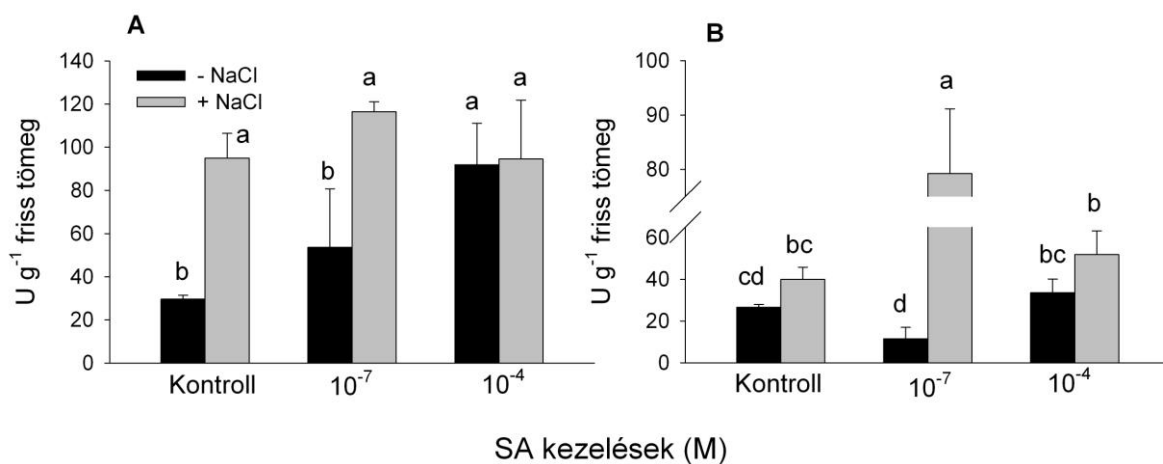


47. ábra: 10⁻⁷ és 10⁻⁴ M SA előkezelés hatása paradicsom növények gyökerének ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre sóstressz alatt (átlag±SE, n=9). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség.

5.2.4 Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigéngyökök eltávolítása

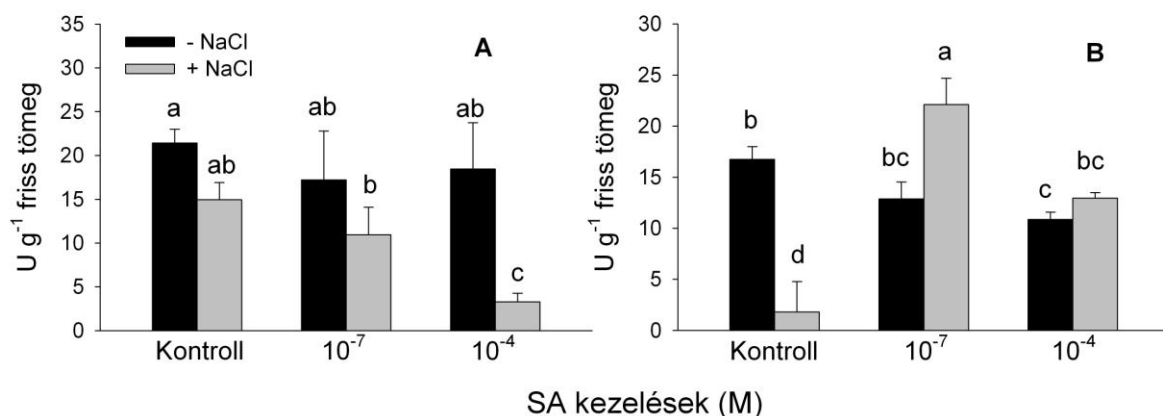
5.2.4.1 A SOD és a KAT aktivitásának változása sóstressz alatt

A SA abiotikus stresszorokkal szembeni védőhatásának egyik lehetséges oka az antioxidáns enzimszisztéma aktivitásának fokozódása lehet. A SA előkezelés önmagában is fokozta a SOD aktivitását paradicsom növények levelében a 3 hetes előkezelés végére (36. ábra). Sókezelés hatására fokozódott a SOD aktivitása mind a növények levelében, mind pedig azok gyökerében. A sóstressz az SA előkezelt levelekben is fokozta a SOD aktivitását a kontrollhoz képest, 10⁻⁴ M SA előkezelés esetében viszont nem különbözött a saját, SA előkezelt kontrolljától. A 100 mM-os NaCl kezelés a kontroll, valamint a 10⁻⁴ M SA-val előkezelt növények gyökerében kismértékben, a 10⁻⁷ M SA előkezelés esetében azonban jelentősen fokozta a SOD aktivitását (48. ábra).



48. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) SOD aktivitására 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

100 mM-os sókitettség alatt csökkent a KAT aktivitása mind a kontroll, mind az SA előkezelte növények levelében. A sóstressz gyökérben is csökkentette az enzim aktivitását, az SA előkezelések azonban megnövelték azt a sókezelt kontrollhoz képest, ami hatékony H₂O₂ lebontásra utal (49. ábra).



49. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének (A) és gyökerének (B) KAT aktivitására 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A kapott eredmények összhangban vannak a ROS (H_2O_2) tartalom mérés során kapott eredményekkel. Sóstressz alatt fokozódott a SOD és jelentősen mérséklődött a KAT aktivitása, ami a H_2O_2 nagymértékű akkumulációjához vezetett levélben, illetve a ROS produkció fokozódásához gyökérben. A 10^{-7} M és 10^{-4} M SA előkezelés azonban a KAT aktivitásának növelésével hozzájárult a ROS szintek csökkentéséhez az apikális gyökérsejtekben sóstressz alatt (45-47. ábra).

5.3 A szalicilsav indukált ROS és NO hatásának vizsgálata mezofillum protoplasztokon, mint modellrendszeren: gyors hatás

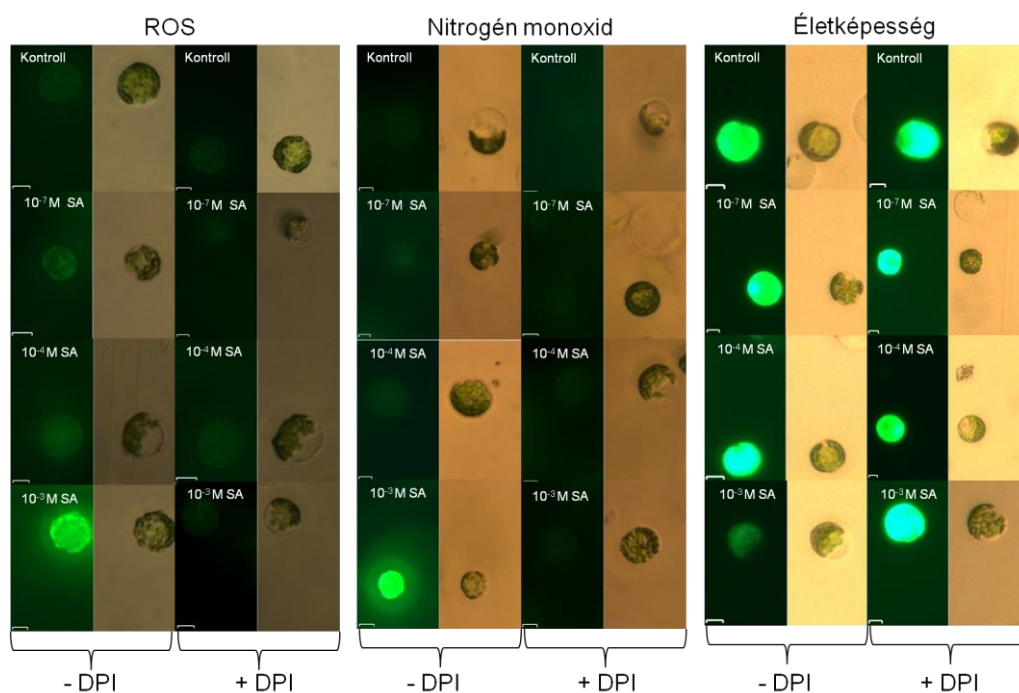
5.3.1 A szalicilsav előkezelések hatása a mezofillum protoplasztok ROS (H₂O₂) és NO produkciójára, valamint az életképességre, valamint a NADPH oxidáz gátlásának hatása normál körülmények, illetve sóstressz alatt

A SA kezelések későbbi abiotikus stressz akklimatizációt, vagy PCD-t okozó hatásában az időfüggvényekből következően különösen fontos szerepe van a hormon által indukált gyors változásoknak, így a ROS (H₂O₂) és az NO SA kezelést követő akkumulációjának. Mivel az SA mindkét reaktív formát indukálhatja, érdekes lehet annak kimutatása, hogy a ROS, vagy az NO játszik fontosabb szerepet az SA által indukált „edződés”, illetve PCD kiváltásában. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az intakt növényekben az SA előkezelések alatt akkumulálódó növekedésszabályozó anyagok, így az ABS, a poliaminok, illetve az etilént generáló ACC hogyan hat a ROS és az NO képződésére.

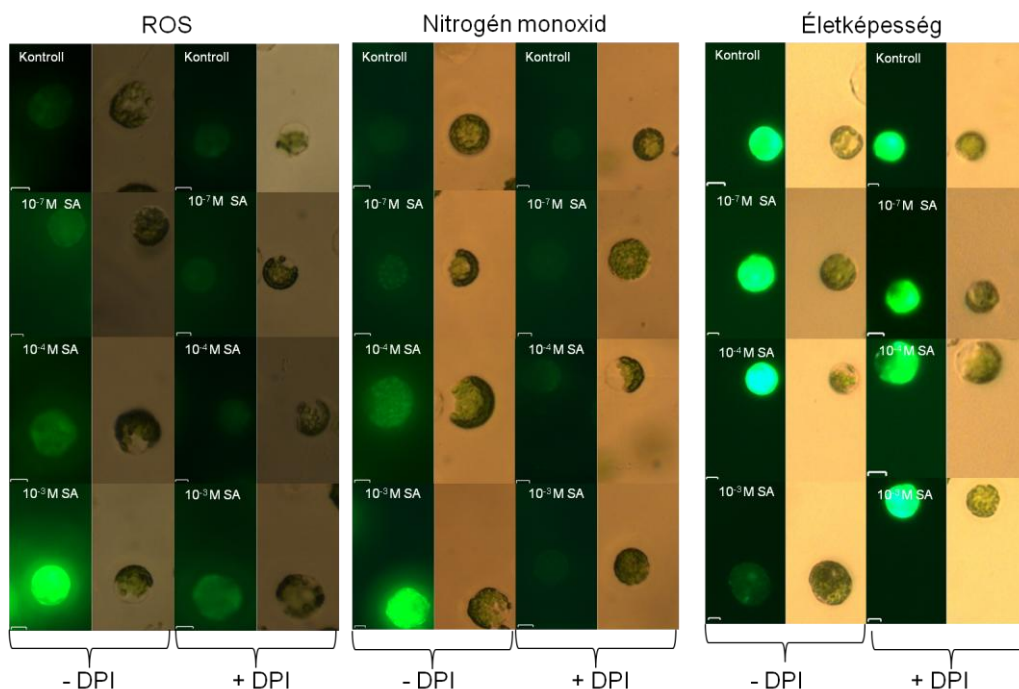
Annak modellezésére, hogy miképp járul hozzá/hozzájárul-e a SA által indukált ROS/H₂O₂, illetve NO produkció az akklimatizációs folyamatok, vagy éppen a növényi sejtek pusztulásához, paradicsom növények leveléből izolált mezofill protoplasztokat használtunk. Az általunk alkalmazott SA valamennyi koncentrációja növelte a protoplasztok intracelluláris ROS szintjét 2.5 órás inkubációt követően, oxidatív robbanást azonban csak a 10⁻³ M SA kezelés okozott (50. ábra. A; 51. ábra. A). 5 órás inkubációt követően a 10⁻⁴ M SA esetében kismértékű, a 10⁻³ M-os SA kezelés hatására pedig továbbra is magas ROS szinteket mértünk, az SA alacsonyabb koncentrációi a kontroll protoplasztokhoz hasonló ROS szintet mutattak (50. ábra. B; 51. ábra. B). A NADPH oxidáz gátlószereként használt difenilén jodónium (DPI) a kontroll, valamint a 10⁻⁷ M SA esetén nem okozott szignifikáns változást a protoplasztok ROS szintjében 5 órás inkubációt követően, szignifikánsan gátolta azonban a 10⁻⁴ M és a 10⁻³ M SA általi ROS produkciót (50. ábra. B; 51. ábra. B). A SA kezelések közül a 10⁻⁴ M-os kismértékben, míg a 10⁻³ M-os mintegy kétszeresére emelte a protoplasztok NO produkcióját 2.5 órás inkubációt követően, ami mindkét említett SA kezelésnél megmaradt az 5 órás inkubáció végére is. DPI hatására azonban gátlódott mind a 10⁻⁴ M-os, mind pedig a 10⁻³ M-os SA általi NO produkció és kontroll szintre állt vissza (50. ábra. A-B; 51. ábra. C-D). Az életképességet az a SA kezelés (10⁻³ M-os SA) csökkentette le szignifikánsan, amely mind a ROS, mind pedig az NO szintjében tartós és nagymértékű növekedést eredményezett, ami jó összhangban van az intakt növényvel végzett kísérleteink során kapott eredményekkel. DPI

hatására csökkent a 10^{-3} M-os SA általi ROS és NO produkció, és javult a protoplasztok vitalitása (50. ábra. A-B; 51. ábra. E-F).

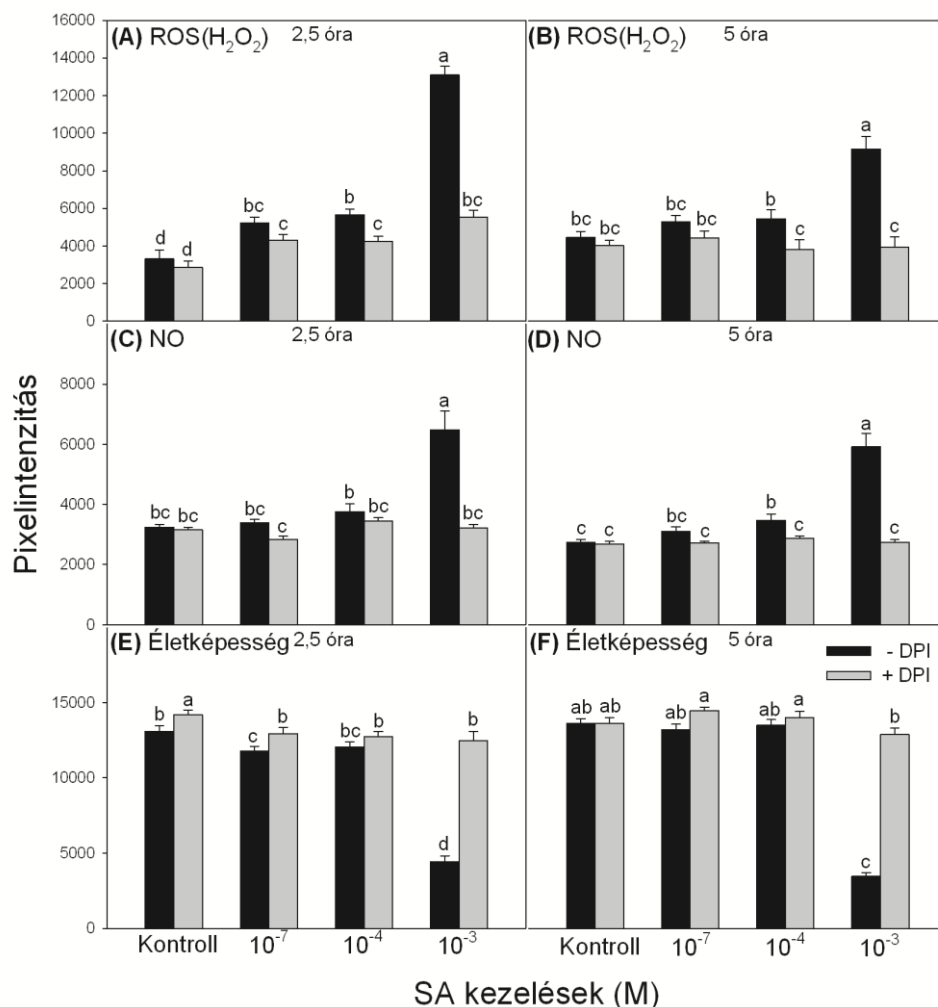
A)



