

**NÖVÉNYEK ANTIOXIDÁNS
VÉDEKEZŐMECHANIZMUSAI KÖRNYEZETI
STRESSZFELTÉTELEK MELLETT**

Szegletes Zsolt

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
környezeti biokémia és biotechnológiai doktor (Ph.D.) program

Témavezető:

Dr. Erdei László *tanszékvezető egyetemi tanár*

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Növényélettani Tanszék

Szeged

2000.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kissné Dr. Laszlavik Márta emlékének ajánlom dolgozatomat. Hálásan gondolok szakmai és baráti irányítására, amivel megtanított a kutatói munka minden fázisának alapos kivitelezésére és ötletgazdagságával új utakra terelt.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Erdei László tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Szegedi Tudományegyetem Növényélettani Tanszék vezetőjének a téma adásáért, valamint segítőkész munkájáért. Köszönöm a segítséget a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet és a Szegedi Tudományegyetem, Növényélettani Tanszék Közös Növényi Stresszélettani Laboratóriumban dolgozó valamennyi dolgozónak, illetve egyetemi hallgatónak, így Bálint Andrásnak, Barabás Katalinnak, Erdei-Griff Tamásnak, Feudic Erikának, Fülöp Krisztának, Kovács Andrásnak, Maróti Zoltánnak, Ördög Mónikának, Pál Erikának, Pestenác Anikónak és Tóth Balázsnek.

Szeretném megköszönni Dr. Ormos Pál akadémikusnak, a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének az igazgatójának, valamint Dr. Dér Andrásnak, Oroszi Lászlónak és az Intézetének összes dolgozójának a segítségét.

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Növényélettani Tanszék összes dolgozójának a munkáját.

Köszönetet mondok Dr. Matkovits Bélának és Ábrahámné Dr. Gulyás Magdolnának az oxidatív stresszel kapcsolatos kutatások elindításában nyújtott segítségéért, útmutatásáért.

Dr. Zsigmond Ágnesnek, Dr. Notheisz Ferencnek és Dr. Bartók Mihály akadémikusnak köszönöm, hogy elindítottak a kutatói pályán.

Szeretném megköszönni Dr. Szűts Viktória, Halmos Ildikó, Rabb Mária és Dr. Szegletes Tivadar segítségét és türelmét, amellyel lehetővé tették e dolgozat megírását.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleim, Dr. Szegletes Tiborné és Dr. Szegletes Tibor odaadó támogatását.

Kísérleteink elvégzéséhez az anyagi támogatást a Phare Accord No. H-9112-0163, OTKA T 017254, T 021192, T 022070 és MKM 360/96 pályázat biztosította.

TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás.....	b
Tartalomjegyzék.....	i
Rövidítések listája.....	iv
1. Bevezetés.....	1
1.1. Stresszfolyamatok.....	1
1.1.1. Oxidatív stressz.....	6
1.2. Oxidatív stresszre adott válaszreakciók.....	8
1.3. Céltűzés.....	18
2. Módszerek.....	20
2.1. Növénynevelés.....	20
2.1.1. Az <i>Aster tripolium</i> L. nevelése.....	20
2.1.2. A búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nevelése.....	22
2.1.3. A kukorica (<i>Zea mays</i> L.) nevelése.....	23
2.1.4. A napraforgó (<i>Helianthus annuus</i> L.) nevelése.....	23
2.1.5. Gabonacirok (<i>Sorghum bicolor</i> [L.] Moench) nevelése.....	24
2.2. Kation tartalom meghatározása.....	24
2.2.1. Növényi minták előkészítése.....	24
2.2.2. Fémek mérése.....	25
2.3. Szervetlen anionok kvalitatív és kvantitatív analízise.....	25
2.3.1. Növényi minták előkészítése.....	25
2.3.2. Növényi minták kromatografálása.....	25
2.4. Poliaminok és prolin analízise.....	26
2.4.1. A növényi minták előkészítése.....	26
2.4.2. Poliaminok benzoilezett származékainak a meghatározása.....	26

2.4.3. Poliaminok és prolin FMOC származékainak együttes meghatározása	27
2.5. A glutation redukált és oxidált formájának analízise.....	28
2.5.1. A növényi minták előkészítése.....	28
2.5.2. Összes glutation szint meghatározása.....	28
2.5.3. A glutation és a glutation-diszulfid koncentrációjának meghatározása	29
2.6. Glutation S-transzferáz.....	29
2.6.1. Növényi minták előkészítése.....	29
2.6.2. A glutation S-transzferáz aktivitásának a meghatározása	30
2.6.4. A fehérjetartalom meghatározása	30
3. Kísérleti eredmények	31
3.1 Kationok.....	31
3.2. Szervetlen anionok.....	35
3.3. Poliaminok és prolin.....	47
3.4. Glutation.....	51
3.5 Glutation reduktáz és glutation S-transzferáz.....	54
4. Eredmények értékelése	57
4.1. Kationok.....	57
4.2. Szervetlen anionok.....	59
4.3. Poliaminok és prolin.....	62
4.4. Glutation.....	64
4.5. Glutation reduktáz és glutation S-transzferáz.....	67
4.6. Eredményeinkből levonható stresszkonceptió.....	68
5. Összefoglalás.....	70
5.1. Módszerfejlesztés a stresszfolyamatok válaszreakcióinak a követésére	70

5.2. Stresszfolyamatok vizsgálata növényekben.....	71
6. Summary	74
7. Irodalomjegyzék.....	77
8. Publikációk.....	94
8.1. A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk.....	94
8.2. A dolgozat témájához kapcsolódó előadások, posztterek.....	94
8.3. Publikációs lista	98
8.3.1. Referált folyóiratokban megjelent publikációk.....	98
8.3.2. Egyéb folyóiratokban és kiadványokban megjelent publikációk	100
8.3.3. Előadások, posztterek.....	102

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

AOS	“active oxygen species”, aktív oxigén tartalmú vegyületek, az ROS szinonimája
APX	aszorbát peroxidáz (EC 1.11.1.11)
AsA	L-aszkorbinsav, C-vitamin, $pK_{a,1}^{25} = 4.2$, $pK_{a,2}^{25} = 11.6$
ATP	adenozin-trifoszfát
BPDS	batofenantrolin-diszulfonsav dinátrium sója (4,7-difenil-1,10-fenantrolin-diszulfonsav), $M_w = 536.5$ [52746-49-3]
BSA	borjúból izolált szérum-albumin
C ₁₈	oktadecil, oktadecilezett szilika, oktadecil-szilánnal módosított, fordított fázisú oszloptöltet (ODS)
CDNB	1-klór-2,4-dinitro-benzol, $M_w = 202.6$ [97-00-7]
CHES	2-(N-ciklohexil-amino)-etán-szulfonsav, $M_w = 207.3$ [103-47-9] $pK_a^{25} = 9.3$
DHA	dehidro-aszkorbinsav
DHAR	dehidro-aszkorbát reduktáz (EC 1.8.5.1)
DNFB	Sanger reagens, 2,4-dinitro-1-fluor-benzol, $M_w = 186.1$ [70-34-8]
DNP	2,4-dinitro-fenil csoport
DTNB	Ellman reagens, 5,5'-ditio-bis(2-nitro-benzoésav), $M_w = 396.3$ [69-78-3]
DTT	Cleland reagens, D,L-ditiotreitol, <i>treo</i> -1,4-dimerkapto-2,3-butándiol, $M_w = 154.2$ [27565-41-9]
EDTA	Selecton® II, etiléndiamin-tetraecetsav, $M_w = 292.2$ [60-00-4]
EU	enzimaktivitás egysége
FAD	flavin-adenin-dinukleotid (dinátrium só), $M_w = 829.5$ [146-14-5]
Fd	ferredoxin
FMOC	9-fluorenil-metil-formil csoport
FMOC-Cl	9-fluorenil-metil-hangyasav klorid, $M_w = 258.7$ [28920-43-6]
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ oxidoreduktáz
HPLC	“high performance liquid chromatography”, nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
gDW	száraz tömeg, [gramm]

gFW	nedves (friss) tömeg, [gramm]
GAS	“general adaptation syndrome”, adaptációs szindróma, a stressz hatására bekövetkező tünetegyüttes
GPX	glutation peroxidáz (EC 1.11.1.9)
GR	glutation reduktáz, GSSG reduktáz (EC 1.6.4.2)
GSH	glutation (γ -glutamil-ciszteinil-glicin), redukált forma, $M_w = 307.3$ [70-18-8]
GSSG	glutation-diszulfid, oxidált forma, $M_w = 612.6$ [27025-41-8]
GST	glutation <i>S</i> -transzferáz (EC 2.5.1.18)
GST-C	CDNB-vel, mint szubsztráttal mért GST aktivitás
GSTNB	a glutation és a DTNB reakciójában képződő vegyes diszulfid.
hGSH	homoglutation (γ -glutamil-ciszteinil- β -alanin)
M	koncentráció, $[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
mBBR	monobró-m-bimán, $M_w = 271.1$ [71418-44-5]
MDHA	monodehidro-aszkorbinsav, szemidehidro-aszkorbinsav, aszkorbát szabadgyökök
MDHAR	monodehidro-aszkorbát reduktáz (EC 1.6.5.4)
mM	koncentráció, $[\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3} = 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
μM	koncentráció, $[\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} = 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
mOsm	milliozmol, $1 \text{ mOsm} = 2.4 \text{ kPa}$
M_w	moláris molekula tömeg $[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
nM	koncentráció, $[\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3} = 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
NAD(P) ⁺	β -nikotinamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
NAD(P)H	β -nikotinamid-adenin-dinukleotid(-foszfát), redukált forma
NEM	<i>N</i> -etil-maleinimid, $M_w = 125.1$ [128-53-0]
ODS	oktadecilezett szilika, oktadecil-szilánnal módosított, fordított fázisú oszloptöltet (C_{18})
PCA	perklórsav, HClO_4 , $M_w = 100.46$ [7601-90-3]
PEG 6000	polietilén-glikol, átlagos moláris tömege $6000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
pM	koncentráció, $[\text{pmol} \cdot \text{dm}^{-3} = 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
PMSF	fenil-metil-szulfonsav-fluorid, α -toluolszulfonsav-fluorid, $M_w = 174.8$ [329-98-6]

PS I	I-es fotoszisztéma
PTFE	politetrafluor-etilén, Teflon®
PVPP	polivinil-polipirrolidon, keresztkötött, vizes közegben oldhatatlan polivinil-pirrolidon, [25249-54-1]
ROS	“reactive oxygen species”, aktív oxigén tartalmú vegyületek, az AOS szinonimája
RP-HPLC	fordított fázisú oszlopot használó HPLC-s technika
rpm	fordulatszám, [min ⁻¹]
sAPX	sztróma frakcióban található szolubilis APX
SF	“sztróma faktor”, valószínűleg MDHAR (Asada, 1999)
SPE	szilárd fázisú extrakció
t _{1/2}	felezési idő, félélet idő, [másodperc]
tAPX	tilakoid membrán kötött APX
térf.	térfogat
TRIS	TRIZMA® Base, <i>trisz</i> -(hidroxi-metil)-amino-metán, M _w = 121.1 [77-86-1] pK _a ²⁵ = 8.1
TNB	5-tio-2-nitro-benzoésav, a DTNB bomlásterméke
UV	ultraibolya tartományba eső hullámhosszú fény
UV-A	az ultraibolya tartomány A sávjába (320-400 nm) tartozó hullámhosszúságú fény
UV-B	az ultraibolya tartomány B sávjába (280-320 nm) tartozó hullámhosszúságú fény

1. BEVEZETÉS

1.1. Stresszfolyamatok

A stressz, mint fogalom meghatározására ma 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). Ily módon a stressznek sajátos ismertető jelei vannak, és a különféle okoknak ugyan olyan hatása van. A stresszor az, ami a stresszt okozza, azaz minden ágens többé-kevésbé stresszor is, abban a mértékben, ahogy stressz, illetőleg nem-fajlagos elváltozások előidézésére képes. A stressz hatására bekövetkező tünet együttes az adaptációs szindróma (GAS), amely egymást követő folyamatokból áll:

- Cannon-féle vészreakció,
- ellenállás vagy rezisztencia,
- kimerülés.

Ezeknek a változásoknak a vizsgálatát növényi szervezetekben Levitt kezdte meg az 1970-es évek elején (Levitt, 1972), ahol a stressz lehetséges tényezőit az alábbi módon csoportosította:

- *Biotikus*: mikroorganizmusok.
- *Abiotikus (fizikai-kémiai)*: hőmérséklet (alacsony vagy magas),
- víz (hiány vagy többlet),
- fizikai (pl.: sugárzások),
- kémiai (sók, gázok, ionok, herbicidek stb.).

Lichtenthaler (1996) a definíciót pontosította, illetve részben más szempontok szerint csoportosította a stresszt kiváltó hatásokat. Szerinte minden olyan körülmény vagy anyag, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére vagy fejlődésére, stressznek tekinthető. Növényi és vegetációs stresszhatást különböző természetes, és antropogén stresszfaktorok válthatnak ki.

Természetes stresszfaktorok:

- erős fénysugárzás (fotoinhibíció, fotooxidáció),
- hőmérséklet (alacsony vagy magas),
- vízhiány (szárazság és só stressz),
- ásványi anyagok hiánya (pl.: nitrogén hiány),
- rovarok,
- gombák, virális és bakteriális patogének.

Antropogén stresszfaktorok:

- herbicidek, fungicidek, inszekticidek,
- légszennyező anyagok (pl.: O₃, SO₂, NO_x),
- nagy reaktivitású oxigén származékok keletkezése,
- fotooxidánsok,
- savas esők, savas köd, savas por és savas reggeli harmat,
- savas pH a talajban és vízben,
- túlzott nitrogénforrás,
- nehézfém szennyezés,
- túl sok ammónia termelés,
- UV-A és UV-B sugárzás növekedése,
- CO₂ szint emelkedése és globális klímaváltozás.

Hatásuk alapján elkülöníthető gyenge és erős, vagy krónikus stresszhatást. A gyenge stressz hatását az akklimatizáció, az adaptáció és a javító mechanizmusok részben kompenzálják. Az erős stressz jelentős károkat okoz, ami végül a sejt és a növény halálához is vezethet.

Napjainkban a Selye-féle általános stresszelméletet többen is igazolták (Leshem és Kuiper, 1996; Lichtenthaler, 1996; Leshem *et al.*, 1998). Ezek alapján elmondható, hogy stressz hatására az élő szervezet anyagcseréjében, így a növényekben is bizonyos reakció utak felgyorsulnak vagy gátlódnak, ami olyan köztes- és végtermékek felhalmozódását, esetleg megjelenését eredményezi, amelyek az ismert biokémiai reakcióutakat valamelyik irányba eltolhatják. Ezek közül a biokémiai folyamatok közül az oxidációs-redukciós állapot változások az egyik leggyorsabban

lezajló molekuláris szintű változások a szervezetben, amit összefoglalóan az oxidatív stressz hatásának nevezünk. Az oxidatív stressz fő okozói az aktív oxigén tartalmú vegyületek, de általánosan elmondható, hogy minden stressznek van oxidatív komponense is (de Kok és Oosterhuis, 1983; Kayupova és Klyshev, 1984; Asada, 1994; Foyer és Harbinson, 1994), amely indukálja az antioxidatív védőrendszer működését.

A növények védekező rendszerének felépítése főbb szerkezetében megegyezik az állatokéval. Az egyes elemek megléte, vagy hiánya azonban még nem bizonyított teljesen. Az ezzel kapcsolatos kutatások két fő irányban folynak:

- az egyes komponensek felkutatása,
- magának a folyamatnak a vizsgálata pl.: a stresszhatás és a válasz mértékének összefüggése, a stresszválasz időbeli lefutása, stb.

A növényélettani vizsgálatok közül a stresszkutatások előtérbe kerülését napjainkban több tényező is indokolja: a globális klímaváltozás, felmelegedés; az ózonlyuk kialakulásával az UV-B sugárzás növekedése; a szikes, sós talajok kialakulása; az arid (sivatagos) zónák kiterjedése; környezetszennyezés; illetve az a tény, hogy a növények ilyen környezeti tényezőkre adott válaszában és alkalmazkodásának mechanizmusa nem teljesen tisztázott.

A növényeket sokféle környezeti stresszhatás éri, többek között extrém hőmérsékleti viszonyok, előtérés indukálta hipoxia, túl erős napsugárzás és ozmotikus stressz. Ezek közül a szárazság és a só stressz okozta ozmotikus hatás a legfontosabb környezeti tényező, amely limitálja a növények növekedését, illetve a termés mennyiségét. Az ozmotikus stressz kivédésére adott növényi válaszreakciók négy nagy kategóriába oszthatóak (McCue és Hanson, 1990):

- egyedfejlődési jelleg (pl. a virágzás időpontja),
- strukturális jelleg (pl. levélen viaszos védőréteg, vagy szőrözöttség kialakulása),
- fiziológias védőmechanizmusok (pl. a sók kizárása vízfelvételnél, és/vagy a felesleges ionok kiválasztása a vakuólumba),
- metabolikus válaszreakciók.

Az első három folyamat genetikai szabályzásának egyes részfolyamatai még felderítetlenek. A negyedik adaptációs mechanizmus magában foglalja mind a fotoszintézishez kapcsolódó metabolitikus utak megváltozását, mind a az elő szervezettek számára "kompatibilis" szerves vegyületek - olyan anyagok, amelyek még magas koncentrációban sem zavarják a bioszintetikus folyamatokat - akkumulációját. Ez utóbbi folyamatban résztvevő néhány gén terméke okoz csak ozmotikusan indukált változást a növényekből kivont mRNS és fehérje populációban.

A csökkent vízpotenciál jól ismert következménye mind a szárazság (vízhiány), mind a só stressznek. E leggyakoribb környezeti stressz körülmények között a növények lecsökkentik a belső vízpotenciáljukat, hogy elkerüljék a kiszáradást (Erdei *et al.*, 1989; Erdei és Taleisnik, 1993). Az ozmózisnyomás növekedését szerves ionok felhalmozásával, és/vagy szerves ozmotikumok szintézisével, mobilizálásával érik el a növények. Só stressz (azaz a fiziológias sókoncentrációnál magasabb ionkoncentráció, hiperozmózis) hatására az ionos válasz, míg szárazság stressznél az utóbbi folyamat, azaz szerves ozmotikumok szintézise és mobilizálása lehet a jelentősebb (Erdei *et al.*, 1990; 1995). Az azonos körülmények között létrejött külső behatásokra adott stresszválaszok milyensége, és a növények esetleges irreverzibilis károsodása a fajtól és fajtától függően eltérő (Flowers és Yeo, 1986).

Ozmotikus stressz hatásnak kitett növények legjobban jellemzett biokémiai válaszreakciói a szerves ozmotikumok akkumulációja. Három fő csoportba sorolhatóak:

- aminosavak (pl. prolin),
- onium csoporttal rendelkezők (pl. glicin-betain, β -dimetil-szulfonio-propionát),
- cukrok és cukoralkoholok (pl. mannit, szorbit, trehalóz).

Lévének nem toxikusak, fel tudnak halmozódni ozmotikusan jelentős koncentrációban is anélkül, hogy a metabolitikus folyamatokat zavarnák. Egyesek képesek még bizonyos enzimek védelmét is biztosítani, pl. a betainok hőhatás elleni védelmet nyújtanak a kolinhoz hasonlóan (Alia *et al.*, 1998), a magas sókoncentrációval szemben a membránkárosodás kivédésében fontosak (Yancey, 1994) és bizonyos gombás betegségek elleni rezisztenciát indukálnak (Manninger *et al.*, 1998). A cukoralkoholok emellett még az aktív oxigén tartalmú vegyületek

semlegesítésében is szerepet játszanak (Smirnov, 1998). A szerves ozmotikumok közül a prolin és a betainok (pl. glicin-betain) a legjelentősebbek. A prolin akár mM koncentrációban is feldúsulhat a sejtekben. A prolin prekursora az ornitin és a glutaminsav (Delauney és Verma, 1993), de ugyancsak az ornitin ciklusból indul ki a putreszcin (1,4-diamino-bután), majd belőle a többi poliamin szintézise is. A poliaminok normál fiziológiás körülmények között a fejlődés és a növekedés folyamatában fontosak, míg stresszkörülmények között felhalmozódnak és fokozott védelmet nyújtanak a sejteknek (Tabor és Tabor, 1984; Erdei *et al.*, 1996; Nuccio *et al.*, 1999): résztvesznek a membránok és a nukleinsavak integritásának megőrzésében stressz körülmények között (Glaston, 1983; Slocum *et al.*, 1984; Smith, 1984; Sankhla *et al.*, 1988). Akkumulációjuk megfigyelhető mind a só, mind a szárazság (Flores és Galston, 1982a, 1984), valamint a hő és az oxidatív (Flores, 1991) stressz esetén.

A halofita (só tűrő) és a glükofita (só érzékeny) növények az ásványi anyagok felhalmozásában jelentősen különböznek. A mezőgazdasági termelésben nagy jelentőségű gabonafélék, és egyéb haszonnövények a legoptimálisabb esetben is csak kevésbé só- és szárazságtűrők. A termesztés szempontjából fontos fajta kiválasztásához nélkülözhetetlen a tolerancia kialakulásának analitikai jellemzése, és a mechanizmus teljes feltérképezése. Ezeket a kérdéseket széles körben tanulmányozták (Turner, 1974, 1986; Erdei és Trivedi, 1989; Delauney és Verma, 1993; Rhodes és Hanson, 1993; Erdei *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 1998; McNeil *et al.*, 1999; Nuccio *et al.*, 1999; Szegletes *et al.*, 2000). A sótűrő fajok magasabb sókoncentráció mellett képesek növekedni, mint a sóérzékenyek. Folyamatos növekedés mellett levéltömegüket növelik, és a felesleges sót itt halmozzák fel, az ionokat a vakuólumokba választják ki (Flowers *et al.*, 1977; Erdei és Kuiper, 1979). Ionszükségletük alkalmazkodik a gyökér által felvett ionmennyiséghez (Albert és Kinzel, 1973; Shennan, 1987; Shennan *et al.*, 1987a, 1987b). A kérdés - hogy ozmoregulációjuk a genetikailag meghatározott mechanizmusa hogyan működik alacsony sókoncentrációk mellett, speciális adottságaik elvesztése nélkül - még mindig megválaszolatlan. Várhatóan alacsony Na^+ és Cl^- koncentráció mellett a tápoldatban található egyéb ionok (pl. NO_3^-) akkumulálódnak, melyek zavarokat okozhatnak a növényi anyagcserében. Az alacsony sótartalmú körülmények között nevelt halofita növények termesztésével kapcsolatos legfontosabb célkitűzés: olyan növénynevelési

körülmények fenntartása, melyek mellett megőrzik eredeti, természetes iontartalmukat, mindenekelőtt az alacsony belső nitrát koncentrációt.

A szakirodalmi adatok és saját kísérleteink alapján megállapítható, hogy a szárazság és só stressznek, mint minden stressznek van oxidatív komponense (deKok és Oosterhuis, 1983; Kayupova és Klyshev, 1984; Asada, 1994; Foyer és Harbinson, 1994), és ebből következik, hogy hatása - legalábbis részben - követhető az antioxidatív védőrendszer vizsgálatával is.

1.1.1. Oxidatív stressz

A szabad gyökök, illetve a gerjesztett molekulák az élő, aerob szervezetekben keletkezhetnek fiziológiás és patológiás körülmények között endogén úton, valamint külső ágensek hatására exogén módon. A szabad gyökökre jellemző, hogy külső elektronhéjukon egy párosítatlan elektron található. Ebből következően igen reaktívak és általában rövid élettartamúak. Az élő szervezetekre gyakorolt hatásukat tekintve a molekuláris oxigénből, általában átmeneti-fémionok katalizálta folyamatokban keletkező gyökök, aktivált vegyületek a dominánsak (1. táblázat) (Alscher, 1989; Cadenas, 1989; Foyer *et al.*, 1994, 1997; Inzé és Van Montagu, 1995; Alscher *et al.*, 1997; Noctor és Foyer, 1998; Asada, 1999).

Az aerob élet vezetett a biokémiai adaptáció olyan evolúciójához, amely ki tudja védeni az aktív oxigén tartalmú vegyületek (AOS vagy ROS) hatását. Az AOS meghatározása általános, nemcsak a szabadgyököket, mint pl. a szuperoxid gyök-aniont és a hidroxil gyököt foglalja magába, hanem a hidrogén peroxidot és a szingulett molekuláris oxigént is (1. táblázat).

Általánosan elfogadott, hogy a hidroxil gyök és a szingulett oxigén annyira reaktív, hogy termelésüket minimális értéken kell tartani (Foyer és Harbinson, 1994; Foyer *et al.*, 1994, 1997), ezzel szemben a szuperoxid gyök-aniont és a hidrogén peroxidot optimális körülmények között is nagy sebességgel szintetizálják a sejtek (Asada, 1999). Az aerob biokémia összes fő területét magukba foglalják ezek a reakciók, így a sejtlegzés és a fotoszintézis elektrontranszport láncát, aglikolát, a xantin és a glukóz oxidációját, e mellett számos enzimreakcióban képzőnek aktív oxigén tartalmú vegyületek, mint pl. a plazmalemmához kötött NADP-függő szuperoxid szintetáz, vagy a szuperoxid dizmutáz esetében. Növényekben ezen folyamatok közül a fénymegkötéshez kapcsolódó folyamatok a legjelentősebbek. A fotoszintetikus

elektrontranszport rendszer a legnagyobb forrása az aktív oxigén tartalmú vegyületeknek (Asada, 1994; Asada, 1999). A szuperoxid gyök-anion és a hidrogén peroxid toxikussága elsősorban abban rejlik, hogy olyan láncreakciókat indíthatnak el, melyek eredményeként hidroxil gyök és egyéb aktív vegyület, mint pl. lipidperoxidok képződnek.

1. táblázat: Reaktív, oxigén tartalmú gyökök, vegyületek és felezési idejük (Sies, 1985).

Vegyület, gyök		$t_{1/2}$ [sec]	Megjegyzés
$\cdot\text{O}_2^-$	szuperoxid gyök-anion	10^{-6}	Jó redukáló és gyenge oxidáló szer. Autooxidációs reakciókban sokszor képződik.
$\cdot\text{HO}_2$	perhidroxi gyök		$\cdot\text{O}_2^-$ protonált formája, lipidoldékonyabb.
H_2O_2	hidrogén peroxid		$\cdot\text{O}_2^-$ -ből ($\cdot\text{HO}_2$) dizmutációval, vagy közvetlenül O_2 -ből képződik. Erős oxidálószer, a tiol csoportokat gyorsan oxidálja, diffúziós távolsága nagy.
$\text{HO}\cdot$	hidroxil gyök	10^{-9}	Fenton (Fridovich, 1983) és a Haber-Weiss (Freeman és Crapo, 1982) reakcióban képződik, igen reaktív, kicsi a diffúziós távolsága.
$\text{RO}\cdot$	alkoxi gyök	10^{-6}	$\text{HO}\cdot$ -hoz hasonlóan reaktív, de annál nagyobb a diffúziós távolsága
$\text{ROO}\cdot$	szerves peroxi gyök	10^{-2}	Gyengén oxidál, de nagy a diffúziós távolsága.
ROOH	szerves hidroperoxid		
$^1\Delta_g\text{O}_2(\text{O})$	szingulett molekuláris oxigén	10^{-6}	Erőteljesen oxidáló tulajdonságú gerjesztett O_2 .
$^3\text{RO}(\text{RO}\cdot)$	Gerjesztett karbonil		

A patológiás szabadgyök-reakciók minden biomolekulát képesek károsítani: enzimeket, fehérjéket, szabad aminosavakat, lipideket, szénhidrátokat, nukleinsavakat. Az oxidatív lipidkárosodást lipidperoxidációnak nevezzük, mely során a telítetlen zsírsavak reagálnak az aktív oxigén tartalmú vegyületekkel, epoxidok, majd lipid peroxidok képződnek. Ez a folyamat károsítja a membránokat, amelyek elvesztik fluiditásukat, lecsökken a membránpotenciáljuk, és megnő a permeabilitásuk. Ezek ellen a veszélyes láncreakciók ellen védi a sejteket az antioxidatív védő rendszer.

A szuperoxid gyök-anion és hidrogén peroxid hatása kettős. Egyrészt az élő szervezetekre káros láncreakciókat indíthatnak el, másrészt viszont a patogén hatások elleni védőreakciók fontos elemei. Ezt a második szerepkört, amely során külső, patogén behatásra nagy koncentrációban aktív oxigén tartalmú vegyületek képződnek "oxidative burst"-nek hívjuk (Inzé és Van Montagu, 1995; Lamb és Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997, Noctor és Foyer, 1998). A legtöbb állati rendszerrel szemben a növényi sejtek képesek aktív oxigén tartalmú vegyületeket, főleg hidrogén peroxidot termelni. Ez a folyamat főleg az apoplastban játszódik le. Fontos szerepe van a sejtfal kialakulásában, azaz a lignifikációban, valamint a sejt-patogén kölcsönhatásban.

1.2. Oxidatív stresszre adott válaszreakciók

Az aerob élő szervezetek kialakulását és tartós fennmaradását a reaktív, oxigén tartalmú vegyületek, gyökök, gerjesztett molekulák elleni detoxifikáló rendszer kialakulása tette lehetővé. Ennek a védekező rendszernek vannak enzimatis és nem enzimatis elemei (2. táblázat).

A betöltött funkció alapján beszélhetünk elsődleges és másodlagos védekező rendszerekről. Az elsődleges védekező rendszerhez tartoznak a szabad gyökök és a gerjesztett molekulák ellen kialakult védekezés elemei. Az oxigénből keletkező intermedierek toxikus hatásaival szemben az antioxidánsok védnek. Megkülönböztetünk zsírolédkony (pl.: α -tokoferol) és vízlédkony (pl.: aszkorbinsav) antioxidánsokat, valamint antioxidatív enzimeket. A másodlagos védekező rendszernek a feladata a már sérült részek eltávolítása, illetve a hibás részeknek a kijávítása (pl.: chaperonok, hőshock fehérjék). A sejt szintű stresszválasz lényegében ezen elemek aktivitásának megváltozásában mutatkozik meg. A kialakuló stressztolerancia a különböző szerveződési (genetikai, biokémiai, élettani, szerkezeti) szinteken megvalósuló adaptációs értékek összegeként fogható fel.

Antioxidáns lehet minden olyan komponens, amely képes kioltani az aktív oxigén tartalmú vegyületeket anélkül, hogy önmaga reaktív gyökké alakulna (2.b táblázat). Antioxidatív enzimek azok az enzimek, amelyek katalizálják ezeket a kioltó reakciókat, vagy maguk is képesek az aktív oxigén tartalmú vegyületek semlegesítésére (2.a táblázat). Így az antioxidánsok és az antioxidatív enzimek funkciója az, hogy megszakítsák a kontrollálatlan oxidáció láncreakcióit. Nagyon sok enzim és metabolit megfelel a fenti definíciónak, és még várhatóan sokat is fognak találni. Ennek ellenére

viszonylag kevés antioxidatív enzimet írtak le részletesen. Ezek az enzimek redox reakciókat katalizálnak, sok közülük csak a kis molekulásúlyú redukálószer elektronját adja tovább.

2.a táblázat: Antioxidatív védőrendszerek az élő szervezetekben (Sies, 1985; Fehér és Vereckei, 1985; Noctor és Foyer, 1998).

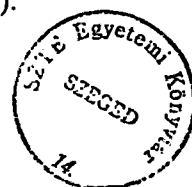
Antioxidatív enzimek	Megjegyzés
Szuperoxid dizmutáz, SOD (EC 1.15.1.1)	CuZn-SOD (citoszol, dimer), Mn-SOD (mitokondrium, tetramer), Cu-SOD (citoplazma), Fe-SOD (növények), CuZn-SOD (extracelluláris tér, tetramer)
Glutation peroxidázok, GPX (EC 1.11.1.9)	állati sejtek Se tartalmú peroxid bontó enzimeit, citoszolban, mitokondriumban
Citokróm c	hem (Fe) tartalmú, az élesztősejtek fő peroxid bontó enzimeit
Aszkorbát peroxidázok, APX (EC 1.11.1.11)	növényekben a legfontosabb peroxid bontó enzimek (Asada, 1994; 1999), hem (Fe) tartalmú, citokróm c-vel azonos szupercsaládba tartozik
Gajakol típusú peroxidázok (EC 1.11.1.7)	hem (Fe) tartalmú, a sejtfa felépítésében (lignifikáció) van szerepük
Kataláz, CAT (EC 1.11.1.6)	hem (Fe) tartalmú enzim, tetramer, növényekben főleg a peroxiszómákban található

Ezek közül a kis molekulásúlyú redukálószer közül messze az aszkorbinsav (AsA) és a glutation (GSH) a legfontosabb. Sokféle szerepet játszanak a védekező reakciókban, és sok mintában millimólos koncentrációban vannak jelen. Ennek ténynek, valamint annak a megfigyelésnek ellenére, hogy stressz hatására az a aszkorbinsav és a glutation szint megnövekszik, kevés olyan elfogadható eredmény van a bioszintézisük szabályzásáról, amely magyarázza a sejtben belüli koncentrációjukat.

2.b táblázat: Antioxidánsok az élő szervezetekben (Sies, 1985; Fehér és Vereckei, 1985).

Antioxidánsok	Megjegyzés
α -tokoferol (E-vitamin)	lipid oldható, membrán kötött gyökfogó
β -karotin, A-vitamin	lipid oldható, $^1\Delta_g\text{O}_2$ megkötő
Bilirubin	lipid oldható
Aszkorbinsav (C-vitamin)	vízoldható, gyökfogó, α -tokoferol regenerálása
Húgysav	vízoldható, $^1\Delta_g\text{O}_2$ megkötő, aszkorbinsav regenerálása
Glutation (GSH)	γ -glutamil-ciszteinil-glicin, peptidázok nem bontják, az élő szervezetek egyik legfontosabb antioxidánsa
Glükóz, szorbit	$\text{HO}^\bullet$ gyökfogó (Smirnoff, 1998)
Flavonoidok	növényi antioxidánsok (Foyer <i>et al.</i> , 1994)
Plazma proteinek	pl.: cöruoplazmin, transzferrin
Szintetikus antioxidánsok	pl.: BHA (butil-hidroxianizol), BHT (butil-hidroxitoluol)

A szuperoxid gyök-anion és a hidrogén peroxid lebontása számos antioxidatív enzim összehangolt működését követeli meg. A szuperoxid gyök-anion a növényi sejt különböző alkotóiban gyorsan átalakul hidrogén peroxiddá a szuperoxid dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) hatására. Az olyan sejtalkotókban, mint pl. kloroplasztisban, ahol az aszkorbinsav koncentráció magas, a szuperoxid gyök-anion közvetlen redukciója is végbemehet (Noctor és Foyer, 1998), de ennek sebessége sokkal kisebb, mint a SOD katalizálta reakciónak (Asada, 1999). A magasabb rendű növényekben a SOD-nak három fő csoportját írták le. A csoportosítás alapja, hogy a prosztetikus csoportja milyen átmeneti fémet tartalmaz. Így megkülönböztetünk CuZn-, Mn- és Fe-SOD-ot. Az ismert szekvencia adatok alapján nincs szerkezeti rokonság az összes eukariótában megtalálható CuZn-SOD és a pro- és eukariótákban is megtalálható Fe- és Mn-SOD között (Bowler *et al.*, 1994). A CuZn-SOD-ot nagyon sok vizsgált növényi fajból kimutatták. Dimer, alegységenként egy Cu és egy Zn atomot tartalmaz. Aktivitását gátolja a cianid ion, valamint a hidrogén peroxid inaktíválja. A növényekben a CuZn-SOD található meg legnagyobb mennyiségben a különböző SOD formák közül. Az enzim megtalálható mind a kloroplasztisban, mind a citoszolban, mind a peroxiszómában és a tilakoidhoz kötött formáját is megtalálták (Asada, 1994).