B)

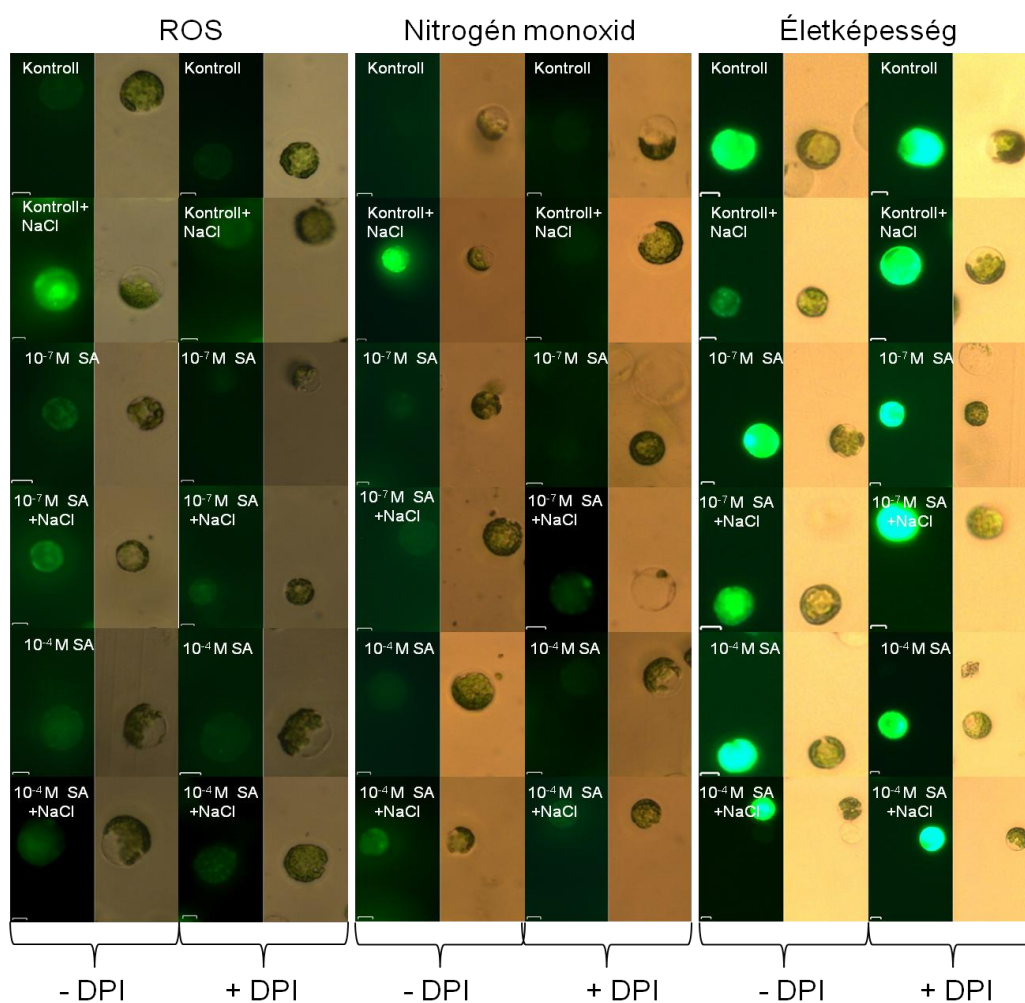


50. ábra: 2.5 (A) és 5 órás (B) SA kezelés, illetve a NADPH oxidáz difenilén jodóniummal (DPI) való gátlásának hatása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS és NO produkciójára, valamint az életképességre (Átlag $\pm$ SE, n=90). Mérce=10 μ m.

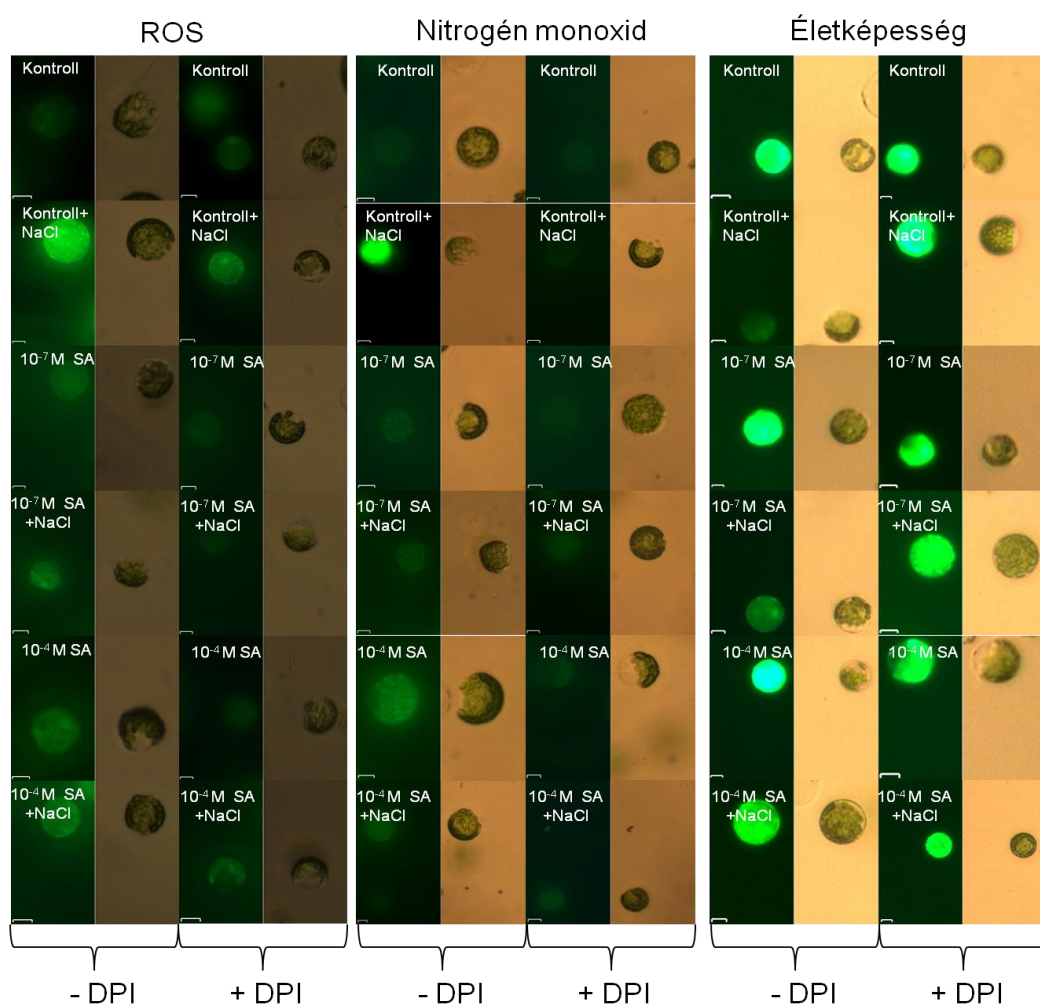


51. ábra: 10⁻⁷-10⁻³ M SA kezelés hatása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 2,5, illetve 5 órás kezelést követően. A szürke oszlopok a difenilén jodónium (DPI) gátló hatását mutatják (Átlag±SE, n=90). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

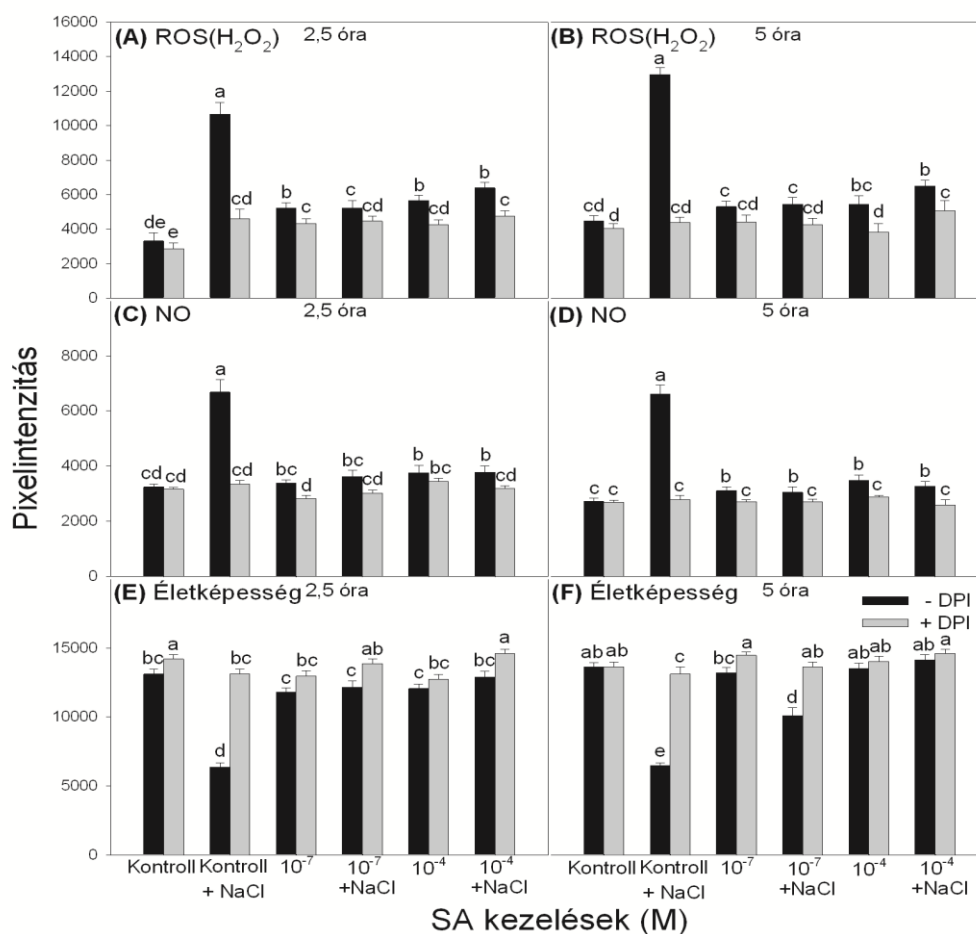
100 mM-os sókezelés hatására jelentős mértékben fokozódott a protoplasztok intracelluláris ROS és NO akkumulációja, amely tartósan megmaradt az 5 órás inkubáció végéig. (52-53. ábra., 54. ábra. A-D.). A sóstressz indukált ROS és NO gátlható volt DPI-vel (52-53. ábra.; 54. ábra. A-D). Sóstressz hatására csökkent a sejtek életképessége, viszont a sóstressz okozta vitalitás csökkenés szintén gátlható volt DPI-vel. A SA előkezelések hatására sóstressz alatt mérséklődött a ROS és NO akkumulációja és nőtt a sejtek vitalitása a sókezelt kontroll protoplasztokhoz képest (52- 53. ábra., 54. ábra. E-F).



52. ábra: 2.5 órás SA kezelés, illetve a NADPH oxidáz difenilén jodóniummal (DPI) való gátlásának hatása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS és NO produkciójára, valamint az életképességre sóstressz alatt (Átlag±SE, n=90). Mércse=10 µm.



53. ábra: 5 órás SA kezelés, illetve a NADPH oxidáz difenilén jodóniummal (DPI) való gátlásának hatása hatása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS és NO produkciójára, valamint az életképességre sóstressz alatt (Átlag±SE, n=90). Mércse=10 µm



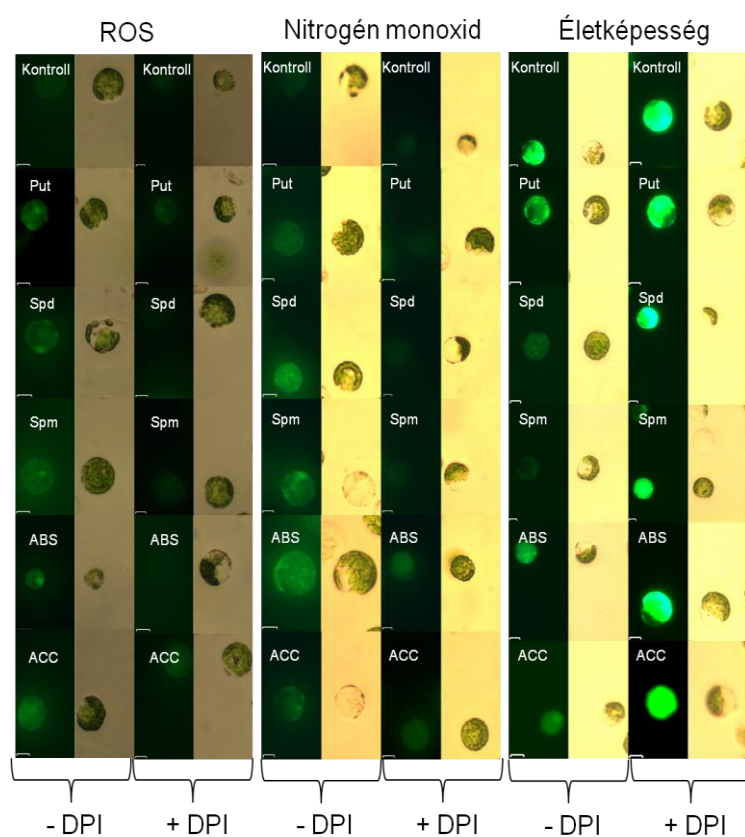
54. ábra: 10⁻⁷-10⁻⁴ M SA kezelés hatása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 2,5, illetve 5 órás kezelést követően sóstressz alatt. A szürke oszlopok a difenilén jodónium (DPI) gátló hatását mutatják (Átlag±SE, n=90). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.3.2 A sóstresszel szembeni akklimatizációt elősegítő növekedésszabályozó anyagok hatása a paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok ROS (H₂O₂) és NO tartalmára, valamint az életképességre és a NADPH oxidáz gátlásának hatása az akklimatizációs folyamatokban

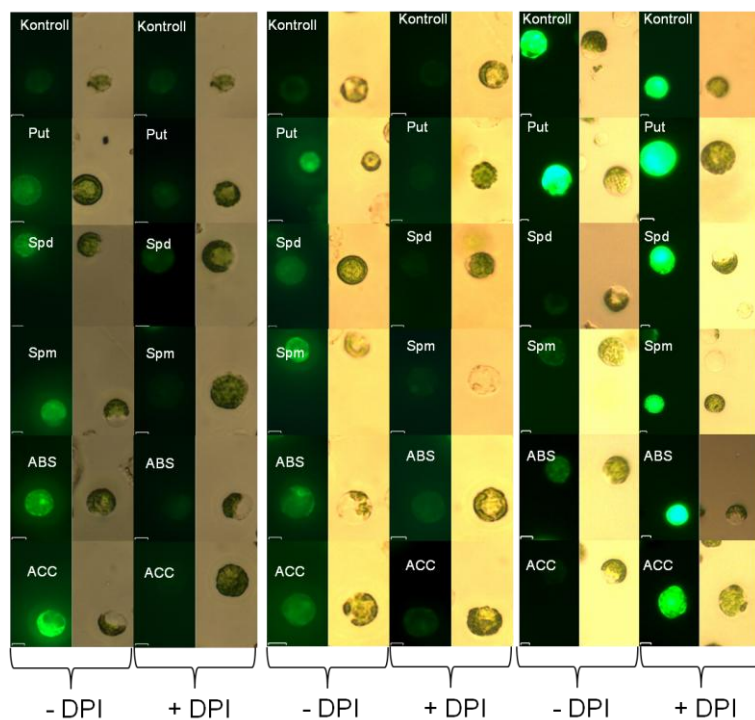
Az általunk vizsgált növekedésszabályozó anyagok közül a Spd és a Spm tartósan és nagymértékben fokozta a protoplasztok általi ROS és NO produkciót és ezzel párhuzamosan csökkentette azok életképességét. A Put szintén megemelte mind a ROS, mind pedig az NO szintjét, azonban nem csökkentette a protoplasztok életképességét. Az etilén szintézisében szerepet játszó ACC a Spd-hez és a Spm-hez hasonlóan tartósan és nagymértékben

megemelte mind a protoplasztok ROS, mind pedig azok NO produkcióját, és ezzel párhuzamosan szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a kontrollhoz képest. Az ABS az inkubáció kezdeti szakaszában növelte a protoplasztok ROS szintjét és csökkentette azok életképességét, az 5 órás inkubáció végére azonban csökkent az ABS általi ROS produkció és növekedett a sejtek vitalitása. DPI hatására minden esetben gátlódott a növekedésszabályozó anyagok általi ROS és NO produkció és javult a sejtek életképessége is (55-56. ábra).