2.c táblázat: Az antioxidatív védőrendszerek kisegítő enzimrendszerei az élő szervezetekben (Sies, 1985; Fehér és Vereckei, 1985; Noctor és Foyer, 1998).

Kisegítő enzimrendszer	Megjegyzés
NADPH-kinon oxidoreduktáz	2 elektronos redukció, dikumarol érzékeny
Epoxid hidroxiláz	
UDP-glükonil transzferáz	
szulfotranszferáz	
Glutation <i>S</i> -transzferázok (EC 2.5.1.18)	egyes típusaiknak GSH függő peroxidáz aktivitása is van
Glutation reduktáz (EC 1.6.4.2)	NADPH függő enzim
Monodehidroaskorbát reduktáz, MDHAR (EC 1.6.5.4)	NAD(P)H függő, FAD tartalmú enzim
Dehidroaskorbát reduktáz, DHAR (EC 1.8.5.1)	GSH függő enzim
NADPH források	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 6-foszfoglukonát dehidrogenáz izocitrát dehidrogenáz transzhydrogenázok
Transzport rendszerek	GSSG export

A Mn-SOD-ot minden eddig vizsgált növény mitokondriális mátrixában megtalálták (Bowler *et al.*, 1994). Mind a Mn-SOD, mind a Fe-SOD egy átmenetifém atomot tartalmaz alegységenként, szekvenciájuk hasonló, valamint egy azonos konszenzus szekvenciát is tartalmaznak. A Fe-SOD cDNS szekvenciáját már több növényből is kimutatták. Biokémiai adatok alapján valószínűsíthető, hogy a növényekben endoszimbiotikus eredetű (Smith és Doolittle, 1992) és a kloroplasztiszban található (Alscher *et al.*, 1997).

A szuperoxid gyök-anion dizmutációja során az egyik aktív oxigén tartalmú vegyületből egy másik képződik. Mivel a képződő hidrogén peroxid erős oxidálószer

és gyorsan oxidálja a tiol csoportokat, ezért nem engedhető meg az akkumulációja olyan sejtalkotókban, mint pl. a kloroplasztisz, ahol a fotoszintézis tiol szabályozta enzimektől függ.

A kataláz (CAT, EC 1.11.1.6) vízzé és molekuláris oxigénné alakítja át a hidrogén peroxidot. Fotoinhibícióra és degradációra érzékeny. A katalitikus aktivitása extrém nagy, de a szubsztrát affinitása kicsi, mivel a reakció egy időben két hidrogén peroxid molekula megkötődését igényli az aktív centrumban. Ezen felül a kloroplasztisz nem tartalmaz katalázt, ami e miatt nem vehet részt a Calvin-ciklus tiol szabályozta enzimeinek a védelmében. Viszont a C_3 -as növényekben a fotorespirációból származó hidrogén peroxid káros hatásainak a kivédésében nélkülözhetetlen (Foyer *et al.*, 1994). A hidrogén peroxid lebontásának másik módja a peroxidázokkal történik. Peroxidázok mindenhol megtalálhatóak a sejtekben és sokkal nagyobb a szubsztrát affinitásuk a hidrogén peroxidhoz, mint a kataláznak. A peroxidázoknak működésükhöz szükségük van redukáló szerre, hogy a hidrogén peroxidot vízzé redukálják. Állati sejtekben azok a peroxidázok a legjelentősebbek, amelyek a redukált glutationt használják fel a hidrogén peroxid detoxifikálásához (glutation peroxidáz, GPX, EC 1.11.1.9). Növényekben a glutation *S*-transzferázokon (GST, EC 2.5.1.18) kívül más olyan enzimet, amely glutation függően tudja redukálni a hidrogén peroxidot, még nem írtak le. Számos olyan növényi gént izoláltak, amely homológiát mutat az emlős foszfolipid-hidroperoxid glutation peroxidázzal (Ben-Hayyim *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 1993, 1995). Ezek közül az egyik olyan proteint kódol, amely glutation függő módon képes redukálni a foszfolipid-hidroperoxidokat (de a hidrogén peroxidot nem), bár sokkal kisebb sebességgel, mint a sertés szívmájában található homológ enzim (Beeor-Tzahar *et al.*, 1995; Avsian-Kretchmer *et al.*, 1999). A növényekből izolált enzimekben cisztein helyettesíti az állatokban található homológ szelenociszteinjét (Brigelius-Flohé *et al.*, 1994). A kloroplasztiszban a foszfolipid-hidroperoxidok redukcióját a glutation peroxidáz mellett a 2-cisztein peroxiredoxin is katalizálja (Baier és Dietz, 1999).

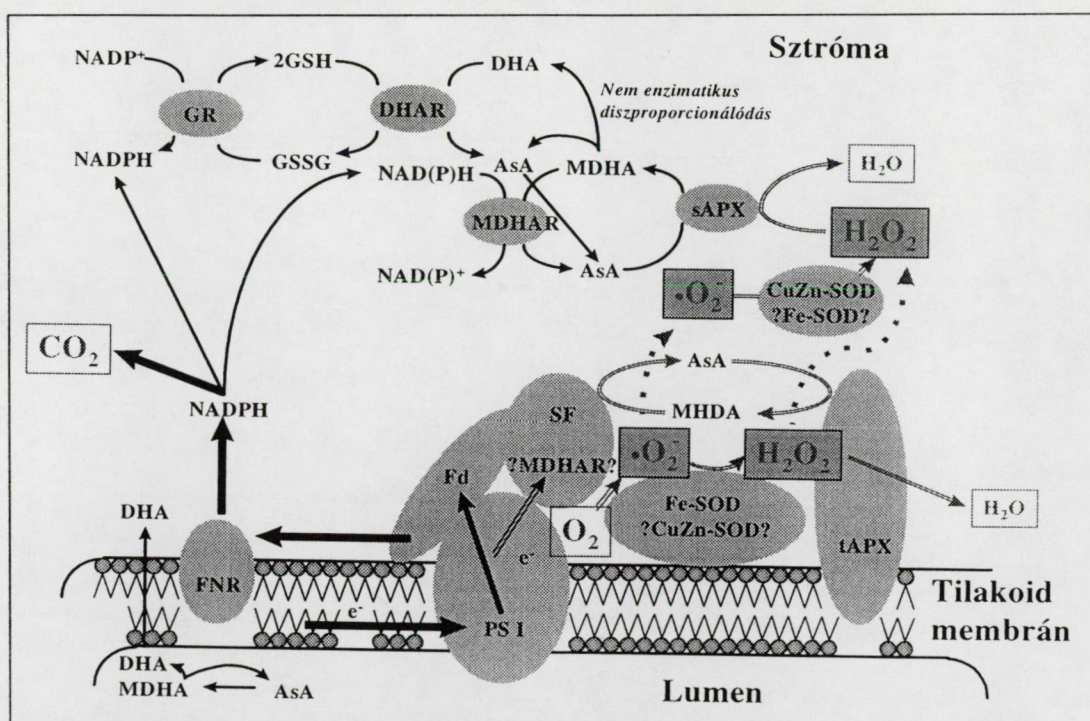
Növényi sejtekben a hidrogén peroxid detoxifikálásában részt vevő legfontosabb redukáló szer az aszkorbinsav (Asada, 1994; 1999; Mehlhorn *et al.*, 1996; Noctor és Foyer, 1998). A folyamatot az aszkorbát peroxidáz (APX, EC 1.11.1.11) katalizálja (Asada, 1992; 1994; 1999). Az APX hem tartalmú peroxidáz, szekvenciája alapján ugyan abba hem-peroxidáz szupercsaládba tartozik, mint a citokróm c.

Háromdimenziós szerkezete is hasonló hozzá. A gajakol peroxidázoktól mind szekvenciájában, mind fiziológiai funkciójában különbözik. A kloroplasztiszban az APX megtalálható, de a gajakol peroxidáz nem. A növényekben három izoformát választottak el, egy citoszolban található (Mittel és Zilinskas, 1992), kettő a kloroplasztiszban (Ishikawa *et al.*, 1996). Ezek közül a szolubilis forma a sztrómában található, míg a tilakoid membránhoz kötött a PSI komplexum közelében. Mindkét izoformának hasonló enzimatisz tulajdonságai vannak és szerkezetileg jelentősen eltérnek a citoszolban található izoformától (Asada, 1999).

Az aszkorbát peroxidáz két molekula aszkorbinsavat használ fel ahhoz, hogy a hidrogén peroxidot vízzé redukálja. A reakció során két molekula monodehidro-aszkorbinsav (MDHA) képződik. A monodehidro-aszkorbinsav egy gyök rövid élettartammal, és ha nem redukálódik gyorsan, aszkorbinsavvá és dehidro-aszkorbinsavvá (DHA) diszproporcionálódik. A sejten belül a monodehidro-aszkorbinsav közvetlenül aszkorbinsavvá redukálható. Ehhez a reakcióhoz az elektron donor valószínűleg egy citokróm b, vagy a redukált ferredoxin (Fd), vagy a NAD(P)H. A redukción a számos sejtalkotóban megtalálható monodehidro-aszkorbát reduktáz (MDHAR, EC 1.6.5.4) katalizálja (Asada, 1999). Tehát mind enzimatisz és nem enzimatisz is képződhet aszkorbinsav a monodehidro-aszkorbinsavból. A monodehidro-aszkorbinsav gyök gyors diszproporcionálódása során az aszkorbinsav mellett mindig képződik dehidro-aszkorbinsav is. A dehidro-aszkorbinsav redukcióját a dehidro-aszkorbát reduktáz (DHAR, EC 1.8.5.1) katalizálja, a redukálószer pedig glutation. A reakció során aszkorbinsav és glutation diszulfid (GSSG) képződik, ez utóbbit a NADPH függő glutation reduktáz (GR, EC 1.6.4.2) redukálja vissza glutationná. A hidrogén peroxid eltávolításának ezt az útját nevezzük aszkorbinsav-glutation, vagy Halliwell-Asada ciklusnak (1. ábra). Az aszkorbinsav és a glutation körfolyamatban vesz részt, amit négy enzim katalizál (APX, MDHAR, DHAR, GR), és végső soron a NAD(P)H-ból származó elektronok redukálják a hidrogén peroxidot vízzé (Noctor és Foyer, 1998).

A előbbiekből is látható, hogy a növényekben az egyik fő antioxidáns az aszkorbinsav. Az *L-treo-2-hexén-1,4-laktont* hívják L-aszkorbinsavnak, vagy C-vitaminnak. A 2-es és 3-as szénatomon található hidroxil csoport savasan disszociálhat ($pK_{a,1}=4.2$, $pK_{a,2}=11.6$), így vizes oldatban és a sejtekben is nagyrészt az egyszeresen disszociált forma, az aszkorbát van jelen. Ugyan ezek a hidroxil csoportok (és a velük

konjugációban lévő kettőskötés rendszer) felelős azért is, hogy az aszkorbinsav elektron donor, azaz redukáló szer lehet. Az összes növény és a főemlősök valamint a tengeri malac kivételével az összes állat képes az aszkorbinsav szintetizálására. Ennek a bioszintézisnek minden lépése még nem egyértelműen tisztázott növényekben (Smirnoff, 1996). Az általánosan elfogadott hipotézis szerint a növények is D-glukózból szintetizálják az L-aszkorbinsavat, bár a radioaktív izotóppal jelölt D-glukóz csak kis mennyiségben konvertálódik aszkorbinsavvá (Saito *et al.*, 1990). Több, különböző bioszintetikus utat is feltételeznek. Ezek közül a D-mannózból kiinduló, L-galaktózon és L-galaktono-1,4-laktonon keresztül történő szintézist bizonyították (Wheeler *et al.*, 1998; Conklin, 1998; 1999; Pallanca és Smirnoff, 1999), de pl. *Arabidopsis*-ban még legalább két bioszintetikus út létezik (Davey *et al.*, 1999).

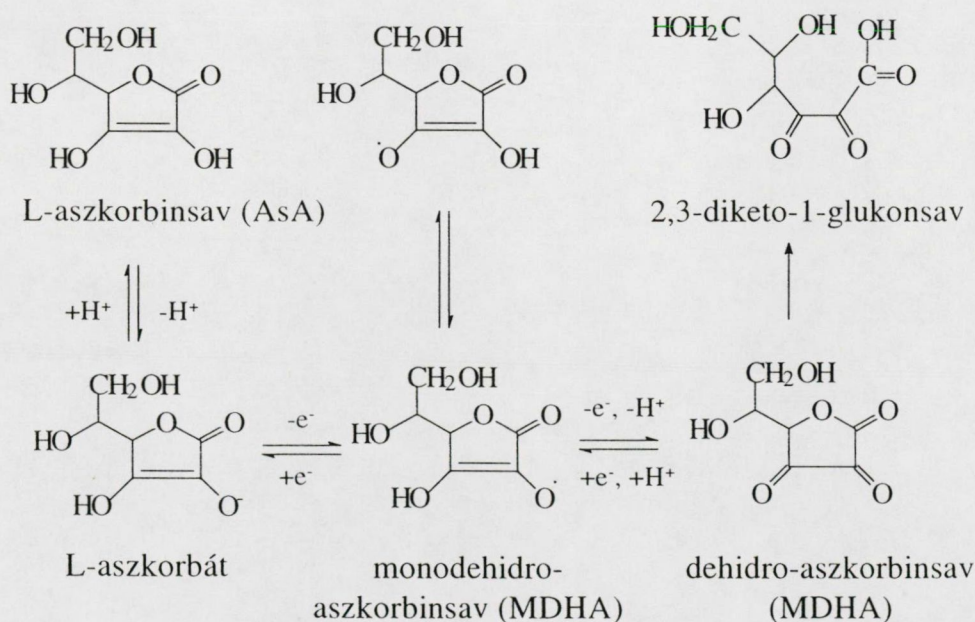


1. ábra: A szuperoxid gyök-anion és a hidrogén peroxid eltávolítása a kloroplasztiszbán (Asada, 1999).

A növényekben az aszkorbinsav millimólos koncentrációban akumulálódik a szövetekben. A levelek gyakran több aszkorbinsavat tartalmaznak, mint klorofillt, és ez az aszkorbinsav mennyiség az oldható szénhidrát mennyiségének akár a 10%-a is lehet. Az aszkorbinsav sok funkcióját leírták már, bár közülük viszonylag keveset jellemeztek részletesen. Az aszkorbinsav a fő elsődleges antioxidáns, közvetlenül is reagál a hidroxil gyökkel, szuperoxid gyök-anionnal és a szingulett oxigénnel. Emellett

fontos szerepe van a fény okozta károsodások kivédésében és a fotoszintézis szabályozásában, valamint segít megőrizni az átmenetifém tartalmú enzimek aktivitását. Az aszkorbinsav hatékony másodlagos antioxidáns is, mivel redukálja a nemvizes fázisok fontos antioxidánsának, az α -tokoferolnak az oxidált formáját.

Az aszkorbinsav redox rendszer az aszkorbinsavat, a monodehidro-aszkorbinsavat és az dehidro-aszkorbinsavat tartalmazza (2. ábra). Bár az aszkorbát oxidáznak különböző biológiai funkciói vannak, az aszkorbinsav redox rendszerben betöltött szerepe egyenlőre nem tisztázott. Az aszkorbinsav mind a két oxidált formája instabil vizes közegben. Az oxidáció az első terméke egy szabadgyök, a monodehidro-aszkorbinsav, vagy szemidehidro-aszkorbinsav, amit újabban aszkorbát szabadgyöknek is hívnak. Az AsA/MDHA rendszer standard redox potenciálja pH= 7.0-nél +330 mV, de a MDHA diszproporcionálódása miatt a sejten belül olyan alacsony a monodehidro-aszkorbinsav koncentrációja, hogy a tényleges érték +60mV körüli (Navas *et al.*, 1994).



2. ábra: Az aszkorbinsav (C vitamin) és oxidációs termékei (Washko *et al.*, 1992).

Az MDHA nem reagál más vegyületekkel, mint pl. a lipidekkel, így elmondható, hogy más gyökökhöz képest kevésbé destruktív hatású. Másodrendű

reakcióban gyorsan diszproporcionálódik, ami aszkorbinsavat és dehidro-aszkorbinsavat eredményez. A tilakoid membránban az MDHA-t a fotoredukált ferredoxin is gyorsan visszaredukálja (Miyake és Asada, 1994) aszkorbinsavvá. A dehidro-aszkorbinsav szintén visszaredukálható aszkorbinsavvá, ezt a reakciót katalizáló enzimet (DHAR) rizsből, spenótból és burgonyából is kitisztították. Ezen kívül *in vitro* DHAR aktivitása van a glutaredoxinoknak (tiol transzferázok), a fehérje diszulfid izomerázoknak, sőt még Kunitz-típusú tripszin inhibítornak is, bár a rizsből tisztított enzim aminosav szekvenciája eltérő ezektől az enzimektől. A DHAR, a GSH és a GR fontos szerepe GR túltermelő transzformált növényeken látható. Ezeknek a növényeknek magasabb az aszkorbinsav tartalma, és toleránsabbak az oxidatív stresszel szemben, míg a kisebb GR aktivitás kisebb toleranciát is jelent. A DHA is meglehetősen instabil molekula, vizes közegben irreverzibilisen 2,3-diketo-1-glukonsavvá hidrolizál (Washko *et al.*, 1992). Ez a reakció nagyon függ az oldat összetételétől, illetve a hőmérséklettől. Amennyiben nem redukálódik vissza a DHA, végső soron olyan két és négy szénatomos molekulákká bomlik, mint az oxálsav és a borkősav.

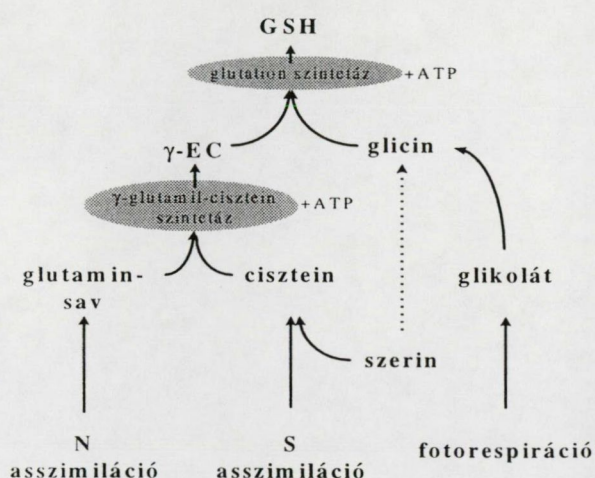
Az aszkorbinsav oxidált formájának, a dehidro-aszkorbinsavnak a redukciójáért a glutation felelős. A glutation redukált formája egy tripeptid (γ -glutamil-ciszteinil-glicin), amely egyensúlyban van az oxidált formával, a glutation diszulfiddal. Számos növény glutation homológokat tartalmaz, amelyekben a C-terminális glicin helyett más aminosav található. Ilyenek a homoglutation (γ -glutamil-ciszteinil- β -alanin) (Klapheck, 1988), a hidroximetil-glutation (γ -glutamil-ciszteinil-szerin) (Klapheck *et al.*, 1992), vagy a γ -glutamil-ciszteinil-glutaminsav (Meuwly *et al.*, 1993). Mivel az élesztőből izolált GR redukálja mind a homoglutation, mind a hidroximetil-glutation oxidált formáját is (Klapheck, 1988; Klapheck *et al.*, 1992), valószínűsíthető, hogy hasonló fiziológiai és biokémiai szerepük van, mint a sokkal szélesebb körben elterjedt glutationnak.

A növényekben a glutation fiziológiai szerepe kettős. Egyrészt résztvesz a kén metabolizmusban, és mint a legfontosabb nem-protein természetű tiol, szabályozza a gyökerek kénfelvételét. Másrészt a stresszhatások elleni védőreakciók fontos komponense. A glutation S-transzferáz szubsztrátja a xenobiotikumok detoxifikációja során. Emellett a nehézfémek toxikus hatását kivédő fitokelatinok prekursora, valamint a glutation fontos antioxidáns is, mind a növényi, mint az állati szervezetekben. Az

aszorbinsav és rajta keresztül az α -tokoferol regenerálása is GSH segítségével történik. Befolyásolja antioxidatív enzimek génjeinek az expresszáldását és szerepe lehet a sejtsztódás redox potenciál által történő szabályzásában is (Foyer *et al.*, 1997; Noctor és Foyer, 1998).

Szemben az aszorbinsav bioszintézisével, a glutation képződése az összes GSH-t tartalmazó élő szervezetben közös és jól ismert (3. ábra). Nem transzlációs folyamat során szintetizálódik, és a peptidázok sem bontják. Két, ATP függő lépésben képződik aminosavakból, mely folyamatokat a γ -glutamil-cisztein szintetáz és a glutation szintetáz katalizálja (Foyer *et al.*, 1994, 1997). Mind a két enzimet izolálták növényekből. Azok a fajokban, melyek hGSH található, homoglutation szintetáz aktivitás mérhető, mely enzimnek az affinitása a β -alaninhoz sokkal nagyobb, mint a glicinhez.

3. ábra: A glutation szintézis lépései.



Stresszkörülmények

között a kezdeti szakaszban (vészreakció) a glutation szint megemelkedik, kivédendő a megnövekedett koncentrációjú aktív oxigén tartalmú vegyületek káros hatását. Mivel a glutation a növényekben legnagyobb mennyiségben előforduló nem protein tiol, így a szintézise szoros

kapcsolatban van a cisztein képződésével és a szulfát anion felvételével is. A GSH szintézis enzimeit túltermelő növényeken végzett vizsgálatok mutatják, hogy a bioszintézis sebességhatározó lépése a γ -glutamil-cisztein képződése. Ezt a folyamatot γ -glutamil-cisztein szintetáz katalizálja. Az enzimet a GSH gátolja, így oxidatív stressz körülményei között, amikor a GSH-ból GSSG képződik, a gátló effektus lecsökken, és a glutation szintézis felgyorsul (Arisi *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 1996; 1997a; 1997b; 1998b).

A glutation *S*-transzferázok (GST, EC 2.5.1.18) katalizálják a redukált glutation és a hidrofil, elektrofil szubsztátok reakcióját (Pickett és Lu, 1989; Marrs, 1996). Ezek az anyagok sokszor citotoxikusak, így a GST-nek fontos szerepe van a xenobiotikumok átalakításában. Az átalakult xenobiotikum-GSH konjugátumokat a növényi sejtek a GSH pumpák segítségével a vakuólumokba transzportálhatják. A transzportált konjugátumokról a peptidázok lehasíthatják a glicint és a glutaminsavat, illetve a maradék cisztein aminocsoportjához hozzákötődhet egy malonil csoport is (Marrs, 1996). Hasonló transzportot tételeznek fel a plazmamembránon keresztül is, ami során az endogén és exogén xenobiotikumok *N*-malonil-cisztein származékai kijutnak az apoplastba és oldhatatlanul a sejtfalhoz kötődnek, de a GSH pumpák jelenléte a plazmamembránban még nem bizonyított (Sandermann, 1994).

1.3. Célkitűzés

Vizsgálatainkkal a növények antioxidatív védőreakcióit követtük nyomon különböző stresszkörülmények között. Arra kerestük a választ, hogy az ozmotikus és só stressz, illetve az UV-B stressz hatására milyen antioxidatív válaszreakciókat adnak a kiválasztott növények, és a stressz kiváltó oka hogyan befolyásolja ezeket a védőreakciókat.

Kísérleteink során egy halofita növény, az *Aster tripolium* alacsony só stressz (a fiziológiás sókoncentrációnál alacsonyabb NaCl koncentráció), továbbá négy glükofita növény, a kétszikű napraforgó (*Helianthus annuus* L.) és az egyszikű búza (*Triticum aestivum* L.), kukorica (*Zea mays* L.) és az étkezési gabonacirok (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) só, szárazság és UV-B stressz hatására bekövetkező stresszválaszait követtük nyomon. A szárazság stresszt polietilén-glikol (PEG6000), mint ozmotikum adagolásával szimuláltuk. Arra a kérdésre igyekeztünk választ kapni, hogy a leggyakoribb környezeti stresszkörülmények milyen hatást váltanak ki különböző növényekben a kezelés ideje alatt. Elsősorban a fiatal növények egyedfejlődésének hajtásnövekedési periódusát vizsgáltuk.

Célunk megvalósításához először olyan analitikai módszert kellett kifejleszteni, illetve az adott körülményekhez adaptálni, amellyel nyomon követhetők a különféle környezeti stresszhatások (ozmotikus, só és UV-B stressz) okozta változások a kísérleti haszonnövények védőrendszerében.

Irodalmi adatok alapján a következő vegyületcsoportokat és enzimeket vizsgáltuk, és dolgozatomat is ezen csoportosítás alapján tagoltam:

- Kationok (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+})
- Szervetlen anionok (Cl^- , NO_3^- , Br^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-})
- Poliaminok (putreszcin, spermidin és spermin) és prolin.
- Glutation redukált és oxidált formája (GSH és GSSG).
- Glutation reduktáz (GSSG reduktáz, GR, EC 1.6.4.2) és glutathion *S*-transzferáz (GST, EC 2.5.1.18)

2. MÓDSZEREK

2.1. Növénynevelés

2.1.1. Az *Aster tripolium* L. nevelése

A halofita *Aster tripolium* Nyugat-Európa tengerpartjain él, Portugáliától Skandináviáig, sós talajokon. Egyik alfaja, a sziki őszirózsa megtalálható a szikeseinken is. Kedvelt saláta, napjainkban próbálják gazdasági haszonnövényként a termesztését megoldani. Az *Aster tripolium*-mal, és még néhány halofita növényvel hasznosítani lehetne a fűlsós, esetleg a szikes területeket. Kísérleteink során arra kerestünk választ, hogy hogyan módosul a belső ion összetétele a növényeknek, ha az eredeti sókoncentrációnál alacsonyabb NaCl tartalmú talajokon termesztik, illetve, melyik az a legalacsonyabb sókoncentráció, amely mellett a növény még megtartja a kedvező tulajdonságait.

Az *Aster tripolium* magokat az Institute of Molecular Biology, Free University of Brussels (VUB), Belgium bocsátotta rendelkezésünkre. Származási helye Hollandia, az Ellewoutsdijk *Aster* populációhoz tartozik (Ellewoutsdijk Laag ökotípus).

A magokat ioncserélt vízzel nedvesített perlitben 25 °C-on 100%-os páratartalom mellett üvegházban csíráztattuk. Az első magok 1 hét után, míg az összes életképes mag 10 nap múlva csírázott ki (63%). A 12-15 napos csíranövényeket 18 dm³-es edényekben, folyadék kultúrában folyamatos levegőztetés mellett, és hetenkénti tápoldat cserével neveltük tovább fitotronban (Conviron Type PGV 36). Egy edénybe 15-18 db csíranövénykét ültettünk el. A tápoldat makro- és mikroelem-összetételét a 3. táblázat mutatja (Erdei *et al.*, 1984).

A növények nevelésénél az eredeti élőhelynek megfelelő magas sókoncentrációjú (300 mM) (Shennan *et al.*, 1987a; 1987b) tápoldat mellett egy NaCl mentes tápoldatban - pontosabban az oldat μ M koncentrációban tartalmazott kloridot, a tápoldat mikroelem tartalma miatt, de ez elhanyagolhatónak tekinthető (ezt neveztük a későbbiekben "kontrollnak")- és a következő, alacsony sótartalmú tápoldatokban is neveltünk növényeket: 2 mM NaCl, 10 mM NaCl. Napi 12 órás megvilágítást használtunk, a fényerősség 60 W*m⁻² volt a növények magasságának a szintjén. A fitotronban a hőmérséklet 23/18 °C (nappal/éjszaka) volt. A világításhoz Sylvania

(F48/T12/CW/WHO) és GroLux WS (F48/T12/GRO/WHO/WS) típusú fénycsőveket használtunk. A tápoldatban való nevelés 17. napján kezdtük meg a sókezelést, mivel a kísérleti növények erre az időre érték el a mintavételhez szükséges nagyságot. Ezt a napot nevezzük később a kísérleteink során a 0. napnak. A 300mM-os kezelést fokozatosan napi 50 mM NaCl koncentráció emeléssel oldottuk meg. A mintavételek a tápoldatban való nevelés 17., 26., 34., és a 45. napján (a kezelést követő 0., 9., 17., 28. napon) történtek.

3(a) táblázat: A tápoldat makroelem összetétele

Oldat NaCl [mM]	Ion koncentráció [mM]							
	K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻
Kontroll 0	2	0	2	2	0	2	5	0.5
NaCl 2	2	2	2	2	2	2	5	0.5
NaCl 10	2	10	2	2	10	2	5	0.5
NaCl 300	2	300	2	2	300	2	5	0.5

3(b) táblázat: A tápoldat mikroelem összetétele

Mikroelem	Vegyület	Koncentráció [μM]
Fe	Fe-EDTA	10
B	H ₃ BO ₃	10
Mn	MnSO ₄	1
Zn	ZnSO ₄	0.5
Cu	CuSO ₄	0.5
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.1
Co	CoCl ₂	0.1
Al	AlCl ₃	0.1
Si	Na ₂ SiO ₃	0.5

Az *Aster tripolium* nevelése során egyértelművé vált, hogy a magról kelt populáció nem homogén, különböző növénytypusokat tartalmaz. Kétféle habitusú (külsőre különböző) *Aster tripolium*-ot lehetett világosan elkülöníteni: egy keskeny és egy széles levelűt. A növénynevelés felgyorsítása, és a kísérletek során jól felhasználható, homogén *Aster tripolium* mintaanyag érdekében vegetatív szaporítással is neveltünk növényeket. A széles levelű forma alsóbb leveleinek hónaljhajlásait,

kimetszettük, majd tápoldatban gyökerezettük. A hajtások 90%-a gyökerezedett meg és növekedett tovább az első 10 nap során. Az így szaporított *Aster tripolium* növények "második generációja" (széles levelű forma) a kísérletekhez jól felhasználható homogén populációt adott.

A halofita *Aster tripolium*-ból meghatároztuk mind az anion, mind a poliamin, mind a glutation koncentráció változást a különböző sókezelések hatására.

2.1.2. A búza (*Triticum aestivum* L.) nevelése

Két fajta búzát (*Triticum aestivum* L. cvs. GK-Kata és GK-Tiszatáj) használtunk fel azokhoz a kísérleteinkhez, amikor az ozmotikus, só és UV-B stressz hatását vizsgáltuk búza csiranövényeken. Mind a két búza fajta magját a szegedi Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság bocsátotta a rendelkezésünkre. A GK-Tiszatáj közepesen szárazságtűrő, míg a GK-Kata érzékenyebb a csökkent vízpotenciál hatására.

A kicsírázott magokat vízkultúrásan, módosított Hoagland tápoldatban (Erdei *et al.*, 1984), fitotronban neveltük. (A vízkultúra nevelési körülmények az *Aster tripolium* nevelésénél leírtakkal azonosak.) A kezeléseket a 11. napon kezdtük azonos ozmolaritású, PEG 6000-et, vagy NaCl-ot tartalmazó tápoldatokkal (0, 100, 200 és 300 mOsm - 0, 0.24, 0.49 és 0.73 MPa -, ami a NaCl esetében rendre 0, 50, 100 és 150 mM koncentrációnak felelt meg).

Az UV-B kezelésekhöz egy fitotront átalakítottunk, és az UV-B tartományban sugárzó Philips TL 100W/01 fénycsővel szereltük fel. A növények szintjén mért UV-B fényintenzitás $2.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ a 310-315 nm-es ($\lambda_{\text{max}} = 311/312 \text{ nm}$) hullámhossztartományban (Santos *et al.*, 1993). A kezeléseket a 4 napos csiranövényeken kezdtük, és a 8. napig naponta vettünk mintát, mind a növekedés vizsgálatokhoz, mind a glutation koncentráció meghatározásához és a glutation reduktáz aktivitás méréséhez.

Az üvegházi kísérleteknél nyolc fajta búzát (*Triticum aestivum* L. cvs. Kharchia, Kobomugi, GK-Tiszatáj, MV-18, Plainsman, OK, GK-Kata és GK-Öthalom) használtunk (4. táblázat). A magokat a szegedi Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság bocsátotta a rendelkezésünkre. A poliamin és prolin szintek

meghatározásához használt zászlólevél mintákat három héttel a virágzás után gyűjtöttük.

4. táblázat: Az üvegházi kísérletek során használt búza fajták

Fajta	Eredet	Jellemző tulajdonság
Kharchia	India, Rajasthan	Sótűrő (Erdei & Trivedi, 1989), tavaszi búza
Kobomugi	Kína, Központi Sivatang	Szárazságtűrő (Erdei <i>et al.</i> , 1990)
Plainsman	USA	Szárazságtűrő (Galiba <i>et al.</i> , 1989), őszi búza
OK 84343	USA	Szárazságtűrő, őszi búza
GK-Kata	Magyarország	Szárazságra érzékeny, őszi búza
GK-Öthalom	Magyarország	Szárazságra érzékeny, őszi búza
GK-Tavaszi	Magyarország	Könnyen adaptálódik, tavaszi búza
GK-Tiszatáj M	Magyarország	Szárazságtűrő, őszi búza
MV-18	Magyarország	Szárazságra érzékeny, őszi búza

2.1.3. A kukorica (*Zea mays* L.) nevelése

Kísérleteinkben a szárazságtűrő cirok (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) poliamin szintjét a sokkal kevésbé szárazságtűrő kukoricához (*Zea mays* L. cv. Pioneer 3900) hasonlítottuk (Nagy *et al.*, 1995).

A vízkultúrák növénynevelés körülményei megegyeznek az előzőekben leírtakkal (Erdei *et al.*, 1984). A stresszhatás vizsgálatát a 8. napon kezdtük és 6 napig folytattuk, a szárazság és só stressz szimulálására 0, 50, 100, 200, 300 és 400 mOsm PEG 6000 (0, 0.12, 0.24, 0.49, 0.73 és 0.97 MPa), vagy NaCl tartalmú (rendre 0, 25, 50, 100, 150, 200 mM NaCl) tápoldatot használtunk.

2.1.4. A napraforgó (*Helianthus annuus* L.) nevelése

A napraforgó (*Helianthus annuus* L. cvs. Viki és Blumix) hibrideket - egy stressz toleráns és egy kevésbé toleráns hibrid - a szegedi Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság bocsátotta rendelkezésünkre. E két hibridet magas olaj tartalmuk és betegségekkel szembeni ellenálló képességük miatt széles körben termesztik. A Viki

nemzetközileg regisztrált hibrid, Franciaországban és Magyarországon a korai éréscsoportban a hivatalos kísérletek standardja. Méréseink során a napraforgót, mint kétszikű növényt vizsgáltuk, és arra voltunk kíváncsiak, hogy az adott paraméterek között a stresszválaszban jelentkezik-e különbség a kétszikű és az egyszikű glükofita növények (napraforgó és búza), valamint a halofita és a glükofita kétszikű növények (*Aster tripolium* és napraforgó) között.