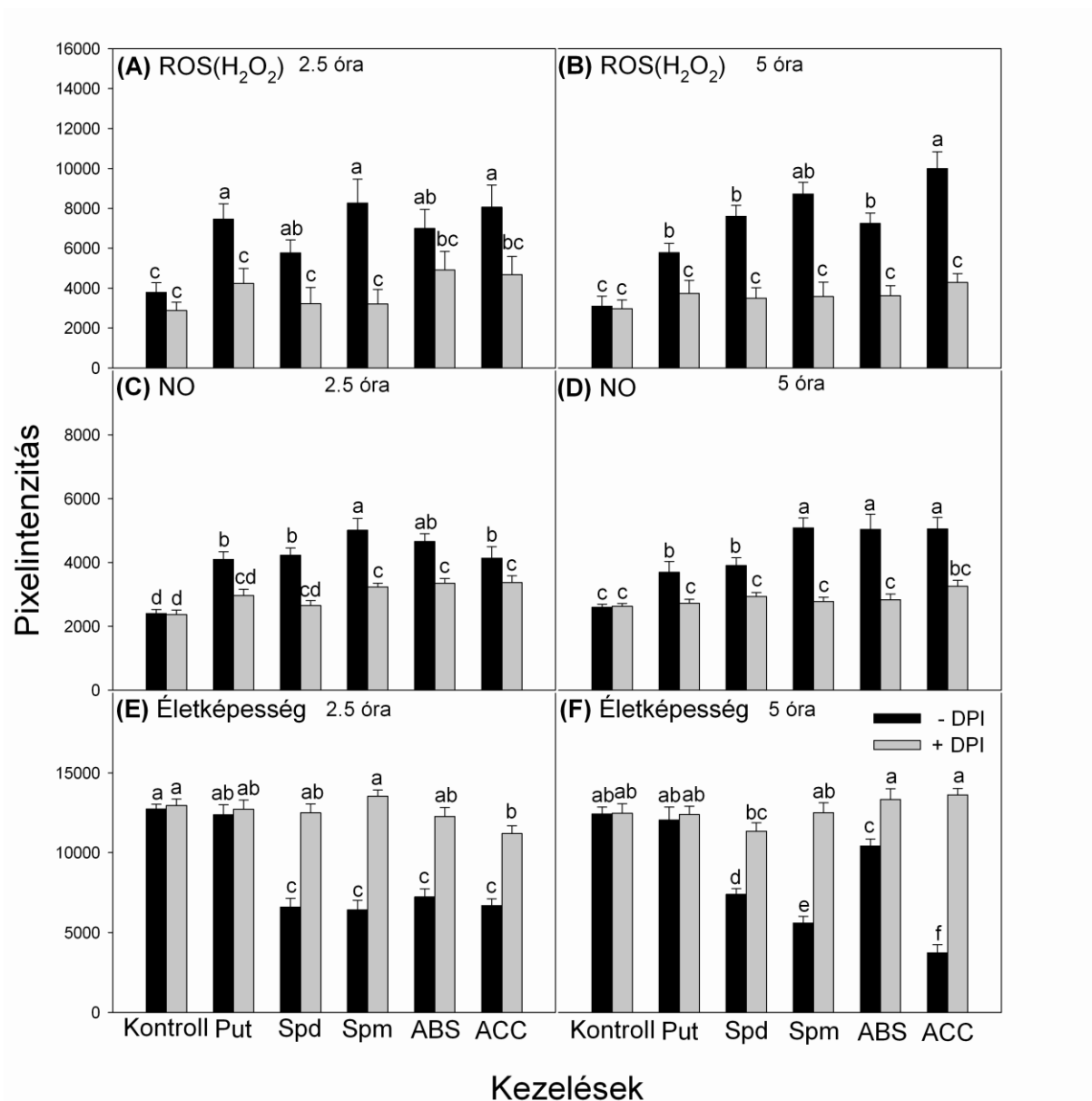
A)



B)



55. ábra: Különböző növekedésszabályozó anyagok, valamint a NADPH oxidáz gátlásának hatása paradicsom mezofillum protoplasztok ROS és NO produkciójára, valamint az életképességre 2.5 (A), illetve 5 órás (B) kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=90). Mércse=10 μ m.



56. ábra: Különböző növekedésszabályozó anyagok, valamint a NADPH oxidáz gátlásának hatása paradicsom mezofillum protoplasztok ROS és NO tartalmára, valamint az életképességre 2.5, illetve 5 órás kezelést követően (Átlag±SE, n=90). A szürke oszlopok a difenilén jodónium (DPI) gátló hatását mutatják (Átlag±SE, n=90). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

6. Eredmények értékelése

6.1 A SA előkezelés hatásai a priming alatt paradicsom növényben

6.1.1 A fotoszintetikus aktivitás szerepe az SA által indukált kémiai edzésben

Az SA sóstressz akklimatizációt fokozó hatásának egyik oka az előkezelés alatt megfigyelhető ozmotikus adaptáció. A paradicsom sóstresszel szembeni toleranciáját meghatározó oldható cukor akkumuláció szorosan kapcsolódhat a fotoszintetikus aktivitás változásával. A SA fotoszintézisre gyakorolt hatásával kapcsolatos eredmények meglehetősen ellentmondásosak. A SA előkezelés erőteljesen gátolhatja a fotoszintetikus folyamatokat, aminek egyik oka a sztómakonduktancia csökkenése, ezáltal pedig a CO₂ fixáció gátlása a növényekben (Raskin, 1992.). Moheraker és mtsai. (2003.) azt tapasztalták, hogy a SA előkezelés csökkentette a klorofill tartalmat, valamint a K_{la}/b arányt búza növényekben. Ezekkel a megfigyelésekkel ellentétben az SA előkezelés növelheti is a fotoszintetikus folyamatok hatékonyságát. Fariduddin és mtsai. (2003.) azt tapasztalták, hogy az exogén SA előkezelés növelte a nettó fotoszintetikus rátát, az intercelluláris CO₂ koncentrációt, a vízpotenciált és a sztómakonduktanciát *B. juncea* növényekben. Kísérletünkben bemutattuk, hogy a SA hatása a fotoszintézisre nagymértékben függ az alkalmazott SA koncentrációjától és a kezelés időtartamától. A SA rövid távon csökkentette a sztómakonduktanciát a levelek mindkét felszínén, ami azonban csak a később PCD-t indukáló 10⁻³ M-os koncentráció esetén vezetett a CO₂ asszimiláció hatékonyságának csökkenéséhez. A fotoszintézis hatékonyságát a 10⁻⁴ M-osnál alacsonyabb SA koncentrációk sem a fényintenzitás, sem az intercelluláris CO₂ koncentráció függvényében nem csökkentették az előkezelés során. A növények gyors elhalását előidéző 10⁻² M SA valószínűleg olyan gyorsan blokkolta a legfontosabb lebontó folyamatokat, ami megakadályozta a fotoszintetikus pigmentek és az antocianinok degradációját is. Az SA alacsonyabb koncentrációinál (10⁻⁷- 10⁻³ M SA) nem alakult ki különbség a fotoszintetikus pigmenttartalmakban, illetve a fotoszintézis primer fotokémiai folyamataiban (F_v/F_m , Φ_{PSII} , q_p , NPQ) sem a kontroll növényekhez képest. 3 hetes előkezelés után az SA-val előkezelt és a kontroll növények már sztómakonduktanciájukban sem különböztek egymástól, tehát az előkezelt növények akklimatizálódtak az őket érő kezdeti stresszhatáshoz. Bár a fotoszintetikus aktivitásban nem volt szignifikáns különbség, az előkezelések közül a 10⁻⁴ M SA már a priming ideje alatt megemelte az összecukor mennyiségét gyökérben, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult az ozmotikus adaptáció kialakításához.

6.1.2 Az etilén szerepe az akklimatizációban

Az etilén, mint a legtöbb növekedésszabályozó anyag, koncentrációtól függően determinálhatja a növények állapotát: elősegítheti az akklimatizációs folyamatokat, vagy nagyobb koncentrációban részt vehet a PCD kialakításában. Mivel a SA előkezelés módosította paradicsom növények ABS tartalmát (Szepesi és mtsai, 2009.), és irodalmi adatokból ismert, hogy az ABS és az etilén bioszintézise között kapcsolat van, azáltal, hogy az etilén képes indukálni az ABS bioszintézisét a dioxigenáz, a xantoxál-dehidrogenáz és az abszcizinaldehid oxidáz aktivitásának fokozásán keresztül (Hansen és mtsai, 2000.), feltételeztük, hogy az előkezelések módosíthatják az etilén szintézisét is. Az általunk használt valamennyi SA koncentráció befolyásolta az etilén szintézisét paradicsom növényben. A magasabb koncentrációk közül a 10^{-3} M SA már az előkezelés kezdetén extrém mértékben fokozta az etilénprodukción a növények gyökerében, ez a 10^{-2} M SA esetén gátlásba ment át. A jelentős etilénprodukción fokozódás hozzájárult a 10^{-3} M-os SA-val kezelt növények gyökérszövegeinek elhalásához, a 10^{-2} M-os SA kezelés esetében azonban a PCD kiváltása az etilénszint emelkedésétől függetlenül történt. Az alacsonyabb koncentrációk, különösen a 10^{-4} M SA, kismértékű emelkedést okoztak az etilénszintézisben, hosszú távon azonban nem eredményeztek változást a növények levelének és gyökerének etilénprodukción a kontroll növényekéhez képest, a növény adaptálódott a változásokhoz. Az etilénszintézis kismértékű és átmeneti növekedése szükséges feltétele lehet a későbbi akklimatizáció kialakulásának. A kapott eredmények összhangban vannak az etilénnek a paradicsom sóstressz akklimatizációban játszott adaptív szerepével kapcsolatos adatokkal (Ouyang és mtsai., 2007.).

6.1.3 A poliaminok akkumulációja az előkezelés alatt

A stresszrezisztencia kialakítása szempontjából az etilén mellett fontos a poliaminok koncentrációjának változása, hiszen megfelelő koncentrációban ezek a növekedésszabályozó anyagok védő funkciót tölthetnek be a sejtekben. Mint polikationok, anionos komponensekhez, úgymint nukleinsavakhoz, fehérjékhez, foszfolipidekhez képesek kapcsolódni. Mivel az irodalomban utalásokat találtunk arra, hogy a poliaminok késleltethetik a szenescenciát az etilén bioszintézis enzimeinek gátlásán keresztül (Lee és mtsai., 1997; Hong és mtsai., 1996; Ziosi és mtsi., 2006.), kíváncsiak voltunk arra, hogy a széles koncentráció intervallumban alkalmazott SA előkezelések miképpen módosítják a poliamintartalmakat és mindez hogyan függ össze az egyes előkezelések hatására az etilénprodukción mért változásokkal. A SA magasabb koncentrációi közül a 10^{-3} M és a

10^{-2} M SA különböző módon fejtette ki hatását az említett növekedésszabályozó anyagok szintézisére. A 10^{-2} M SA mintegy ötszörösére emelte a Put és mintegy huszonötszörösére a Spm koncentrációját és ezzel egyidőben jelentősen mérsékelte az etilén szintézisét a növények levelében. Megállapítható, hogy a poliaminok akkumulációja a gyors szöveti dezorganizációt eredményező 10^{-2} M-os SA előkezelések esetén is megtörténik, ami a DAO és PAO aktivitás növekedésének eredményeképpen fokozhatja a PCD-t. A poliaminok citoplazmatikus oxidatív stresszt generáló hatását a protoplasztos kísérleteinkben bizonyítottuk (55-56. ábra). A 10^{-3} M-os SA nagymértékben és tartósan fokozta az etilénprodukción, mellyel párhuzamosan jelentős mértékben növelte a Put és a Spd akkumulációját is a növények gyökerében. Megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA előkezelés a poliaminok és az etilén bioszintézisének együttes indukálásán, és az ennek eredményeképpen keletkező növekedésszabályozó anyagok gyors és nagymértékű akkumulációján keresztül fokozhatja az oxidatív stresszt, ami a gyökérszövetek elhalásához vezethet. Az SA magasabb koncentrációival ellentétben azonban a 10^{-4} M SA az etilénszintézis átmeneti és kismértékű fokozásával, valamint a Put koncentrációjának növelésével levélben, a Spd és a Spm akkumulációjának fokozásával gyökérben a halofita növényekre jellemző poliamin spektrumot alakított ki.

6.1.4 ROS, vagy NO, esetleg mindkettő

A SA koncentrációtól függően oxidatív stresszt generál, melynek eredményeképpen megnő a ROS extra,- és intracelluláris koncentrációja (Knörzer és mtsai., 1999.) A ROS kis koncentrációban az antioxidáns mechanizmusok aktiválásával hozzájárulhat a sikeres akklimatizációhoz, nagyobb koncentrációban azonban a sejtek metabolikus aktivitásának csökkenését okozhatja. Zottini és mtsai. (2007.) azt tapasztalták, hogy *Arabidopsis* növényekben a SA indukálta a NO szintézisét. A NO hatása szintén koncentrációfüggő: toxikus vagy védő hatású (Lipton és mtsai., 1993.). A ROS és a NO hatása függhet, de lehet független is a másik molekula szöveti koncentrációjától (Zhang és mtsai., 2007.; Neil és mtsai, 2008.). Ily módon az egyensúly a ROS és NO között determinálhatja a sejtek állapotát, hozzájárulva a sikeres akklimatizációhoz, vagy a sejthalálhoz. Megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációi a levélben gyors és nagymértékű H_2O_2 akkumulációt, gyökérben pedig ROS és NO produkciót eredményeztek. A NO és ROS szintek együttes és jelentős mértékű megemelkedése pedig a sejtek vitalitásának csökkenéséhez, végül sejthalálhoz vezetett. Ezzel szemben az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott előkezelések közül a 10^{-4} M SA mérsékelten növelte a ROS akkumulációját gyökérben, a NO produkcióban azonban az előkezelés végére a kontrollhoz hasonló tendenciát mutatott, mely a sóstressz

akklimatizációt nem javító 10^{-7} M SA-nál nem volt megfigyelhető. A ROS megemelkedése az apikális gyökérsejtekben önmagában nem csökkentette a szövetek életképességét, éppen ellenkezőleg, növelte a növény antioxidáns kapacitását, hozzájárulva a védelmi mechanizmusok aktiválódásához. Ily módon a gyökércsúcsokban 10^{-4} M-nál detektálható tartós és mérsékelt ROS akkumuláció fontos szereppel bírhat az ezt követő sóstressz akklimatizáció sikerességében. Teljes gyökér szintjén ez a tendencia nem detektálható (26. ábra).

A ROS mennyiségét a sejtekben összetett antioxidáns védekező mechanizmusok szabályozzák. A SOD különböző típusai az oxidatív károsodás elleni védelem első vonalát alkotó fémtartalmú enzimek, amelyek a szuperoxid gyökéanion átalakítását végzik hidrogén peroxiddá. Rao és mtsai. (1997.) kimutatták, hogy a SA *Arabidopsis*-ban serkentette a SOD enzim 2 izoenzimének az aktivitását, így módon pedig növelte a szövetek H_2O_2 tartalmát. A KAT az egyik legfontosabb enzim, amely a sejtekben keletkező H_2O_2 lebontását végzi. A SA gátolja a KAT-t azáltal, hogy képes az enzimhez kötődni (Conrath és mtsai, 1995.), azonban ez a gátló hatása nem teljesen egyértelmű. Paradicsomban, uborkában és dohányban a SA gátolta a KAT aktivitását, míg kukoricában, illetve rizsben nem találtak szignifikáns gátlást (Sánchez-Casas és Klessig, 1994.). A SA magas koncentrációban irodalmi adatokkal megegyező módon növelte a SOD és csökkentette a KAT aktivitását, ezáltal pedig tartósan és nagymértékben megemelte a H_2O_2 koncentrációját levélben, valamint a ROS akkumulációját gyökérben. Ezek az SA koncentrációk (10^{-2} és 10^{-3} M SA) a nagymértékű H_2O_2 akkumuláció következtében a növények pusztulásához vezettek. Hosszú távon alkalmazva a 10^{-4} M SA előkezelés a SOD aktivitásának fokozásával levélben és változatlan KAT aktivitás mellett hozzájárult a H_2O_2 tartalmának növeléséhez, ami az előkezelés végére már nem volt szignifikáns. A gyökérben nem emelkedett meg 10^{-4} M-nál a SOD aktivitás, de ehhez a KAT aktivitás jelentős gátlása is társult, ami hozzájárulhatott a gyökércsúcsok mérsékelt emelkedett ROS szintjéhez.

A KAT gátlás során a SA szabadgyökké alakulhat, mely a továbbiakban lipidperoxidációt okozhat (Anderson és mtsai., 1998.). Az irodalommal megegyező módon, azok az SA előkezelések, melyek serkentették a SOD és gátolták a KAT aktivitását rövid távon, fokozott MDA akkumulációt eredményeztek a növények levelében, míg a KAT-t nem gátló kezelések (10^{-4} M és 10^{-7} M SA) esetében a kontrollal azonos MDA tartalmakat mértünk.

6.2 A SA előkezelés sóstresszel szembeni akklimatizációt fokozó biokémiai mechanizmusai paradicsom növényben

6.2.1 A fotoszintetikus aktivitás változása SA előkezelt paradicsom növényekben sóstressz alatt

A SA hozzájárulhat a növények stresszrezisztenciájának fokozásához. Abiotikus és biotikus stresszorokkal szembeni védő hatása azonban nagymértékben függ az alkalmazott koncentrációtól, a kezelés módjától és időtartamától, valamint a növény fejlődési stádiumától (Szepesi és mtsai., 2009.). Paradicsom növények levelében sóstressz alatt a 10^{-4} M SA növelte a vízpotenciált, és nagyobb ABS tartalmat eredményezett a sókezelt kontrollhoz képest (Szepesi és mtsai., 2009.). A várt eredményeknek megfelelően kísérleti rendszerünkben a sóstressz jelentős sztómazáródást eredményezett, aminek eredményeképpen gátlódott a CO_2 asszimiláció. Ugyanakkor sóstressz alatt mindkét SA előkezelés, de különösen a 10^{-4} M SA növelte a sztómakonduktanciát. Növekedett a maximális CO_2 asszimiláció mértéke ($A_{\max}$), valamint a karboxiláció hatékonysága (CE), mely a CO_2 fixáció hatékonyságának fokozásához vezetett. Sóstressz alatt a maximális asszimiláció mértéke ($A_{\max}$) a fényintenzitás függvényében is nagyobb volt az SA előkezelt növényekben, ami arra utal, hogy ezek a növények hatékonyabban hasznosították a fényenergiát a fotokémiai folyamatokban, ami pedig magasabb kvantum hasznosításhoz vezetett a sókezelt kontroll növényekhez képest. Ez azt jelenti, hogy a növények fotoszintetikus kapacitása az SA előkezelt növényekben az intercelluláris CO_2 telítési értékén és telítési fényintenzitáson nagyobb volt. Az általunk használt SA koncentrációi sóstressz alatt a fotoszintézis fényreakcióit is hatékonyabbá tették, amit jól mutat a fluoreszcencia indukciós paraméterek, köztük az F_v/F_m értékének változatlansága, az effektív kvantumhasznosítás (Φ_{PSII}) növekedése, illetve a hődisszipáció mértékének csökkenése (NPQ) a sókezelt kontrollhoz képest. Mindez azt jelenti, hogy az SA előkezelt növények fotokémiai aktivitása és elektrontranszportja hatékonyabb volt az előkezelést nem kapott sókezelt kontroll növényekhez képest. Az effektív kvantumhasznosítás értékének növekedése, valamint nem fotokémiai kioltás (NPQ) fotokémiai (q_p) javára történő eltolódása pedig sótoleráns növényekre jellemző adaptív tulajdonság (Dionisio-Sese és Tobita, 2000.). Összességében megállapítható, hogy az SA előkezelés csak a letális koncentrációknál vezetett a fotoszintézis gátlásához paradicsomban, a szubletális koncentrációk nem okoztak szignifikáns változást a CO_2 fixációban, viszont sóstressz alatt növelték a maximális CO_2 fixációt, a Rubisco karboxilációs hatékonyságát (CE), és csökkentették a CO_2 kompenzációs pontot a sókezelt kontrollhoz képest. Sókezelés hatására

csökkent a klorofill, illetve a karotinoid tartalom. A fotoszintetikus pigmentek szintézisének gátlása és/vagy degradációjának fokozódása jellemző paraméter sóstressz alatt (Jones és mtsai, 1985.). Kaydan és mtsai. (2007.) azt tapasztalták, hogy a SA előkezelés növelte a klorofill, illetve a karotinoid tartalmakat búza csíranövényben sóstressz alatt. Az irodalommal megegyező módon az általunk használt mindkét SA koncentráció, de különösen a 10^{-4} M SA megemelte a K1a, a K1b, valamint a karotinoid tartalmakat 100 mM-os sókitettség alatt, ami az antioxidáns karotinoidok esetében a fotoszintézis hatékonyságának növelésén túl, sótoleráns paradicsom genotípusoknál fontos fiziológiai markernek tekinthető. A szintén antioxidáns antocianin tartalom változása azonban nem volt számottevő. Így a karotinoidok valószínűleg hatékonyabb antioxidánsok, mint az antocianinok a sóstressznek kitett paradicsom növényeknél.

A fotoszintézis termékei, a cukrok akkumulációja, a paradicsomnál szintén adaptív jellegű tulajdonság a sóstressz akklimatizációban (Juan és mtsai., 2005.). A SA előkezelés önmagában is megnövelte az összucortartalmat a növények levelében és gyökerében, ami a 10^{-4} M SA előkezelés esetén kapcsolatban lehet a csökkent abszolút növekedéssel (Szepesi és mtsai., 2009.). Sóstressz alatt a 10^{-7} M SA a sókezelt kontrollhoz hasonlóan nem változtatta az összucortartalmat paradicsom növények gyökerében, a 10^{-4} M SA azonban növelte azt, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult a sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ozmotikus adaptációhoz.

Sóstressz alatt a lipidperoxidáció mértékének alakulása szintén fontos fiziológiai markernek tekinthető. Sóstressz hatására fokozódott a lipidperoxidáció mértéke. A hosszú távú SA előkezelés azonban mind hajtásban, mind gyökérben bár nem szignifikánsan, de mérsékelte a malondialdehid tartalmat a sókezelt kontrollhoz képest. Hasonló eredményeket kaptak sóstressz hatására a sótoleráns *S. pennellii* leveleiben is (Shalata és mtsai, 2001.).

6.2.2 Az etilénprodukciónak változása az SA előkezelt növényekben sóstressz alatt

Az abiotikus stressz, így a sóstressz is számos növényi hormon, úgy mint a poliaminok, illetve az etilén szintézisét indukálhatja, amely hormonok fontosak a növények stresszválaszaiban. Sóstressz alatt a 10^{-4} M SA előkezelés hatására paradicsom levelekben megemelkedett a Put, gyökerekben a Spd és Spm szintje, mely poliaminok megemelkedett szintje halofita növényekre jellemző sajátosság, ily módon pedig a sikeres akklimatizáció jele (Szepesi és mtsai, 2009.). A SA előkezelés csökkentette az etilénprodukciónak hidegstressz alatt kukorica növényben (Szalai és mtsai., 2000.). Az irodalommal megegyező módon azt tapasztaltuk, hogy a SA előkezelések, különösen a 10^{-4} M SA mérsékelte a sóindukált

etilénprodukción, ami ezáltal hozzájárulhatott a sóstresszel szembeni sikeres akklimatizáció kialakulásához az SA előkezelt növényekben.

6.2.3 A ROS és NO produkció szerepe a sóstressz akklimatizációban

A sóstressz számos zavart okozhat a növények metabolikus folyamataiban, azáltal, hogy indukálja a ROS keletkezését, amely oxidatív stresszt okozva károsíthatja a DNS-t, inaktíválhatja az enzimeket és lipid peroxidációt okozhat (Smirnoff és mtsai., 1993.). Só- és ozmotikus stresszt illetően a SA hatása néha ellentmondásos. Sóstressz alatt *Arabidopsis* növényekben a SA fokozta a ROS termelődését, ami által felerősödtek a károsodási tünetek (Borsani és mtsai, 2001.). Ugyanakkor számos irodalmat találunk arra vonatkozóan, hogy a külsőleg alkalmazott SA előkezelés kivédheti a sóstressz általi oxidatív károsodást. Növekedett sótoleranciát figyeltek meg SA előkezelés hatására búza csíranövényekben (Hamada és Al-Hakimi, 2001.), valamint paradicsomban, mely utóbbi esetében a sótolerancia kialakulásához hozzájárult bizonyos antioxidáns enzimek, úgy mint az APX, illetve az aldóz reduktáz aktivitásának növekedése, valamint az ozmotikumként fontos prolin akkumulációjának fokozódása (Tari és mtsai., 2002, 2004; Szepesi és mtsai., 2005.). Ezen megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a SA előkezelés közvetlenül, vagy közvetve befolyásolhatja az antioxidáns enzimek aktivitását, ily módon pedig a ROS akkumulációját, ezáltal pedig a sóstresszel szembeni akklimatizáció kialakulásának sikerességét. Mivel a sóstressz általi PCD a növények gyökerének 1 mm-es szegmentjében detektálható (Huh és mtsai., 2002.), ezért kísérleinkben ezen gyökérrégió ROS és NO tartalmának, valamint életképességének változását követtük nyomon az egyes kezelések hatására. A sóstressz fokozta a SOD és mérsékelte a KAT aktivitását, ami által irodalmi adatokkal megegyező módon jelentős mértékben indukálta a H_2O_2 keletkezését paradicsom növények levelében, valamint a ROS keletkezését gyökérben. A 10^{-4} M SA az előkezelés ideje alatt fokozta a ROS produkciót az apikális gyökérsejtekben. 100 mM-os sókitettség mellett azonban jelentősen csökkent a 10^{-4} M SA általi ROS akkumuláció gyökérben a sókezelt kontrollhoz képest. A NO produkcióban a priming alatt az SA előkezelt és a kontroll növények azonban nem különböztek egymástól. Megállapítható, hogy az edzettségi állapot kialakításában az NO önmagában nem játszik szerepet, viszont a ROS igen. Sóstressz hatására jelentősen fokozódott a NO produkció gyökérben, a ROS és NO nagymértékű akkumulációja pedig az apikális gyökérsejtek életképességének csökkenéséhez vezetett. Irodalmi adatokkal megegyező módon mindkét általunk alkalmazott SA előkezelés fokozta a SOD aktivitását, azonban gyökérben a KAT aktivitásának növelésével hozzájárult a sóindukált ROS hatékony

eliminálásához sóstressz alatt. A SA előkezelt növények gyökerében csökkent a NO produkció is a sókezelt kontrollhoz képest, amin keresztül pedig javult a gyökérsejtek életképessége.

6.3 A NO és ROS közötti interakciók tisztázása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok, mint modellrendszer segítségével: gyors hatás

Miután az intracelluláris ROS fontos szerepet játszik a sóstresszre adott növényi válaszokban (Leshem és mtsai., 2007.), és a sejten belüli ROS keletkezése gyakran abiotikus stresszfaktorokhoz is kötődik (Bi és mtsai., 2009.), érdekes volt annak felderítése, hogy vajon az intracelluláris ROS és NO szignifikánsan hozzájárulhat-e a sejtek vitalitásának csökkenéséhez, vagy éppen az akklimatizáció kialakulásához különböző stresszorok hatására. Mivel paradicsom növényekkel végzett kísérleteink során az SA előkezelések közül a 10^{-3} M SA, illetve a 100 mM-os sókitettség csökkentette, míg a 10^{-7} M és 10^{-4} M SA sóstressz alatt a kontrollhoz hasonlóvá tette a gyökérsejtek vitalitását, befolyásolva ROS és NO produkcióját, megnéztük, hogy az egyes kezelések miképp módosítják ezen paramétereket mezofill protoplasztok esetében. Mivel a ROS egyik forrása növényekben a PM lokalizált NADPH oxidáz (Mittler és mtsai., 2004.), és az irodalomban számos utalást találtunk arra vonatkozóan, hogy a NO és a ROS szabályozhatják egymás szöveti koncentrációját (Lum és mtsai., 2002.; She és mtsai., 2004; He és mtsai., 2005.) megnéztük, hogy az enzim gátlása miképpen befolyásolja a sejtek általi ROS produkciót és ez hogyan hat a NO akkumulációjára, valamint az életképesség alakulására. A NADPH oxidáz gátlására difenilén jodóniumot (DPI) használtunk. Irodalomból ismert, hogy a difenilén jodónium hatása, mely kovalensen tud kötődni a flavin tartalmú NADPH-oxidáz reakciócentrumához nem specifikus (O Donell és mtsai., 1993.). Kimutatták, hogy a DPI gátolhatja az állati szervezetekben a NO egyik forrásaként szolgáló enzimet, a nitrogén oxid szintázt (NOS) is, azonban jelenlegi tudomásunk szerint növényekben az állati NOS-sal homológ enzimet ezideáig nem azonosítottak. Megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA kezelés, illetve a sóstressz oxidatív robbanást okozva tartósan és nagymértékben megemelte mind a ROS, mind pedig a NO intracelluláris szintjét és ezzel egyidőben tartósan csökkentette a sejtek életképességét. Ugyanakkor a 10^{-3} M SA, illetve a 100 mM-os sókitettség NO és ROS tartalmat növelő és életképességet csökkentő hatása javítható volt a PM lokalizált NADPH oxidáz gátlásán keresztül. DPI hatására csökkent a sejtek ROS és NO szintje és javult az életképessége. A SA alacsonyabb koncentrációban csökkentette a sóindukált ROS és NO akkumulációt, aminek eredményeképpen a SA előkezelések hatására sóstressz alatt is a kontrollhoz hasonló maradt a

protoplasztok vitalitása. Mindez egyrészt összefügg az irodalomban tapasztaltakkal, miszerint a ROS és NO produkció sok esetben függhet a másik molekula szöveti koncentrációjától (Delledonne és mtsai., 1998.; Clarke és mtsai., 2000.), másrészt alátámasztja az intakt növényekkel végzett kísérleti eredményeinket. Az irodalomban számos utalást találunk arra vonatkozóan, hogy a növekedésszabályozó anyagok indukálhatják vagy a NO, vagy a ROS keletkezését, és intakt növényekkel végzett kísérleteink során bebizonyosodott, hogy egyes stresszfolyamatokban a növekedésszabályozó anyagok koncentrációjának változása hozzájárulhat az akklimatizáció, vagy éppen a sejthalál kialakulásához. Ezért a továbbiakban megnéztük, hogy az egyes növekedésszabályozó anyagok, miképpen befolyásolják a sejtek általi ROS és NO produkciót és mindez hogyan hat a protoplasztok életképességére. Az irodalomban számos ellentmondást találunk a poliaminok ROS akkumulációjára gyakorolt hatásával kapcsolatban. Ogata és mtsai. (1996.) kimutatták, hogy a Spd és a Spm növelte a sejtek H_2O_2 akkumulációját a NADPH oxidáz aktivitásának fokozásán keresztül. Ezzel ellentétben Papadakis és mtsai. (2005.) azt tapasztalták, hogy a poliaminok gátolták a NADPH oxidáz működését, ezáltal pedig csökkentették a ROS szintjét dohány növények mikroszóma frakciójában. Mások azt is kimutatták, hogy a Spd és a Spm gyors NO akkumulációt indukálhat növényi szövetekben (Yamasaki és mtsai., 2006.; Gaupels és mtsai., 2008.). A poliaminoknak fontos szerepük van a különböző abiotikus stresszorokkal, így pl. a sóstresszel szemben kialakuló akklimatizációban. Lebontásukat aminoxidázok végzik. Az apoplasztikus flavoprotein PAO a Spd és a Spm oxidálását végzi, mely folyamat eredményeképpen H_2O_2 keletkezik. Moschou és mtsai. (2008.) azt tapasztalták, hogy dohány növényekben, ahol az apoplasztikus PAO overexpresszált, sóstressz alatt növekedett a H_2O_2 koncentrációja, ami hozzájárult a PCD kialakulásához. Ugyanakkor PAO aktivitást az apoplaszton kívül más sejtkompartimentumban, nevezetesen gyökérsejtek peroxiszómájában is kimutattak (Kamada-Nbushada és mtsai., 2008.) Kísérleti rendszerünkben a Spd és a Spm növelte a ROS és NO szintet és szignifikánsan csökkentette az életképességet, ami a hosszú szénláncú poliaminok oxidációjára utalhat. Mindebből arra következtethetünk, hogy a PAO paradicsomban is lokalizálódhat belső sejtkompartimentumokban, így pl. a peroxiszómában, ami ily módon hozzájárulhat a ROS keletkezéséhez. A Put szintén növelte a NO akkumulációját, de kisebb mértékben, mint a Spm és nem csökkentette a protoplasztok életképességét. Ez összhangban van korábbi kísérleti eredményeinkkel, miszerint az akklimatizációt javító SA előkezelések a priming alatt a Put koncentrációját paradicsom növények levelében, míg a Spd és a Spm tartalmat gyökérben emelték meg. A mezofillum protoplasztok ebből a szempontból a levél reakcióját modellezzik.