A kaszatterméseket perlitbe vetettük, majd a csíranövényeket 7 napos korukban helyeztük a tápoldatba, ahol 17 napos korukig neveltük őket. (A vízkultúrák nevelési körülmények az *Aster tripolium* nevelésénél leírtakkal azonosak.) A stresszkezeléseket a 11. napon kezdtük és 6 napig folytattuk, napi mintavételek mellett. Az ozmotikus stresszt 200 mOsm polietilén-glikol (14.3 % PEG 6000) tartalmú tápoldatban valósítottuk meg, az oldat ozmolaritását ozmométerrel ellenőriztük. A PEG koncentrációt korábbi kísérletek alapján határoztuk meg (Trolinder és Shang, 1991; Szabó-Nagy *et al.*, 1992; Erdei és Taleisnik, 1993). A só stressz során 100 mM NaCl tartalmú tápoldatot használtunk, amely azonos ozmolaritású volt, mint a PEG 6000-es tápoldatunk.

A napraforgónál az anion háztartás változását vizsgáltuk a szárazság és a só stressz hatására.

2.1.5. Gabonacirok (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) nevelése

A kísérleteinkben használt étkezési gabonacirok (*Sorghum bicolor* [L.] Moench cv. ICSV 112) Indiából származó szárazságtűrő fajta (Masojidek *et al.*, 1991). Vizsgálataink célja, hogy kiderítsük, az előző növényeknél vizsgált paraméterekkel lehet-e jellemezni a *Sorghum bicolor* szárazságtűrését.

A növénynevelés és a kísérleti körülmények azonosak voltak a kukoricánál leírtakkal.

2.2. Kation tartalom meghatározása

2.2.1. Növényi minták előkészítése

A növénymintának meghatároztuk a nedves súlyát (gFW), majd 85°C-on 24 órán át szárítottuk, és légszáraz állapotban, szobahőmérsékleten megmértük a száraz súlyát is (gDW). A szárított és elporított növényi mintákból 0.1 gDW-re ráértünk

5 cm³ cc. salétomsavat (HNO₃), állni hagytuk egy éjszakán át, majd forraltuk (kb. 160 °C-on,) a nitrozus gőzök megszűnéséig. Ezután a mintákat lehűtöttük, óvatosan hozzáadtunk 2 cm³ cc. hidrogén-peroxidot (H₂O₂) és újra forraltuk. A hidrogén-peroxid elpárolgása után a mintákat lehűtöttük, újra 2 cm³ cc. hidrogén-peroxidot (H₂O₂) adtunk hozzá, majd újra forraltuk. A kihűtött, elroncsolt mintákat 20 cm³-re hígítottuk, és a felhasználásig 4 °C-on, jól zárható szcintillációs csövekben tároltuk.

2.2.2. Fémek mérése

A roncsolt növényi minták fémtartalmát (Na, Mg, K és Ca) Zeiss AAS-1-N és Hitachi Z8200 atomabszorpciós spektrofotométerrel határoztuk meg. A gerjesztéshez acetilén/levegő lángot használtunk.

2.3. Szervetlen anionok kvalitatív és kvantitatív analízise

2.3.1. Növényi minták előkészítése

2 gFW cseppfolyós N₂-ben lefagyasztott mintát és 0.5 g mosott kvarchomokkal dörzsmozsárban jól eldörzsöltünk 20 cm³ háromszor desztillált vízben, és üveg kémcsőben 60 °C-on az ultrahangos mosogatóban szonifikáltuk 1 óráig N₂ atmoszféra alatt. Ez után 10 percre forrásban lévő vízbe mártottuk a kémcsöveket, hogy a fehérjék egy része kicsapódjon, és 27000 g-n (15000 rpm) 4 °C-on lecentrifugáltuk (20 min). A felülúszóból 5 cm³-t C₁₈-as "SPE cartridge"-on átnyomtunk, és 0.2 µm-es PTFE (politetrafluoro-etilén, Teflon®) membránszűrőn szűrtük. A kapott oldatot -20 °C-on tároltuk, és szükség esetén hígítottuk (10- és 100-szoros hígítás). A módszer szerint a nitrit nem oxidálódott a mintaelőkészítés során.

2.3.2. Növényi minták kromatografálása

Interaction Ion 120 anioncserélő oszlopot használtunk 2 mM szalicilsav + 2 mM Na-szalicilát (TRIS pufferrel pH = 7.8-ra állítva) eluenssel, izokratikus HPLC pumpával (BioRad) és vezetőképesség mérő detektorral (BioRad), szobahőmérsékleten (Maróti *et al.*, 1994). Az áramlási sebesség 1.2 cm³·min⁻¹ volt, és 20 µl mintát injektáltunk. Az értékeléshez BioRad Model 700 Chromatography Workstation ver. 3.64 software-t használtunk.

Mivel az eredetileg használt Interaction Ion 120 kolonna a mérési sorozat közben előregedett, és a piacon nem volt beszerezhető ilyen típusú analitikai oszlop, ezért a módszert adaptáltuk Merck Polyspher IC AN-1 anion cserélő oszlopra és előtét kolonnára. Eluensként az oszlophoz javasolt Merck 2.13-as puffert használtuk, amely még 5 % acetonitrilt is tartalmazott (4.5 mM bórsav + 13.5 mM mannit [mannitol] + 3.8 mM TRIS + 5% acetonitril). Az áramlási sebesség $1.2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ volt 45 °C-on. Az anionokat Bio-Rad vezetőképességmérő detektorral (Range: 200 μS , Sensitivity: 100) mértük. 100 μl -es mintát injektáltunk. Gynkotec Model 300-as izokratikus HPLC pumpát (Dionex-Softtron) és Gynkosoftware Chromatography Data System, ver. 4.22 kromatográfiás értékelő software-t (Dionex-Softtron) használtunk.

2.4. Poliaminok és prolin analízise

2.4.1. A növényi minták előkészítése

A meghatározásához 1 gFW növényi mintát használtunk. A mintát cseppfolyós N_2 -ben lefagyasztottuk, és porcelán mozsárban 4 °C-on eldörzsöltük 0.5 g perklórsavval mosott kvarchomok és 5 cm^3 0.5 M HClO_4 (perklórsav, PCA) jelenlétében. A homogenizátumot 4 °C-on, 27000 g-n (15000 rpm) 20 percig centrifugáltuk, a felülúszót 0.45 μm -es PTFE membránszűrőn leszűrtük és a további mintaelőkészítéshez az így kapott oldatokat használtuk (Erdei *et al.*, 1996).

2.4.2. Poliaminok benzoilezett származékainak a meghatározása

Származék képzés: A poliaminok koncentrációját Flores és Galston (1982b), valamint Erdei és munkatársai (1990) módszere alapján határoztuk meg. 2.5 cm^3 felülúszót meglúgosítottunk 2 cm^3 2 M NaOH-dal, és szobahőmérsékleten intenzíven kevertettük 10 μl benzoil-kloriddal 30 percig (Redmond és Tseng, 1979). Az extrakció megkönnyítésére 1 cm^3 telített NaCl-ot adtunk az elegyhez (Flores és Galston, 1982b). A poliaminok benzoil származékait $2 \times 2 \text{ cm}^3$ dietil-éterrel kiextraháltuk, az étert N_2 áramban elpárologtattuk, a bepárolt mintát 0.1 cm^3 acetonitrilben feloldottuk, és -70 °C-on tároltuk a mérésekig. A szobahőmérsékletre felmelegített mintákat használtuk a folyadékkromatográfiás mérésekhez.

Kromatográfiás körülmények: A poliaminok benzoilezett származékait izokratikus körülmények között analizáltuk 45 térf. % acetonitril tartalmú eluenssel,

35 °C-on. Az eluens áramlási sebessége $1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ volt. A mérésekhez előbb Hi-Pore C-18 (250 mm*4.6 mm), majd a későbbiekben PhaseSept Spherisorb S5 C8 (250 mm*4.6 mm) fordított fázisú analitikai oszlopot használtuk (Erdei *et al.*, 1996), és 254 nm-en detektáltuk a mérendő vegyületeket UV detektorral (BioRad UVIS 204, Spectra-Physics) (Erdei *et al.*, 1996). Gynkotek Model 300-as izokratikus HPLC pumpával (Dionex-Softtron) biztosítottuk az eluens áramlását, 20 µl mintát injektáltunk. A kapott eredményeket Gynkosoftware Chromatography Data System, ver. 4.22 software-rel (Dionex-Softtron) értékeltük ki. Külső standard módszerrel kalibráltunk, a poliamin standardekkel a teljes mintaelőkészítési folyamatot végrehajtottuk. Az eredményeket standard addícióval ellenőriztük.

2.4.3. Poliaminok és prolin FMOC származékainak együttes meghatározása

Származék képzés: 0.1 cm^3 KOH (2 M) - KHCO_3 (2.4 M) oldatot és 1 cm^3 400 mM borát puffert (pH = 10.4) adtunk 0.2 cm^3 felülúszóhoz (PCA-s extraktum), majd szobahőmérsékleten 10 percig reagáltattuk 0.2 cm^3 acetonitrilben oldott FMOC-Cl-dal (10 mM), sötétben (Bartók *et al.*, 1992). A reakcióelegyet 4 °C-on Eppendorf centrifugában lecentrifugáltuk (15 min), a felülúszót $0.2 \mu\text{m}$ -es PTFE membránszűrőn szűrtük és azonnal kromatografáltuk.

Kromatográfiai körülmények: A poliaminok és a prolin FMOC származékait izokratikus körülmények között analizáltuk 45 térf. % acetonitril tartalmú eluenssel, 35 °C-on. Kovasil MS-C14 (35 mm*4.6 mm) fordított fázisú, nem pórusos analitikai oszlopon választottuk el a komponenseket (Szegetes *et al.*, 1996; 2000), és 264 nm-en detektáltuk az FMOC származékokat UV detektorral (BioRad UVIS 204, Spectra-Physics). Gynkotek Model 300-as izokratikus HPLC pumpát (Dionex-Softtron) használtunk, az eluens áramlási sebessége $1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ volt. 20 µl mintát injektáltunk be a HPLC-be. A kapott eredményeket Gynkosoftware Chromatography Data System, ver. 4.22 software-rel (Dionex-Softtron) értékeltük ki. Külső standard módszerrel kalibráltunk, az eredményeket standard addícióval ellenőriztük. A standardekkel a teljes mintaelőkészítési folyamatot végrehajtottuk. 1,6-diamino-hexánt használtunk belső standardként.

2.5. A glutation redukált és oxidált formájának analízise

2.5.1. A növényi minták előkészítése

1 gFW friss növényi mintát cseppfolyós N_2 -ben lefagyasztottunk, hozzáadtunk 0.5 g PCA-val mosott kvarchomokot, porcelán mozsárban elporítottuk, majd 4 °C-on 4 cm³ 1 mM BPDS-t tartalmazó 1 M perklórsavval (PCA) kioldottuk a mintából az oldható tioloikat. A minta előkészítés során használt BPDS nagyon jó kelátképző, főleg a Fe^{3+} és Cu^{2+} ionokkal alkot stabil komplexet, így csökkenti a szabad tiol csoportokat tartalmazó molekulák autooxidációját. A másik nagy előnye, hogy a DNP-származék mérése során nem jelentkezik interferencia a GSSG DNP-származékával (Reed *et al.*, 1980). Az extraktumot 4 °C-on, 27000 g-n (15000 rpm) 20 percig centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk a származékképzési reakciókhoz.

2.5.2. Összes glutation szint meghatározása

Származék képzés: 0.6 cm³ 200 mM CHES-t (pH = 9.3) és 0.2 cm³ KOH (2 M) - $KHCO_3$ (2.4 M) oldatot adtunk 0.4 cm³ PCA-s extraktumhoz, és az oxidált diszulfid kötéseket 1 órán át redukáltuk sötétben, szobahőmérsékleten 0.1 cm³ 3 mM DTT oldattal. A teljes redukció után a reakcióelegyből kivettünk 0.33 cm³-t, és ezt reagáltattuk 0.02 cm³ 15 mM mBBR acetonitriles oldatával, sötétben, szobahőmérsékleten. A reakciót 15 perc múlva 0.25 cm³ 0.25 térf. % metánszulfonsav adagolásával állítottuk meg, hogy elkerüljük a nem kívánt mellékreakciókat (Rauser *et al.*, 1991). Az oldatot 4 °C-on Eppendorf centrifugában lecentrifugáltuk (15 min), a felülúszót 0.2 µm-es PTFE membránszűrőn szűrtük, és a mérésekig -20 °C-on tároltuk. A minták legalább 2 hétig, mérhető bomlás nélkül tárolhatóak voltak.

Kromatográfiás körülmények: A fluoreszcens mBBR származékot BioRad Bio-Sil ODS-5S (250 mm*4.0 mm) oszlopon, gradiens HPLC készülékben (BioRad) választottuk el, és detektálásra fluoreszcens detektort (BioRad, Jasco) használtunk, 380/480 nm-en. A gradiens profil a következő volt: lineáris gradiens 5 percig, 5% B oldattól 13 %-ig, majd további 9 percig izokratikus körülmények között mértünk, utána 13 %-ról 98 %-ra emeltük a B oldat arányát, hogy a melléktermékektől megtisztítsuk az oszlopot. Az A oldat 0.25 térf. % ecetsavat, 5 térf. % acetonitrilt és 50 mM $KClO_4$ -ot tartalmazott, a B oldat pedig 0.25 térf. % ecetsavat, 80 térf. % acetonitrilt és 50 mM $KClO_4$ -ot. Az áramlási sebesség 1.0 cm³*min⁻¹ volt. 20 µl mintát injektáltunk a

mérések során. Külső standard módszerrel kalibráltunk, az eredményeket standard addícióval ellenőriztük. Az értékeléshez BioRad Model 700 Chromatography Workstation ver. 3.64 software-t használtunk.

2.5.3. A glutation és a glutation-diszulfid koncentrációjának meghatározása

Származék képzés: 0.5 cm³ PCA-s extraktumot 0.05 cm³ 100 mM jódecetsav oldattal karboxi-metileztünk. A 100 mM jódecetsav oldat 0.2 mM *m*-kerzol bíort tartalmazott, ami egyrészt a sav-bázis indikátor szerepét töltötte be a későbbiekben, másrészt stabilizálta az oldatban a jódecetsavat. A savas oldatot 0.48 cm³ KOH (2 M) - KHCO₃ (2.4 M) oldattal meglúgosítottuk (pH = 9-10), és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk sötétben. Miután lejátszódott a karboxi-metilezési reakció, 0.01 cm³ megolvasztott DNFB-t adtunk a mintáinkhoz, amit ezután 4°C-on 12 óráig állni hagytunk sötétben (Farris és Reed, 1987). A kész DNP-származékot tartalmazó oldatot Eppendorf centrifugában lecentrifugáltuk (4°C, 15 min), majd 0.2 µm-es PTFE membránszűrőn átszűrtük és 4°C-on tároltuk. A DNP-származékokat tartalmazó mintákat 24 órán belül analizáltuk (Siller-Cepeda *et al.*, 1991).

Kromatográfias körülmények: A DNP származékokat gradiens HPLC készülékben (BioRad), BioRad Amino-5S oszlopon (250 mm*4 mm) választottuk el, és UV detektorral (BioRad, Spectra-Physics) detektáltuk, 365 nm-en. 10 percig izokratikus körülmények között mértünk (75 % A oldat, 25 % B oldat), majd 30 perces lineáris gradienssel a B oldat koncentrációját 95%-ig emeltük. Az A oldat 80 térf. % metanolt tartalmazott, míg a B oldat 0.55 M nátrium acetátot, 12.6 térf. % ecetsavat és 64 térf. % metanolt (Szegetes *et al.*, 1994). Az áramlási sebesség 1.0 cm³*min⁻¹ volt. A mérések során 100 µl mintát injektáltunk. Külső standard módszerrel kalibráltunk, az eredményeket standard addícióval ellenőriztük. Az értékeléshez BioRad Model 700 Chromatography Workstation ver. 3.64 software-t használtunk.

2.6. Glutation S-transzferáz

2.6.1. Növényi minták előkészítése

Az előkészítés során a mintákat jégén tartottuk. Az 1 gFW, cseppfolyós nitrogénben lefagyasztott növényi mintát előhűtött porcelán mozsárban 0.5 g kvarchomok, 0.04 g PVPP és 4 cm³ 50 mM foszfát puffer (pH = 7.0, 1 mM EDTA)

hozzáadásával eldörzsöltük. Az így kapott homogenizátumot 4°C-on, 27000 g-n (15000 rpm) 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót Eppendorf csövekbe szétosztottuk, és mérésig -70 °C-os hűtőben tároltuk.

2.6.2. A glutation *S*-transzferáz aktivitásának a meghatározása

A glutation S-transzferáz (GST, EC 2.5.1.18) aktivitását 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB), mint szubsztrát segítségével mértük meg, spektrofotometriásan, Mannervik és Guthenberg (1981) által kidolgozott módszer alapján.

- 2.60 ml 0.2 M foszfát puffer, pH = 7.5, 1 mM EDTA,
- 0.15 ml 20 mM GSH,
- 0.10 ml enzim kivonat,
- 0.15 ml 20 mM CDNB, etanolban.

A reakciót a CDNB hozzáadásával indítottuk el és az abszorbania növekedés sebességét detektáltuk 340 nm-en. Az enzimaktivitás (GST-C aktivitás) számolásához irodalmi adatokból származó moláris extinciókoefficiens ϵ_{340} (GSH-CDNB) = 9.6 mM⁻¹·cm⁻¹) használtunk (Habig *et al.*, 1974; Irzyk és Fuerst, 1993; Riechers *et al.*, 1997). A végeredményt EU/mg fehérje [EU/mg prot.] mértékegységben adtuk meg.

2.6.4. A fehérjetartalom meghatározása

Az enzimaktivitás méréshez használt extraktumból Lowry és munkatársai (1951) módszerével mértük meg a protein tartalmat. Az abszorbancia változást 735nm-en detektáltuk, standardként borjú-szérum albumint (BSA) használtunk.

3. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

3.1 Kationok

A célkitűzésekben feltett kérdések megválaszolása teszi szükségessé az irodalomban már széleskörűen feltérképezett kation tartalom (Bengtsson *et al.*, 1987; Jensén *et al.*, 1987) meghatározását a különböző stressz körülmények között.

A növényi minták kation tartalmát atomabszorpciós spektrofotométerrel határoztuk meg. A kation akkumulációját ozmotikus és só stressz körülményi között fejlődött halofita és glükofita növényekben mértünk. Az egyes növények levelének és gyökérzetének összes (az egyes fémekből az adott növényi szervben található összes mennyiség) makroelem (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) tartalmát hasonlítottuk össze. Vizsgáltuk:

- Kation koncentrációt a széles és keskeny levelű *Aster tripolium*-ban,
- a só és az ozmotikus stressznek a kation összetételre gyakorolt hatását napraforgóban,
- a só és ozmotikus stressz hatását a búza kation háztartásának cirkadián ritmusára,
- az UV-B sugárzás befolyását a kation akkumulációra só és ozmotikus stressz körülmények között.

A független kísérletek azt mutatták, hogy a méréseink jól reprodukálhatók és az egyes növény nevelésekből származó minták közötti eltérés 10% alatt van.

Az *Aster* hajtásában a kationok koncentrációja és egymáshoz való aránya megváltozott, ha a fiziológiás körülményekhez képest ($\approx 300 \text{ mM NaCl}$) csökkentettük tápoldat NaCl tartalmát. Független növénynevelések során mért Na^+ tartalom már 2 mM Na^+ ion kezelés hatására megemelkedett a "kontroll"-nak tekintett 0 mM NaCl kezeléshez képest a 46 napos kísérlet során, míg 10 mM sókezelés ennek közel duplájára növelte a hajtásban Na^+ koncentrációt. A 300 mM kezelés, ami közel fiziológiás körülményeknek felel meg a halofita *Aster tripolium* esetében, $5200 \mu\text{mol/gDW}$ koncentrációra emelte a levél Na^+ szintjét. Amíg a Na^+ ion emelkedett a kezeléshez használt NaCl koncentrációval arányosan, addig a felvett K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok szintje már a 10. napra csökkent és a 45. napra igen alacsony szintre esett vissza (Erdei *et al.*, 1995).

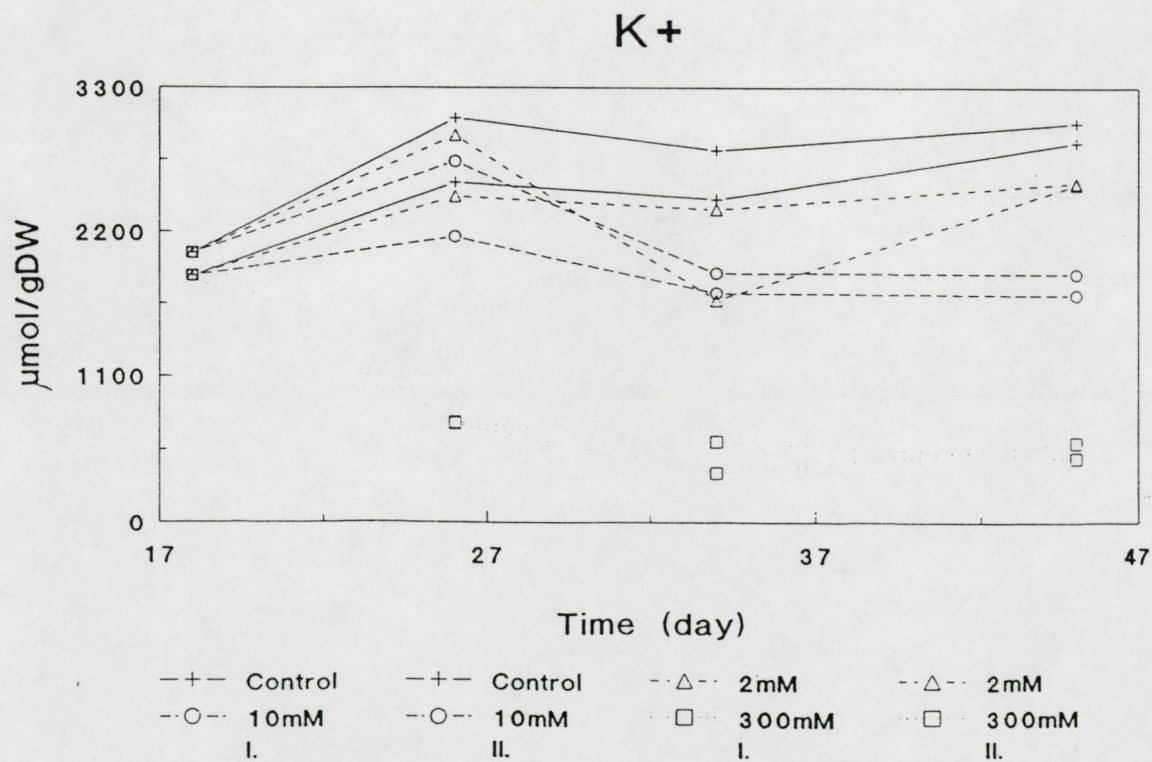
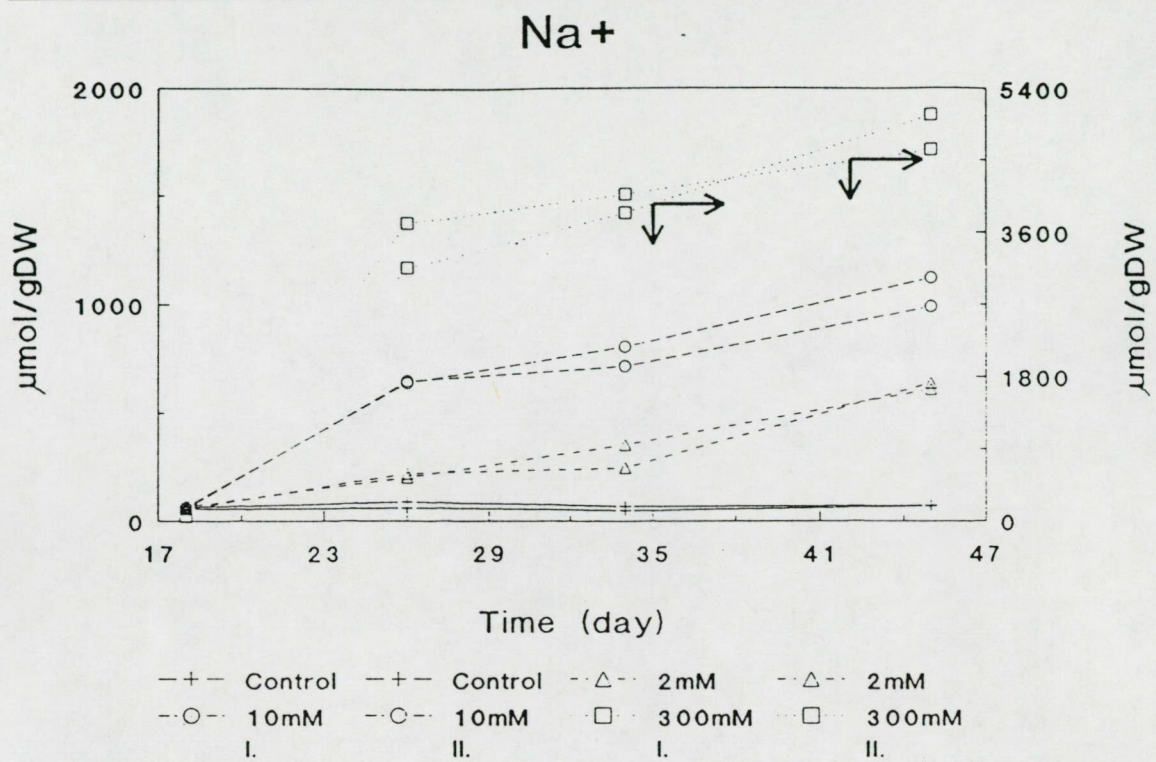
A Na^+ akkumulációja emelkedett mind a külső só koncentrációjának növelésével, mind a növény életkorának előrehaladásával. Már a legalacsonyabb koncentráció mellett (2 mM) szignifikánsan nőtt a belső Na^+ ion felhalmozás, ami 46 nap elteltével ennek közel duplájára emelkedett 10 mM NaCl kezeléskor. A 300 mM sókezelés kb. ötszörös belső Na^+ felhalmozást eredményezett a hajtásokban. Tíz nap elteltével a K^+ koncentráció lecsökkent a levelekben az alacsonyabb külső NaCl jelenlétében, ámbar ez nem jelentett 30 %-nál nagyobb eltérést a kontrollhoz (0 mM NaCl) képest (4. ábra). Azonban drámai változás állt be a 300 mM sókezeléskor, ahol a K^+ ion felvétel állandó értékre állt be, 500 $\mu\text{mol/gDW}$ körülire. Hasonló csökkenő változás trendje érvényesült a Ca^{2+} és a Mg^{2+} koncentrációra levélben is (5. ábra), ahol szignifikáns hatást csak a 300 mM külső NaCl mellett mértünk.

A széles levelű és a keskeny levelű *Aster tripolium*-nál eltérő kation felhalmozást találtunk: 300 mM külső NaCl mellett a széles levelű forma Na^+ ion koncentrációja nagyobb volt, ennek 50-70 %-át mértük a keskeny levelű formánál (4. ábra). Az alacsonyabb külső NaCl jelenléte nem okozott ilyen változást. Érdekes, hogy a széles levelűek *Aster tripolium*-ban a só stressz okozta K^+ tartalom sokkal intenzívebb változást mutatott a kezelés kezdetén mint a keskenylevelű formában (4. ábra). Ugyanez a tendencia figyelhető meg a kétértékű Ca^{2+} és Mg^{2+} mennyiségre (5. ábra), bár ez csak a magas sókoncentráció mellett mérhető és szignifikáns eltérést csak a Na^+ esetében kaptunk.

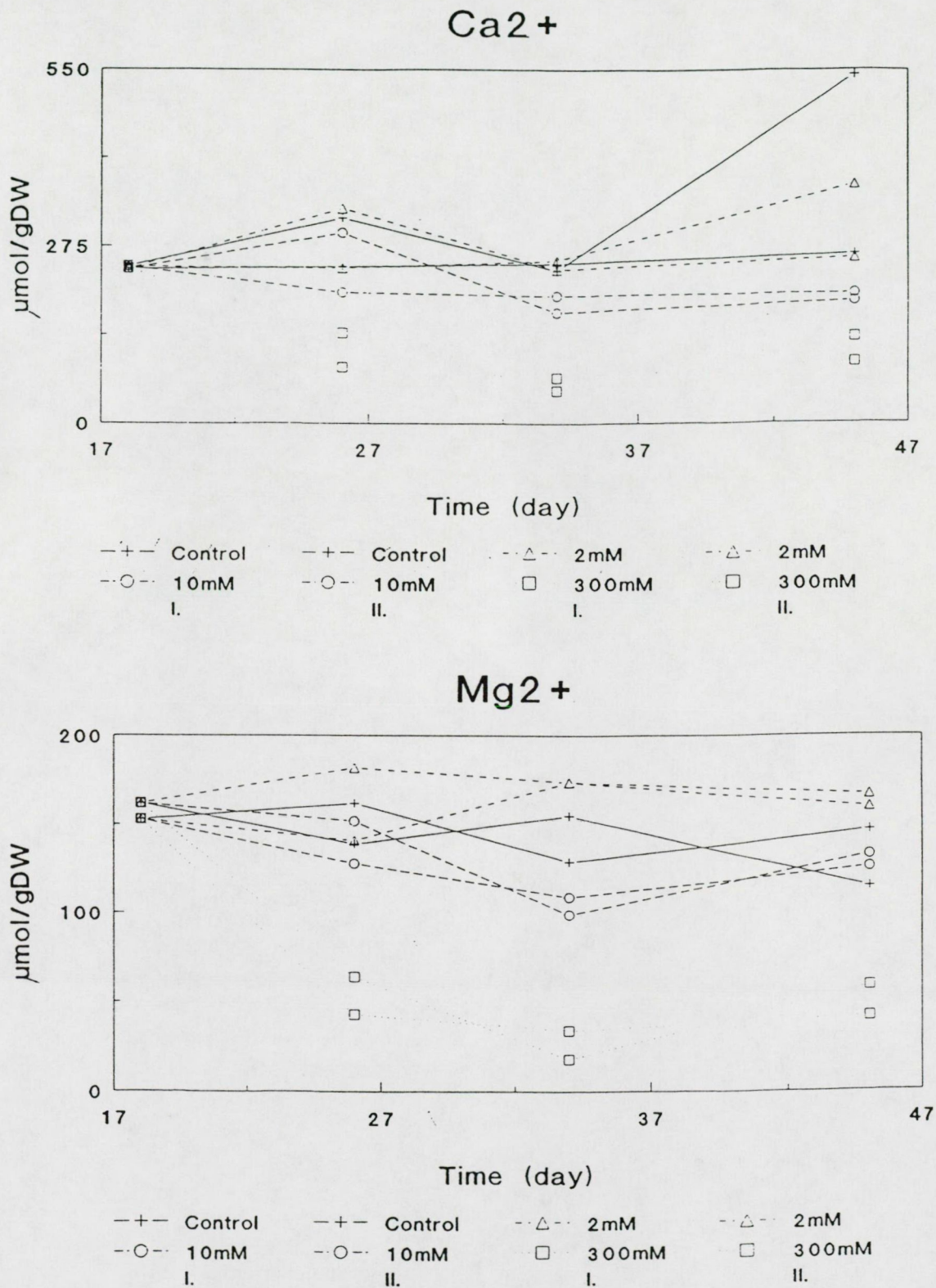
Napraforgóban a Viki fajtát mint stresszre toleránsabb, és a Blumixet mint a szárazság és só stresszre érzékeny fajtát vizsgáltuk. A mintákat a korábbi eredményeink alapján a 3. napon vettük. Az ozmotikus stresszt 200 mOsm PEG alkalmazásával, míg só stresszt 100 mM NaCl bevitelével váltottunk ki.

Három független kísérlet sorozatot végeztünk, a kation felhalmozást a 6., 7. ábrákon mutatjuk be.

A Na^+ felhalmozódás sókezelés hatására jelentősen megnövekedett. Ennek értéke 200-szorosára nőtt a gyökérben, illetve 100-szorosára a levélben. A stressztoleránsabb Vikiben eltérés egyedül a levélben volt alacsonyabb, közel 60-szorosára nőtt a Na^+ ion szint a kontrollhoz képest (6. ábra).



4. ábra: Az *Aster tripolium* levél Na⁺ és K⁺ tartalmának a változása sókezelés hatására. Az (I.) a széles levelű forma, míg a (II.) a keskeny levelű.



5. ábra:

Az *Aster tripolium* levél Ca^{2+} és Mg^{2+} tartalmának a változása sókezelés hatására. Az (I.) a széles levelű forma, míg a (II.) a keskeny levelű.

A Na^+ ion akkumuláció nőtt NaCl bekezelést követően, de a Na^+ ionok nem vesznek részt az ozmotikus szabályozásban a PEG-gel kiváltott szárazság stressz esetében. A Na^+ kismértékben felhalmozódott a gyökerekben és csak részlegesen transzlokálódott a hajtásban. A Viki nagyobb hatékonysággal tudta kizárni a nátrium iont a hajtásból mint a Blumix.

A K^+ koncentráció mind a levélben, mind a gyökérben lecsökkent a só stressz hatására, míg a PEG által indukált ozmotikus stressz során kismértékű növekedést okozott, bár a változások nem különböztek szignifikánsan a kontrolltól (6. ábra). A fajták között nem volt különbség a K^+ koncentrációban.

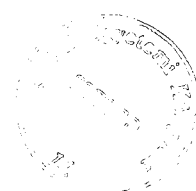
A mért kétértékű ionok (Ca^{2+} , Mg^{2+}) szintje NaCl kezelés hatására csökkent (6., 7. ábra), míg PEG kezelés során nőtt, mind a levélben, mind a gyökérben. Itt sem találtunk szignifikáns különbségeket a fajták között.

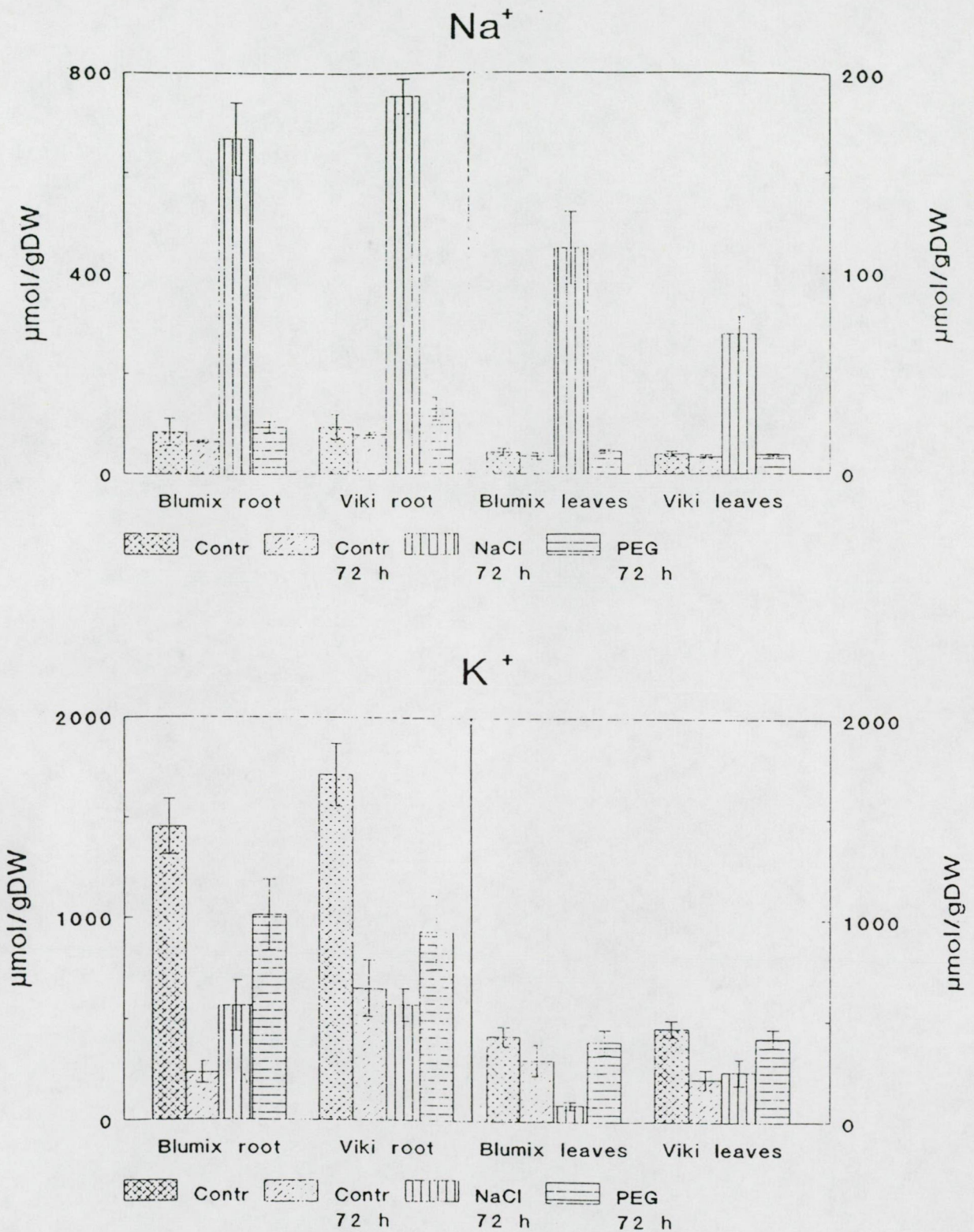
A kationok változását a búza növekedési periódusának 11. és 16. napja között követtük nyomon, a GK-Kata fajtában. Az öt napig tartó különböző sókezelést UV-B fénybesugárzással kombináltuk, és mintáinkat gyökérből és levélből vettük. A növények intenzív növekedését láttuk 150 mM NaCl külső bevitel alatt.

A Na^+ , K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok akkumulációját követtük emelkedő NaCl koncentráció mellett, sötét és fény periódus váltakozásával. A Na^+ gyökérben a mintavétel során folyamatosan akkumulálódott (8. ábra), míg a levélbe ennek a mennyiségnek csak egy része jutott el. Ugyanakkor hajtásban a Na^+ ionok felhalmozódása egy jól meghatározott periódicitást mutatott. Hasonló periódicitást követett a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok koncentrációjának időbeli változása is (9-11. ábra). A korábbi eredményekhez hasonlóan a sókezelés hatására ezeknek az ionoknak a koncentrációja lecsökkent. A csökkenés a gyökérben volt a nagyobb mértékű.

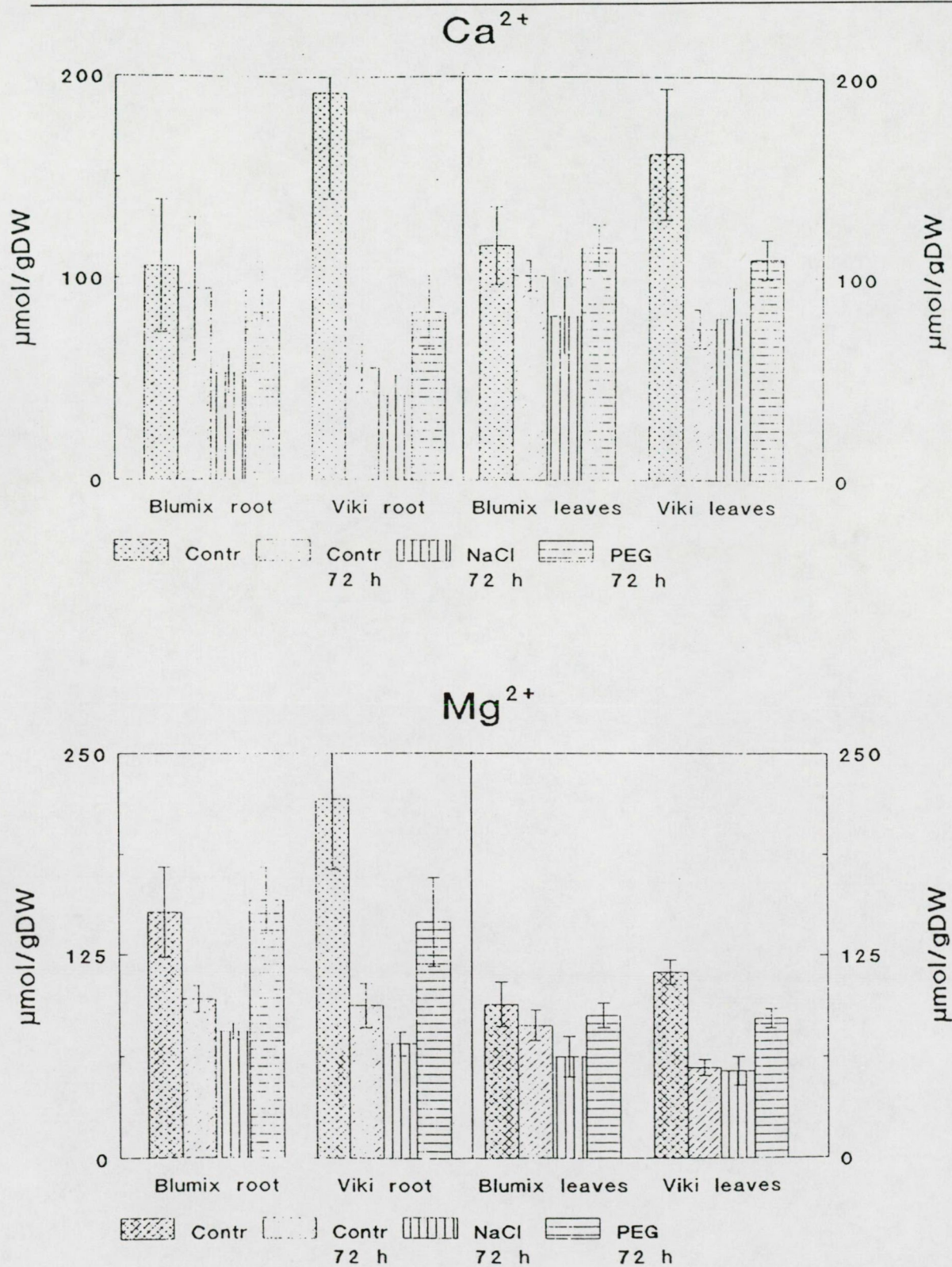
Mindezek az eredmények arra irányították figyelmünket, hogy az oszcilláció paraméterei a kationok típusától és a külsőleg adott kation koncentrációtól függő, ami komoly matematikai értékelést kíván.

Amennyiben a sókezelést UV-B kezeléssel kombináltuk, a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} felvételben nem tapasztunk mérhető eltérést az UV-B kezelt és nem kezelt növények között. A Na^+ ion akkumuláció viszont a levélben, és kisebb mértékben, ugyan de a gyökérben is csökkent (12-15. ábra).

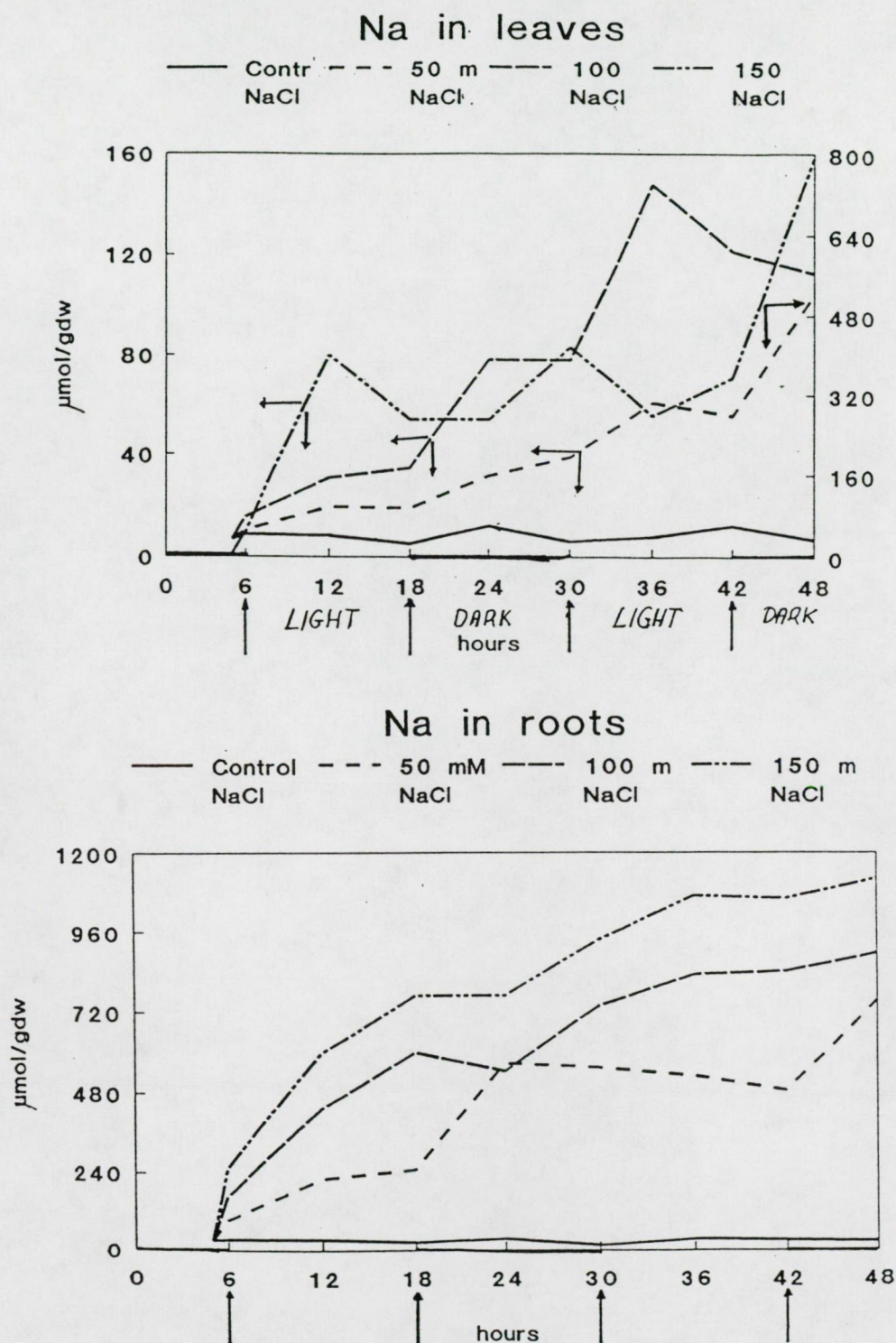




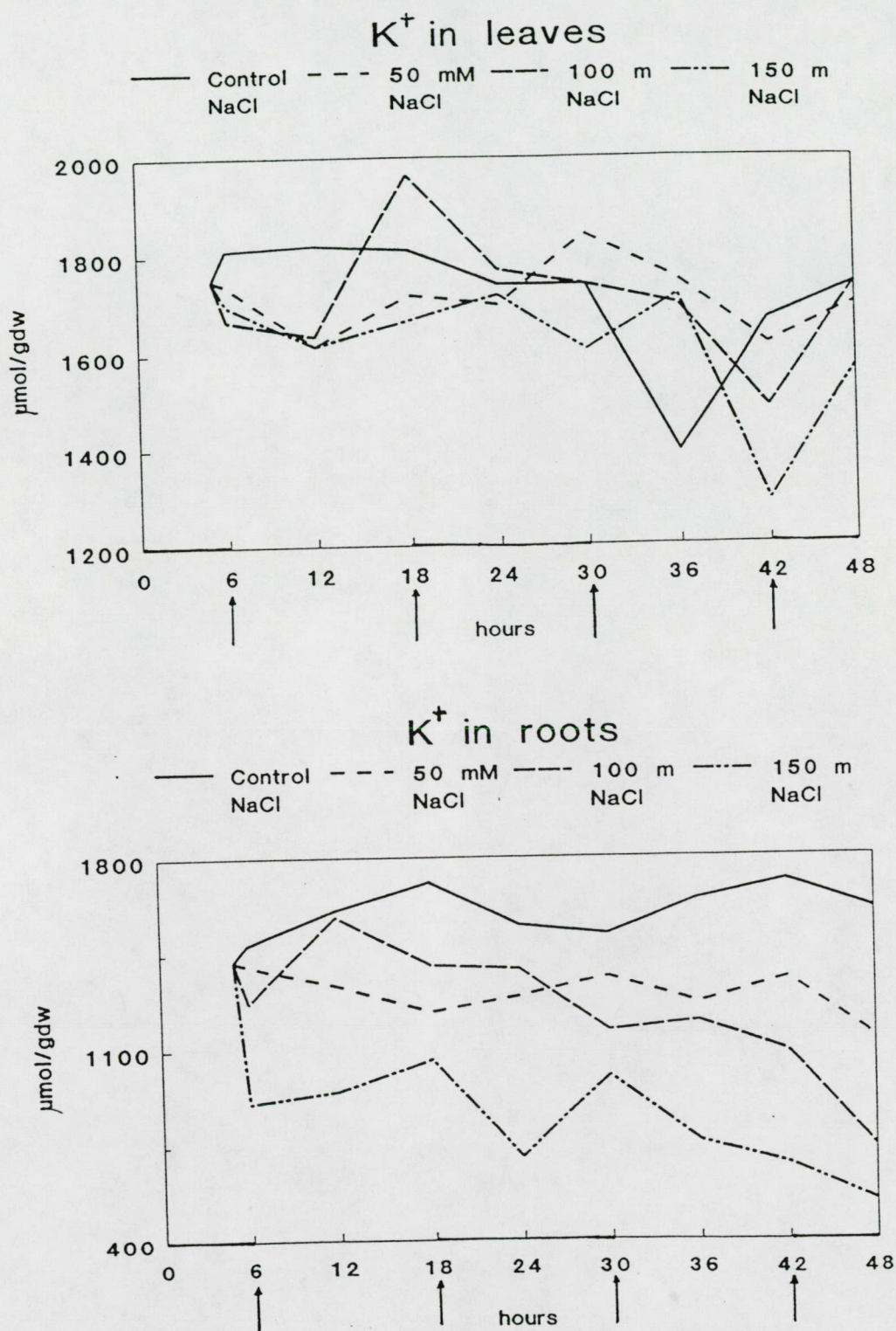
6. ábra: A napraforgó (Blumix és Viki) gyökér és levél Na⁺ és K⁺ tartalmának a változása só- és PEG-kezelés hatására.



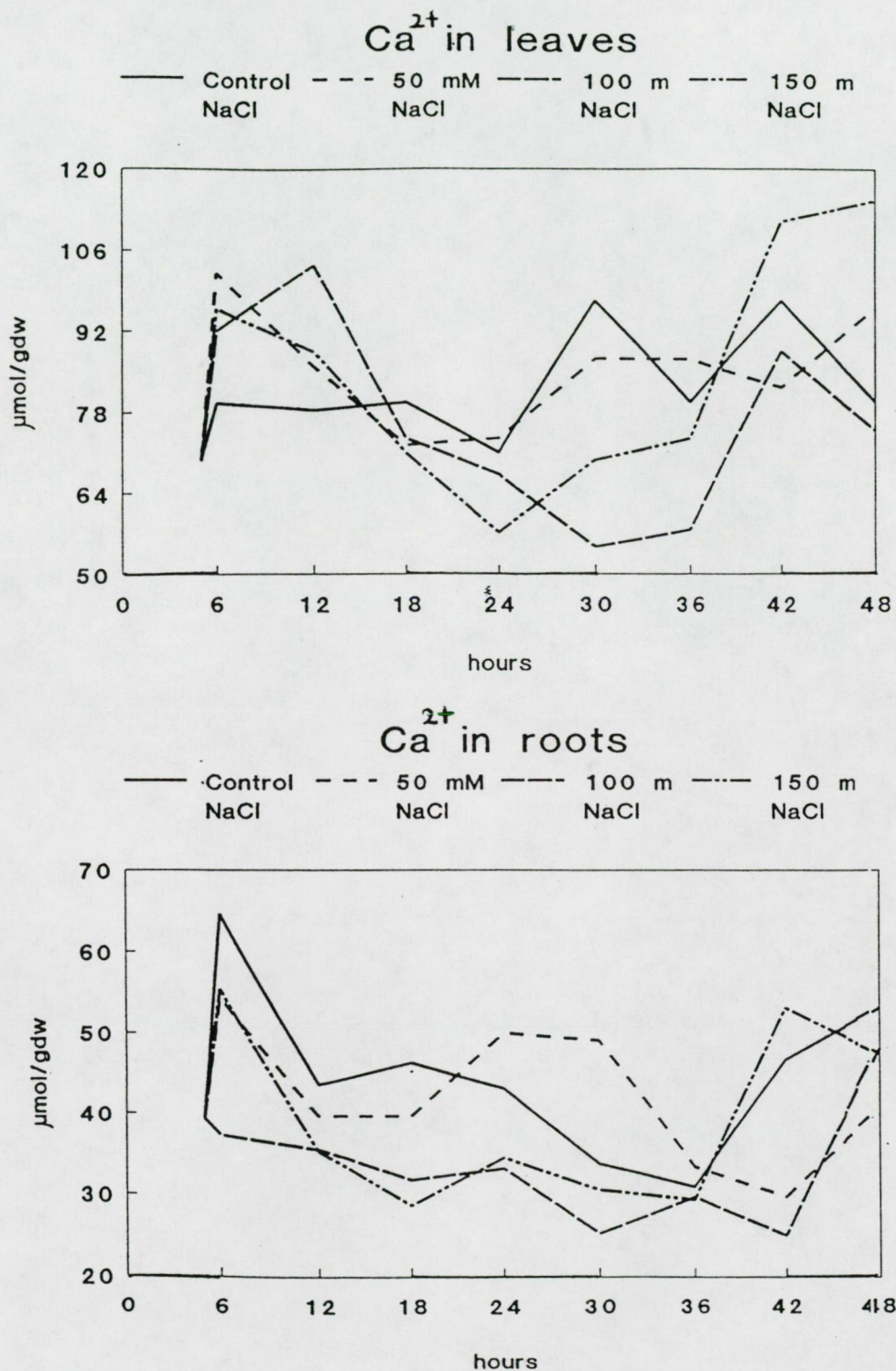
7. ábra: A napraforgó (Blumix és Viki) gyökér és levél Ca^{2+} és Mg^{2+} tartalmának a változása só- és PEG-kezelés hatására.



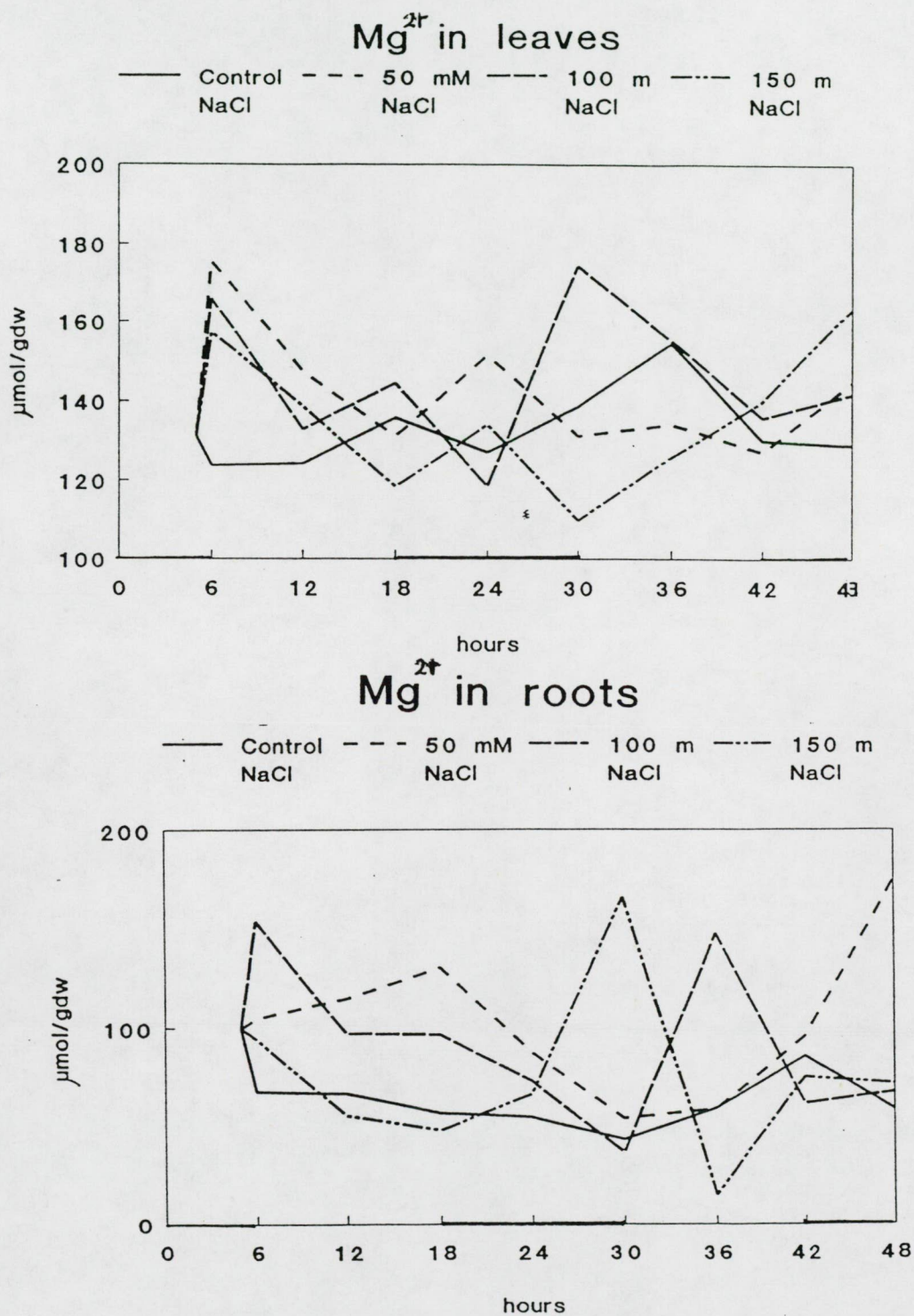
8. ábra: Búza levél és gyökér Na^+ tartalmának fluktuálása sókezelés hatására.



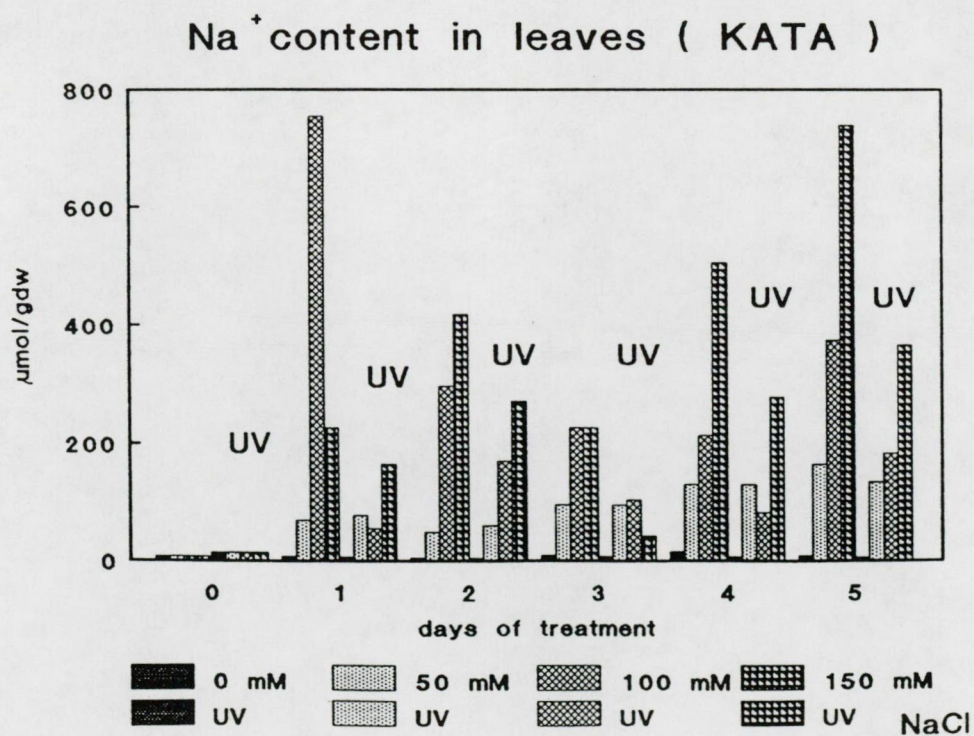
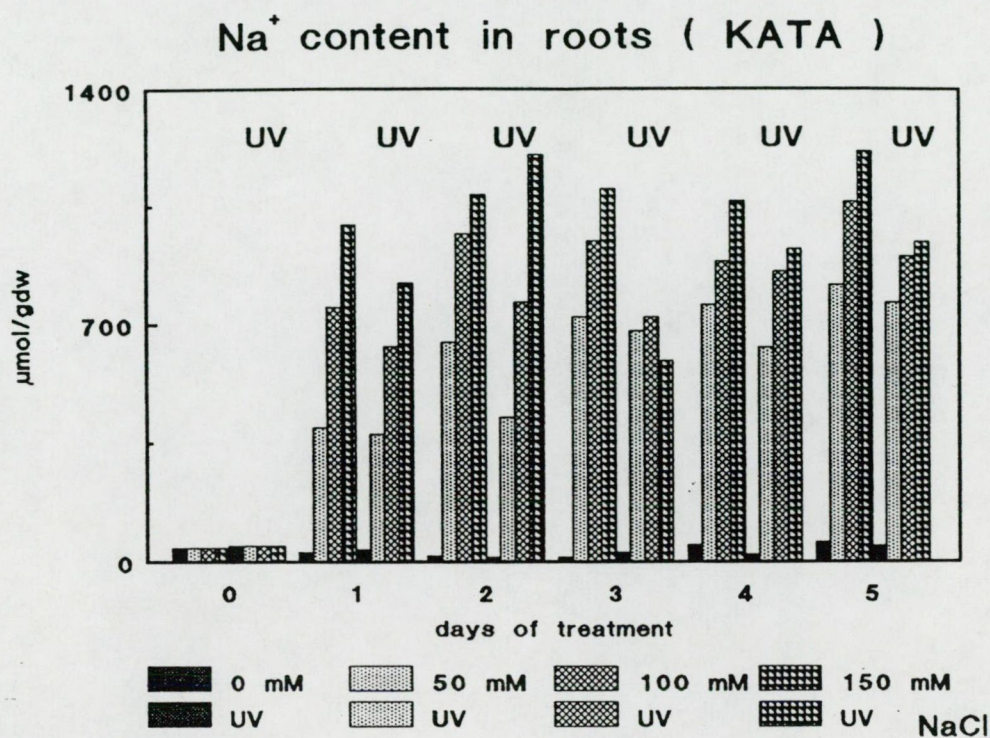
9. ábra: Búza levél és gyökér K^+ tartalmának fluktuálása sókezelés hatására.



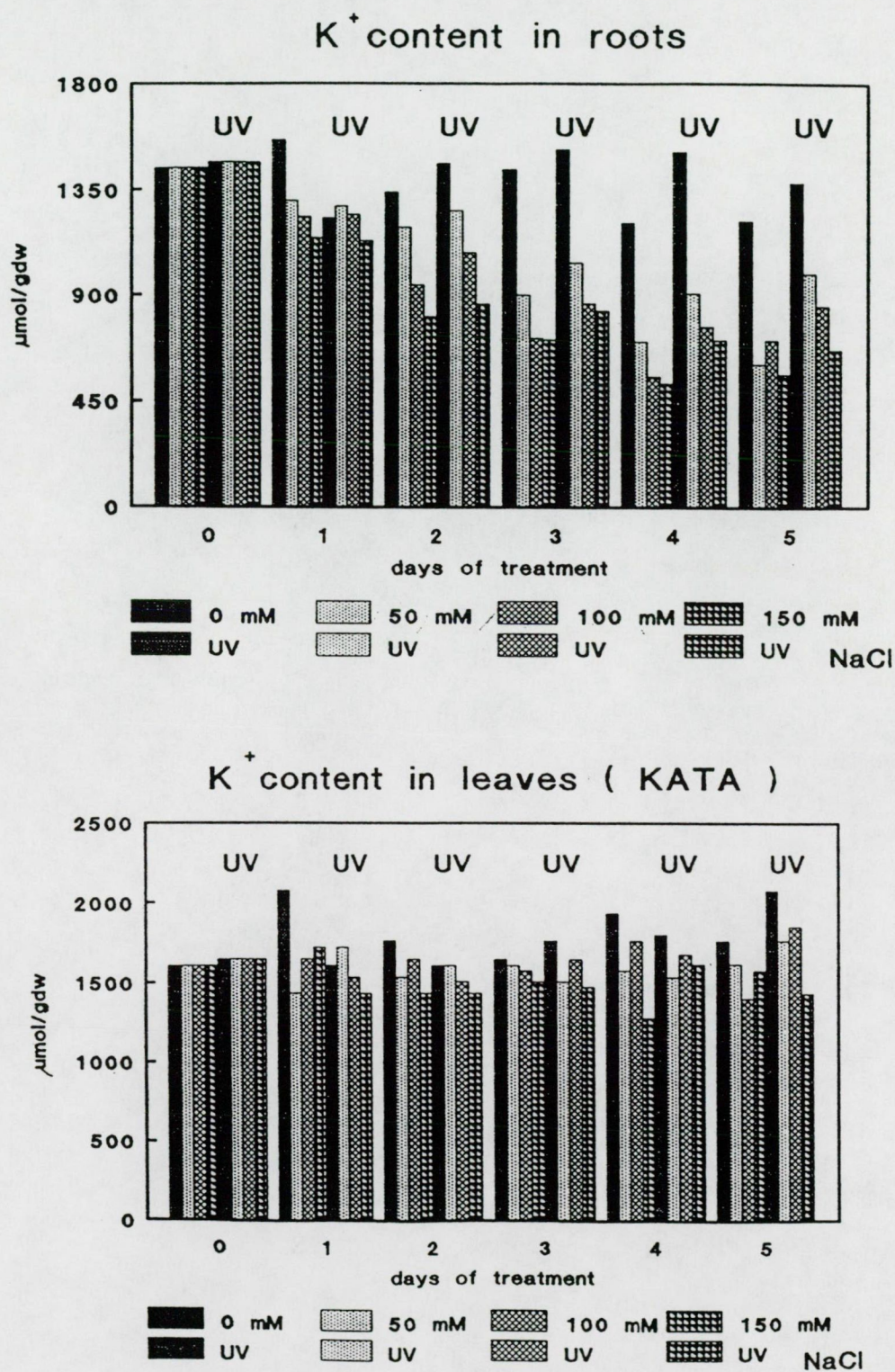
10. ábra: Búza levél és gyökér Ca²⁺ tartalmának fluktuálása sókezelés hatására.



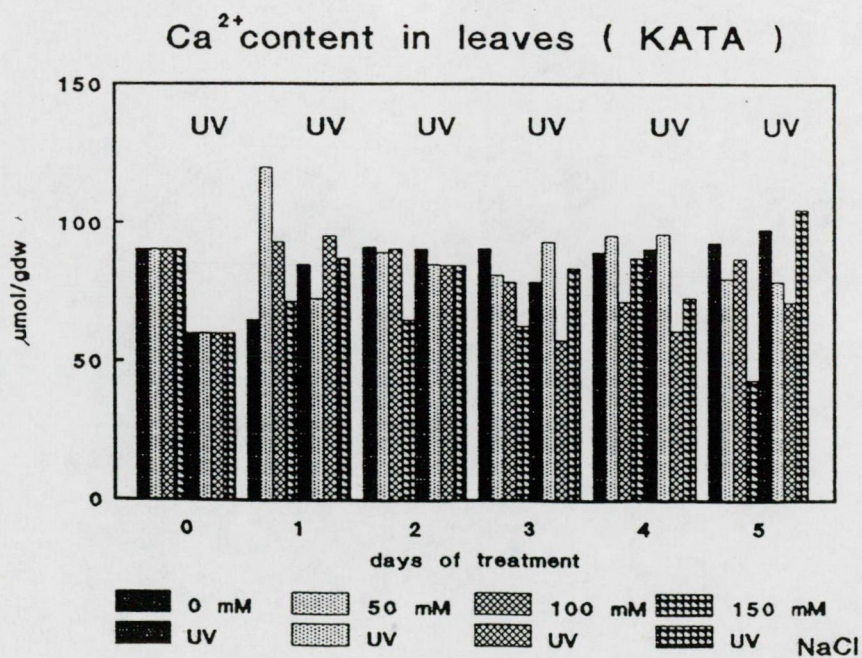
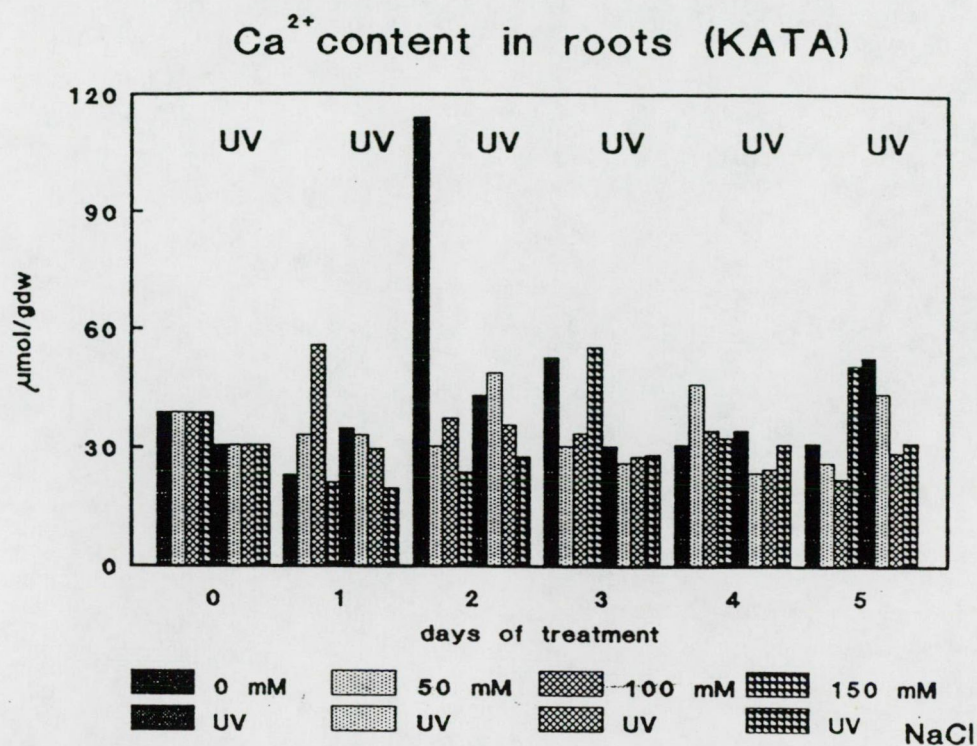
11. ábra: Búza levél és gyökér Mg²⁺ tartalmának fluktuálása sókezelés hatására.