Az ABS szintén indukálhatja a H_2O_2 keletkezését a NADPH oxidáz aktiválásán keresztül (Desikan és mtsai., 2004.) és fokozhatja a NO szintézisét is (Garcia-Mata és Lamattina, 2002.). Az etilén, mint növényi hormon fontos szerepet játszik a növények védekezési folyamataiban, ugyanakkor koncentrációtól függően részt vehet a PCD kialakításában is. Az etilén közvetlenül, vagy közvetve szintén befolyásolhatja a szövetek H_2O_2 , illetve NO produkcióját. De Jong és mtsai. (2002.) kimutatták, hogy az etilén közvetlen prekursora, az ACC növelte a H_2O_2 akkumulációt és csökkentette a sejtek életképességét paradicsom sejtuszuspenzióban. Yordanova és mtsai. (2010.) azt tapasztalták, hogy az etilén közreműködött a NO-dal a mastoparan által indukált sejthalál kialakításában zöld algában: az etilén stimulálta a NO produkciót és fordíva, a NO is indukálta az etilén szintézisét. Az irodalommal megegyező módon azt tapasztaltuk, hogy mind az ABS, mind az ACC növelte a protoplasztok ROS és NO produkcióját, azonban a NADPH oxidáz gátlószere csökkentette mindkét jelmolekula intracelluláris szintjét. Yesbergenova és mtsai. (2005.) kimutatták, hogy az ABS koncentrációtól függően növelheti a H_2O_2 -t produkáló aldehid oxidáz (AO) és a O_2^- - t generáló xantin dehidrogenáz aktivitását, ami ezáltal hozzájárulhat a citoplazmikus össz ROS szint növekedéséhez. Másfelől az ABS növelheti a ROS-kioltó enzimek, úgy mint a KAT, az APX, valamint a GR aktivitását, illetve expresszióját, hozzájárulva a ROS tartalom csökkenéséhez a sejtek citoplazmájában (Zhang és mtsai., 2006.). Megállapítottuk, hogy bár az ABS átmenetileg növelte a protoplasztok ROS és NO szintjét, és csökkentette a sejtek életképességét hosszú távon kisebb mértékű ROS produkciót eredményezett és javította az életképességet. Ezzel szemben az etilén bioszintézisben szerepet játszó ACC tartósan és nagymértékben növelte mind a ROS, mind pedig az NO intracelluláris akkumulációját, mindez pedig az életképesség tartós és jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett.

Kísérleti eredményeink alapján összességében megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációban csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát és oxidatív robbanást okoz, ami a ROS és NO szintjének együttes és nagymértékű növelésén keresztül a gyökérrendszer dezorganizációjához vezet. Ugyanakkor a SA alacsony koncentrációban (10^{-7} M és 10^{-4} M SA), hosszú távon alkalmazva javítja a fotoszintézis hatékonyságát sóstressz alatt, azonban az ozmotikus adaptáció kialakításához szükséges cukor akkumuláció csak a 10^{-4} M-os SA előkezelés esetében figyelhető meg gyökérben, amely koncentráció ily módon eredményesebben hozzájárulhat a sóstresszrel szembeni sikeres akklimatizáció kialakulásához. A 10^{-4} M SA előkezelés jelentősen csökkenti gyökérben a sóindukált etilénprodukciót is. A gyökér akklimatizációja tehát rendkívül fontos a sóstresszhez való alkalmazkodás folyamán. Sóstressz hatására fokozódik a H_2O_2 produkció levélben, az előkezelések azonban csökkentik

a levelek H_2O_2 tartalmát a sókezelt kontrollhoz képest. Önmagában a 10^{-4} M SA az előkezelés ideje alatt növeli a gyökerek apikális zónájának ROS produkcióját, azonban sóstressz alatt a sókezelt kontrollhoz képest kisebb ROS szintet eredményez. A gyökércsúcsban a 10^{-4} M SA hatására a kontrollhoz képest megmaradó kismértékű ROS fokozódás, az NO szint emelkedése nélkül, lehetővé teszi az oxidatív stresszhez való sikeres alkalmazkodást. Tehát a SA által indukált edzettségi állapot (eustressz) kialakításában a NO önmagában nem játszik szerepet, viszont a ROS igen, a kettő együtt pedig sejthalál kiváltásához vezet.

7. Összefoglalás

Kutatásom célja a jelen értekezésben közölt kísérletek elvégzésével az volt, hogy megállapítsam, milyen biokémiai és fiziológiai folyamatok húzódnak a széles koncentráció intervallumban alkalmazott SA előkezelések hátterében a „priming” alatt, valamint mi vezet a 10^{-4} M-os hosszútávú SA előkezelés sóstresszel szembeni rezisztenciájának fokozásához, illetve az ennél magasabb koncentrációk esetében a növényi szövetek elhalásához.

A témával kapcsolatban a következő eredmények születtek:

1. A SA előkezelés hatásai a „priming” alatt paradicsom növényben

1.1 A fotoszintetikus aktivitás szerepe az SA által indukált kémiai edzésben

Néhány fontos stresszmarker segítségével bebizonyítottuk, hogy a 10^{-3} M SA előkezelt növények fiziológiai paraméterei már az előkezelés kezdetén rosszabb értéket mutatnak a kontroll növényekénél. Csökkent a sztómakonduktancia, ami által gátlódott a CO_2 fixáció hatékonysága. Csökkent az összecukor mennyisége gyökérben, mely kompatibilis ozmotikum hiányában a gyökér vízfelvevő képessége csökkenhet és ozmotikus stressz történhet. Az SA alacsonyabb koncentrációinál (10^{-4} M és 10^{-7} M SA) azonban nem alakult ki különbség a fotoszintetikus pigmenttartalmakban, illetve a fotoszintézis primer fotokémiai folyamataiban (F_v/F_m , Φ_{PSII} , q_p , NPQ) sem a kontroll növényekhez képest. Bár az SA alacsonyabb koncentrációi szintén csökkentették átmenetileg a növények sztómakonduktanciáját, a 3 hetes előkezelés végére a 10^{-7} M-os, illetve a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt és a kontroll növények már sztómakonduktanciájukban sem különböztek egymástól. A 10^{-4} M SA már a „priming” ideje alatt megemelte az ozmotikus adaptáció kialakítása szempontjából fontos összecukor mennyiségét gyökérben, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult az ozmotikus adaptáció kialakításához.

1.2 Az etilén szerepe az akklimatizációban

A magasabb koncentrációk közül a 10^{-3} M SA már az előkezelés kezdetén extrém mértékben fokozta az etilénprodukción a növények gyökerében, ami a 10^{-2} M SA esetén gátlásba ment át. A jelentős etilénprodukción fokozódás hozzájárult a 10^{-3} M-os SA-val kezelt növények gyökérszöveteinek elhalásához, a 10^{-2} M-os SA kezelés esetében azonban a PCD kiváltása az etilénszint emelkedésétől függetlenül történt. Az alacsonyabb koncentrációk, különösen a 10^{-4} M SA, kismértékű emelkedést okoztak

az etilénszintézisben, hosszú távon azonban nem eredményeztek változást a növények levelének és gyökerének etilénprodukciónak a kontroll növényekéhez képest, a növény adaptálódott a változásokhoz. Az etilénszintézis kismértékű és átmeneti növekedése szükséges feltétele lehet a későbbi akklimatizáció kialakulásának.

1.3 A poliaminok akkumulációja az előkezelés alatt

A SA magasabb koncentrációi közül a 10^{-3} M és a 10^{-2} M SA különböző módon fejtette ki hatását a növekedésszabályozó anyagok szintézisére. A 10^{-2} M SA mintegy ötszörösére emelte a Put és mintegy húszötszörösére a Spm koncentrációját és ezzel egyidőben jelentősen mérsékelte az etilén szintézisét a növények levelében. Megállapítottuk, hogy a poliaminok akkumulációja a gyors szöveti dezorganizációt eredményező 10^{-2} M-os SA előkezelések esetén is megtörténik. A 10^{-3} M-os SA nagymértékben és tartósan fokozta az etilénprodukciónak, mellyel párhuzamosan jelentős mértékben növelte a Put és a Spd akkumulációját is a növények gyökerében. Megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA előkezelés a poliaminok és az etilén bioszintézisének együttes indukálásán, és az ennek eredményeképpen keletkező növekedésszabályozó anyagok gyors és nagymértékű akkumulációján keresztül fokozhatja az oxidatív stresszt, ami a gyökérszövetek elhalásához vezethet. Ezzel szemben az SA alacsonyabb koncentrációi közül a 10^{-4} M SA az etilénszintézis átmeneti és kismértékű fokozásával, valamint a Put koncentrációjának növelésével levélben, a Spd és a Spm akkumulációjának fokozásával gyökérben a halofita növényekre jellemző spektrumot alakított ki.

1.4 ROS, vagy NO, esetleg mindkettő

Megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációi (10^{-3} M és 10^{-2} M SA) már az előkezelés kezdetén csökkentették a O_2^- produkciót, ugyanakkor jelentős mértékben fokozták a SOD és csökkentették a KAT aktivitását, ami levélben nagymértékű és tartós H_2O_2 , gyökérben pedig ROS akkumulációhoz vezetett. Mindkét magas koncentrációban alkalmazott kezelés a ROS szintek fokozásával egyidőben jelentős mértékű NO akkumulációt okozott az apikális gyökérszövetekben. A NO és a ROS szintek együttes és jelentős mértékű megemelkedése pedig az apikális gyökérsejtek vitalitásának csökkenéséhez, végül pedig sejthalálhoz vezetett. Hosszú távon gyökérben nem emelkedett meg 10^{-4} M-nál a SOD aktivitás, de ehhez a KAT aktivitás jelentős gátlása is társult, ami hozzájárulhatott a gyökércsúcsok emelkedett ROS

szintjéhez. A NO produkcióban azonban a kontroll és a 10^{-4} M SA-val előkezelt növények az edződés végére nem különböztek egymástól. A ROS mérsékelt megemelkedése önmagában nem csökkentette a gyökérsejtek életképességét, éppen ellenkezőleg, növelte a növény antioxidáns kapacitását, ami által hozzájárult a védelmi mechanizmusok aktiválódásához.

2. A SA előkezelés sóstresszel szembeni akklimatizációt fokozó biokémiai mechanizmusai paradicsom növényben

2.1 A fotoszintetikus aktivitás változása SA előkezelt paradicsom növényekben sóstressz alatt

A sóstressz erőteljes sztómazáródást okozott, melynek eredményeképpen csökkent a CO_2 fixáció hatékonysága, a klorofill *a*, a klorofill *b*, a karotinoidok és az antocianin mennyisége és gátlódtak a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatai (Φ_{PSII} , *qP*). Ezzel szemben sóstressz alatt mindkét SA előkezelés, de különösen a 10^{-4} M-os SA hatására a növények sztómakonduktanciája a sókezelt kontrollhoz képest nagyobb volt, ami ily módon hatékonyabb CO_2 fixációt eredményezett. 10^{-4} M SA előkezelés hatására növekedett a maximális CO_2 asszimiláció mértéke (A_{max}), valamint a karboxiláció hatékonysága (CE), mely a CO_2 fixáció hatékonyságának fokozásához vezetett. A SA előkezelés mindkét koncentrációnál, de különösen 10^{-4} M-nál növelte a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét és javította a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatait (Φ_{PSII} , *qP*) is a sókezelt kontrollhoz képest. A 10^{-7} M-os SA a sókezelt kontroll növényekhez hasonlóan nem változtatta gyökérben az össz cukortartalmat, a 10^{-4} M-os SA előkezelés azonban ezzel szemben növelte azt, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult a sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ozmotikus adaptáció kialakításához.

2.2 Az etilénprodukciónak változása az SA előkezelt növényekben sóstressz alatt

Sóstressz hatására fokozódott az etilén szintézise a növények levelében, azonban az SA előkezelések, különösen a 10^{-4} M-os mérsékelte azt 100 mM-os sóitethettség alatt. Gyökérben az SA előkezelések közül a 10^{-4} M-os SA önmagában is mérsékelte az előkezelés végére az etilénprodukciónak, ami sóstressz alatt ezen SA előkezelés esetében további csökkenést mutatott. Megállapítottuk, hogy a 10^{-4} M-os SA előkezelés az etilénprodukciónak mérséklésével sóstressz alatt hozzájárult a sikeres akklimatizáció kialakulásához.

2.3 A ROS és NO produkció szerepe a sóstressz akklimatizációban

A sóstressz fokozta a SOD és mérsékelte a KAT aktivitását, növelve a H_2O_2 akkumulációját levélben, valamint a ROS keletkezését gyökérben. Sóstressz hatására jelentősen fokozódott a NO produkció is gyökérben, a ROS és NO nagymértékű akkumulációja pedig az apikális gyökérsejtek életképességének csökkenéséhez vezetett. A sóstressz az SA előkezelt levelekben is fokozta a SOD aktivitását, gyökérben azonban a KAT aktivitásának növelésével hozzájárult a só indukálta ROS hatékony eliminálásához. Sóstressz alatt a SA előkezelt növények gyökerében csökkent a NO produkció is a sókezelt kontrollhoz képest, amin keresztül pedig javult az apikális gyökérsejtek életképessége.

3. A NO és ROS közötti interakciók tisztázása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok, mint modellrendszer segítségével: gyors hatás

Protoplasztokon végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA kezelés, illetve a sóstressz oxidatív robbanást okozva tartósan és nagymértékben megemelte mind a ROS, mind pedig a NO intracelluláris szintjét, ami a sejtek életképességének jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett. Ugyanakkor a 10^{-3} M SA, illetve a 100 mM-os sókitettség NO és ROS tartalmat növelő és életképességet csökkentő hatása javítható volt a PM lokalizált NADPH oxidáz gátlásán keresztül. DPI hatására csökkent a sejtek ROS és NO szintje és javult az életképessége. A SA alacsonyabb koncentrációban csökkentette a sóindukált ROS és NO akkumulációt, aminek eredményeképpen a SA előkezelések hatására sóstressz alatt is a kontrollhoz hasonló maradt a protoplasztok életképessége. Mivel intakt növényekkel végzett kísérleteink során bebizonyosodott, hogy egyes stresszfolyamatokban a növekedésszabályozó anyagok koncentrációjának változása hozzájárulhat az akklimatizáció, vagy éppen a sejthalál kialakulásához, a továbbiakban megnéztük, hogy a különböző növekedésszabályozó anyagok hogyan befolyásolják a sejtek általi ROS és NO produkciót és mindez hogyan hat a protoplasztok életképességére. Kísérleti rendszerünkben a Spd és a Spm növelte a ROS és NO szintet és szignifikánsan csökkentette az életképességet, ami utalhat arra, hogy a hosszú szénláncú poliaminokat oxidáló, H_2O_2 -t generáló poliamin oxidáz a paradicsomban is lokalizálódhat a belső sejtkompartumokban, így pl. a peroxiszómában, ami protoplasztok esetén is hozzájárulhat a ROS-ok keletkezéséhez. A Put szintén növelte a NO akkumulációját,

de kisebb mértékben, mint a Spm, illetve a Spd és nem csökkentette a protoplasztok életképességét sem. Ez összhangban van korábbi kísérleti eredményeinkkel, miszerint az akklimatizációt javító SA előkezelések a „priming” alatt a Put koncentrációját paradicsom növények levelében, míg a Spd és a Spm tartalmat gyökérben emelték meg. A mezofillum protoplasztok ebből a szempontból a levél reakcióját modellezzik. A sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ABS a putreszcinhez hasonlóan átmenetileg növelte a ROS-ok és a NO szintjét és csökkentette az életképességet, hosszú távon azonban kisebb mértékű ROS produkciót eredményezett és javította az életképességet. Ezzel szemben az etilén bioszintézisében szerepet játszó, sejthalál kialakításában részt vevő ACC tartósan és nagymértékben fokozta a protoplasztok ROS és NO akkumulációját, mindez pedig az életképesség tartós és jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett.