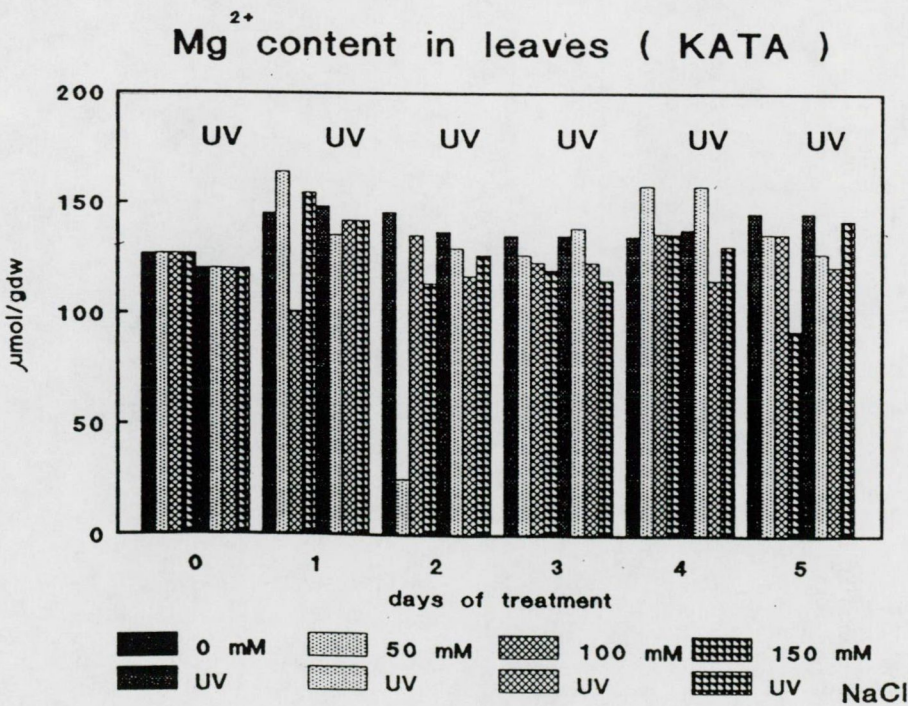
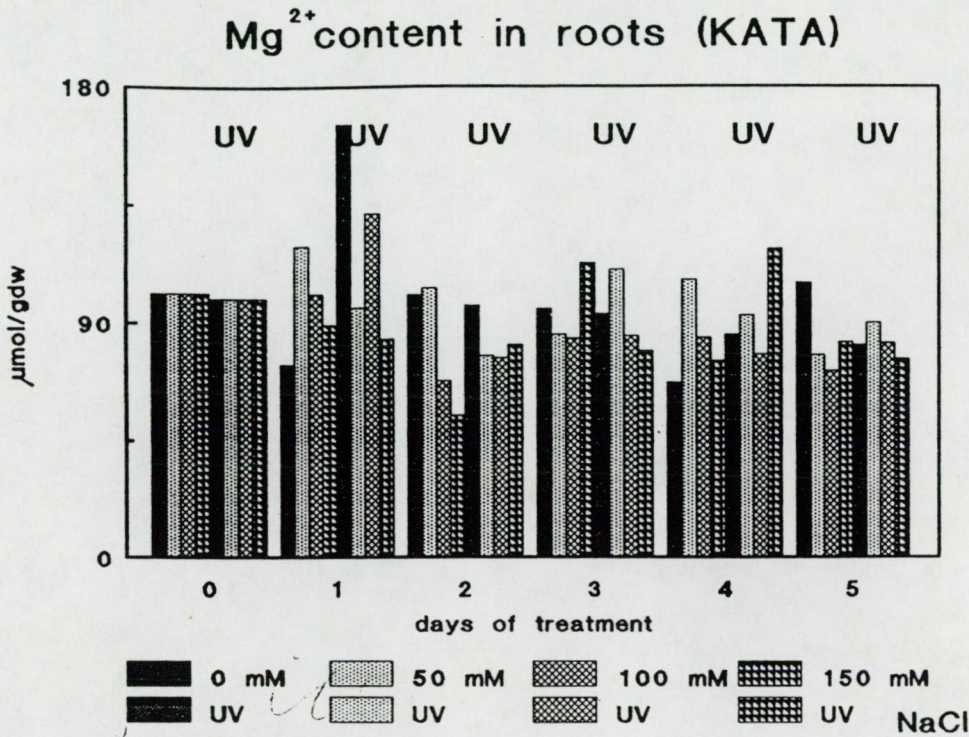
12. ábra: Búza gyökér és levél Na⁺ tartalma só- és UV-B kezelés hatására.



13. ábra: Búza gyökér és levél K⁺ tartalma só- és UV-B kezelés hatására.



14. ábra: Búza gyökér és levél Ca²⁺ tartalma só- és UV-B kezelés hatására.

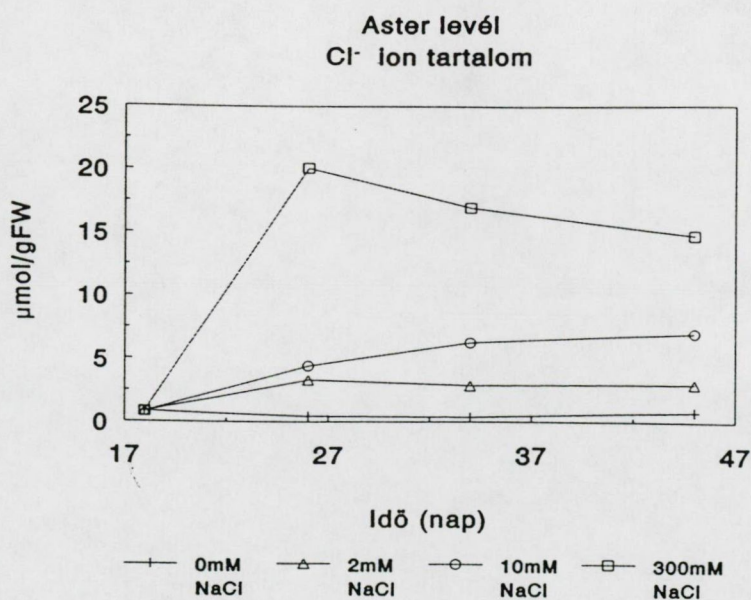


15. ábra: Búza gyökér és levél Mg²⁺ tartalma só- és UV-B kezelés hatására.

3.2. Szervetlen anionok

A növények belső anion összetételének kvalitatív és kvantitatív meghatározására korábban aniononként többféle módszert használtak, külön kimutatva az egyes anionokat. Az általunk kifejlesztett, HPLC-s technikán (ionkromatográfia) alapuló analitikai módszer alkalmas egyetlen növényi mintából több szervetlen anion egyidejű minőségi és mennyiségi meghatározására.

HPLC-s analitikai módszerünkben klorid, bromid, nitrit, nitrát, foszfát és szulfát standard anyagokat tartalmazó elegy kromatográfiás szeparálását oldottuk meg. Az elválasztást Interaction Ion 120 anioncserélő oszlopon végeztük, detektálásra vezetőképességi detektort használtunk. Módszerünk kimutatási határa $10\mu\text{M}$ alatt van az adott aniontól függően. A kidolgozott kromatográfiás szeparálás lehetővé tette, hogy megfelelően megválasztott mintaelőkészítés után növényi minták anion összetételét is meghatározzuk.



16. ábra: Az *Aster tripolium* Cl^- ion tartalmának a változása sókezelés hatására.

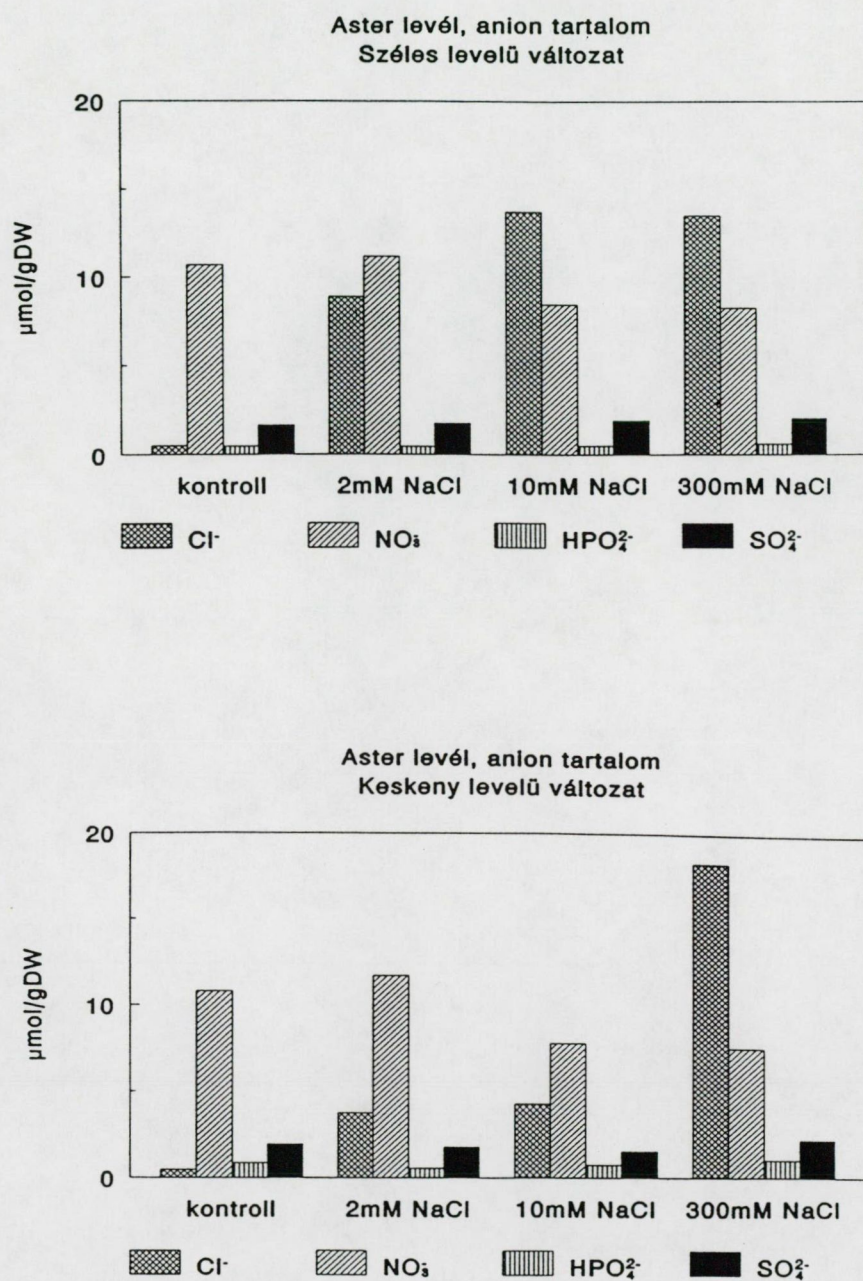
Az *Aster tripolium* esetében nyomon követtük az anion koncentráció változását 28 napon át (18-46. nap). A kezelés első 10 napjában az anionok koncentrációja jelentősen megváltozott, majd egy bizonyos szinten stabilizálódott. A növényi minták Cl^- ion tartalma a kontroll növények esetén (0 mM NaCl) a kimutatási határon volt. Már a 2 mM NaCl kezelés hatására egy viszonylag magas Cl^- ion szint alakult ki, amely a 10 és 300 mM NaCl-os kezelés esetén a kezeléstől függően tovább emelkedett, azonban a Cl^- ion szintek nagyságrendekben nem különböztek egymástól (16. ábra). A NaCl mentes ("kontroll") és a 2 mM NaCl-os kezelés során kialakult NO_3^- akkumuláció a növény stressz állapotára utalt, a nitrát felhalmozódást a 10 és a 300 mM NaCl-os kezelés megszüntette. A foszfát- és a szulfáton tartalomban nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket (17. ábra). A különböző *Aster tripolium* fenotípusok anion összetételükben, és a stresszhatásokra adott válaszukban nem különböztek szignifikánsan egymástól.

Kísérleteinkben só, illetve ozmotikus stressz körülmények között nevelt, két napraforgó hibrid (*Helianthus annuus* L. cvs. Viki és Blumix) anion összetételének változását is nyomon követtük levélben, szárban és gyökérben a kezelést követő 6 napon keresztül. A két napraforgó hibrid növényen belüli anion eloszlása, továbbá anion akkumulációja, illetve ezek időbeli lefutása különböző képet mutatott.

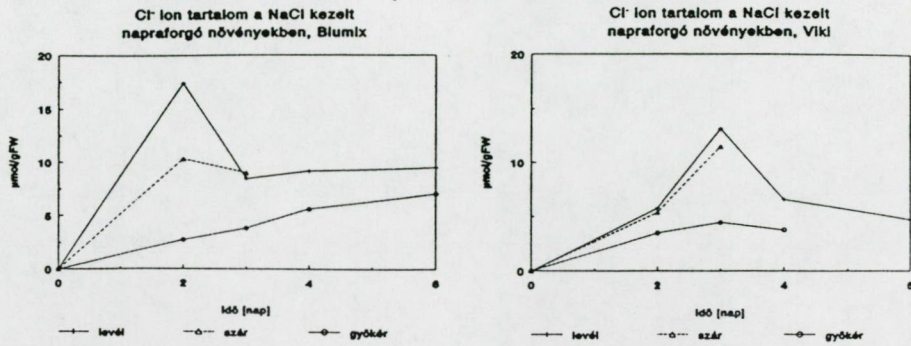
Eredményeink alapján megállapítható, hogy a só (NaCl) és az ozmotikus (PEG 6000) kezelés különböző stressz körülményeket jelent a növény számára, ennek megfelelően mások a stresszt kivédő mechanizmusok is. A nitrát anion akkumulációja csak a szárazság (ozmotikus) stressz kivédésében játszott jelentős szerepet. Mérési eredményeink szerint a Blumix gyorsabban reagált a környezeti stressztényezőkre, mint a Viki (18. ábra).

Búzában a levél Cl^- koncentrációja nagyobb volt, mint a gyökérben mért érték, és együtt nőtt a külső NaCl koncentrációval (19. ábra). Magas klorid koncentráció (150 mM) jelenlétében a nitrát tartalom csökkenését tudtuk detektálni. Az együttes UV-B és sókezelést kapott növények Cl^- ion tartalma kismértékben kisebb volt, mint a csak sókezelést kapott növényeké, de az eltérés nem volt szignifikáns.

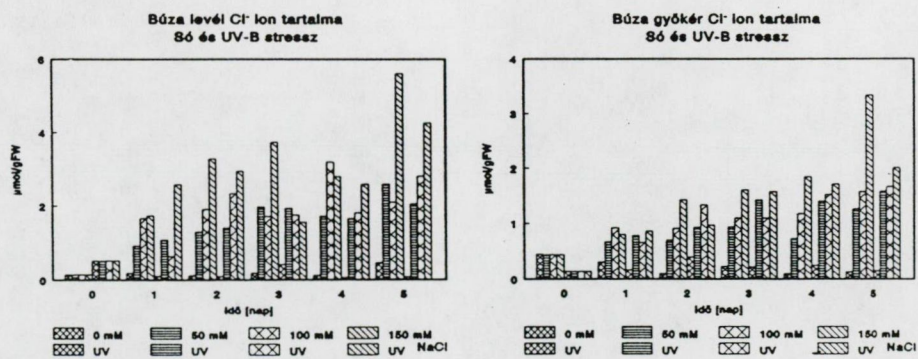
A növényi anyaggal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a bromid- és nitrit tartalom a detektálási határt nem érte el egyik növényi szervben sem.



17. ábra: A széles és keskeny levelű *Aster tripolium* anion tartalma a 46. napon.



18. ábra: Cl⁻ ion tartalom sókezelt napraforgóban (Blumix és Viki).



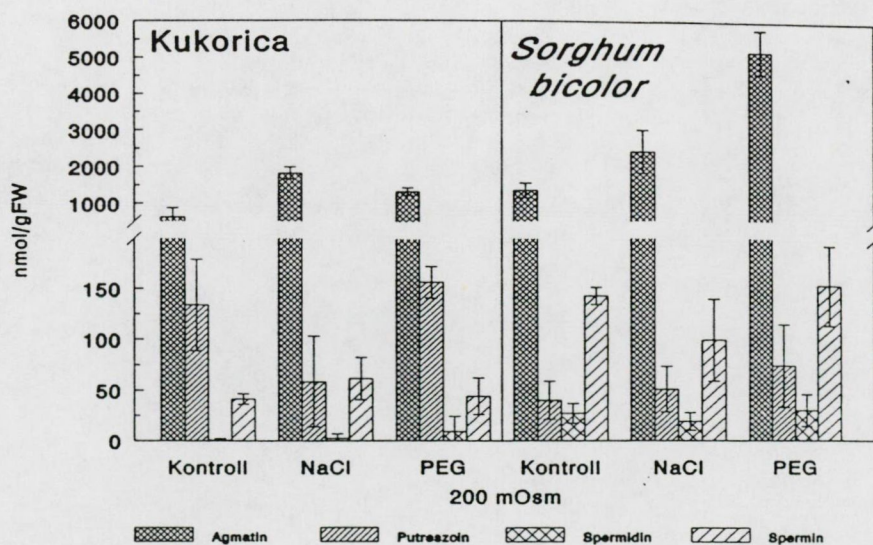
19. ábra: Búza levél és gyökér Cl⁻ ion tartalmának változása só- és UV-B stressz hatására.

3.3. Poliaminok és prolin

Só stressz hatására a szerves ionok akkumulációja az elsődleges folyamat, míg az ozmotikus (szárazság) stressz esetében a növények szerves anyagok szintézisével és akkumulációjával csökkentik a vízpotenciáljukat.

Kísérleti eredményeinkből látható, hogy a toleránsabb *Sorghum bicolor*-ban (Erdei és Taleisnik, 1993) só stressz esetében a poliamin szintézis általában nem indukálódik, szemben a kukoricával, ahol a putreszcin akkumulációja figyelhető meg 50 mOsm NaCl kezelés hatására. A poliamin szint csökkenését nagyobb sókoncentrációknál a szintézishez szükséges enzimek aktivitásának a csökkenése idézheti elő.

Szárazság stressz hatására a poliamin akkumuláció sokkal jelentősebb, különösen a *Sorghum bicolor* esetében (Erdei *et al.*, 1995; 1996). Érdekesség, hogy a legnagyobb poliamin akkumulációt a 200 mOsm PEG kezelés hatására tapasztaltuk, ez a folyamat is a bioszintézis egyes enzimeinek a dezaktiválódásával magyarázható (20. ábra).

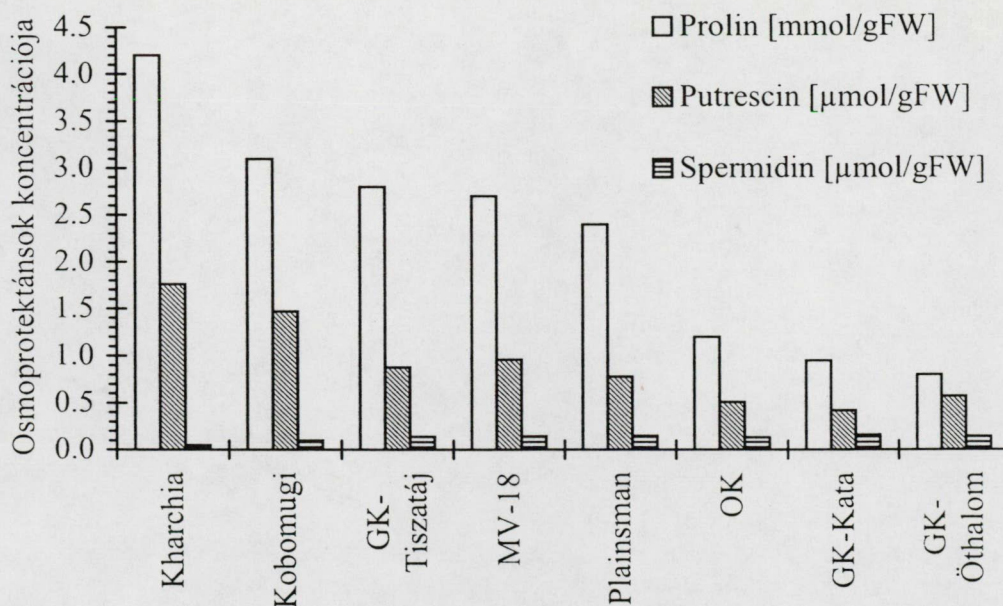


20. ábra: A kukorica és a *Sorghum bicolor* poliamin tartalma.ű

A szárazság és só stressz kísérleteknél a mintavétel a kezelés után 72 órával történt, de az ozmotikus válaszreakciók kialakulása már a kezelést követő 1-2 órán belül megkezdődik (Flores és Galston, 1984), ugyanis a poliamin akkumulációhoz *de novo* protein szintézis szükséges (Flores, 1991).

Só stressz hatására az *Aster tripolium* minták poliamin koncentrációiban nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

A só és ozmotikus stresszre különböző érzékenységgű búza fajták prolin és poliamin tartalma különböző a zászlólevelekben. A prolin és a putreszcín szint együtt változott, és a toleránsabb fajtákban volt magasabb koncentrációja (Szegetes *et al.*, 1996; 2000). Ezzel szemben a spermidin szint az érzékenyebb fajtákban volt magasabb. A kísérleti körülmények között a spermin koncentrációja a kimutatási határ közelében volt, és nem változott szignifikánsan. Mintáinkban 1,3-diamino-propánt és kadaverint nem sikerült kimutatni (21. ábra)



21. ábra: A prolin, a putreszcín és a spermidin koncentrációja különböző búza fajták zászlólevelében.

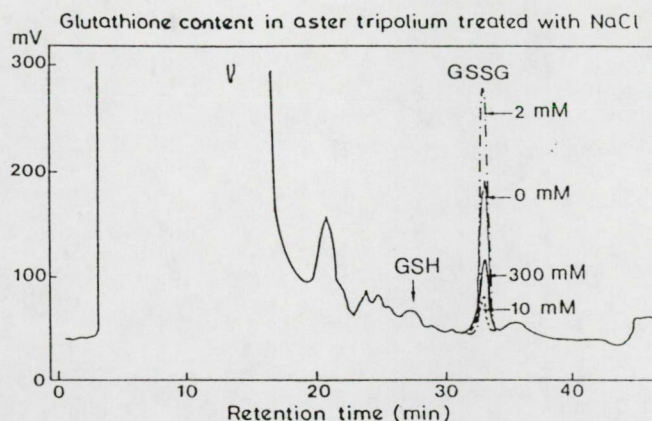
3.4. Glutation

Mind a két általunk használt módszer alkalmas volt a növények glutation tartalmának a meghatározására. A mBBBr-nal képzett származék esetében használt módszer kimutatási határa két nagyságrenddel volt kisebb, mint a DNP-származék

mérésénél használt módszer esetében. A DNP-származék mérésénél a vizsgált növényekben a redukált glutation (GSH) koncentráció a kimutatási határ (170 ± 50 nmol/gFW GSH, 100 ± 30 nmol/gFW GSSG) közelében volt.

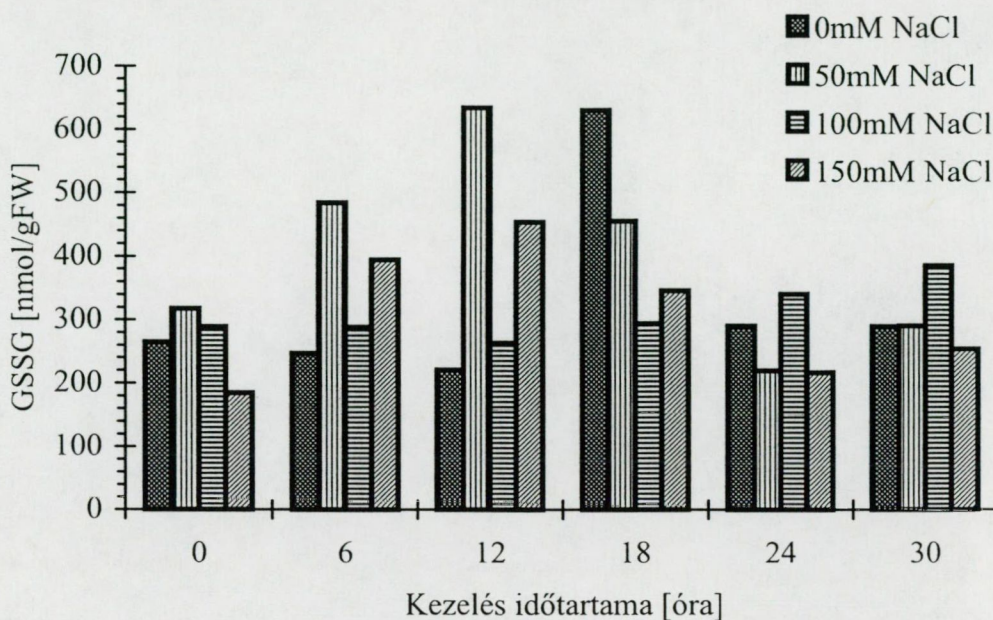
A búza és az *Aster tripolium* glutation és glutation-diszulfid szintjét határoztuk meg a kísérleteink során. A búza neveléséhez a fiziológias sókoncentrációnál magasabb NaCl koncentrációt használtunk, míg az *Aster tripolium* a fiziológias sókoncentrációnál alacsonyabb NaCl tartalmú volt a tápoldat.

Aster tripolium esetében mind az alacsony (0 mM és 2 mM NaCl), mind a magas (300 mM NaCl) sókoncentráció az oxidált glutation-diszulfid akkumulációját eredményezte, míg a 10 mM NaCl kezelés esetében a GSSG koncentráció alacsony maradt (22. ábra). A folyadék kromatográfiás mérések alapján meghatároztuk, hogy a halofita *Aster tripolium* neveléséhez a tápoldat 10 mM NaCl tartalma megfelelő.

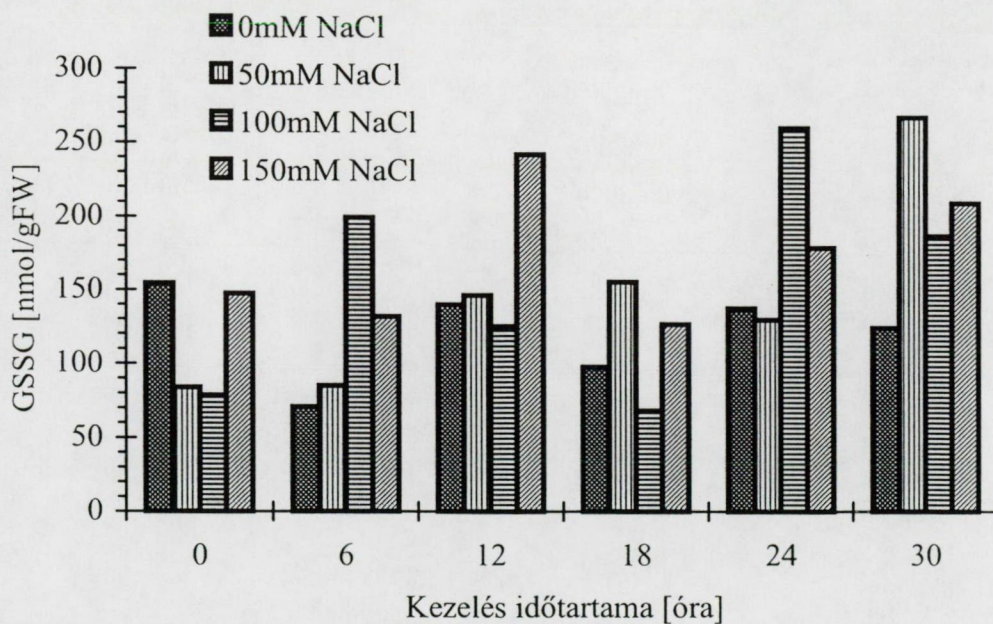


22. ábra: Az *Aster tripolium* GSSG tartalmának a változása, NaCl kezelés hatására.

A búzával végzett kísérleteknél mind a kontroll, mind sókezelt növényeknél a levélben magasabb glutation szintet mértünk, mint a gyökérben. A sókezelés hatására az oxidált glutation-diszulfid koncentrációja megnőtt, majd a kísérlet során időben lassan csökkent (Szegletes *et al.*, 1994) (23., 24. ábra).



23. ábra: Glutation diszulfid koncentráció változása búza levélben só stressz hatására a kezelés első 30 órájában.

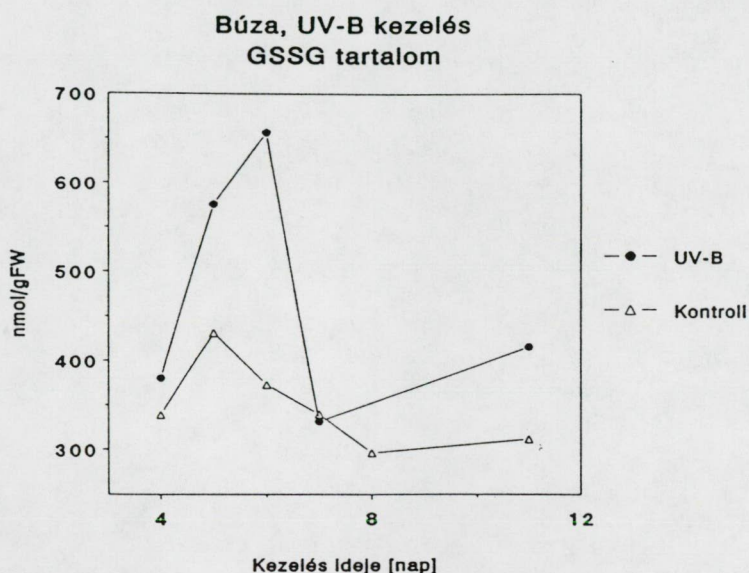


24. ábra:

Az alkalmazott sókoncentráció és a GSSG szint között nem találtunk összefüggést, ami, egyéb kísérleteinkkel összhangban azzal magyarázható, hogy a stressz hatására a növények napi ritmusa megváltozik (Erdei *et al.*, 1995; 1998). Mivel a glutation koncentráció a különböző napszakokban eltér, ennek a ritmusnak az

eltolódása esetén a különbözőképpen kezelt növények nem azonos fázisban vannak, ezért a kapott eredményeink nem összehasonlíthatóak.

Búza esetében vizsgáltuk az UV-B sugárzás hatását is a növényekre. A stresszhatás elején megnövekedett a kísérleti növényekben a GSSG mennyisége (25. ábra). A kísérlet időtartama (8 nap) alatt a növények adaptálódtak az UV-B sugárzáshoz (Erdei *et al.*, 1995; Barabás *et al.*, 1996; 1998).



25. ábra: Az UV-B kezelés hatása a búza levél glutation diszulfid tartalmára.

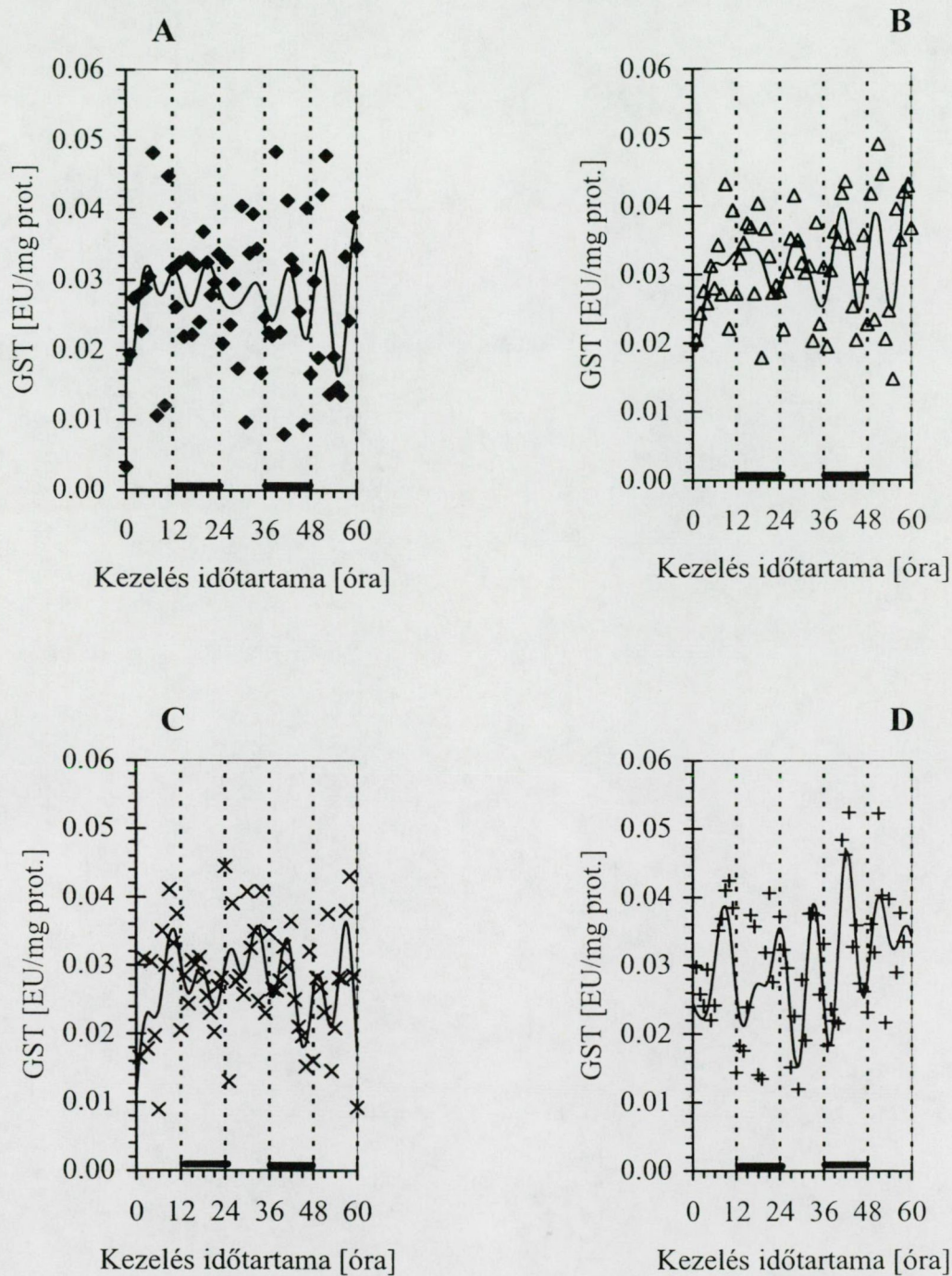
3.5 Glutation reduktáz és glutation *S*-transzferáz

A glutation *S*-transzferáz aktivitását búzában mértük, párhuzamosan a glutation meghatározással.

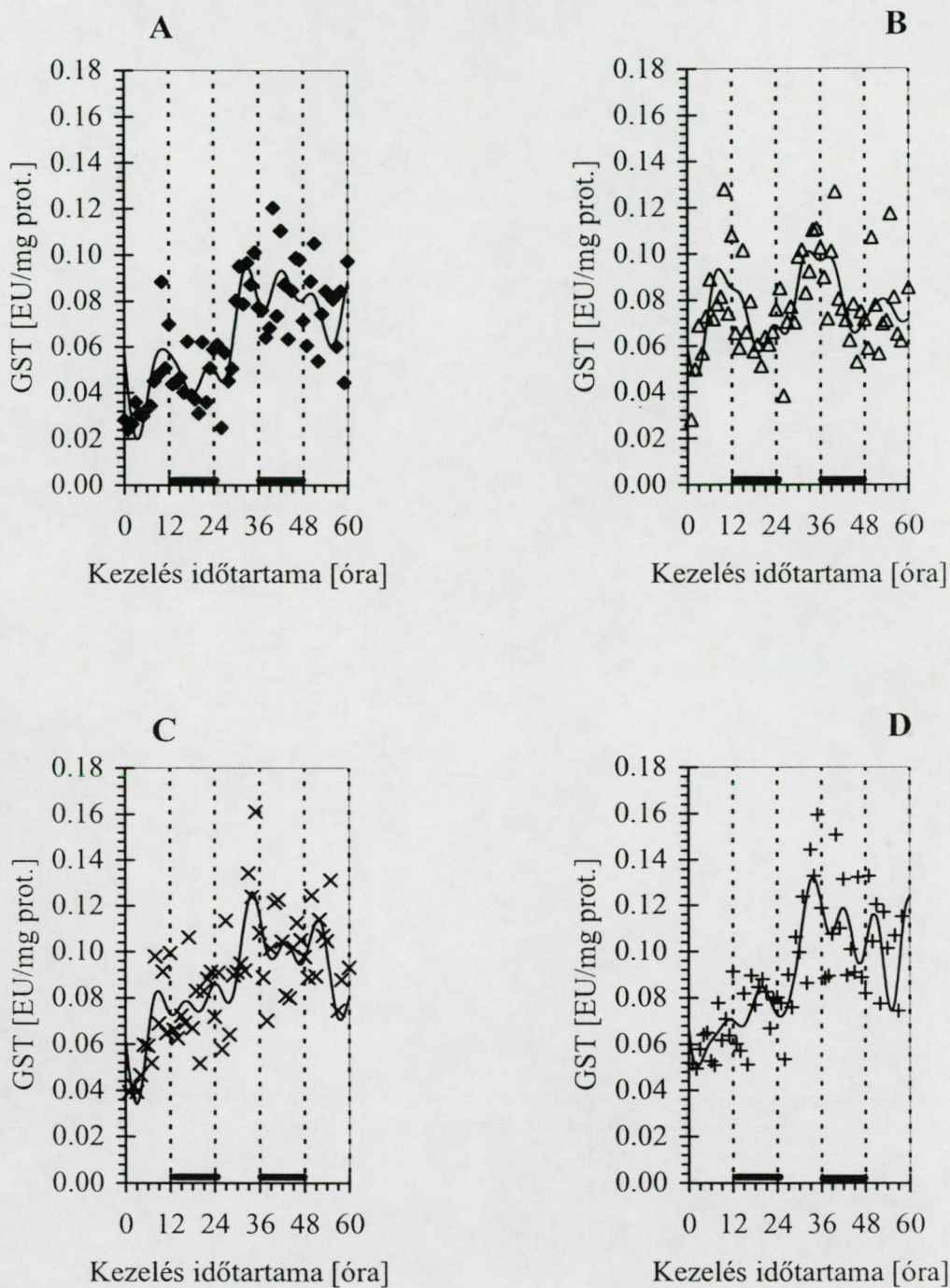
A glutation *S*-transzferáz napi ritmusa levélben nem mérhető, de szintje oszcillál a sejtben, ultradián ritmusa van (26., 27. ábra). Gyökérben a napi ritmus két maximum csúcsot ad kontrol növényekben (0 mM, 50 mM) magasabb koncentrációk esetében, és az alapértéke 3-szorosa a levélhez viszonyítva. Sókezelésre a GST aktivitása nőtt gyökérben, ugyanakkor levélben állandó.

Az életkor előrehaladásával a GST nőtt gyökérben (26., 27. ábra).

Jelen kísérleteinkben a GST diurnális ritmusnál rövidebb, ultradián fluktuációja, úgy tűnik, felgyorsul a stresszkörülmények között. Mindezen felül, az amplitúdók felerősödtek.



26. ábra: A GST-C aktivitás napi ritmusának változása 0 mM (A), 50 mM (B), 100 mM (C) és 150 mM (D) NaCl kezelés hatására, búza levélben. A pontok az óránként vett mintákból mért enzimaktivitások értékét jelentik, míg a folytonos vonal a Fourier transzformációval illesztett görbét. A sötét szakaszok 12-24 és 36-48 óráig tartottak.



27. ábra: A GST-C aktivitás napi ritmusának változása 0 mM (A), 50 mM (B), 100 mM (C) és 150 mM (D) NaCl kezelés hatására, búza gyökérben. A pontok az óránként vett mintákból mért enzimaktivitások értékét jelentik, míg a folytonos vonal a Fourier transzformációval illesztett görbét. A sötét szakaszok 12-24 és 36-48 óráig tartottak.

4. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

4.1. Kationok

Mivel a mezőgazdaságban fontos növények, pl. a gabonafélék szárazság és só tűrése eltérő, ezekre a tulajdonságokra nézve szelekciót (a genetikai átalakítások mellett) kell végezni, amihez kiterjedt vizsgálatainkkal szeretnénk segítséget nyújtani. Szárazság és só stressz hatására a növények belső vízpotenciáljukat úgy redukálják, hogy szerves és szervetlen anyagokat halmoznak fel, vagy szintetizálnak. Az ásványi sók hasznosítását befolyásolják a kedvezőtlen ozmotikus feltételek vagy a tápanyagok magas ion koncentrációja, majd az ezt követő szabadgyökös reakciók lefolyása, megváltozása. Doktori értekezésemet elsősorban mind a napi periódusban (fluktuációban), mind a cirkadián ritmusban bekövetkező zavarok felderítésére összpontosítottam, amelyek a növényt ért környezeti változásokra, konkrétan só és szárazság stresszre álltak be. A széleskörű analízishez számos méréshez új módszereket, illetve a már ismertek tovább fejlesztését kellett elvégezniem.

Kation összetételt a halofita *Aster tripolium*, és a glükofita napraforgó és búza fajtákban mértünk. A növények levelének és gyökérzetének kation tartalmát összehasonlítva a független kísérletek azt mutatták, hogy a méréseink jól reprodukálhatók és az egyes növény nevelésekből származó minták közötti eltérés 10 % alatt van. Vizsgáltuk:

- Kation koncentrációt a széles levelű *Aster tripolium*-ban,
- a só és az ozmotikus stressznek a hatását a kation összetételre napraforgóban,
- a só és ozmotikus stressz hatását a búza kation háztartásának a cirkadián ritmusára,
- az UV-B sugárzás befolyását a kation hasznosításra.

Aster tripolium levélben só stresszre míg a Na^+ ion emelkedett a kezeléshez használt NaCl koncentrációval arányosan, addig a felvett K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok szintje már a 10. napra csökkent és a 45. napra igen alacsony szintre esett vissza (Erdei *et al.*, 1995). Az anionok közül a Cl^- koncentrációja hasonlóan alakul mint a Na^+ ioné. A

széles és keskeny levelű forma között eltérést találtunk a kation akkumulációban, de ennek a fiziológiai hátterét egyenlőre nem sikerül kideríteni.

Napraforgóban a Na^+ ion akkumuláció nőtt NaCl bekezelést követően, de a Na^+ ionok nem vesznek részt az ozmotikus szabályozásban a PEG-gel kiváltott szárazság stresszben. A Na^+ felhalmozódás a stresszkezeléshez használt sókoncentrációval arányosan nőtt a gyökérben és csak részlegesen transzlokálódott a hajtásban. A Viki nagyobb hatékonysággal tudta kizárni a nátrium iont a hajtásból mint a Blumix. A mért egyéb ionok (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) szintje NaCl kezelés hatására csökkent, míg PEG kezelés során nőtt, mind a levélben, mind a gyökérben, viszont nem találtunk szignifikáns különbségeket a fajták között. Ezek az eredmények jó összhangban vannak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint só stressz hatására az ionos válasz, míg ozmotikus stressznél a szerves ozmotikumok szintézise és mobilizálása lehet a jelentősebb (Erdei *et al.*, 1995; 1996). Természetesen amellett, hogy a növény megpróbálja akkumulálni a tápoldatban megtalálható ionokat is, bár sokkal kisebb mértékben, mint a só stressz esetében.

A Na^+ búza gyökérben a mintavétel során folyamatosan akkumulálódott, míg a levélbe ennek a mennyiségnek csak egy része jutott el. Ugyanakkor hajtásban a Na^+ ionok felhalmozódása egy jól meghatározott periódicitást mutatott. Hasonló periódicitást követett a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok koncentrációjának időbeli változása is, mind a levélben, mind a gyökérben. Macduff és Dhanoa (1996) hasonló napi ("diurnális") és rövidebb periódusú ("ultradián") ritmikusságot írt le a K^+ felvétel vizsgálata során. Az ásványi anyagok felvételét segítő proton kiválasztás is napi ritmikusságot mutat búzában Gorr és munkatársai (1995) szerint, és ezért a ritmikusan változó fényintenzitás a felelős, valamint fotoreceptorok indukálják az aquaporinok expressziójáért felelős géneket is (Clarkson *et al.*, 2000). A korábbi eredményekhez hasonlóan a sókezelés hatására ezeknek az ionoknak a koncentrációja lecsökkent.

Az eredményeink azt mutatják, hogy mind a makroelem, mikroelem és az anionok felvételét búzában gyors mérési módszerekkel tudjuk követni, és látható, hogy mindezen elemek fluktuációja a cirkadián oszcillátor modellel jól leírhatók, de sok mérést és bonyolult matematikai analízist kívánnak a helyes értékelések.

Ezek az eredmények arra irányították figyelmünket, hogy az oszcilláció paraméterei a kationok típusától és a külsőleg jelen lévő kation koncentrációtól függő. Azonban a szignál transzdukciós folyamatokat a stressz faktorok befolyásolják, ami az

oszillátor módosulását eredményezi. Kitűzött célunk megvalósításához a továbbiakban egyrészt a szignál transzdukciós folyamatok vizsgálatát (Erdei *et al.*, 1995; 1998), másrészt a stressz hatásra bekövetkező szabadgyökös reakciók változását tanulmányoztuk. Részletesebben ez utóbbiakhoz tartozó glutation rendszer kifejtését találtam érdekesnek és ennek változását szeretném bemutatni.

4.2. Szervetlen anionok

A növények kation tartalmának egyidejű mérése az irodalomból jól ismert, atomspektroszkópiai módszerekkel rutinszerűen megvalósítható (Bérczi *et al.*, 1982; Zsoldos *et al.*, 1987). A növényi sejtekben a kationokat semlegesítő, főként szervetlen anionok mérése azonban nehézkes, nincs olyan jól reprodukálható, univerzális műszeres mérési módszer, amelynek a segítségével több szervetlen aniont lehetne szimultán, ugyanabból a mintából rutinszerűen mérni. Az irodalomban és az analitikai szabványokban (MSZ 260/7-71, 260/11-71, 260/6-77, 260/10-85) az egyes anionokat külön-külön, kémiai reakcióval, kolorimetriásan, titrimetriásan, vagy kemilumineszcenciásan (Dunham *et al.*, 1995) lehet mennyiségileg meghatározni.

Szervetlen anionok szeparálására a kromatográfiás körülmények és a különböző anioncserélő oszlopok összehasonlítása már az irodalomból ismert (Haddad *et al.*, 1985; Martin és Giacofei, 1993). A HPLC-vel végzett vizsgálatokra az irodalomban a csapvíz (Martin és Giacofei, 1993), a szennyvíz (Brunt, 1985; Bignami *et al.*, 1993) és az élelmiszerek (Schuster, 1986) aniontartalmának meghatározására már vannak adatok. Ezek alapján kifejleszthető egy olyan ionkromatográfiás módszer, ami lehetővé teszi a szervetlen anionok egyidejű, reprodukálható meghatározását kis mennyiségű (1-2 gFW) növényi mintákból. A mérés nehézségét a növényi minták komplex volta, valamint az ionkromatográfiában használt analitikai ioncserélő oszlopok érzékenysége jelenti. Ezért a mintaelőkészítés során a növényi extraktumot a lehető legjobban meg kell tisztítani a szennyező anyagoktól.

A HPLC-s anion cserélő oszlopok igen kis pórusmérete, illetve az oszlop erős affinitása a negatív töltésű molekulákhoz (mintákban lévő fehérjék, szerves savak anionjai) a mintaelőkészítéssel szemben igen magas követelményeket támaszt (Smith és Chang, 1983). Növényi mintákból szennyeződésektől (fehérjék, szénhidrátok, ketonok, poliaminok, lipidek, kéntartalmú vegyületek, nehézfém ionok, stb.) mentes

vizes oldatot kellett készítenünk (Maas *et al.*, 1986). Ez a feladat kétféleképpen oldható meg:

- a vizes növényi extraktumból az összes zavaró szennyeződést, amely a mérést, illetve az analitikai oszlop működését zavarja, eltávolítjuk;
- a vizes növényi extraktumból csak az anionokat vonjuk ki, és ezek oldatát használjuk fel a további mérések során.

Utóbbi feladat megoldására a víz analízishez a különböző, szilárd fázisú ioncserén alapuló "SPE cartridge"-okat széles körben használják (Brunt, 1985). Az erős anioncserélő "SPE cartridge"-okban található kvaterner ammónium tölteten a negatívan töltött részecskék megkötődnek, ahonnan az anionokat az ionerősség növelésével, és a pH csökkentésével eluálják le. Ez a módszer a következő okok miatt nem alkalmazható a növényi minták vizsgálatára:

- Az "SPE cartridge"-ról a mintánkat a kromatográfiás oszlopon használt eluens alkalmazásával nem lehetett leoldani, mivel az erős kötődés miatt annyi eluens szükséges, amelynél az anionok koncentrációja már a detektálási szint alá csökken. Víz-analízisnél ez a módszer azért használható, mert lehetőség van a "cartridge"-on az anionok koncentrálására, nagy mennyiségű, viszonylag tiszta minta felhasználásával. Ezek a feltételek növényi minták esetén (1-2 g növényi minta, amely koncentráltan tartalmaz ionos és nem ionos anyagokat) nem adottak.
- Töményebb eluens használatával, a nagy mennyiségben bevitt kísérő anion elfedi kromatogrammunkat. Az ionerősség más módon történő növelése csak egy új anion bevitelével valósulhat meg, amely a növényi minta adott anionjának meghatározását teszi lehetetlenné.
- A pH csökkentését, a mintákban várt NO_2^- ion alacsony pH-n való bomlása miatt nem alkalmazhattuk.

A másik lehetőség az egyéb anyagok eltávolításán alapul, amelyre már több, jól bevált módszert ismerünk: fehérjék denaturálása nehézfémekkel (cink, alumínium, ólom), vagy savas főzéssel (perklórsav, szulfoszalicilsav, trifluorecetsav); cukrok megkötése Ca^{2+} -formájú kation cserélő gyantákon; apoláros komponensek megkötése

aktív szénen, illetve kinyerésük szerves oldószeres extrakcióval. Ezen eljárásokat azonban mégsem tudtuk alkalmazni:

- oszlopunk érzékenysége miatt (többértékű nehézfémekre, különböző szerves oldószerekre);
- a mintában kialakuló alacsony pH miatt (perklórsavas főzés);
- a módszerek során alkalmazott anyagok nem kontrollálható nagy felülete miatt (kation cserélő gyanta, aktív szén), melyeken a nem specifikus kötések következtében nagy mennyiségű anion kötődik meg, amely az alacsony koncentrációban jelenlevő anionok reprodukálható mérését lehetetlenné teszi.

Ezért választottuk az oktadecil-szililezett (C_{18} -as) töltetű "SPE cartridge"-ot, amely a szennyező anyagok nagy részét megkötötte.

Növényfiziológiai vizsgálatok során a kation meghatározással párhuzamosan vizsgáltuk az *Aster tripolium*, a napraforgó és a búza anion tartalmát.

Alacsony és fiziológiás sókoncentrációjú körülmények között nevelt halofita növény, az *Aster tripolium* esetében meghatároztuk, illetve követtük az anion összetételét és akkumulációját 28 napon át. Kísérleti adataink alapján e sótűrő növénynek egy bizonyos mennyiségű Na^+ és/vagy Cl^- ion szükséges a normális kifejlődéshez. A kezelés első 10 napjában az anionok koncentrációja jelentősen megváltozott, majd egy bizonyos szinten stabilizálódott. A növényi minták Cl^- ion tartalma a kontroll növények esetén (0 mM NaCl) a kimutatási határon volt. Már a 2 mM NaCl kezelés hatására egy viszonylag magas Cl^- ion szint alakult ki, amely a 10 és 300 mM NaCl-os kezelés esetén a kezeléstől függően tovább emelkedett, azonban a Cl^- ion szintek nagyságrendekben nem különböztek egymástól. Ez a folyamat, ellentétben a glükofita növényekkel (Zsoldos *et al.*, 1990), alacsonyabb NaCl koncentrációk mellett aktív Cl^- ion felvételt, illetve magasabb só koncentrációk esetén effektív Cl^- ion kizárást feltételez. A NaCl nélküli ("kontroll") és a 2 mM NaCl-os kezelés során kialakult NO_3^- akkumuláció a növény stressz állapotára utalt, a nitrát felhalmozódást a 10 és a 300 mM NaCl-os kezelés megszüntette. A foszfát- és a szulfátion tartalomban nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket, ez az eredmény egybevág az anionok egymással való helyettesíthetőségével (Stienstra, 1986). A

különböző *Aster tripolium* fenotípusok anion összetételükben, és a stresszhatásokra adott válaszukban nem különböztek szignifikánsan egymástól.

Kísérleteinkben só, illetve ozmotikus stressz körülmények között nevelt, két napraforgó hibrid (*Helianthus annuus* L. cvs. Viki és Blumix) anion összetételének változását is nyomon követtük levélben, szárban és gyökérben a kezelést követő 6 napon keresztül. A két napraforgó hibrid növényen belüli anion eloszlása, továbbá anion akkumulációja, illetve ezek időbeli lefutása különböző képet mutatott (Maróti *et al.*, 1996).

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a só (NaCl) és az ozmotikus (PEG 6000) kezelés különböző stressz körülményeket jelent a növény számára, ennek megfelelően mások a stresszt kivédő mechanizmusok is. A nitrát anion akkumulációja csak a szárazság (ozmotikus) stressz kivédésében játszott jelentős szerepet. Mérési eredményeink szerint a Blumix gyorsabban reagált a környezeti stressztényezőkre, mint a Viki.

Búzában a levél Cl^- koncentrációja nagyobb volt, mint a gyökérben mért érték, és együtt nőtt a külső NaCl koncentrációval. Magas klorid koncentráció (150mM) jelenlétében a nitrát tartalom csökkenését tudtuk detektálni.

4.3. Poliaminok és prolin

A poliaminok minden élő szervezetnek alkotórészei. A növényekben a poliaminok fontos szerepet játszanak a sejtek növekedési és fejlődési folyamataiban. Résztvesznek a membránok és a nukleinsavak integritásának megőrzésében stressz körülmények között (Glaston, 1983; Slocum *et al.*, 1984; Smith, 1984; Sankhla *et al.*, 1988). Akkumulációjuk megfigyelhető mind a só, mind a szárazság (Flores és Galston, 1982a, 1984), valamint a hő és az oxidatív (Flores, 1991) stressz esetén. A só és a szárazság stressz különböző módon befolyásolja a poliaminok metabolizmusát (Erdei és Matsumoto, 1991; Flores, 1991; Reggiani *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1995).

Só stressz hatására a szerves ionok akkumulációja az elsődleges folyamat, míg az ozmotikus (szárazság) stressz esetében a növények szerves anyagok szintézisével és akkumulációjával csökkentik a vízpotenciáljukat. A poliaminok felhalmozódása ozmotikus stressz hatására a növényekben, de különösképpen gabonafélékben, már jól ismert az irodalomból (Flores és Galston, 1982a; 1984). Kísérleti adataink is ezeket az eredményeket támasztják alá, mivel mind a kukorica, mind a *Sorghum bicolor* esetében

az ozmotikus stressz hatására indult be a poliamin szintézis és az akkumuláció (Erdei *et al.*, 1996). Ha permeábilis ionok vannak jelen (pl.: a Na^+ és a Cl^-), ezek az ionok felhalmozódnak, és meghatározzák az ozmotikus potenciált, a poliamin bioszintézis ilyenkor nem indukálódik.

Kísérleti eredményeinkből látható, hogy a toleránsabb *Sorghum bicolor*-ban (Erdei és Taleisnik, 1993) só stressz esetében a poliamin szintézis általában nem indukálódik, szemben a kukoricával, ahol a putreszcin akkumulációja figyelhető meg 50 mOsm NaCl kezelés hatására. Nagyobb sókoncentrációk esetében a poliamin bioszintézis egyes enzimeit szenvedhetnek oxidatív degradációt (Erdei *et al.*, 1990), ez eredményezheti a poliamin szint csökkenését.

Szárazság stressz hatására a poliamin akkumuláció sokkal jelentősebb, különösen a *Sorghum bicolor* esetében (Erdei *et al.*, 1995; 1996). Érdekes, hogy a legnagyobb poliamin akkumulációt a 200 mOsm PEG kezelés hatására tapasztaltuk, ez a folyamat is a bioszintézis egyes enzimeinek a dezaktiválódásával magyarázható.

A szárazság és só stressz kísérleteknél a mintavétel a kezelés után 72 órával történt, de az ozmotikus válaszreakciók kialakulása már a kezelést követő 1-2 órán belül megkezdődik (Flores és Galston, 1984), ugyanis a poliamin akkumulációhoz *de novo* protein szintézis szükséges (Flores, 1991). A kalcium függő protein kinázzal végzett kísérleteink szerint a *Sorghum bicolor*-ban ozmotikus stressz hatására már a kezelést követő második órában megnő a foszforilációs aktivitás (Pestenác és Erdei, 1996), ami a fokozott protein szintézist jelzi. A kukorica esetében ilyen indukciót nem tapasztaltunk.

Só stressz hatására az *Aster tripolium* minták poliamin koncentrációiban nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

Búza esetében az egyes variánsokban, normál fiziológiai körülmények között, a láthatóan magas prolin tartalom mellett a putreszcin koncentráció hasonló tendenciát mutat a magas só és szárazságtűrő tájfajtákban (Karchia és Kobomughi) a stresszérzékeny fajtákhoz viszonyítva. A putreszcin és a prolin szint együtt változott a különböző fajtákban, de a termesztett búzafajták szárazságtűrése és a virágzás után a zászlólevelekből mérhető poliamin, valamint a prolin szintek között nincs egyértelmű kapcsolat (Szegeletes *et al.*, 1996; 2000).

4.4. Glutation

Az élőlények, így a növények számára is az egyik legfontosabb kis molekulatömegű antioxidáns a glutation (γ -glutamil-ciszteinil-glicin) (Smith *et al.*, 1990). Fő szerepe az aktív gyökök megkötése (Alscher *et al.*, 1987; Alscher, 1989; Alscher *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1994; 1997; Inzé és Van Montagu, 1995; Noctor és Foyer, 1998; Asada, 1999). Mind a kloroplasztiszban, mind a citoszolban megtalálható (Foyer és Halliwell, 1976; Klapheck *et al.*, 1987). Antioxidatív hatása mellett fontos komponense a sejten belüli kéntranszportnak, és résztvesz a xenobiotikumok lebontási folyamataiban, valamint szerepet játszik az aminosavak transzportjában is. Az oxidatív stressz szempontjából nemcsak a növények összes glutation tartalmának van jelentősége, hanem fontos ismerni a redukált és az oxidált glutation (glutation diszulfid) arányát (GSH/GSSG) is, mivel ennek az aránynak az eltolódása jellemző az oxidatív stresszre (Szegeletes, *et al.*, 1994; Asensi *et al.*, 1994; 1999; Viña *et al.*, 1995). A megváltozó GSH/GSSG arány hatással van a glutationt regeneráló enzimrendszerekre is, ezért a kísérleteink során nemcsak a növényi extraktumok redukált és oxidált glutation tartalmának a változását vizsgáltuk a különböző stressz körülmények között, hanem a glutation regenerálásért felelős glutation reduktáz enzim (GR, EC 1.6.4.2) aktivitását is nyomon követtük. A glutation reduktáz maximális aktivitása közvetlenül a csírázás után mérhető, és az enzim aktivitás gyorsan csökken a növény öregedésével. A glutation reduktáz főleg a citoszolban található NADPH függő enzim, funkciója a glutation-diszulfid redukciója glutationná (Schmidt és Kunert, 1986).

Az irodalomban a glutation koncentráció meghatározására több módszert is leírtak már. A legelső, és ma is a leggyakrabban használt módszer a szabad tiol csoport meghatározása DTNB-vel (Ellman, 1959; Deakin *et al.*, 1963; Tietze, 1969), spektrofotometriásan. A módszer egyszerű, gyorsan kivitelezhető, nagy hátránya, hogy a származék képzés során a mintában megtalálható összes szabad tiol elreagál a származék képző DTNB-vel, így a kapott eredmény nem a redukált (illetve, ha a mintaelőkészítés során redukáljuk a diszulfid kötéseket, akkor az összes) glutation szinttel arányos. Ez növényi kivonatoknál nagy hibát okozhat, mivel bizonyos növények a glutation mellett jelentős mennyiségben tartalmaznak homoglutationt (hGSH, γ -glutamil-ciszteinil- β -alanin) (Klapheck, 1988), vagy γ -glutamil-ciszteinil-szerint (Klapheck *et al.*, 1992), esetleg γ -glutamil-ciszteinil-glutaminsavat (Meuwly *et al.*, 1993). A hibák kiküszöbölésére, illetve a redukált/oxidált glutation arányának

meghatározására a módszert többen módosították (De Kok *et al.*, 1981; Guy és Carter, 1982; Anderson *et al.*, 1992). A módosítások hatására a mintaelőkészítés bonyolultabb lett, azonban nem sikerült egyértelműen kizárni a glutation analógok zavaró hatását. A zavaró tényezők minimálisra csökkentése miatt a folyadék kromatográfián alapuló glutation meghatározást használtuk a kísérleteinkben. A glutationt közvetlenül amperometriásan/voltometriásan lehet detektálni (Vandeberg és Johnson, 1994, Lakritz *et al.*, 1997) biológiai mintákból. UV detektorral nehezen mérhető, mivel a moláris extinciókoefficiense kicsi és nem specifikus, ezen felül nem fluoreszkál, ezért célszerű megfelelő származékot készíteni belőle, hogy spektroszkópiás elven működő detektorokat is lehessen használni. A DTNB-vel képzett származék (egy vegyes diszulfid) alkalmas erre a célra, de a származék képzés során keletkező bomlástermékek retenciósideje nagyon hosszú az RP-HPLC-s mérés során. Egy másik lehetséges megoldás az aminosav analízisnél használt *orto*-ftálaldehiddel és β -merkaptopropanollal készített származék (Dohmen *et al.*, 1990) kromatografálása és detektálása fluoreszcenciásan. Ennek a módszernek a hátránya, hogy a képződő származék rendkívül bomlékony, és megfelelő reprodukálhatósággal csak speciális kiépítettségű folyadék kromatográffal használható.

Mi a kísérleteink során két különböző folyadék kromatográfiás módszert használtunk. Az egyik módszer alapja a monobrómbimán (mBB, *szin*-9,10-dioxabimán származék) (Kosower *et al.*, 1978) reakciója lúgos közegben a szabad tiol csoportokkal (Kosower *et al.*, 1979). A képződő termék fluoreszkál, míg az egyéb melléktermékek nem, így kromatográfiásan a szabad tiol csoportot tartalmazó molekulák könnyen detektálhatók (Fahey *et al.*, 1981; Newton *et al.*, 1981; Rauser *et al.*, 1991). A módszer nagyon érzékeny, minimális mennyiségű ciszteint és GSH-t lehet vele kimutatni (Luo *et al.*, 1995). Hátránya, hogy csak a szabad (redukált) tiol tud reagálni a mBB-nal, így közvetlenül csak a redukált, vagy a minta redukálása után az összes glutation szint meghatározására használható. A GSSG szelektív redukciójával ez a módszer is alkalmassá tehető a GSH/GSSG arány mérésére is, de így megnő a mintaelőkészítési igény, és megduplázódik a mintaszám is. Más származékképző reagens használatával a módszer kimutatási határa még tovább csökkenthető (Winters *et al.*, 1995; Ridnour *et al.*, 1999).

A másik módszer használatánál egy mérésen belül meg tudjuk határozni a redukált és az oxidált glutation mennyiségét. Származék képzésre a 2,4-dinitro-fluor-

benzolt (DNFB, Sanger reagens) használtuk, amely lúgos körülmények között a primer amin ($-NH_2$), a fenolos hidroxil ($Ph-OH$), a tiol ($-SH$) és az imin ($=NH$) csoportokkal képes reagálni. A képződő DNP-származékok sárga színűek, és 365 nm-en UV detektorral könnyen mérhetőek. A Sanger reagenst már régóta használták fehérjék *N*-terminális aminosavának a meghatározására. Mivel az általunk mérendő redukált glutation szabad tiol csoportot is tartalmaz, ezt a csoportot először jódecetsavval, vagy jódecetamiddal el kell reagáltatni (Reed *et al.*, 1980), védeni kell, hogy jól mérhető, és eléggé stabil származékot kapjunk. A szabad tiol csoportok elreagáltatására egyéb vegyületek is használhatók a jódecetsav mellett, például az *N*-etil-maleinimid (NEM) (Riordan és Vallee, 1972; Akerboom és Sies, 1981; Asensi *et al.*, 1994), vagy a 2-vinil-piridin (Griffith, 1980; Asensi *et al.*, 1994).

Mivel a redukált glutation (GSH) oxidációra érzékeny, ezért a mintaelőkészítésnél olyan körülményeket kellett biztosítani, hogy az autooxidáció lehetőségét minimálisra csökkentsük. A tiol csoport oxidációja lúgos közegben, általában átmenetifém-katalízissel megy végbe, ezért az általunk használt eljárás során az oldható vegyületeket savas körülmények között, komplexképző jelenlétében extraháltuk ki, alacsony hőmérsékleten.

Az *Aster tripolium* esetében mind az alacsony (0 mM és 2 mM NaCl), mind a magas (300 mM NaCl) sókoncentráció az oxidált glutation-diszulfid akkumulációját eredményezte, míg a 10 mM NaCl kezelés esetében a GSSG koncentráció alacsony maradt. Stressz hatására a GSSG koncentráció megemelkedik (Albrecht és Wiedenroth, 1994; Asensi *et al.*, 1994; 1999; Szegletes *et al.*, 1994), és az általunk végzett kísérletekben a GSSG szint növekedés korrelációban volt az alacsony, vagy magas NaCl koncentrációval. Azaz a halofita *Aster tripolium* számára mind az általunk alkalmazott alacsony, mind a magas sókoncentráció oxidatív stresszkörülményeket jelent. A folyadék kromatográfiás mérések alapján meghatároztuk, hogy az *Aster tripolium* neveléséhez a tápoldat 10 mM NaCl tartalma megfelelő, ezt támasztotta alá az a tény is, hogy már 10 mM NaCl visszaszorította a nitrát anion akkumulációját.

A búzával végzett kísérleteknél mind a kontroll, mind sókezelt növényeknél a magasabb glutation szintet mértünk levélben, mint a gyökérben. A sókezelés hatására az oxidált glutation-diszulfid koncentrációja megnőtt, majd a kísérlet során időben lassan csökkent (Szegletes *et al.*, 1994). Az alkalmazott sókoncentráció és a GSSG szint között nem találtunk összefüggést, ami, egyéb kísérleteinkkel összhangban azzal

magyarázható, hogy a stressz hatására a növények napi ritmusa megváltozik (Erdei *et al.*, 1995; 1998). Mivel a glutation koncentráció a különböző napszakokban eltér, és saját napi ritmusa (Schupp és Rennenberg, 1988) van a növényekben, ennek a ritmusnak az eltolódása esetén a különbözőképpen kezelt növények nem azonos fázisban vannak, ezért a kapott eredményeink nem összehasonlíthatóak.

A glutation rendszer napi ritmusa feltételezhetően a fotorespiráción keresztül a fotoperiódushoz kötött, mivel a glutation szintézisének a sebességmeghatározó lépése a szabad glicin szintézise, és hozzákapcsolása a γ -glutamil-ciszteinhez (Smith, 1985; Noctor *et al.*, 1996; 1997a; 1997b; Arisi, 1997).

Búza esetében vizsgáltuk az UV-B sugárzás hatását is a növényekre. A stresszhatás elején megnövekedett a kísérleti növényekben a GSSG mennyisége. Ezt követte a megnövekedett glutation reduktáz aktivitás (Barabás *et al.*, 1996; 1998), amit időlegesen a redukált GSH koncentráció növekedés kísért, de a kísérlet időtartama (8 nap) alatt a növények adaptálódtak az UV-B sugárzáshoz (Erdei *et al.*, 1995; Barabás *et al.*, 1996; 1998). A megnövekedett glutation reduktáz aktivitás hatására GSH-vá redukálódik az UV-B sugárzás hatására a képződött GSSG, és a felszabaduló GSH újra részt vehet a gyök megkötő folyamatokban, valamint megvédi a sejteket a GSSG toxikus felhalmozódásától (Navari-Izzo és Izzo, 1993). Ez a megnövekedett GSSG szint jelzi, hogy az UV-B sugárzás oxidatív stresszt okoz a növényekben.

4.5. Glutation reduktáz és glutation *S*-transzferáz

A glutation reduktáz és glutation *S*-transzferáz aktivitását búzában mértük. A kísérletek során a só stressz hatására bekövetkező napi ritmus változást követtük nyomon. A glutation reduktáznak napi ritmusa mind a levélben mind a gyökérben jól kimérhető, és mindkettőnél naponta 2 maximumot kaptunk. A két maximum érték közötti idő 8 óra és a második csúcs a sötét periódusban mérhető. A glutation *S*-transzferáz napi ritmusa levélben nem mérhető, de szintje oszcillál a sejtben, ultradián ritmusa van. Gyökérben a napi ritmus két maximum csúcsot ad kontrol növényekben (0 mM, 50 mM) magasabb koncentrációk esetében, és az alapértéke 3-szorosa a levélhez viszonyítva (Erdei *et al.*, 1998). Sókezelésre a GST aktivitása nőtt gyökérben, ugyanakkor levélben állandó. Az életkor előrehaladásával a GR nőtt gyökérben és levélben egyaránt, ugyanakkor a GST csak gyökérben.

Az oszcilláló komponensnek a legérdekesebb karaktere/komponense szemmel láthatóan a glutation reduktáz aktivitásának a változása. Látható, hogy a GR aktivitás minimuma a sötét periódus végén van, és a fényperiódus kezdete előtt elkezd emelkedni. Mindezek arra irányítják a figyelmünket, hogy a fázist (a fázisok beállítását) ilyen módon, más faktorok is kell hogy szabályozzák, nemcsak a sötét/fény periódusok. A periodogramok, amelyek Fourier transzformációs analízissel készültek, egy növekedési tendenciát mutatnak amplitúdójukban, a sókoncentráció növelésével párhuzamosan, ráadásul egy 10 órás ultradián periódicitást kaptunk az összes minta analízise során, kivételt a 150 mM NaCl kezelés sorozat képez.