Kísérleti eredményeink alapján összességében megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációban csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát és oxidatív robbanást okoz, ami a ROS és NO szintjének együttes és nagymértékű növelésén keresztül a gyökérrendszer dezorganizációjához vezet. Ugyanakkor a SA alacsonyabb koncentrációban (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) hosszú távon alkalmazva javítja a fotoszintézis hatékonyságát sóstressz alatt. A 10^{-4} M SA hosszú távon alkalmazva már a „priming” alatt az összcukor mennyiségének növelésével gyökérben hozzájárul az ozmotikus adaptáció kialakításához, mérsékli a növények etilénprodukciónak és a halofita növényekre jellemző poliamin spektrumot alakít ki, ami 100 mM-os sókitettség mellett hozzájárul a sikeres akklimatizáció kialakulásához.

Önmagában a 10^{-4} M SA az előkezelés ideje alatt növeli a gyökerek apikális zónájának ROS produkcióját, azonban sóstressz alatt a sókezelt kontrollhoz képest kisebb ROS szintet eredményez. A gyökércsúcsban a 10^{-4} M SA hatására a kontrollhoz képest megmaradó kismértékű ROS fokozódás, a NO szint emelkedése nélkül, lehetővé teszi az oxidatív stresszhez való sikeres alkalmazkodást. Tehát a SA által indukált edzettségi állapot (eustressz) kialakításában a NO önmagában nem játszik szerepet, viszont a ROS igen, a kettő együtt pedig sejthalál kiváltásához vezet.

8. Summary

Our aim was to investigate the changes in the biochemical and physiological parameters of tomato plants treated with SA during pre-adaptation period. We were also interested in how 10^{-4} M SA pre-treatment can induced tolerance to salt stress and how 10^{-3} and 10^{-2} M SA pre-treatment resulted in a decrease in the viability of the plants.

Our results can be summarized as follows:

1. Effect of SA pre-treatment on tomato plants during „priming”

1.1. Role of photosynthetic activity in the SA induced hardening process

SA applied at 10^{-3} M concentration decreased the stomatal conductance and resulted in a reduction of photosynthetic activity. Total sugar content in roots treated with 10^{-3} M SA was significantly reduced and in the absence of osmotically active carbohydrates the water retaining capacity of tissues declined. Lower concentrations of SA did not cause any difference in the contents of photosynthetic pigments, and in the primary photochemical processes of photosynthesis (F_v/F_m , Φ_{PSII} , q_p) compared to the control plants. Although lower concentrations of SA decreased stomatal conductance at the beginning of pre-treatment, after 3-week-long pre-incubation stomatal conductance of SA treated leaves did not differ significantly from those of control plants. Pre-treatment with 10^{-4} M SA enhanced total sugar content of root tissues during the „priming” suggesting that sugar accumulation contributed to the osmotic adaptation in the root tissues of 10^{-4} M SA-treated plants.

1.2. Effect of ethylene in the acclimation

10^{-3} M SA caused considerable increase in ethylene production of tomato roots but the ethylene synthesis was inhibited by 10^{-2} M SA. Significant enhancement in ethylene production could lead to the death of root tissues at 10^{-3} M SA treatment. SA applied at 10^{-2} M, triggered the cell death, but in this case the PCD did not depend on the ethylene production. Lower concentrations of SA caused a moderate ethylene production of the leaves, however, after three weeks 10^{-4} M SA did not result in change of the ethylene production of root and shoot tissues compared to the control.

1.3. Accumulation of polyamines during pre-treatment

Higher concentrations of SA (10^{-3} M and 10^{-2} M SA) affect the synthesis of growth-regulating compounds differently. In 10^{-2} M SA treated plants putrescine (Put) content was 5-fold greater and spermine (Spm) was 25-fold greater than in control plants. 10^{-2} M SA also diminished the ethylene production of leaf tissues. We can state that accumulation of polyamines also occurred at 10^{-2} M SA treatment .

10^{-3} M SA significantly enhanced the ethylene production and the accumulation of Put and Spd in root tissues. We can conclude that 10^{-3} M SA treatment induced the biosynthesis of polyamines and ethylene and this could result in a fast and considerable accumulation of reactive oxygen species causing oxidative stress. In contrast with higher concentrations of SA, 10^{-4} M SA induced a transient increase in ethylene production and enhanced the concentration of Put in the leaves and Spd and Spm in the roots resulting a polyamine spectrum which characterizes halophytes.

1.4. ROS or NO, or both

It was demonstrated that higher concentrations of SA (10^{-3} M and 10^{-2} M) decreased $O_2^{\cdot -}$ level and considerably increased the activity of SOD and inhibited the activity of CAT resulting in high levels of H_2O_2 in the leaves and the accumulation of ROS in the roots. Both of 10^{-3} M and 10^{-2} M SA concentrations could induce significant increase in NO production in the apical root tissues. Enhancement of ROS and NO production of root apices caused a fast decrease in the cell viability. In root tissues 10^{-4} M SA did not increase SOD and inhibited CAT activity and enhanced ROS production in root apices. However, there were no differences in NO production between control and 10^{-4} M SA pre-treated plants during the hardening process. The small increases in ROS accumulation in root apices did not decrease the viability, on the contrary, it increased the antioxidant capacity of the plants and induced the defense mechanisms.

2. Improvement of salt stress acclimation by SA pre-treatment

2.1. Changes in photosynthetic activity in SA pre-treated plants during salt stress

Decrease in stomatal conductance was considerable after exposure to 100 mM NaCl in tomato. Salt stress reduced the CO_2 assimilation rate, the contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids and anthocyanin of tissues. The primary photochemical processes of photosynthesis (Φ_{PSII} , qp) of control plants also declined after exposure to high salinity. In contrast with untreated plants, 10^{-7} and 10^{-4} M, increased stomatal

conductance and photosynthetic activity during salt stress. 10^{-4} M SA pre-treatment enhanced maximal CO_2 assimilation rate (A_{max}) and carboxylation efficiency (CE) resulting in more efficient CO_2 fixation. Lower concentrations of SA, (e. g. 10^{-4} M) increased the content of photosynthetic pigments and improved the primary photochemical processes of photosynthesis (Φ_{PSII} , q_p) compared to the salt stressed control.

In control and 10^{-7} M SA pre-treated roots, total sugar content did not decline during 100 mM NaCl exposure, however, in the roots of 10^{-4} M SA pre-treated plants an enhanced sugar content could be detected under high salinity. Increase in soluble sugars of root under salt stress could contribute to the osmotic adaptation resulting successful acclimation during salt stress condition.

2.2.Changes in ethylene production of SA pre-treated plants during salt stress

Salt stress enhanced the ethylene synthesis of the leaves, however SA pre-treatments, mainly 10^{-4} M decreased the ethylene production during 100 mM NaCl exposure. In root tissues, 10^{-4} M SA decreased the ethylene emanation after 3 weeks of pre-treatment. During salt stress 10^{-4} M SA reduced further the ethylene synthesis contributing to a successful acclimation.

2.3.Role of ROS and NO production in salt stress acclimation

Salt stress enhanced SOD and diminished CAT activity inducing a high level of H_2O_2 in the leaf tissues and the generation of ROS in root apices. Salt stress significantly induced the production of NO in root tissues. A high amount of ROS (H_2O_2) and NO considerably decreased the viability of root cells. SA pre-treatments also increased SOD activity in leaves during 100 mM NaCl exposure, but increased CAT activity in roots contributing to the elimination of salt stress inducing ROS (H_2O_2). During salt stress the level of NO and ROS decreased in the roots of SA pre-treated plants compared to the salt stressed controls improving the vitality of root cells.

3. Interaction between ROS and NO in mesophyll protoplasts

Both 10^{-3} M SA and 100 mM NaCl considerably increased the intracellular ROS and NO levels of the protoplasts and caused oxidative damage. Viability of the protoplasts decreased in response to 10^{-3} M SA treatment and salt stress, respectively, in parallel with high intracellular production of NO and ROS, which were effectively blocked by

DPI, an inhibitor of NADPH oxidase. Salt stress induced ROS and NO were prevented in the presence of 10^{-7} M and 10^{-4} M SA and viability did not change significantly compared to control protoplasts. In intact tomato plants we could demonstrate that changes in the concentrations of different growth-regulating compounds can contribute to successful acclimation or to cell death. To investigate the effect of these compounds on ROS and NO production and cell viability we used protoplasts as a model system. Spd and Spm enhanced the levels of ROS and NO and caused a significant decrease in the viability of the cells. This suggests that polyamines may increase ROS production not only in the apoplast, though the activity of apoplastic polyamine oxidase (PAO), but also intracellularly. PAO may be localized in different compartments inside in the cells, for example in peroxisome, and these compartments could contribute to the generation of ROS. Put also increased the accumulation of NO, but it was smaller compared to the effects of Spm and Spd and did not decrease the viability of protoplasts. These results correspond with our earlier findings observed in plant tissues. ABA is a very important stress hormone that controls the acclimation to high salinity. ABA enhanced both ROS and NO levels and decreased the viability in 2.5 hours however, after 5 hours of incubation ABA reduced ROS production and improved the cell viability. In contrast with ABA, ACC, the immediate precursor of ethylene significantly increased the accumulation of ROS and NO causing a significant decrease in the cell viability.

Summarizing the results, we can conclude that higher concentrations of SA could decrease the efficiency of photosynthesis and cause oxidative damage. Both the levels of ROS and NO considerably increased by 10^{-3} and 10^{-2} M SA and resulted in desorganization of the root system. However 10^{-4} M SA could improve the efficiency of photosynthesis during salt stress. 10^{-4} M SA using in long term experiments, could increase total sugar content in the roots contributing to the osmotic adaptation, could decrease the ethylene production and could modify the polyamine spectrum during the "priming". 10^{-4} M SA during the hardening process could enhance the ROS production of root apices. However during salt stress decreased ROS levels can be observed compared to the salt stressed control root tissues. In 10^{-4} M SA pre-treated root apices ROS production could contribute to a successful acclimation to oxidative stress, however NO was not involved in SA induced priming. At 10^{-3} and 10^{-2} M SA application parallel accumulation of ROS and NO caused the death of cells.

9. Függelék

9. 1 Irodalomjegyzék

Abdullah, Z., Ahmed, R.: Effect of pre and post kinetin treatment on salt tolerance of different potato cultivars growing on saline soils.- J. Agron. Crop Sci. 165: 94-102. 1990.

Adams, D.O. és Yang, S.F.: Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 170-174. 1979.

Amtmann, A., Sanders, D.: Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. – Adv. Bot. Res. 29: 75-112, 1999.

Ananieva, A.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P.: Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. – J. Plant Physiol. 159: 685-693, 2002.

Ananieva, E.A., Christov, K.N., Popova, L.P.: Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. – J. Plant Physiol. 161: 319-328, 2004.

Anderson, L.S., Mansfield, T.A.: Effect of nitric-oxide pollution on the growth of tomato. – Environmental Pollution 20: 113-121. 1979.

Anderson, M.D., Chen, Z., Klessig, D.F.: Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. Phytochemistry 47: 555–566. 1998.

Ashraf, M., Harris, P.J.C.: Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. – Plant Science 166: 3-16. 2004.

Barkosky, R.R., Einhellig, F.A.: Effects of salicylic-acid on plant water relationships. – J. Chem. Soc. 19: 237-247. 1993.

Baziramakenga, R., Simard, R.R., Leroux, G.D.: Effects of benzoic and cinnamic-acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. – J. Chem. Ecol. 20: 2821-2833. 1994.

Bezrukova, M.V., Sakhabutdinova, R., Fatkhutdinova, R.A., Kyldiarova, I., Shakirova, F.: The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. – *Agrochemiya (Russ)* 2: 51-54, 2001.

Bi, Y.H., Chen, W.L., Zhang, W.N., Zhou, Q., Yun, L.J., Xing, D.: Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. – *Biol Cell* 101: 629-643. 2009.

Bilger, W., Schreiber, U.: Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves.- *Photosynthesis Research* 10: 303-308. 1986.

Bilger, W., Björkman, O.: Role of the xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*.- *Photosynthesis Research* 25: 173-185. 1990.

Bors, N., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann, H.: Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone injury. – *Phytochemistry* 28: 1589-1595. 1989.

Borsani, O., Valpuestan, V., Botella, M.A.: Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings.- *Plant Physiol.* 126: 1024-1030. 2001.

Bourbouloux, A., Raymond, P., Delrot, S.: Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. – *J. Exp. Bot.* 49: 239-247, 1998.

Boyer, J.S.: Water deficits and photosynthesis.- In: Kozlowsky, T.T. (ed.): *Water deficit and Plant Growth*. Vol. IV. Pp. 153-190. Academic Press, New York- San Francisco-London. 1976.

Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. and Neill, S.J.: ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. - *Plant J.* 45: 113-122, 2006.

Brodersen, C., Lavergne, S., Molofsky, J.: Genetic variation in photosynthetic characteristics among invasive and native populations of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*).- *Biological Invasions* 10: 1317-1325. 2008.

Brugnoli, E., Björkman, O.: Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy.- *Planta* 187:335-347. 1992.

von Caemmerer, S., Farquhar, G.D.: Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves.- *Planta* 153: 376-387. 1981.

Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H.Jr., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W.: Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5818-5823. 1998.

Chen, H.Y, Zhang, J.H, Zhuang, T.M.: Evaluation of salt tolerance of the wild tomato species and its utilization. - *East China Univ. Sci. Technol.* 271: 51-55, (kínaiul, angol nyelvű ábrákkal és ábrafeliratokkal) 2001.

Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., Neill, S.J.: NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 24: 667-677. 2000.

Conrath, U., Chen, Z.X., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. :Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7143–7147. 1995.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.: Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.- *Cell Mol. Life Sci.* 57:779-795. 2000.

De Jong, A.J., Yakimova, E.T., Kapcina, V.M., Woltering, E.J.: A critical role of ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. – *Planta* 214: 537-545. 2002.

Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.: Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. – *Nature* 394: 585-588. 1998.

Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C.: Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13454-13459. 2001.

del Río, L.A., Corpas, F.J., Scandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., Barroso, J.B.: Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. – J Exp Bot 53:1255-1272. 2002.

Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Barroso, J.B.: Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants.- Phytochemistry 65: 783-792. 2004.

Desikan, R., Mackerness, S.A.H., Hancock, J.T., Neill, S.J.: Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. – Plant Physiol. 127: 159-172. 2001.

Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J.: ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. – J Exp Bot 55: 205-212. 2004.

Dhindsa, R.S., Plumb, K., Dhindsa, P., Thorpe, T.A.: Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. – J. Exp. Bot. 32: 93-101. 1981.

Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S.: Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance.- J. Plant Physiol. 157: 54-58. 2000.

Downs, C.G., and Lovell, P.H.: The effect of spermidine and putrescine on the senescence of cut carnations.- Plant Physiol. 66: 679-684. 1986.

Dubois, M., Gibbs, K.A, Hamilton, J.K., Roberts, D.A., Smith F.: Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. - Anal. Chem. 28: 350-352, 1956.

Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F.: Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10328-10333. 1998.

Enyedi, A.J.: Induction of salicylic acid biosynthesis and systemic acquired resistance using the active oxygen species generator rose bengal.-J. Plant Physiol. 154: 106-112. 1999.

Etani, S., Yoshida, S.: Reversible and irreversible reduction of ACC-dependent ethylene formation in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) hypocotyls caused by chilling.- Plant Cell Physiol. 28: 83-91. 1987.

Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A.: Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*.- *Photosynthetica* 41: 281-284. 2003.

Finkelstein, R.R., Rock, C.D.: Absciscic acid biosynthesis and response.- In *The Arabidopsis Book*, eds: American Society of Plant Biologists, pp: 1-48. 2002.

Flores, H.E., Galston, A.W.: Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. - *Plant Physiol.* 69: 701-706. 1982.

Flowers, T.J., Yeo, A.R.: Breeding for salt resistance in plants. In: Jaiwal, P.K., Singh, R.P., Gulati, A. (Eds) *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*. Oxford and IBH, New Delhi, pp. 247-264. 1997.a.

Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R.: The mechanism of salt tolerance in halophytes. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 28: 89-121. 1997.b.

Foyer, C.H., Noctor, G.: Oxidant and antioxidant signaling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. – *Plant Cell Environ* 28: 1056-1071. 2005.

Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Biology of disease. Free radicals and tissue injury.- *Lab. Invest* 47(5): 412-426. 1982.

Fridovich, I.: Superoxide radical: An endogenous toxicant.- *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257. 1983.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.: Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance.- *Science* 261: 754-756. 1993.

Garcia-Mata, C., Lamattina, L.: Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. – *Plant Physiol* 128: 790-792. 2002.

Gaupels, F., Furch, A.C.U., Will, T., Mur, L.A.J., Kogel, K.H., van Bel, A.J.E.: Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals. *New Phytol* 178: 634-646. 2008.

Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C.: Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death.- *BioEssays* 28: 1091-1101. 2006.

Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R.: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.- *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92. 1989.

Gonuguta, V.K., Srivastava, N., Puli, M.R., Raghavendra, A.S.: Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalization during stomatal closure induced by abscisic acid. – *Plant Cell Environ* 31: 1717-1724. 2008.

Guo, H. and Ecker, J.R.: The ethylene signaling pathway: new insights.- *Plant Biol.* 7: 40-49. 2004.

Guo, P., Cao, Y., Li, Z., Zhao, B.: Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. – *Plant, Cell & Environment* 27: 473-477. 2004.

Guóth, A., Tari, I., Gallé, Á., Csiszár, J., Pécsváradi, A., Cseuz, L., Erdei, L.: Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels and grain yield.- *J. Plant Growth Reg.* 28: 167-176. 2009.

Hajar, A.S., Zidan, M.A., Al-Zahrani, H.S.: Effect of salinity stress on the germination, growth, and some physiological activities of black cumin (*Nigella sativa* L.).- *Arab Gulf J. Sci. Res.* 14: 445-454. 1996.

Hamada, A.M., El-Enany, A.E.: Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants.- *Biol. Plant.* 36: 75-81. 1994.

Hamada, A.M., Al-Hakimi, A.M.A.: Salicylic acid versus salinity-drought induced stress on wheat seedlings.- *Rostl. Vyr.* 47: 444-450. 2001.

Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B. and Blatt, M.R.: Ca^{2+} channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid.- *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4967-4972. 2000.

Hansen, H. and Grossmann, K.: Auxin induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition.- *Plant Physiol.* 124(3): 1437-1448. 2000.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J-K., Bohnert, H.J.: Plant cellular and molecular responses to high salinity. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-49. 2000.

He, J.M., Xu, H., She, X.P., Song, X.G., Zhao, W.M.: The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. – *Functional Plant Biology* 32: 237-247. 2005.

Heath, R.L., Parker, L.: Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. – *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198. 1968.

Hong, S. J. and Lee, S. K.: Changes in endogenous putrescine and the relationship to the ripening of tomato fruits. *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* 37: 369-373. 1996.

Horváth, E., Janda, T., Szalai, G., Páldi, E.: *In vitro* salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isoenzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. – *Plant Sci.* 163: 1129-1135. 2002.

Hu, X., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, A., Lin, F., Tan, M.: Calcium-calmodulin is required for abscisic acid induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. – *New Phytol* 173: 27-38. 2007.

Huang, X., von Rad, U., Durner, J.: Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells.- *Planta* 215: 914-923. 2002.

Huh, G-H., Dansz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.: Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. – *Plant J* 29: 649-659. 2002.

Irwing, H.R., Gehring, C.A. and Parish, R.W.: Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements.- *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1790-1794. 1992.

Ishikawa, S., Wagatsuma, T.: Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. – *Plant Cell Physiol* 39: 516-525. 1998.

Janda T., Szalai G., Tari, I. and Páldi, E.: Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) - *Planta* 208: 175-180. 1999.

Janowiak, F., Dörffling, K.: Chilling-induced changes in the contents of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and its N-malonyl conjugate (MACC) in seedlings of two maize inbreds differing in chilling tolerance.- *J. Plant Physiol.* 147: 257-262. 1995.

Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz, O.A., Rodríguez-Kessler, M.: Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress.- *Plant Physiol. Biochem.* 45:812-821. 2007.

Jones, C.A.: *Grasses and Cereals*.- John Wiley and Sons, New York 1985.

Juan, M., Rivero, R.M., Romero, L., Ruiz, J.M.: Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. – *Environ. Exp. Bot.*, 54: 193-201. 2005.

Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., Nishimura, M.: A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*.-*Plant Cell Physiol.* 49: 1272-1282. 2008.

Kato, Y., Hasegawa, T. and Fujii, T.: Effect of 1-aminocyclopropane-1carboxylic acid production on the changes in the polyamine levels in Hiproly barley callus after auxin withdrawal.- *Agric. Biol. Chem.* 51: 2457-2463. 1987.

Kao, W.Y., Tsai, T.T., Shih, C.N.: Photosynthetic gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of three wild soybean species in response to NaCl treatments.- *Photosynthetica* 41: 415-419. 2003.

Kaydan, D., Yagmur, M., Okut, N.: Effects of Salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi* 13(2): 114-119. 2007.

Kim, T.E., Kim, S-K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C.: ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). - *Physiol Plant* 115: 370-376. 2002.

Kirst, G.O.: Salinity tolerance of eukaryotic marine algae.- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 40: 21-53. 1989.

Klepper, L.A.: Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. – WSSA Abstracts 184: 70. 1975.

Knörzer, O.C., Lederer, B., Durner, J., Böger, P.: Antioxidative defense activation in soybean cells. – *Physiol Plant* 107: 294-302. 1999.

Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T.: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators, diaminofluoresceins. – *Anal Chem.* 70: 2446-2453. 1998.

Kolbert, Zs., Bartha, B., Erdei, L.: Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generations are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum* L. – *Physiol Plant* 133: 406-416. 2008.

Köves, E., Nagy, M.: *Növényélettant: A növények növekedése és fejlődése.*- JATEpress, Szeged. 1997.

Kulshreshtha, S., Mishra, D.P., Gupta, R.K.: Changes in contents of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplasts and chloroplast membrane fractions at different water potential in drought resistant and sensitive genotypes of wheat.- *Photosynthetica* 21: 65-70. 1987.

Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., Schroeder, J.I.: NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. – *EMBO J* 22: 2623-2633. 2003.

Laloi, C., Apel, K., Danon, A.: Reactive oxygen signalling: the latest news.- *Curr opin Plant Biol.* 7: 323-328. 2004.

Láng Ferenc: *Növényélettant. A növényi anyagcsere.*-ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. 1998.

Lapina, L.P., Popov, B.A.: Effect of sodium chloride on photosynthetic apparatus of tomatoes. *Fiziol. Rast.* 17: 580-584. 1970.

Larkindale, J., Knight, M.: Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. – *Plant Physiol.* 128: 682-695. 2002.

Lee, M. M., Lee, S. H. and Park, K. J. Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. - *J. Plant. Physiol.* 151: 68-73. 1997.

León, J., Lawton, M.A., Raskin, I.: Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco.- *Plant Physiol.* 108: 1673-1678. 1995

Leshem, Y.Y., Haramaty, E.: The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. – *J Plant Physiol* 148: 258-263. 1996.

Leshem, Y.Y., Pinchasov, Y.: Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). – *J Exp Bot* 51: 1471-1473. 2000.

Leshem, Y.: Nitric oxide in plants. London, UK: Kluwer Academic Publishers 2001.

Leshem, Y., Seri, L., Levin, A.: Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* 51: 185-197. 2007.

Leslie, C.A., Romani, R.J.: Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid.- *Plant Physiol.* 88: 833-837. 1988.

Leung, J., Giraudat, J.: Absciscic acid signal transduction.- *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222. 1998.

Lichtenthaler, H.K.: Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants.– *J. Plant Physiol.* 148: 4 -14, 1996.

Lin, C.C., Kao, C.H.: Levels of endogenous polyamines and NaCl inhibited growth of rice seedlings. -*Plant Growth Regul* 17: 15-20. 1995.

Lin, J., Wang, Y., Wang, G.: Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status, *J. Plant Physiol.* 163: 731-739. 2006

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632. 1993.

Lovelock, C.E., Ball, M.C.: Influence of salinity on photosynthesis of halophytes, In: Lauchli, A., Lüttge, U. (2002): Salinity: Environment – Plants – Molecules, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 315-339. 2002.

Lum, H.K., Butt, Y.K.C., Lo, S.C.L.: Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). Nitric Oxide: Biology and Chemistry 6:205-213. 2002.

Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J.: Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities, Plant Sci. 161: 125-132. 2001.

Ma, S., Gong, Q., Bohnert, H.J.: Dissecting salt stress pathways. – J. Exp. Bot. 57: 1097-1107. 2006.

Maathuis, F.J.M., Amtmann, A.: K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. – Ann. Bot. 84: 123-133. 1999.

Macháčková, I., Hanišová, A., Krekule, J.: Levels of ethylene, ACC, MACC, ABA and proline as indicators of cold hardening and frost resistance in winter wheat.- Physiol. Plant 76: 603-607. 1989.

Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D.: Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. – Physiology and Molecular Biology of Plants 6: 117-127. 2000.

Manthe, B., Schulz, M., Schnabl, H.: Effects of salicylic-acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.. Evidence for salicylic-acid metabolization. – J. Chem. Ecol. 18: 1525-1539. 1992.

Martin-Tanguy, J., Sun, L.Y., Burtin, D., Vernoy, R., Rossin, N., Tepfer, D.: Attenuation of the phenotype caused by root-inducing, left-hand, transferred DNA and its rolA gene. Correlation with changes in polyamine metabolism and DNA methylation. – Physiol Plant 111: 259-267. 1996.

Mishra, A., Choudhuri, M.A.: Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration in rice. – Biol. Plant. 42: 409-415. 1999.

Misra, A.N., Sahu, S.M., Mishra, M., Singh, P., Meera, I., Das, N., Kar, M., Sahu, P.: Sodium Chloride induced changes in leaf growth and pigment and protein contents in two rice cultivars.- Biol. Plant. 39: 257-262. 1997.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.: Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9: 490-498. 2004.

Mittova, V., Theodoulou, F.L., Kiddle, G., Volokita, M., Tal, M., Foyer, C.H., Guy, M.: Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. – Plant Cell Environ 27: 237-250. 2004.

Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., Salgado, I.: Nitric oxide synthase- mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* elicitor.- Plant Physiol. 130: 1288-1297. 2002.

Moheraker, S.T., Lokhande, S.D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A., Chavan, P.D.: Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotinoid contents of wheat and moong seedlings.- Photosynthetica 41: 315-317. 2003.

Morales, F., Abadía, A., Gómez-Aparisi, J., Abadía, J.: Effect of combined NaCl and CaCl₂ salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution.- Physiol. Plant. 86: 419-426. 1992.

Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I. and Roubelakis-Angelakis K.A. : Spermidine Exodus and Oxidation in the Apoplast Induced by Abiotic Stress Is Responsible for H₂O₂ Signatures That Direct Tolerance Responses in Tobacco.- The Plant Cell 20: 1708-1724. 2008.a.

Moschou, P.N., Paschalidis, K.A. and Roubelakis-Angelakis K.A.: Plant polyamine catabolism. Plant Signaling and Behavior 12: 1061-1066. 2008.b.

Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum F.: Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. – Biochem Pharmacol 65: 1575-1582. 2003.

Nagele, A., Felix, K., Lengfelder, E.: Induction of oxidative stress and protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity by the superoxide dismutase-mimetic complex copper-put-pyridine. – Biochem Pharmacol 47: 555-562. 1994.

Navakoudis, E., Lutz, C., Langebartels, C., Lutz-Meindl, U., Kotzabasis, K.: Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. – *Biochem Biophys Acta* 1621: 160-169. 2003.

Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T.: Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants.- *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247. 2002.

Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T.: Nitric oxide signaling in plants. – *New Phytol* 159: 11-35. 2003.

Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I.: Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. – *J Exp Bot* 59: 165-176. 2008.

Németh, M., Janda, T., Horváth, E., Páldi, E., Szalai, G.: Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize.- *Plant Sci.* 162: 569-574. 2002.

Németh T.: Talajvédelem, Országos Talajvédelmi Stratégia tudományos háttere, Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium. 2005.

http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/talaj_tajekoztato/index.htm

O'Donnel, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T., England, P.J.: Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290: 41-49. 1993.

Ogata, K., Nishimoto, N., Uhlinger, D.J., Igarashi, K., Takeshita, M.: Spermine suppresses the activation of human neutrophil NADPH oxidase in cell-free and semi-recombinant systems. – *Biochem J* 313: 549-554. 1996.

Ouyang, B., Yang, T., Li, H., Zhang, L., Zhang, Y., Zang, J., Fei, Z., Ye, Z.: Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis.- *J. Exp. Bot.* 58: 507-520. 2007.

Pancheva, T.V., Popova, L.P., Uzunova, A.N.: Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. – *J. Plant Physiol.* 149: 57-63. 1996.

Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K. and Kumar N.: Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence.- *J. Bioscience* 25:291-299. 2000.

Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A.: Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide.- *Planta* 220: 826-837. 2005.

Parida, A.K., Das, A.B., Mittra, B: Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition, and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts.- *Photosynthetica* 41: 191-200. 2003.

Passioura, J.B., Munns, R.: Rapid environmental changes that affect leaf water status induced transient surges or pauses in leaf expansion rate, *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 941-948. 2000.

Pastori, G.M., Foyer, C.: Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. – *Plant Physiol.* 129: 460-468. 2002.

Peek, M.S., Russek-Cohen, E., Wait, D.A., Forseth, I.N.: Physiological response curve analysis using nonlinear mixed models.- *Oecologia* 132: 175-180. 2002.

Pfanz, H., Vodnik, D., Wittmann, C., Aschan, G., Batic, F., Turk, B., Macek, I.: Photosynthetic performance (CO₂ compensation point, carboxylation efficiency, and net photosynthesis) of timothy grass (*Phelum pretense* L.) is affected by elevated carbon dioxide in post-volcanic mofette areas.- *Environmental and Experimental Botany* 61: 41-48. 2007.

Pitman, M.G., Lauchli, A.: Global impact of salinity and agricultural ecosystems, In: Lauchli, A., Lüttge, U.: *Salinity: Environment – Plants – Molecules*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 3-20. 2002.

Podulso, J.F., Gurran, G.L.: Increased permeability of superoxide dismutase at the blood-nerve and blood-brain barriers with retained enzymatic activity after covalent modification with naturally occurring putrescine. – *J Neurochem* 67: 734-741. 1996.

Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., Delledonne, M.: Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*.- *Mol. Plant-Microbe interact* 16: 1094-1105. 2003.

Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B.: Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. – *Plant Physiol.* 115: 137-149, 1997.

Rao, M.V., Lee Hyung-il and Davis Keith, R.: Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death.- *The Plant Journal* 447. 2002.

Raskin, I.: Role of salicylic acid in plants.- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463. 1992.

Räthel TR, Leikert J Ju, Vollmar AM, Dirsch VM.: Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. – *Biol. Proced. Online* 5:136-142. 2003.

Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., Rich, P.J.: Salinity, osmolytes and compatible solutes, In: Lauchli, A., Lüttge, U. (2002): *Salinity: Environment – Plants – Molecules*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 181-204. 2002.

Rodríguez-Navarro, A., Rubio, F.: High-affinity potassium and sodium transport systems in plants, *J. Exp. Bot.* 57: 1149-1160. 2006.

Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., Delledonne, M.: Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions.- *Cell Microbiol.* 6: 795-803. 2004.

Rubio,F., Gassman, W., Schroeder, J.I.: Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. – *Science* 270: 1660-1663. 1995.