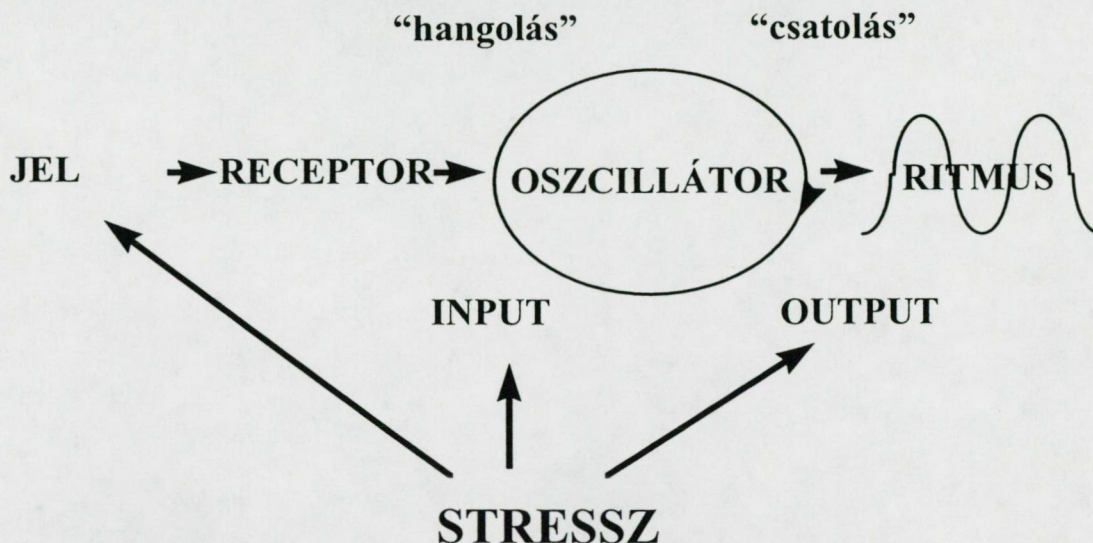
Jelen kísérleteinkben a cirkadián ritmus periódusa nem változott, azonban a rövidebb ultradián fluktuáció úgy tűnik eltűnt. Mindezen felül, az amplitúdók felerősödtek.

4.6. Eredményeinkből levonható stresszkoncepció

Az általunk vizsgált növényi rendszerekről is elmondható, hogy érvényes rájuk a Selye-féle általános stresszhipotézis, azaz különböző környezeti hatásokra a növények hasonló módon reagálnak. Az ionos jellegű stresszre ionos jellegű válasz a domináló, azaz a növények a tápoldatból felvehető kationokat és anionokat akkumulálják. Ezzel ellentétben ozmotikus stressz esetén a szerves, "kompatibilis" ozmotikumok (pl. prolin) szintézise és akkumulációja a domináns.

E mellett azt az irodalomban már ismert tényt is igazoltuk, hogy az só, szárazság és UV-B stressznek van oxidatív komponense, ami ellen a növények a megfelelő antioxidatív védőrendszer aktiválják. Kísérleteink során megmutattuk, hogy a glutation diszulfid, a glutation oxidált formájának a koncentrációját meghatározva követhető az oxidatív stressz mértéke. Oxidatív stressz hatására megnő a sejtek GSSG tartalma, majd ezt az indukálódó glutation reduktáz redukálja, így a szintje gyorsan visszaáll az eredeti értékre, azaz a növények adaptálódnak, és a gyors védőreakciót felváltják más, hosszantartó hatású adaptív folyamatok (pl. a proteinszintézis módosulása, stresszfehérjék indukciója).

A GSH szint fluktuációja megfelel a fényperiódus változásának, mivel a kiváltó oka feltehetően a fotorespiráció során szabad glicin képződése. Az általunk meghatározott fluktuáció stresszkörülmények között módosul.



28. ábra: A stressz hatása a növények napi ritmusára

Feltételezésünk szerint a növények stresszválaszait előidézhetheti az oszcilláló biokémiai reakciók modulációja, illetve a deszinkronizációja (28. ábra). Ennek a folyamatnak csökkent rezisztencia lehet az eredménye. A stresszor kölcsönhathat a biológia óra beállításában résztvevő szignál transzdukciós kaszkádreakcióval az input oldalon, vagy az output oldalon, a transzláció, vagy végtermék fehérje közvetlen befolyásolásával.

A vizsgált növényi rendszerek túlságosan sok változósak ahhoz, hogy egy-egy kiragadott paraméter egyértelmű választ adjon arra kérdésre, hogy hogyan reagálnak a növények a környezet változására, ezért a vizsgált paraméterek összességét kellett elemezni. Az egzakt válaszhoz kísérleteinket folytatni szeretnénk, kiterjesztve a stresszválaszok RNS és fehérje szintű vizsgálatával.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során glükofita és halofita növényeket tanulmányoztunk. Vizsgáltuk kation és anion összetételüket, poliamin és prolin szintjüket és a GSH/GSSG arányukat, valamint ehhez kapcsolódóan a glutation reduktáz és a glutation *S*-transzferáz aktivitás napi ritmusának változását ozmotikus és só stresszkörülmények között. Az anionok, a poliaminok, a prolin és a glutation méréséhez nagy hatékonyságú folyadék kromatográfián (HPLC) alapuló módszereket dolgoztunk ki.

5.1. Módszerfejlesztés a stresszfolyamatok válaszreakcióinak a követésére

A szerves anionokat ion kromatográfiás módszerrel, anion cserélő oszlopon választottuk el. Az anionokat vezetőképesség mérő detektorral mértük. Az elválasztásra használt analitikai oszlop érzékenysége miatt olyan mintaelőkészítési eljárást kellett kidolgoznunk, amely a komplex növényi extraktumok estében is lehetővé teszi a mérendő szerves anionok meghatározását. Erre a célra az ún. "clean up" technikát használtuk, és szilárd fázisú extrakcióval, C_{18} oszlopon tisztítottuk meg a mintáinkat. Az így kapott oldatok alkalmasak voltak arra, hogy a növényi minták anion tartalmát megmérjük.

A membránok és a nukleinsavak integritásának megőrzésében fontos szerepet játszó poliaminokat savas kioldással nyertük ki a növényi mintákból, benzoilezett származékot készítettünk belőlük, majd az elkészült származékokat fordított fázisú kromatográfiás oszlopon elválasztottuk, és UV detektort használtunk a komponensek mérésére. Ennek a származék képzési technikának az előnye, hogy viszonylag egyszerűen megvalósítható, és stabil, hosszabb ideig tárolható vegyületet eredményez. A benzoilezett poliaminok UV detektorral, 254 nm-en kellő érzékenységgel vizsgálhatóak, a módszer alkalmas növényi minták vizsgálatára. Amennyiben a minta prolin, ami az egyik legnagyobb koncentrációban előforduló szerves ozmotikum, mennyiségére is szükségünk volt, egy másik származék képzési reakciót kellett alkalmaznunk. Erre a célra FMOC-Cl-ot használtuk, és az elválasztást egy nem porózus, fordított fázisú kromatográfiás oszlopon valósítottuk meg. A nem porózus oszlop előnye, hogy nagyon gyors elválasztást tesz lehetővé, így egy mérésen belül el tudtuk választani a poliaminokat és a prolint is (Szegletes *et al.*, 1996, 2000).

A glutation redukált és oxidált formájának a meghatározására két módszert is kipróbáltunk. A mintákat savval extraháltuk, majd az extraktumokból kétféle származékot készítettünk. Az összes glutation szint mérésénél az oxidált tiolokat redukáltuk, és mBBr-nal készítettünk belőlük származékot. A kész származékot fordított fázisú oszlopon kromatografáltuk, és fluoreszcenciásan detektáltuk. Ez a módszer rendkívül érzékeny, pmol anyagmennyiség detektálását tette lehetővé. Mivel az oxidatív stressz mértéke az oxidált glutation-diszulfid mennyiségével arányos inkább, és nem az összes glutationéval, viszont a GSH/GSSG arány meghatározása megduplázza a mintaszámot, mindez nagyon megnehezíti a glutation napi ritmusának a vizsgálatát. Ezért egy másik, szintén folyadék kromatográfiás elválasztáson alapuló módszert is kipróbáltunk. Ennek a módszernek a segítségével közvetlenül meg tudtuk határozni a redukált/oxidált glutation arányt. A redukált/oxidált glutation arány meghatározásánál a szabad tiol csoportokat karboximetileztük. Származék képzésre DNFB-t használtunk, amely a primer amino csoportokkal reagálva UV detektorral jól mérhető vegyületet ad. A DNP származékot Amino-5S oszlopon választottuk el.

Az alkalmazott módszereinkről elmondható, hogy alkalmasak a növények stresszválaszainak követésére és felhasználhatóak a növényélettani, növényi biokémiai kutatásban, valamint a környezetvédelmi és környezeti stresszhatás vizsgálatokban is eredményesen alkalmazhatóak.

5.2. Stresszfolyamatok vizsgálata növényekben

Az *Aster tripolium* levélben só stresszre a Na^+ ion akkumuláció emelkedett, ellenben a felvett K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok szintje már a 10. napra csökkent és a 45. napra igen alacsony szintre esett vissza, különösen a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} esetében (Erdei *et al.*, 1995). Az anionok közül a Cl^- koncentrációja hasonlóan alakul mint a Na^+ ioné. Alacsony Cl^- koncentrációknál NO_3^- akkumulálódott a növényekben, de ezt a folyamatot már 10 mM NaCl is visszaszorította.

Napraforgóban a Na^+ ion akkumuláció nőtt NaCl bekezelést követően, arányosan a sókoncentrációval, de a Na^+ ionok nem vettek részt az ozmotikus szabályozásban a PEG-gel kiváltott szárazság stresszben. A Na^+ felhalmozódás elsősorban a gyökérben jelentkezett és csak részlegesen transzlokálódott a hajtásban a nátrium ion. A Viki nagyobb hatékonysággal tudta kizárni a nátrium iont a hajtásból mint a Blumix.

Meghatároztuk a különböző stressz hatásokra megváltozó klorid, nitrát, foszfát és szulfát koncentrációt a vizsgált növényekben. A kísérleteink azt mutatták, hogy a bromid- és nitrit tartalom a kimutatási határt nem érte el egyik növényi szervben sem. Só stressz hatására a szervetlen anionok koncentráció változásának nyomon követésével különbséget tudunk tenni egy glükofita és egy halofita növény között. A különböző növényi szervek ion tartalma alapján következtetni tudunk a növények ionfelvételi mechanizmusára is. A NaCl kezelések során a Na^+ és Cl^- ion koncentráció együtt változott. A magas Cl^- koncentráció visszaszorította a NO_3^- felhalmozódását.

A szárazság és só stressz hatását a növények vízpotenciáljuk csökkentésével próbálják ellensúlyozni. A só stressz esetén ionos anyagokat akkumulálnak, míg szárazság stressz hatására inkább szerves vegyületeket, többek között prolint, és a membránok integritásának a megőrzésére poliaminokat szintetizálnak és akkumulálnak. Ennek a folyamatnak fontos szerepe van a tolerancia kialakulásában. A növényi minták poliamin szintjeinek vizsgálata során jellemző különbséget találtunk a szárazságtűrő *Sorghum bicolor* és a vízhiányt nehezebben elviselő kukorica között. Búza esetében a putreszcin és a prolin szint együtt változott a különböző fajtákban, de a termesztett búzafajták szárazságtűrése és a virágzás után a zászlólevelekből mérhető poliamin, valamint a prolin szintek között nincs egyértelmű kapcsolat.

Az ozmotikus, só és UV-B stressz hatására bekövetkező glutation szint változást meghatároztuk. A különböző növényekben a glutation és a glutation-diszulfid aránya, illetve a glutation-diszulfid koncentrációja arányos volt az oxidatív stressz mértékével, így annak nyomon követésére jól használható. Megállapítottuk, hogy a glutation koncentrációja napi ritmus szerint változik a növényekben, és ezt a ritmust a környezeti stresszhatások (pl. só stressz) deszinkronizálják. A glutation rendszer napi ritmusának a vizsgálatát kiegészítettük a glutation reduktáz és a glutation *S*-transzferáz napi ritmusának a vizsgálatával. Ezeket a vizsgálatokat búzán végeztük el. A búza növekedése során a glutation reduktáz aktivitása a napi ritmusát megtartva növekedett.

Búzában a glutation reduktáznak napi ritmusa mind a levélben mind a gyökérben jól kimérhető, a glutation *S*-transzferáz szintje oszcillál a sejtben, de ennek a ritmusnak a periódusideje rövidebb a napi ritmusnál. Az életkor előrehaladásával a GR nőtt búza gyökérben és levélben egyaránt, ugyanakkor a GST csak gyökérben.

Kísérleteink során kidolgoztunk olyan nagy hatékonyságú folyadék kromatográfián (HPLC) alapuló módszereket, amelyek alkalmasak arra, hogy növényi mintákból meghatározzuk a szervesetlen anionokat, a poliaminokat, a prolint és a glutation redukált és oxidált formáját. A módszereinket alkalmazni tudtuk a biokémiai és fiziológiai kutatásokban. Az irodalmi adatok alapján kiválasztott vegyületek koncentráció változásának a nyomon követésével jellemezni tudtuk a kísérleti növények állapotát és stresszreakcióikat a különböző környezeti stresszhatások mellett. A vizsgált biológiai élő rendszerek túlságosan sok változósak ahhoz, hogy egy-egy kiragadott paraméter egyértelmű választ adjon arra kérdésre, hogy hogyan reagálnak a növények a környezet változására, ezért a vizsgált paraméterek összességét kellett elemezni. Ez alól talán csak a glutation-diszulfid a kivétel, mivel koncentrációjának időleges megnövekedése egyértelműen jelzi az oxidatív stresszhatást (Erdei *et al.*, 1995), de az általunk használt UV-B stresszhatáshoz a kísérleti növények gyorsan adaptálódtak (Erdei *et al.*, 1995; Barabás *et al.*, 1998), így az oxidatív stressz megfelelő jelzéséhez gyakori mintavételekre volt szükség.

Összefoglalva, feltételezzük, hogy a növények stressz folyamataira adaptált Selye-féle koncepciónak megfelelően növényekben a stresszhatásra adott válaszok során a biokémiai és a fiziológiai folyamatok oszcillációjának paraméterei módosulnak, deszinkronizálódnak.

6. SUMMARY

Our aim was to study the antioxidant mechanism under different stress conditions as drought and salinity. A hypothesis was developed that the immediate stress for the organism is an oxidative stress and therefore, antioxidants indeed play an important role in tolerance. We investigated the antioxidant defence mechanism and related mechanisms. The question, how does their genetically engraved mechanism of osmotic adjustment work under different salt condition, without losing their special attributes are still unanswered. It can be expected that at low supply of Na^+ and Cl^- ions, other available nutrient ions will be accumulated and possibly metabolic disturbance will appear. For this purpose we investigated the analysis for cations, anions, and other osmotically interesting metabolites (like carbohydrates, polyamines, proline) and glutathione, glutathione reductase, glutathione *S*-transferase in the halophytic and glycophytic species.

First we measured the daily fluctuation in mineral uptake and the diurnal rhythm by osmotic and salt stress. Na^+ accumulation increased both with increasing external NaCl concentration and with the age of *Aster tripolium* and sunflower (*Helianthus annuus* L. cvs Viki and Blumix). But Na^+ did not participate in osmotic adjustment under water stress induced by PEG in sunflower. Dramatic reduction occurred in plants grown at high salt concentration where a constant low value of K^+ was maintained. Similar trend in decrease appeared for leaf Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations in *Aster tripolium* and sunflower where no cultivar differences were found. The accumulation of chloride is gradually increasing during the time course and Cl^- is intensively translocated to the leaves in both varieties of sunflower. Our data showed that nitrate levels increased only under osmotic (PEG) treatment in roots, stems and leaves. In wheat the Na ion concentration increased both in leaves and roots with age and with increasing NaCl salinity but a decrease of K^+ content can be measured. There was not any effect of UV-B treatment in the other cation composition.

The effects of NaCl as the simulation of salt stress was studied on the glutathione system in plants. The diurnal fluctuation of glutathione and glutathione disulfide as a marker of oxidative stress were determined under salt stress. NaCl

treatment caused changes in the enzyme activities and in the level of glutathione. Salinity resulted in an enhanced level of glutathione disulfide that means that salt stress has an oxidative component, too. In the present experiments, the period of the circadian rhythm was not influenced, however, the shorter ultradian fluctuations seemed to disappear. Amplitudes, on the other side, were increasing. Glutathione reductase and glutathione S-transferase activities increased with age and were higher in the treated plants. Diurnal rhythm of changes was also modulated: minimum activities of GR occurred towards the end of the dark period and started to increase before the onset of the light period. This suggests that the phase, in this way, is governed by other factor than the dark/light transition. Periodograms as calculated by fast Fourier analysis showed an increasing trend in the amplitudes as the function of salt concentrations, and, an additional 10-hour ultradian period occurred in all except for the 150 mM NaCl samples.

It can be stated that fluctuations follow the model of circadian oscillator. Initiation and control of the phase of the rhythm are assumed to results from light action. However, the transduction of the signal is altered by stress factors, resulting the modulation of the oscillator.

Drought and excessive salinity are stress factors with common consequence for reduced water potential in the external medium. Under any of these conditions, plants are forced to decrease their internal water potential to avoid desiccation. To sustaining the homeostasis under osmotic stress the plant cells accumulate ions mainly inside the vacuoles, and the levels of other osmoprotectants are increased in the cytoplasm to maintain the water potential equilibrium within the cell. These compatible osmolytes are organic compounds as proline, glycine betaine, sugars. These compounds contribute to the osmotic adjustment processes and help to maintain the water balance of the plant cells. At the same time polyamines are responsible for ensuring the integrity of membranes, nucleic acids and other subcellular organelles under stress conditions. Polyamines, such as putrescine, spermidine and spermine, are essential for cell growth and for cell differentiation. They are thought to be involved in salt, osmotic, heat and drought as well as in oxidative stress responses in plants. They play important

role in maintaining membrane and nucleic acid integrity under most of these stress conditions.

Qualitative and quantitative changes polyamines and proline contents were studied in varieties of common wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in origin, drought and salt tolerance during two types of drought stress. Flag leaves were used for the determination of the concentration of the osmoprotectants and comparable results were obtained from wheat lines. The salt tolerant wheat, Kharchia, accumulates higher amount of proline and putrescine than the drought tolerant or sensitive lines. Proline accumulated to a significantly higher level in the salt tolerant varieties, Kharchia, compared to that of the drought tolerant or drought sensitive genotypes, like Kobomugi or GK-Kata.

Our data support the idea that the initiation of polyamines, especially putrescine and proline, needs an osmotic signal. However, if permeable ions are present, salt accumulation can contribute to the osmotic adjustment and thus the onset of polyamine and proline biosynthesis is delayed or does not take place. Correlation between drought tolerance of wheat cultivars and the accumulation of polyamines and proline was found.

In summary, we have hypothesised that stress responses in plants, as described by the stress concept of Selye and adopted in plant physiology, can be evoked by the modification and desynchronization of oscillations of biochemical and physiological processes resulting in a decreased state of resistance.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H.: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, **77**: 373-382 (1981).
- ALBERT, R. & KINZEL, H.: Unterscheidung von Physiotypen bei Halophyten des Neusiedlerseegebietes (Österreich). *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, **70.S**: 138-157 (1973).
- ALBRECHT, G. & WIEDENROTH, E-M.: Protection against activated oxygen following reaeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of glutathione system. *J. Exp. Bot.*, **45**: 449-455 (1994).
- ALSCHER, R., BOWER, J. & ZIPFEL, W.: The basis for different sensitivities of photosynthesis to SO_4^{2-} in two cultivars of pea. *J. Exp. Bot.*, **38**: 99-108 (1987).
- ALSCHER, R. G.: Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.*, **77**: 457-464 (1989).
- ALSCHER, R. G., DONAHUE, J. L. & CRAMER, C. L.: Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiol. Plant.*, **100**: 224-233 (1997).
- ANDERSON, J. V., CHEVONE, B. I. & HESS, J. L.: Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. *Plant Physiol.*, **98**: 501-508 (1992).
- ARISI, A-C. M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. & JOUANIN, L.: Modification of thiol contents in poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) overexpressing enzymes involving glutathione synthesis. *Planta*, **203**: 362-372 (1997).
- ASADA, K.: Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, **85**: 235-241 (1992).
- ASADA, K.: Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. *In*: Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants,

- eds.: C. H. FOYER & P. M. MULLINEAUX, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104. (1994).*
- ASADA, K.: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**: 601-639 (1999).
- ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDO, F. V., ESTRELA, J. M. & VIÑA, J.: Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, **234**: 367-371 (1994).
- ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDO, F. V., GARCIA-DE-LA ASUNCION, J., ESTRELA, J. M. & VIÑA, J.: A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal. Biochem.*, **217**: 323-328 (1994).
- ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDO, F. V., LLORET, A., LEHNER, M., GARCIA-DE-LA ASUNCION, J. & VIÑA, J.: Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol.*, **299**: 267-276 (1999).
- AVSIAN-KRETCHMER, O., ESHDAT, Y., GUETA-DAHAN, Y. & BEN-HAYYIM, G.: Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta*, **209**: 469-477 (1999).
- BAIER, M. & DIETZ, K.-J.: Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, **4**(5): 166-168 (1999).
- BARABÁS, K. N., SZEGLETES, ZS., FÜLÖP, K. & ERDEI, L.: UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 231 (1996).
- BARABÁS, K. N., SZEGLETES, ZS., PESTENÁČZ, A., FÜLÖP, K. & ERDEI, L.: Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, **153**: 146-153 (1998).

- BARTÓK, T., BÖRCSÖK, G. & SÁGI, F.: RP-HPLC separation of polyamines after automatic FMOC-Cl derivatisation and precolumn sample clean-up using column switching. *J. Liquid Chromatogr.*, **15**(5): 777-790 (1992).
- BEEOR-TZAHAR, T., BEN-HAYYIM, G., HOLLAND, D., FALTIN, Z. & ESHDAT, Y.: A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Lett.*, **366**: 151-155 (1995).
- BENGTTSSON, B., ERDEI, L., JENSÉN, P., BÉRCZI, A. & KYLIN, A.: Effect of switches in nutrient levels during the life cycle of spring wheat. *Plant and Soil*, **103**: 199-204 (1987).
- BEN-HAYYIM, G., FALTIN, Z., GEPSTEIN, S., CAMOIN, L. STROSBERG, A. D. & ESHDAT, Y.: Isolation and characterization of salt-associated protein in *Citrus*. *Plant Sci.*, **88**: 129-140 (1993).
- BÉRCZI, A., OLÁH, Z. & ERDEI, L.: Potassium transport in wheat seedlings grown with different potassium supplies. I. Ion contents and potassium influx. *Physiol. Plant.*, **55**: 371-376 (1982).
- BIGNAMI, S. M. L., MILAN, C. M., MORETTI, M. & NAVARRA, F.: Evaluation of ionexchange chromatography for nitrate determination in wastewaters. *J. Chromatogr.*, **644**: 341-344 (1993).
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M. & INZÉ, D.: Superoxide dismutases in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **13**: 199-213 (1994).
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R., AUMANN, K. D., BLOCKER, H., GROSS, G., KIESS, M., KLOPPEL, K. D., MAIORINO, M., ROVERI, A., SCHUCKELT, R. & USANI, F.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 7342-7348 (1994).
- BRUNT, K.: Sulfate determination in industrial wastewater by liquid chromatography with postcolumn solid-phase reaction detection. *Anal. Chem.*, **57**: 1338-1341 (1985).
- CADENAS, E.: Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**: 79-110 (1989).

- CLARKSON, D. T., CARVAJAL, M., HENZLER, T., WATERHOUSE, R. N., SMYTH, A. J., COOKE, D. T. & STEUDLE, E.: Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.*, **51**: 61-70 (2000).
- CONKLIN, P. L., NORRIS, S. R., WHELLER, G. L., WILLIAMS, E. H., SMIRNOFF, N. & LAST, R. L.: Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 4198-4203 (1999).
- CONKLIN, P. L.: Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*, **3(9)**: 329-330 (1998).
- DAVEY, M. W., GILOT, C., PERSIAU, G., OSTERGAARD, J., HAN, Y., BAUW, G. C. & VAN MONTAGU, M. C.: Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. *Plant Physiol.*, **121**: 535-543 (1999).
- DE KOK, L. J. & OOSTERHUIS, F. A.: Effect of frost-hardening and salinity on glutathione and sulfhydryl levels and on glutathione reductase activity in spinach leaves. *Physiol. Plant.*, **58**: 47-51 (1983).
- DE KOK, L. J. DE KAN, P. J. L., TÁNCOS, O. G. & KUIPER, P. J. C.: Sulphate-induced accumulation of glutathione and frost-tolerance of spinach leaf tissue. *Physiol. Plant.*, **53**: 435-438 (1981).
- DELAUNEY, A. J. & VERMA, D. P. S.: Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, **4**: 215-223 (1993).
- DOHMEN, G. P., KOPPERS, A. & LANGEBARTELS, C.: Biochemical response of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: effects on amino acid, glutathione and polyamine titers. *Environ. Pollut.*, **64**: 375-383 (1990).
- DUNHAM, A. J., BARKLEY, R. M. & SIESVERS, R. E.: Aqueous nitrite ion determination by selective reduction and gas phase nitric oxide chemiluminescence. *Anal. Chem.*, **67(1)**: 220-224 (1995).
- ELLMAN, G. L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**: 70-77 (1959).

- ERDEI, L. & KUIPER, P. J. C.: The effect of salinity on growth, cation content, Na^+ -uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. *Physiol. Plant.*, **47**: 95-99 (1979).
- ERDEI, L., OLÁH, Z. & BÉRCZI, A.: Phases in potassium transport and their regulation under near-equilibrium conditions in wheat seedlings. *Physiol. Plant.*, **60**: 81-85 (1984).
- ERDEI, L., MØLLER, I. M. & JENSÉN P.: The effects of energy supply and growth regulation on K^+ uptake into plant roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **184**: 345-361 (1989).
- ERDEI, L. & TRIVEDI, S.: Responses to salinity of wheat varieties differing in drought tolerance. In: Plant water relations and growth under stress. eds.: M. TAZAWA, M. KATSUMI, Y. MASUDA & H. OKAMOTO, Myu K. K., Tokyo, pp. 201-208 (1989) ISBN 4-943995-03-9.
- ERDEI, L., TRIVEDI, S., TAKEDA, K. & MATSUMOTO, H.: Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *J. Plant Physiol.*, **137**: 165-168 (1990).
- ERDEI, L. & MATSUMOTO, H.: Mitigation of Ca^{2+} deficiency by benzyladenin in cucumber: ion levels, polyamines and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **187**: 177-188 (1991).
- ERDEI, L. & TALEISNIK, E.: Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Plant.*, **89**: 381-387 (1993).
- ERDEI, L., PESTENÁČZ, A., BARABÁS, K. & SZEGLETES, Zs.: Adaptive responses of plants under stress conditions. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, **30**: 27-37 (1995).
- ERDEI, L., SZEGLETES, Zs., BARABÁS, K. & PESTENÁČZ, A.: Responses in polyamines titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, **147**: 599-603 (1996).

- ERDEI, L., SZEGLETES, ZS., BARABÁS, K., PESTENÁ CZ, A., KOVÁCS, A. & TÓTH, B.: Effects in environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 267 (1996).
- ERDEI, L., SZEGLETES, ZS., BARABÁS, K. N., PESTENÁ CZ, A., FÜLÖP, K., KALMÁR, L., KOVÁCS, A., TÓTH, B. & DÉR, A.: Environmental stress and the biological clock in plants: Changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J. Plant Physiol.*, **152**: 265-271 (1998).
- FAHEY, R. C., NEWTON, G. L., DORIAN, R. & KOSOWER, E. M.: Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, **111**: 357-365 (1981).
- FARRIS, M. W. & REED, D. J.: High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol.*, **143**: 101-109 (1987).
- FEHÉR, J. & VERECKEI A.: Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. *Medicina Könyvkiadó*, Budapest, (1985).
- FLORES, H. E. & GALSTON, A. W.: Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science*, **217**: 1259-1260 (1982).
- FLORES, H. E. & GALSTON, A. W.: Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, **69**: 701-706 (1982).
- FLORES, H. E. & GALSTON, A. W.: Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of response. *Plant Physiol.*, **75**: 102-109 (1984).
- FLORES, H. E.: Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. *In*: Biochemistry and physiology of polyamines in plants. eds.: R. D. SLOCUM & H. E. FLORES, *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, pp. 213-228 (1991).
- FLOWERS, T. J., TROKE, P.F. & YEO, A. R.: The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **13**: 75-91 (1977).

- FLOWERS, T. J. & YEO, A. R.: Ion relations of plants under drought and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**: 75-91 (1986).
- FOYER, C. H. & HALLIWELL, B.: The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**: 21-25 (1976).
- FOYER, C. H. & HARBINSON, J.: Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport *In*: Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants, *eds.*: C. H. FOYER & P. M. MULLINEAUX, *CRC Press*, Boca Raton, FL, pp. 1-42. (1994).
- FOYER, C. H., LELANDIS, M. & KUNERT, K. J.: Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, **92**: 696-717 (1994).
- FOYER, C. H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J. F. & SCOTT, I. M.: Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.*, **100**: 241-254 (1997).
- FREEMAN, B. A. & 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).
- GALSTON, A. W.: Polyamines as modulators of plant development. *BioSci.*, **33**: 382-388 (1983).
- GOLDEN, S. S., ISHIURA, M., JOHNSON, C. H. & KONDO, T.: Cyanobacterial circadian rhythms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**: 327-354 (1997).
- GORR, G., OBST, G., DÖRING, O. & BÖTTGER, M.: Light-dependent proton excretion of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots. *Bot. Acta*, **108**: 351-357 (1995).
- GRIFFITH, O. W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, **106**: 207-212 (1980).

- GUY, C. L. & CARTER, J. V.: Effect of low temperature on the glutathione status of plant cells. *In: Plant Cold Hardness and Freezing Stress. eds.: P. H. Li & A. SAKAI, Academic Press, London, Vol. II. pp. 169-179 (1982).*
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B.: Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **246**: 7130-7139 (1974).
- HADDAD, P. R., JACKSON P. E. & HECKENBERG A. L.: Performance characteristic of some commercially available low-capacity anion-exchange columns suitable for non-suppressed ion chromatography. *J. Chromatogr.*, **346**: 139-148 (1985).
- HALL, J. C.: Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.*, **18**: 230-240 (1995).
- HOLLAND, D., BEN-HAYYIM, G., FALTIN, Z., CAMOIN, L. STROSBERG, A. D. & ESHDAT, Y.: Molecular characterization of salt-stress associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidase. *Plant Mol. Biol.*, **21**: 923-927 (1993).
- HOLLAND, D., FALTIN, Z., PERL, A., BEN-HAYYIM, G. & ESHDAT, Y.: A novel plant glutathione peroxidase-like protein provides tolerance to oxygen radicals generated by paraquat in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **337**: 52-55 (1994).
- INZÉ, D. & VAN MONTAGU, M.: Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**: 153-158 (1995).
- IRZYK, G. P. & FUERST, E. P.: Purification and characterization of glutathione *S*-transferase from Benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.*, **102**: 803-810 (1993).
- ISHIKAWA, T., SAKAI, K., YOSHIMURA, K., TAKEDA, T. & SHIGEOKA, S.: cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding region. *FEBS Lett.*, **384**: 289-293 (1996).

- JENSÉN, P., ERDEI, L. & MØLLER, I. M.: K⁺ uptake in plant roots: Experimental approach and influx models. *Physiol. Plant.*, **70**: 743-748 (1987).
- KAYUPOVA, G. A. & KLYSHEV, L. K.: Superoxide dismutase in pea roots as influenced by high NaCl concentrations. *Fiziol. Rast.*, **31**: 555-559 (1984).
- KLAPHECK, S., LATUS, C. & BERGMANN, L.: Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.*, **131**: 123-131 (1987).
- KLAPHECK, S.: Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol. Plant.*, **74**: 727-732 (1988).
- KLAPHECK, S., CHROST, B., STARKE, J. & ZIMMERMANN, H.: γ -Glutamylcysteinylserine - a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot. Acta*, **105**: 174-179 (1992).
- KOSOWER, E. M., PAZHENCHEVSKY, B. & HERSHKOWITZ, E.: 1,5-Diazabicyclo-[3.3.0]-octadienediones (9,10-dioxabimanes). Strongly fluorescent *syn* isomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**: 6516-6518 (1978).
- KOSOWER, N. S., KOSOWER, E. M., NEWTON, G. L. & RANNEY, H. M.: Bimane fluorescent labels: labelling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(7): 3382-3386 (1979).
- KOSOWER, N. S. & KOSOWER, E. M.: Thiol labelling with bromobimanes. *Methods Enzymol.*, **143**: 76-84 (1987).
- KOSOWER, E. M. & KOSOWER, N. S.: Bromobimane probes for thiols. *Methods Enzymol.*, **251**: 133-148 (1995).
- LAKRITZ, J., PLOPPER, C. G. & BUCKPITT, A. R.: Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal. Biochem.*, **247**(1): 63-68 (1997).
- LAMB, C. & DIXON, R. A.: The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**: 251-275 (1997).

- LESHAM, Y. Y. KUIPER P. J. C.: Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? *Biol. Plant.*, **38**: 1-18 (1996).
- LESHAM, Y. Y, KUIPER, P. J. C., ERDEI, L., LURIE, S. & PERL-TREVES, R.: Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Annals of the New York Academy of Sciences*, **851**: 199-208 (1998).
- LEVITT, J.: Physiological ecology: Responses of plants to environmental stresses. *Academic Press*, New York, (1972).
- LICHTENTHALER, H. K.: Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.*, **148**: 4-14 (1996).
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275 (1951).
- LUO, J-L., HAMMARQVIST, F., COTGREAVE, I. A., LIND, C., ANDERSSON, K. & WERNERMAN, J.: Determination of intracellular glutathione in human skeletal muscle by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **670**: 29-36 (1995).
- MAAS, F. M., HOFFMANN, I., VAN HERMELEN, M. J. & DE KOK L. J.: Refractometric determination of sulphate and other anions in plants separated by HPLC. *Plant and Soil.*, **91**: 129-132 (1986).
- MACDUFF, J. H:& DHANOA, M. S.: Diurnal and ultradian rhythms in K⁺ uptake by *Trifolium repens* under natural light patterns: evidence for segmentation at different root temperatures. *Physiol. Plant.*, **98**: 298-308 (1996).
- MANNERVIK, B. & GUTHENBERG, C.: Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.*, **77**: 231-235 (1981).
- MARÓTI, Z., LASZLAVIK, M., ERDEI, L. & SZEGLETES, Zs.: Effects of salinity and osmotic stress on the anion composition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biol. Plant.*, **36**: S363 (1994).
- MARRS, K. A.: The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 127-158 (1996).