Rus, A.M., Panoff, M., Perez-Alfocea, F., Bolarín, M.C.: NaCl responses in tomato calli and whole plants. – *J. Plant Physiol.* 155: 727-733. 1999.

Sahu, G.K., Kar, M., Sabat, S.C.: Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. – *Plant Biology* 4:321-328. 2002.

Sakamoto, H., Matsuda, O., Iba, K.: *ITN*, a novel gene, encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. – *Plant J.*, 56: 411-422, 2008.

Sanchez-Casas, P., Klessig, D.F. : A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* 106: 1675-1679. 1994.

Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarin, M.C.: Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. – *Plant Physiol Biochem* 37: 65-71. 1999.

Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D.: Guard cell signal transduction.- *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 627-658. 2001.

Selye, H.: A syndrome produced by various noxious agents. – *Nature* 138: 32-34. 1956.

Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M.: Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. - *Physiol Plant* 112: 487-494. 2001.

She, X.P., Song, X.G., He, J.M.: Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Botanica Sinica* 46:1292-1300. 2004.

Sims, DA., and Gamon, JA.: Relationship between pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337-354. 2002.

Singh, M.P., Pandey, S.K., Singh, M., Ram, P.C., Singh, B.B.: Photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf chlorophyll content in mustard genotypes grown under sodic conditions.- *Photosynthetica* 24: 623-627. 1990.

Sivakumar, P., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P.: Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1,5-biphosphate oxygenase activity.- *Biochem. biophys. Res. Commun.* 279: 512-515. 2000.

Smirnoff, N.: The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation.- *New Phytol.* 125: 27-58. 1993.

Song, F., Goodman RM.: Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance.-*Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1458-1462. 2001

Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestencz, A. and Pldi, E.: Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling.- Biol. Plant. 43: 637-640. 2000.

Szegletes, Zs. Erdei, L., Tari, I., Cseuz, L.: Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. – Cer. Res. Comm. 28: 403-410. 2000.

Szepesi, ., Csiszár, J., Bajkán, Sz., Gmes, K., Horváth, F., Erdei, L., Der, A., Simon, L.M., Tari, I.: Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. – Acta Biol. Szeged, 49: 123-125. 2005.

Szepesi, ., Csiszár, J., Gall, ., Gmes, K., Por, P., Tari, I.: Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. Acta Agron. Hung. 58: 129-138.2008.

Szepesi, ., Csiszár, J., Gmes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, L.M., Tari, I.: Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. - J. Plant Physiol. 166:914-925, 2009.

Taiz, L., Zeiger, E.: Plant Physiology (fourth Edition), Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc., Publishers, 692-698. 2006.

Takabe, T. Incharoensakdi, A., Arakawa, K., Yokota, S.: CO₂ fixation rate and RuBisCO increase in the halotolerant cyanobacterium, *Aphanothece halophytica*, grown in high salinities.- Plant Physiol. 88: 1120-1124. 1988.

Takahashi, S. and Yamasaki, H.: Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. Febs Letters 512: 145-148. 2002.

Tang, W., Newton, R.J.: Polyamines reduce salt-induced damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. – Plant Growth Regul 46: 31-43. 2005.

Tari, I., Szalai, G., Lorincz, Zs., Blint, A.: Changes in thiol content in roots of wheat cultivars exposed to copper stress. Biol. Plant. 45:255-260. 2002a.

Tari, I., Csiszár, J., Szalai, G., Horváth, F., Pécsváradi, A., Kiss, G., Szepesi, Á., Szabó, M., Erdei, L.: Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. – Acta Biol. Szeged, 46: 55-56. 2002b.

Tari, I., Csiszár, J.: Effects of NO_2^- or NO_3^- supply on polyamine accumulation and ethylene production of wheat roots at acidic and neutral pH: implications for root growth. - Plant Growth Regul. 40: 121-128, 2003. a.

Tari, I., Csiszár, J., Gallé Á., Bajkán Sz., Szepesi Á., Vashegyi Á.: Élettani megközelítések gazdasági növények szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. - Bot. Közlem. 90: 139-158, 2003. b.

Tari, I., Simon, L.M., Deer, K.A., Csiszár, J., Bajkán, Sz., Kis, Gy., Szepesi, A.: Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation.- Acta Physiol. Plant. 14th FESPB Congress, Poland, Book of Abstracts 237. 2004.

Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M.A., Ponzio, C., Everad, J.D.: Growth, gas exchange and ion content in *Olea europea* plants during salinity and subsequent relief.- Physiol. Plant. 95: 117-124. 1995.

Tiwari, B.S., Bose, A., Ghosh, B.: Photosynthesis in rice under salt stress.- Photosynthetica 34: 303-306. 1997.

Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N., Smith, B.N.: Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. – J. Plant Physiol. 121: 453-461, 1985.

Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D.: H_2O_2 and NO : redox signals in disease resistance.- Trends Plant Sci. 3: 330-334. 1998.

Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Grissem, W., Inzé, D., Van Breusegem, F.: Genome- wide analysis of hydrogen peroxide- regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis.- Plant Physiol. 139: 806-821. 2005.

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A.: Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci 151: 59-66. 2000.

Vranová, E., Inzé, D., Breusegem, F.V.: Signal transduction during oxidative stress. – J. Exp. Bot. 53: 1227-1236, 2002.

Wang, C.Y., Adams, D.O.: Chilling induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.).- Physiol. Plant. 69: 424-427. 1982.

Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M. and Assmann, S.M.: G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells.- Science 292: 2070-2072. 2001.

Wilkinson, S., Davies, W.J.: ABA-based chemical signalling: co-ordination of responses to stress in plants. – Plant Cell Environ 25: 195-210, 2002.

Wodala, B., Deak, Z., Vass, I., Erdei, L., Altorjay, I., Horvath, F.: In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. Plant Physiol 146: 1920-1927. 2008.

Xing, Y., Higgins, V.J., Blumwald, E.: Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. – Plant Cell 9: 249-259. 1997.

Yalpani, N., Enyedi, A.J., León, J., Raskin, I.: Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. – Planta, 193: 373-376, 1994.

Yamasaki, H., Cohen, M.F.: NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? Trends in Plant Science 11: 522-524. 2006

Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., Flowers, T.J.: Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.)- J. Exp. Bot. 42: 881-889. 1991.

Yeo, B., Muller, H.H., Zhang, J., Gressel, J.: Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine generating enzymes correlated with oxidative stress resistance in *Conyza Canadensis* and wheat.- Plant Physiol. 115: 1443-1451. 1997.

Yesbergerova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R., Sagi, M.: The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. – *Plant J.* 42: 862-876, 2005.

Yordanova, Z.P., Iakimova, E.T., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., Kapchina-Toteva, V.M., Woltering, E.J.: Involvement of ethylene and nitric oxide in cell death in mastoparan-treated unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. – *Cell. Biol. Int.* 34: 301-308, 2010.

Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M., Van Breusege, F.: Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. – *Plant Physiol* 141: 404-411, 2006.

Zechmann, B., Zellning, G. and Muller, M.: Immunocytochemical localization of glutathione precursors in plant cells. – *Journal of Electron Microscopy* 55: 173-181, 2006.

Zhang, F., Wang, Y., Yang, Y., Wu, H., Wang, D., Liu, J.: Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. – *Plant Cell Physiol* 30: 775-785, 2007.

Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, L., Cao, Y., Huang, D., Tang, K.: Molecular cloning and stress-dependent regulation of potassium channel gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). – *J Plant Physiol* 163: 968-978, 2006.

Zhou, R., Sicher, R.C., Cheng, L., Quebedeaux, B.: Regulation of apple aldose-6-phosphate reductase activity by inorganic phosphate and divalent cations. – *Func. Plant Biol.* 30: 1037-1043, 2002.

Zhu, J.K., Liu, J., Xiong, L.: Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. – *Plant Cell* 10: 1181-91, 1998.

Zhu, J-K.: Plant salt tolerance. – *Trends in Plant Sci.* 6: 66-72, 2001.

Ziosi, V., Bregoli, A.M., Bonghi, C., Fossati, T., Biondi, S., Costa, G., and Torrigiani, P.: Transcription of ethylene perception and biosynthesis genes is altered by putrescine, spermidine and aminoethoxyvinylglycine (AVG) during ripening in peach fruit (*Prunus persica*) *New Phytologist* 172: 229-238, 2006.

Zottini, M., Costa, A., Michele, R.D., Ruzzene, M., Carimi, F., Schiavo, F.L.: Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in Arabidopsis. – J Exp Bot 58: 1397-140. 2007.

9. 2 Publikációs lista

(* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

1. * **Gémes K**, Poór P, Horváth E, Kolbert Zs, Szopkó D, Szepesi Á, Tari I. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum* 2011; DOI: 10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x **IF: 2,708**
2. * Poór P, **Gémes K**, Horváth F, Szepesi Á, Simon LM and Tari I. 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 Biology* 2011; 13: 105-114. **IF: 2,223**
3. Tari I, Kiss G, Deér AK, Csiszár J, Erdei L, Gallé Á, **Gémes K**, Horváth F, Poór P, Szepesi Á and Simon LM. Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum* 2010; 54 (4): 677-683. **IF: 1,656**
4. Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Horváth E, Horváth F, Simon LM, Tari I. Salicylic acid improves the 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. *Journal of Plant Physiology* 2009; 166: 914-925. **IF: 2,5**
5. Tari I, Camen D, Coradini G, Csiszár J, Fediuc E, **Gémes K**, Lazar A, Madosa E, Mihacea S, Poor P, Postelnicu S, Staicu M, Szepesi Á, Nedelea G, Erdei L. Changes in chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress responses of bush bean genotypes for selecting contrasting acclimation strategies under water stress. *Acta Biologica Hungarica* 2008; 59(3):335-345. **IF: 0,619**
6. Tari I, Csiszár J, **Gémes K** and Szepesi Á. Modulation of Cu²⁺ accumulation by (aminoethoxyvinyl)glycine and methylglyoxal bis(guanyldrazone), the

inhibitors of stress ethylene and polyamine synthesis in wheat genotypes. Cereal Research Communications 2006; 34: 989-996. **IF: 1.037**

7. * **Gémes K**, Poór P, Sulyok Z, Szepesi Á, Szabó M, Tari I. Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego) under salt stress. Acta Biologica Szegediensis 2008; 52(1):161-162.
8. * Szepesi Á, Csiszár J, Gallé Á, **Gémes K**, Poór P and Tari I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. Acta Agronomica Hungarica 2008; 56(2): 129-138.
9. Szepesi Á, Poór P, **Gémes K**, Horváth E, Tari I. Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants. Acta Biologica Szegediensis 2008; 52(1):199-200.
10. Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in processes related to photosynthesis and detoxifying defense system. Magyar-Román PHARE CBC 2003. évi Program. Project Report 2006; pp:171-185.
11. Szepesi Á, Csiszár J, Bajkán Sz, **Gémes K**, Horváth F, Erdei L, Deér A, Simon LM., Tari I. Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. Acta Biologica Szegediensis 2005; 49(1-2):123-125.

Poszterek

1. Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid improves the acclimation of tomato to high salinity by stimulating abscisic acid biosynthesis and accumulation. XV FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology. 2006. Július 17-21. Lyon, Franciaország, Book of Abstracts, pp. 174.
2. Tari I, Csiszár J, Gémes K, Horváth E, Szepesi Á, Poór P, Sulyok Z. A szalicilsav, mint allelopatikus anyag. IX. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2008. július 7-9.
3. Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*. 3rd EPSO Conference, “Plant Dynamics: from Molecules to Ecosystems”. 2006. Május 28- Június 1. Visegrád, Magyarország, Book of Abstracts, pp. 163.
4. **Gémes K**, Szepesi Á, Guóth A, Tari I. Role of photosynthetic performance in salt stress acclimation of tomato after salicylic acid pre-treatment. 2nd World Conference of Stress. 2007. Augusztus 23-26. Budapest, Magyarország. Book of Abstracts, pp. 213.
5. Szepesi Á, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid pre-treatment induced antioxidant defence processes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) during salt stress. „RoS in Plants” Conference. 2007. Szeptember 12-14. Gent, Belgium.
6. **Gémes K**, Poór P, Sulyok Z, Szepesi Á, Szabó M, Tari I. Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego) under salt stress. IX. Congress of Hungarian Society for Plant Biology. 2008. Július 7-9. Szeged, Magyarország.
7. Szepesi Á, Poór P, **Gémes K**, Horváth E, Tari I. Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed

- tomato plants. IX. Congress of Hungarian Society of Plant Biology. 2008. Július 7-9. Szeged, Magyarország.
8. Tari I, **Gémes K**, Poór P, Csiszár J. Acclimation of the photosynthetic performance of tomato to high salinity after salicylic acid pre-treatment. Plant Abiotic Stress Tolerance, International Conference. 2009. Február 8-11. Bécs, Ausztria. Book of Abstracts, pp. 82.
 9. Poór P, Gémes K, Rózsavölgyi T, Tari I. Szalicilsav kezelés hatása paradicsom növények sztómaregulációjára. 8. Magyar Ökológus Kongresszus, Posztterek összefoglalói, szerkesztette: Körmöczy László. 2009. augusztus 26-28. Szeged, Magyarország. 184. old. ISBN: 987-963-482-948-5. <http://www.ecology.hu/mok2009/8MOKabstract.pdf>
 10. Moschou PN, Andronis E, Toumi I, **Gémes K**, Paschalidis KA, Papadakis AK. and Roubelakis Angelakis KA. What is new on the role(s) of polyamines in the response of plants to stresses? Cost 858 Viticulture Final Meeting, 2009. Október 27-30. Bordeaux, Franciaország.
 11. Poór P, **Gémes K**, Szepesi Á. and Tari I. Involvement of NO and reactive oxygen species in salicylic acid-induced stomatal closure in abaxial epidermal peels of tomato. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. 2010. július 4-9. Valencia, Spanyolország. Book of Abstracts pp. 44.
 12. **Gémes K**, Poór P, Kolbert Zs, Tari I. Salicylic acid-generated NO and reactive oxygen species during salt stress in tomato roots: acclimation or programmed cell death. 3rd International Plant NO Club, 2010. július 15-16. Olmütz, Csehország
 13. Tari I, Poór P, **Gémes K**, Szepesi Á, Szopkó D, Simon LM, Csiszár J. Improvement of salt stress acclimation of tomato by salicylic acid: the role of osmotic adaptation. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional

Research" 2010. október 13-15., ISIRR Magyarország – Románia – Szerbia (előadás) Book of Abstract, pp. 7

14. Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Orosz G, Poór P, Takács Z, Tari I. Oxidative stress responses of salicylic acid pre-treated tomato plants during salt stress. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional Research" 2010. október 13-15., ISIRR Magyarország – Románia – Szerbia (előadás) Book of Abstract, pp. 7

Díjak, elismerések

MTA, Szegedi Akadémiai Bizottság 2007. évi pályázata: **I. díj**

Görög Kormányzati Ösztöndíj 2009/2010 nyertese, Krétai Egyetem, Növénybiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Heraklion, Kréta, Görögország

9. 3 Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tari Irma Tanszékvezető Tanárnőnek fáradhatatlan szakmai és emberi támogatásáért, ösztönző tanácsaiért és a doktori disszertációm elkészítéséhez nyújtott felbecsülhetetlen és kiváló szakmai iránymutatásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Erdei Lászlónak és Dr. Csiszár Jolánnak támogatásukért mind szakmai, mind emberi vonatkozásban.

Köszönöm szakdolgozóimnak Horváth Editnek, Poór Péternek és Sulyok Zitának a kísérleteim kivitelezéséhez nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni baráti és szakmai támogatását Dr. Gallé Ágnesnek, Dr. Kolbert Zsuzsannának és Dr. Szepesi Ágnesnek.

Köszönet illeti Kispálné Szabó Ibolyát, Ádámné Meszlényi Máriát és Tandari Máriát a kísérleti munkához nyújtott kiváló asszisztenciáért.

Köszönöm a Növénybiológiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának a munkámhoz nyújtott segítséget.

Örök hálával tartozom családomnak, hogy éveken keresztül támogatták és segítették munkámat és doktori disszertációm elkészülését.

Ezt a munkát köszönetképpen szeretném ajánlani vőlegényemnek, Picherer Csabának, aki tanulmányaim és munkám során mindvégig kitartott mellettem, szerető támogatásával segítette disszertációm létrejöttét.