- MARTIN, W. M. & GIACOFEI A. R.: Ultratrace anion analysis of high-purity water. A column comparison. *J. Chromatogr.*, **644**: 333-340 (1993).
- MASOJDEK, J., TRIVEDI, S., HALSHAW, L., ALEXIOU, A. & HALL, D. O.: The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. *Plant Physiol.*, **96**: 198-207 (1991).
- MCCUE, F. K. & HANSON, A. D.: Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech.*, **8**: 358-362 (1990).
- MEHLHORN, H., LELANDAS, M., KORTH, H. G. & FOYER, C. H.: Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett.*, **378**: 203-206 (1996).
- MEUWLY, P., THIMBAULT, P & RAUSER, W. E.: γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.*, **336**: 472-476 (1993).
- MIYAKE, C. & ASADA, K.: Ferredoxin dependent photoreduction of monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 539-549 (1994).
- NAGY, Z., TUBA, Z., ZSOLDOS, F. & ERDEI, L.: CO₂-exchange and water relation responses of sorghum and maize during water and salt stress. *J. Plant Physiol.*, **145**: 539-544 (1995).
- NAVARI-IZZO, F. & IZZO, R.: Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a results of SO₂ fumigation. *Plant Sci.*, **96**: 456-459 (1993).
- NAVAS, P., VILLALBA, J. M. & CORDOBA, F.: Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**: 1-13 (1994).
- NEWTON, G. L., DORIAN, R. & FAHEY, R. C.: Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **114**: 383-387 (1981).
- NEWTON, G. L. & FAHEY, R. C.: Determination of biothiols by bromobimane labelling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, **251**: 148-166 (1995).

- NOCTOR, G., STROHM, M., JOUANIN, L., KUNERT, K.-J., FOYER, C. H. & RENNENBERG, H.: Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.*, **112**: 1071-1078 (1996).
- NOCTOR, G., ARISI, A.-C. M., JOUANIN, L., VALADIER, M.-H., ROUX, Y. & FOYER, C. H.: The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implication for glutathione production during stress. *Physiol. Plant.*, **100**: 255-263 (1997).
- NOCTOR, G., ARISI, A.-C. M., JOUANIN, L., VALADIER, M.-H., ROUX, Y. & FOYER, C. H.: Light-dependent modulation of foliar glutathione synthesis and associated amino acid metabolism in poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Planta*, **202**: 357-369 (1997).
- NOCTOR, G. & FOYER, C. H.: Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, **49**: 249-279 (1998).
- NOCTOR, G. & FOYER, C. H.: Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol.*, **118**(2): 471-482 (1998).
- PALLANCA, J. E. & SMIRNOFF N.: Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbose, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol.*, **120**: 453-462 (1999).
- PESTENÁČZ, A. & ERDEI, L.: Calcium-dependent protein kinase in maize and sorghum induced by polyethylene glycol. *Physiol. Plant.*, **97**: 360-364 (1996).
- PICKETT, C. B. & LU, A. Y. H.: Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**: 743-764 (1989).
- RAUSER, W. E., SCHUPP, R. & RENNENBERG, H.: Cysteine, γ -glutamylcysteine, and glutathione levels in maize seedlings. *Plant Physiol.*, **97**: 128-138 (1991).
- REDMOND, J. W. & TSENG, A.: High pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.*, **170**: 479-481 (1979).

- REED, D. J., BABSON, J. R., BEATTY, P. W., BRODIE, A. E., ELLIS, W. W. & POTTER, D. W.: High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.*, **106**: 55-62 (1980).
- REGGIANI, R., AURISANO, N., MATTANA, M. & BERTANI, A.: Influence of K⁺ ions on polyamine level in wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* **141**: 136-140 (1993).
- RHODES, D. & HANSON, A. D.: Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 357-384 (1993).
- RIDNOUR, L. A., WINTERS, R. A., ERCAL, N. & SPITZ, D. R.: Measurement of glutathione, glutathione disulfide, and other thiols in mammalian cell and tissue homogenates using high-performance liquid chromatography separation of *N*-1(1-pyrenyl)maleimide derivatives. *Methods Enzymol.*, **299**: 258-267 (1999).
- RIECHERS, D. E., IRZYK, G. P., JONES, S. S. & FUERST, E. P.: Partial characterization of glutathione *S*-transferase from wheat (*Triticum spp.*) and purification of safener-induced glutathione *S*-transferase from *Triticum tauschii*. *Plant Physiol.*, **114**: 1461-1470 (1997).
- SAITO, K., NICK, J. A. & LOEWUS, F. A.: D-glucose and L-sorbose, putative intermediates of L-ascorbate biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiol.*, **94**: 1496-1500 (1990).
- SANDERMANN, H.: Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics*, **4**: 225-241 (1994).
- SANKHLA, N., UPADHYAYA, A. & DAVIS, T. D.: Polyamines in plant growth and development. In: Hormone regulation of plant growth and development. ed.: P. P. PUROHIT, *Agro-Botanical Publisher*, Bikaner, India, Vol. IV. pp. 171-204 (1988).

- SANTOS, I., ALMEIDA, J. M. & SALEMA, R.: Plants of *Zea mays* L. development under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.*, **141**: 450-456 (1993).
- SCHMIDT, G. & KUNERT, K. J.: Lipid peroxidation in higher plants: the role of glutathione reductase. *Plant Physiol.*, **82**: 700-703 (1986).
- SCHUPP, R. & RENNENBERG, H.: Diurnal changes in the glutathione content of spruces needles (*Picea abies* L.). *Plant Sci.*, **57**: 113-117 (1988).
- SCHUSTER, R.: HPLC Application: HPLC determination of anions in food. *Hewlett Packard Publication* number: 12-5954-6258 (1986).
- SELYE, H.: The stress of life. *McGraw-Hill Book Company, Inc.*, New York, (1956).
- SHENNAN, C., HUNT, R. & MACROBBIE, E. A. C.: Salt tolerance in *Aster tripolium* L. I. The effect of salinity on growth. *Plant, Cell and Environment*, **10**: 59-65 (1987).
- SHENNAN, C., HUNT, R. & MACROBBIE, E. A. C.: Salt tolerance in *Aster tripolium* L. II. Ionic regulation. *Plant, Cell and Environment*, **10**: 67-74 (1987).
- SHENNAN, C.: Salt tolerance in *Aster tripolium* L. III. Na and K fluxes in intact seedlings. *Plant, Cell and Environment*, **10**: 75-81 (1987).
- SIES, H.: Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*. ed.: H. SIES, *Academic Press Inc. (London) Ltd.*, London, pp. 1-8 (1985) ISBN 0-12-642760-7.
- SILLER-CEPEDA, J. H., CHEN, T. H. H. & FUCHIGAMI, L. H.: High performance liquid chromatography analysis of reduced and oxidized glutathione in woody plant tissues. *Plant Cell Physiol.*, **32**(8): 1179-1185 (1991).
- SLOCUM, R., KAUR-SAWHNEY, R. & GALSTON, A. W.: The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**: 283-303 (1984).
- SMIRNOFF, N.: The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.*, **78**: 661-699 (1996).

- SMIRNOFF, N.: Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**: 214-219 (1998).
- SMITH, F. C. & CHANG, R. C.: The practice of ion chromatography. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, pp. 109-179 (1983) ISBN 0-471-05517-4.
- SMITH, I. K.: Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.*, **79**: 1044-1047 (1985).
- SMITH, I. K., VIERHELLER, T. L. & THORNE, C. A.: Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.*, **175**: 408-413 (1988).
- SMITH, I. K., POLLE, A. & RENNENBERG, H.: Glutathione. *In*: Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism. *eds.*: R. G. ALSCHER & J. R. CUMMINGS, *Wiley-Liss Inc.*, New York, pp. 201-215 (1990).
- SMITH, M. W. & DOOLITTLE, R. F.: A comparison of evolutionary rates of two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.*, **34**: 175-184 (1992).
- SMITH, T. A.: Putrescine and inorganic ions. *Recent Adv. Phytochem.*, **18**: 7-54 (1984).
- STIENSTRA, A. W.: Does nitrate play a role in osmoregulation? *In*: Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants. *eds.*: H. LAMBERS, J. J. NEETESON & I. STULEN, *Martinus Nijhoff Publishers*, Dordrecht, pp. 481-485 (1986) ISBN 90-247-3258-1.
- SZABÓ-NAGY, A., GALIBA, G. & ERDEI, L.: Induction of soluble phosphatases under ionic and non-ionic osmotic stresses in wheat. *J. Plant Physiol.*, **140**: 629-633 (1992).
- SZEGLETES, ZS., BARABÁS, K., ERDEI, L. & LASZLAVIK, M.: Determination of glutathione reductase activity and levels of reduced and oxidized forms of glutathione by HPLC in wheat. *Biol. Plant.*, **36**: S370 (1994).
- SZEGLETES, ZS., ERDEI, L. & CSEUZ, L.: Connection between drought tolerance and the accumulation of polyamines and proline in wheat. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 280. (1996).

- SZEGLETES, ZS., ERDEI, L. & CSEUZ, L.: Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, **00**: 000-000 (2000).
- TABOR, C. W. & TABOR, H.: Polyamines. *Ann. Rev. Biochem*, **53**: 749-790 (1984).
- TIETZE, F.: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **27**: 502-522 (1969).
- TROLINDER, N. L. & SHANG, X.: *In vitro* selection and regeneration of cotton resistant to high temperature stress. *Plant Cell Reports*, **10**: 448-452 (1991).
- TURNER, N. C.: Stomatal behaviour and water status of maize, sorghum, and tobacco under field conditions. II. At low soil water potential. *Plant. Physiol.*, **53**: 360-365 (1974).
- TURNER, N. C.: Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**: 175-190 (1986).
- VANDEBERG, P. J. & JOHNSON, D. C.: Comparison of pulsed amperometric detection and integrated voltametric detection for organic sulfur compounds in liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **290**: 317-327 (1994).
- VIÑA, J., SASTRE, J., ASENSI, M. & PARKER, L.: Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. *Methods Enzymol.*, **251**: 237-243 (1995).
- WASHKO, P.W., WELCH, R. W., DHARIWAL, K. R., WANG, Y. & LEVINE, M.: Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. *Anal. Biochem.*, **204**: 1-14 (1992).
- WHEELER, G. L., JONES, M. A. & SMIRNOFF, N.: The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, **393**: 365-369 (1998).
- WINTERS, R. A., ZUKOWSKI, J., ERCAL, N., MATTHEWS, R. H. & SPITZ, R. D.: Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by *N*-(1-pyrenyl)maleimide. *Anal. Biochem.*, **227**: 14-21 (1995).

- WOJTASZEK, P.: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, **322**: 681-692 (1997).
- ZHOU, X., MINOCHA, R. & MINOCHA S. C.: Physiological responses of suspension cultures of *Catharanthus roseus* to aluminium: changes in polyamines and inorganic ions. *J. Plant Physiol.*, **145**: 277-284 (1995).
- ZSOLDOS, F., VASHEGYI, Á. & ERDEI, L.: Lack of active K⁺ uptake in aeroponically grown wheat seedlings. *Physiol. Plant.*, **71**: 359-364 (1987).
- ZSOLDOS, F., HAUNOLD E., VASHEGYI Á. & HERGER P.: Effects of sodium chloride stress and calcium supply on growth, potassium uptake, and internal chloride and sodium levels of winter wheat seedlings. *Acta Biol. Hung.*, **41**(4): 399-408 (1990).

8. PUBLIKÁCIÓK

8.1. A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk

1. Erdei, L., Pestenácz, A., Barabás, K. & Szegletes, Zs.: Adaptive responses of plants under stress conditions. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, **30**: 27-37 (1995). (imp.f₁₉₉₅: 0.050)
2. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. & Pestenácz, A.: Responses in polyamines titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, **147**(5): 599-603 (1996). (imp.f₁₉₉₆: 1.142)
3. Barabás, K. N., Szegletes, Zs., Pestenácz, A., Fülöp, K. & Erdei, L.: Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, **153**: 146-153 (1998). (imp.f₁₉₉₈: 1.195)
4. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. N., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth B. & Dér, A.: Environmental stress and the biological clock in plants: an integrated approach. *J. Plant Physiol.*, **152**: 265-271 (1998). (imp.f₁₉₉₈: 1.195)
5. Szegletes, Zs., Erdei, L. & Cseuz, L.: Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, **00**: 000-000 (2000). (imp.f₁₉₉₈: 0.173) (*elfogadva*)
6. Szegletes, Zs., Fülöp, K., Oroszi, L., Dér, A. & Erdei, L.: Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. (2000). (*előkészületben*)

8.2. A dolgozat témájához kapcsolódó előadások, poszterek

1. Erdei, L., Laszlavik, M., Pestenácz, A., Szabó Nagy, A., Szegletes, Zs., Fodor, E. & Barabás, K. (1994) Stressz és adaptáció növényekben [Stress and adaptation in plants, language: Hungarian]. *SZBK Napok*, Szeged, Hungary. (*előadás*)
2. Laszlavik, M., Erdei, L., Szegletes, Zs. & Maróti, Z. (1994) Effects of salinity, osmotic and UV-B stresses on the anion composition in wheat and sunflower. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (*poszter*)

3. Laszlavik, M., Maróti, Z. **Szegletes, Zs.** & Erdei, L. (1994) Cation and anion composition of *Aster tripolium* L. grown under low and high salt condition. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
4. Laszlavik, M., **Szegletes, Zs.** & Erdei, L. (1994) Determination of polyamines levels under salt, osmotic and UV-B stresses in plants by HPLC. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
5. Maróti, Z., Laszlavik, M., Erdei, L. & **Szegletes, Zs.** (1994) Effects of salinity and osmotic stress on the anion composition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 9th FESPP Congress, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S363. (poszter)
6. **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Erdei, L. & Laszlavik, M. (1994) Determination of glutathione reductase activity and levels of reduced and oxidized forms of glutathione by HPLC in wheat. 9th FESPP Congress, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S370. (poszter)
7. **Szegletes, Zs.** & Erdei, L. (1994) Determination of the changes of the reduced and oxidised glutathione levels by HPLC in *Aster tripolium* L. under UV-B stress. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
8. Barabás, K., **Szegletes, Zs.**, Pál, E. & Erdei, L. (1995) Defence strategies against oxidative stress in plants. XXV. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
9. **Szegletes, Zs.**, Laszlavik, M., Maróti, Z., Ördög, M. & Erdei, L. (1995) A kis sókoncentrációjú tápoldatokban nevelt halofita *Aster tripolium* ionháztartása [Ion composition in the halophytic *Aster tripolium* grown in low salt concentration medium, language: Hungarian]. XXV. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
10. Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K. & Erdei, L. (1996) UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). 10th FESPP Congress, From

- Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue: 231**. (előadás)
11. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Pestenácz, A., Kovács, A. & Tóth, B. (1996) Effects in environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue: 267**. (poszter)
 12. **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Pestenácz, A., Fülöp K., Kovács, A., Tóth, B., Kalmár, L. & Erdei, L. (1996) Szárazság-, só- és UV-B stressz oxidatív komponensei növényekben. [Oxidative components of drought, salt and UV-B stresses in plants; language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)
 13. **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Cseuz, L. (1996) Connection between drought tolerance and the accumulation of polyamines and proline in wheat. *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue: 280**. (poszter)
 14. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A. & Tóth, B. (1997) Environmental stresses and the circadian rhythm in plants. *"Stress of Life" Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
 15. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B. & Dér, A. (1997) A környezeti stressz és a cirkadián ritmus lehetséges kapcsolata növényekben [The effect of the environmental stresses on the circadian rhythm of plants, language: Hungarian]. *VI. Magyar Növényélettani Kongresszus*, Budapest, Hungary. (előadás)
 16. Fülöp, K., Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Effect of salinity on the antioxidant system in wheat. *"Stress of Life" Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
 17. **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K., Barabás, K. N., Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Diurnal changes of the glutathione levels under salt stress conditions in wheat. *"Stress of Life" Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (poszter)

-
18. Cseuz, L., Kertész, Z., Matuz, J., Mózsik, L., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. (1998) Wheat breeding system with special attention to abiotic stresses. *9th International Wheat Genetics Symposium*, Saskatoon, Canada. *In: Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium (ed.: Slinkard, A. E.), vol. 4, pp. 13-15 (poszter)*
 19. **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K., Barabás, K. N., & Erdei, L. (1998) Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. *4th International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease*, Antwerp, Belgium. *(poszter)*
 20. Erdei, L., Csiszár, J., Fediuc, E., **Szegletes, Zs.** & Tari, I. (1999) A glutation rendszer központi szerepe a növények abiotikus és biotikus stressz válaszában. [The glutathione system on the cross-road in the signalling network in plants, language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. *(előadás)*

8.3. Publikációs lista

8.3.1. Referált folyóiratokban megjelent publikációk

1. Tóth-Soma, L., Gulyás, S. & Szegletes, Zs.: Functional connection between intracellular and extracellular secretion in species of *Euphorbia* genus. *Acta Biol. Hung.*, **44(4)**: 433-443 (1993). (imp.f₁₉₉₃: 0.203)
2. Notheisz, F., Zsigmond, Á., Bartók, M., Szegletes, Zs. & Smith, G. V.: Mass transfer test and maximum rate determination during liquid phase hydrogenation. *Applied Catal. A*, **120**: 105-114 (1994). (imp.f₁₉₉₄: 1.421)
3. Török, B., Szegletes, Zs. & Molnár, Á.: Separation and identification of stereoisomeric cyclobutanediols by gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **668**: 463-467 (1994). (imp.f₁₉₉₄: 2.523)
4. Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Zs., Halasy, K. & Nemcsók, J.: Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous methidathion and pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, **33**: 279-295 (1995). (imp.f₁₉₉₅: 1.748)
5. Erdei, L., Pestenács, A., Barabás, K. & Szegletes, Zs.: Adaptive responses of plants under stress conditions. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, **30**: 27-37 (1995). (imp.f₁₉₉₅: 0.050)
6. Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Zs. & Nemcsók, J.: Changes caused by methidathion in activity and distribution of molecular forms of carp (*Cyprinus carpio* L.) AChE. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **52**: 71-79 (1995). (imp.f₁₉₉₅: 1.601)
7. Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Zs. & Nemcsók, J.: *In vivo* effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **31(3)**: 258-263 (1995). (imp.f₁₉₉₅: 0.939)
8. Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, K. & Pestenács, A.: Responses in polyamines titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, **147(5)**: 599-603 (1996). (imp.f₁₉₉₆: 1.142)

9. Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Pestenácz, A., Fülöp, K. & Erdei, L.: Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, **153**: 146-153 (1998). (imp.f₁₉₉₈: 1.195)
10. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Pestenácz, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth B. & Dér, A.: Environmental stress and the biological clock in plants: an integrated approach. *J. Plant Physiol.*, **152**: 265-271 (1998). (imp.f₁₉₉₈: 1.195)
11. Dusha, I., Oláh, B., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Kondorosi, A.: *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **12(9)**: 755-765 (1999). (imp.f₁₉₉₈: 3.450)
12. Zsoldos, F., Vashegyi, Á., Bóna, L., Pécsváradi, A. & **Szegletes, Zs.**: Aluminium and nitrite induced alteration in potassium transport of wheat. *Cereal Research Communications*, **27(1-2)**: 147-153 (1999). (imp.f₁₉₉₈: 0.173)
13. Varanka, Zs., Szegletes, T., **Szegletes, Zs.**, Nemcsók, J. & Ábrahám, M.: Relationship between the structure of some humic compounds and their inhibitory effects on carp catalase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **63(6)**: 751-758 (1999). (imp.f₁₉₉₈: 0.653)
14. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F., Tari, I., Pécsváradi, A. & Dulai, S.: Changes in the balance of C/N metabolism and stomatal regulation in clonal fragments of the common reed, *Phragmites australis*, in the Lake Balaton. *Aquatic Botany*, **00**: 000-000 (2000). (imp.f₁₉₉₈: 0.825) (*elfogadva*)
15. **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Cseuz, L.: Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, **00**: 000-000 (2000). (imp.f₁₉₉₈: 0.173) (*elfogadva*)
16. **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K., Oroszi, L. & Erdei, L.: Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. (2000). (*előkészületben*)

8.3.2. Egyéb folyóiratokban és kiadványokban megjelent publikációk

1. Bálint, T., Szegletes, T., **Szegletes, Zs.**, Halasy, K. & Nemcsók, J.: Effects of Decis 2,5 EC treatment on biochemical parameters of carp. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, **5**: 155-169 (1994).
2. Maróti, Z., Laszlavik, M., Erdei, L. & **Szegletes, Zs.**: Effects of salinity and osmotic stress on the anion composition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biol. Plant.*, **36**: S363 (1994).
3. Szegletes, T., Bálint, T., **Szegletes, Zs.**, Halasy, K. & Nemcsók, J.: Effects of the insecticide Ultracid WP 40 on AChE of different tissues of carp. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, **5**: 141-154 (1994).
4. Szegletes, T., Bálint, T., **Szegletes, Zs.**, Halasy, K. & Nemcsók, J.: Két inszekticid pontyra (*Cyprinus carpio* L.) gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata [Comparative examination of the effects of two insecticides on carp (*Cyprinus carpio* L.), language: Hungarian]. *Halászatfejlesztés*, **17**: 42-55 (1994). HU ISSN 0324-3826
5. **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Erdei, L. & Laszlavik, M.: Determination of glutathione reductase activity and levels of reduced and oxidized forms of glutathione by HPLC in wheat. *Biol. Plant.*, **36**: S370 (1994).
6. Tóth-Soma, L. T., Datta, N. M. & **Szegletes, Zs.**: General connection between latex and nectar secretional system of *Asclepias syriaca* L. *Acta Bio. Szeged.*, **41**: 37-44 (1995/1996).
7. Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K. & Erdei, L.: UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 231 (1996).
8. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Pestenács, A., Kovács, A. & Tóth, B.: Effects in environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 267 (1996).

-
9. **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Cseuz, L.: Connection between drought tolerance and the accumulation of polyamines and proline in wheat. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 280 (1996).
 10. Tóth-Soma, L. T., **Szegletes, Zs.** & Datta, N. M.: Anatomical and functional connection between intracellular and extracellular secretion of common milkweed. *Journal of Botanical Society of India*. (1996). (nyomtatás alatt)
 11. Dusha, I., Oláh, B., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Kondorosi, Á.: *syrM* is involved in the determination of the amount and the ratio of the two forms of exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. In: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. (eds.: Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W. E.) Kluwer Acad. Publ. p. 271 (1997).
 12. Cseuz, L., Kertész, Z., Matuz, J., Mózsik, L., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L.: Wheat breeding system with special attention to abiotic stresses. In: Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium (ed.: Slinkard, A. E.), vol. 4, pp. 13-15 (1998).
 13. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F. & Pécsváradi, A.: Changes in ion accumulation, stomatal movements and nitrogen metabolism in clonal fragments of the common reed, *Phragmites australis* Cav. Trin ex Steudel in the Lake Balaton. *Bulgarian J. Plant Physiol. Special Issue*: 233 (1998).
 14. Várkonyi, Zs., Zsiros, O., Farkas, T., Garab, G., Ughy, B., **Szegletes, Zs.** & Gombos, Z.: Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 to different environmental effects. In: Photosynthesis: Mechanisms and Effects (ed.: Garab, G.), vol. 3, pp. 1819-1822, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, ISBN 0-7923-5544-X (1998).
 15. Zsoldos, F., Vashegyi, Á, Bóna, L., Pécsváradi, A. **Szegletes, Zs.**: Alumínium- és nitritstressz hatása közönséges őszi búza és durum búza csíranövénykori növekedésére és káliumtranszportjára [Effect of aluminium and nitrite stress on growth and potassium transport of common winter wheat and durum wheat seedlings, language: Hungarian]. *Növénytermelés* **47(5)**: 491-502 (1998).

8.3.3. Előadások, posztterek

1. Tóth-Soma, L. & Szegletes, Zs. (1992) A nektár és tejnedvszekréció kapcsolata az *Asclepias syriaca* L.-ben [Connection between intracellular and extracellular secretion in *Asclepias syriaca* L., language: Hungarian]. *Magyar Biológiai Társaság 1270. szakülése*, Budapest, Hungary. (előadás)
2. Török, B., Szegletes, Zs. & Molnár, Á. (1993) Separation and identification of stereoisomeric cyclobutanediols and derivatives by GC-MS. *9th Danube Symposium on Chromatography*, Budapest, Hungary. (poszter)
3. Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Zs., Halasy, K. & Nemcsók, J. (1994) Effects of Decis 2,5 EC treatment on biochemical parameters of carp *3rd Meeting of Central and Eastern European Regional Section, International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX)*, Balatonaliga, Hungary. (poszter)
4. Erdei, L., Laszlavik, M., Pestenács, A., Szabó Nagy, A., Szegletes, Zs., Fodor, E. & Barabás, K. (1994) Stressz és adaptáció növényekben [Stress and adaptation in plants, language: Hungarian]. *SZBK Napok*, Szeged, Hungary. (előadás)
5. Laszlavik, M., Erdei, L., Szegletes, Zs. & Maróti, Z. (1994) Effects of salinity, osmotic and UV-B stresses on the anion composition in wheat and sunflower. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
6. Laszlavik, M., Maróti, Z., Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Cation and anion composition of *Aster tripolium* L. grown under low and high salt condition. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
7. Laszlavik, M., Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Determination of polyamines levels under salt, osmotic and UV-B stresses in plants by HPLC. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
8. Maróti, Z., Laszlavik, M., Erdei, L. & Szegletes, Zs. (1994) Effects of salinity and osmotic stress on the anion composition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *9th FESPP Congress*, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S363. (poszter)

-
9. Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Zs., Halasy, K. & Nemcsók, J. (1994) Comparative biochemical evaluation of two insecticides on fish. *International Symposium on Human Health and Environment: Mechanisms of Toxicity and Biomarkers to Assess Adverse Effects of Chemicals*, Salsomaggiore Terme, Italy. (poszter)
 10. Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Zs., Halasy, K. & Nemcsók, J. (1994) Effects of the insecticide Ultracid WP 40 on AChE of different tissues of carp. *3rd Meeting of Central and Eastern European Regional Section, International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX)*, Balatonaliga, Hungary. (előadás)
 11. Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Zs., Halasy, K. & Nemcsók, J. (1994) Két inszekticid pontyra (*Cyprinus carpio* L.) gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata [Comparative analysis of the effect of two insecticides on carp (*Cyprinus carpio* L.), language: Hungarian]. *XVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás*, Szarvas. (előadás)
 12. Szegletes, Zs., Barabás, K., Erdei, L. & Laszlavik, M. (1994) Determination of glutathione reductase activity and levels of reduced and oxidized forms of glutathione by HPLC in wheat. *9th FESPP Congress*, Brno, Czech Republic. *Biol. Plant.*, **36**: S370. (poszter)
 13. Szegletes, Zs. & Erdei, L. (1994) Determination of the changes of the reduced and oxidised glutathione levels by HPLC in *Aster tripolium* L. under UV-B stress. *Biostress '94, Workshop on Plant Responses to Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (poszter)
 14. Barabás, K., Szegletes, Zs., Pál, E. & Erdei, L. (1995) Defence strategies against oxidative stress in plants. *XXV. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
 15. Szegletes, Zs., Laszlavik, M., Maróti, Z., Ördög, M. & Erdei, L. (1995) A kis sókoncentrációjú tápoldatokban nevelt halofita *Aster tripolium* ionháztartása [Ion composition in the halophytic *Aster tripolium* grown in low salt concentration

- medium, language: Hungarian]. *XXV. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
16. **Szegletes, Zs.**, Lauwereys, B. & Erdei, L. (1995) Kadmium mérése kis mennyiségű növényi mintákban [Measurement of cadmium from small amount of plant tissues; language: Hungarian]. *XXV. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
17. Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K. & Erdei, L. (1996) UV-B effect on antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 231. (előadás)
18. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Pestenácz, A., Kovács, A. & Tóth, B. (1996) Effects in environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 267. (poszter)
19. **Szegletes, Zs.**, Barabás, K., Pestenácz, A., Fülöp K., Kovács, A., Tóth, B., Kalmár, L. & Erdei, L. (1996) Szárazság-, só- és UV-B stressz oxidatív komponensei növényekben. [Oxidative components of drought, salt and UV-B stresses in plants; language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)
20. **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Cseuz, L. (1996) Connection between drought tolerance and the accumulation of polyamines and proline in wheat. *10th FESPP Congress, From Molecular Mechanisms to the Plant: an Integrated Approach*, Florence, Italy. *Plant Physiol. Biochem.*, **Special Issue**: 280. (poszter)
21. Dusha, I., Oláh, B., **Szegletes, Zs.** (1997) Egy bakteriális regulátor gén szerepe a növénybaktérium jelcserében [For the invasion of the root nodule cells of alfalfa by the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Rhizobium meliloti*, the acidic exopolysaccharide EPSI synthesized by the bacterium is required. Nitrogen starvation of *Rhizobium meliloti* 1021 results in a considerable increase of EPSI production, language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)

-
22. Dusha, I., Oláh, B., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. & Kondorosi, Á. (1997) *syrM* is involved in the determination of the amount and the ratio of the two forms of exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *11th International Congress on Nitrogen Fixation*, Paris, France. In: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century.* (eds.: Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W. E.) Kluwer Acad. Publ. p. 271 (poszter)
 23. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Pestenács, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A. & Tóth, B. (1997) Environmental stresses and the circadian rhythm in plants. "*Stress of Life*" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
 24. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Pestenács, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B. & Dér, A. (1997) A környezeti stressz és a cirkadián ritmus lehetséges kapcsolata növényekben [The effect of the environmental stresses on the circadian rhythm of plants, language: Hungarian]. *VI. Magyar Növényélettani Kongresszus*, Budapest, Hungary. (előadás)
 25. Fülöp, K., Barabás, K. N., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Effect of salinity on the antioxidant system in wheat. "*Stress of Life*" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (előadás)
 26. Gubai, Z., Szöllősiné Varga, I. & **Szegletes, Zs.** (1997) Vizsgálatok a környezet szempontjából túlterhelt és terhelés mentes növényi mintákon [Analysis of polluted and unpolluted plants in environmental aspect, language: Hungarian] *The 2nd Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Szeged, Hungary. (poszter)
 27. **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K., Barabás, K. N., Horváth, F. & Erdei, L. (1997) Diurnal changes of the glutathione levels under salt stress conditions in wheat. "*Stress of Life*" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (poszter)
 28. Varanka, Zs., Szegletes, T., **Szegletes, Zs.**, Kotormán, M., Nemcsók, J. & Ábrahám, M. (1997) A comparative study of the inhibitory properties of humic derivatives on fish catalase. *5th Free Radical Research Conference*, Gödöllő, Hungary. (előadás)

-
29. Varanka, Zs., Szegletes, T., **Szegletes, Zs.**, Kotormán, M., Nemcsók, J. & Ábrahám, M. (1997) The *in vivo* effects of humic compounds on fish catalase. "*Stress of Life*" *Stress and Adaptation from Molecules to Man*, Budapest, Hungary. (poszter)
 30. Cseuz, L., Kertész, Z., Matuz, J., Mózsik, L., **Szegletes, Zs.**, Erdei, L. (1998) Wheat breeding system with special attention to abiotic stresses. *9th International Wheat Genetics Symposium*, Saskatoon, Canada. In: *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium* (ed.: Slinkard, A. E.), vol. 4, pp. 13-15 (poszter)
 31. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F. & Pécsváradi, A. (1998) Changes in ion accumulation, stomatal movements and nitrogen metabolism in clonal fragments of the common reed, *Phragmites australis* Cav. Trin ex Steudel in the Lake Balaton. *11th FESPP Congress*, Varna, Bulgaria. *Bulgarian J. Plant Physiol., Special Issue*: 233.
 32. **Szegletes, Zs.**, Fülöp, K., Barabás, K. N., & Erdei, L. (1998) Effect of salt stress on the diurnal changes of the glutathione system in wheat. *4th International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease*, Antwerp, Belgium. (poszter)
 33. Várkonyi, Zs., Zsiros, O., Ughy B., **Szegletes Zs.** & Gombos, Z. (1998) Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 to different environmental effects. *XIth International Congress on Photosynthesis*, Budapest, Hungary. (poszter)
 34. Csiszár, J., **Szegletes, Zs.**, Barabás, K. N., Horváth, V. G., Oberschall, A., Dudits, D. & Erdei, L. (1999) A glutation antioxidáns rendszer változásai ozmotikus stressz hatására aldózreduktázt túltermelő transzgenikus dohány növényekben [Changes of the glutathione antioxidative scavenger system in tobacco plants overexpressing aldose reductase under osmotic stress, language: Hungarian] *XXIX. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (előadás)
 35. Erdei, L., **Szegletes, Zs.**, Horváth, F., Pécsváradi, A., Tari, I. & Dulai, S. (1999) Changes in the balance of C/N metabolism and stomatal regulation in clonal fragments of the common reed, *Phragmites australis*, in the Lake Balaton.

International Conference on Phragmites-dominated wetlands, their function and sustainable use, Trebon, Czech Republic. (előadás)

36. Erdei, L., Szegletes, Zs., Horváth, F., Pécsváradi, A. & Dulai, S. (1999) A C/N metabolizmus és a sztómareguláció változásai a Balaton körüli nád klonáris fragmentumaiban [Changes in stomatal regulation and the balance of C/N metabolism in clonal fragments of the common reed in the Lake Balaton, language: Hungarian] *Szegedi Akadémiai Bizottság, Szegedi Balatoni Kutatások*, Szeged, Hungary. (előadás)
37. Erdei, L., Szegletes, Zs., Horváth, F., Pécsváradi, A., Tari, I. & Dulai, S. (1999) A sztómazárósejtek működési zavarai és a C/N metabolizmus és arányváltozásai a Balaton körüli nád klonáris fragmentumaiban [Changes in the balance of C/N metabolism and stomatal regulation in clonal fragments of the common reed in the Lake Balaton, language: Hungarian] *XXIX. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (előadás)
38. Erdei, L., Szegletes, Zs., Csiszár, J., Barabás, N. K., Lips, H., Sagi, M., Horváth, V. G., Oberschall, A. & Dudits, D. (1999) Physiological background of osmotic stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing aldose/aldehyde reductase. *Hungarian-Israeli Conference on Plants and Environmental Stress*, Szeged, Hungary. (előadás)
39. Erdei, L., Csiszár, J., Fediuc, E., Szegletes, Zs. & Tari, I. (1999) A glutation rendszer központi szerepe a növények abiotikus és biotikus stressz válaszában. [The glutathione system on the cross-road in the signalling network in plants, language: Hungarian] *Straub-napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. (előadás)
40. Fediuc, E., Vámosi, V., Szegletes, Zs., Nagy, E., Mihalik, E. & Erdei, L. (1999) Kadmium felvétele és akkumulációja növényekben [Uptake and accumulation of cadmium in plants, language: Hungarian] *XXIX. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary. (poszter)
41. Szegletes, Zs., Csiszár, J., Barabás, K. N., Sagi, M., Horváth, V. G., Oberschall, A., Dudits, D. & Erdei, L. (1999) Aldózreduktázt túltermelő dohány ozmotikus stresszválaszának fiziológiai vizsgálata. [Physiological study of tobacco plants

-
- overexpressing aldose reductase under osmotic stress, language: Hungarian] *Straub-
napok (SZBK Napok)*, Szeged, Hungary. *(előadás)*
42. Varanka, Zs., Rojik, I., Szegletes, Zs., Kotormán, M., Nemcsók, J. & Ábrahám, M.
(1999) Biochemical and morphological alterations in carp (*Cyprinus carpio* L.)
exposed to ellagic acid and copper sulfate alone or in combination. *Society for Free
Radical Research Summer Meeting*, Dresden, Germany. *(poszter)*