

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Hosszútávú szalicilsav előkezelés hatása paradicsom növények
sóstressz akklimatizációjára

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szepesi Ágnes

Témavezető:

Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma
egyetemi docens

Készült a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Növénybiológiai Tanszékén

Szeged

2009.

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1 Stresszfolyamatok és a sóstressz	11
2.2. A sóstressz : a Na ⁺ akkumuláció és tolerancia mechanizmusai növényekben	12
2.3. Az abszcizinsav, mint általános stresszhormon	18
2.3.1. Az abszcizinsav bioszintézis szabályozása abiotikus stresszorok által	18
2.3.2. A xantofill ciklus valamint az ABS bioszintézis és jelátvitel kapcsolata	21
2.4. A prolin, mint kompatibilis ozmotikum hatásai.....	23
2.5. Szalicilsav fiziológiai hatásai növényekben.....	24
2.6. Az oxidatív stressz.....	26
2.6.1. A Halliwell-Asada-Foyer ciklus.....	30
2.6.2. Nem enzimatis antioxiidánsok: az aszkorbinsav	31
2.6.3. Az aszkorbát és a H ₂ O ₂ kapcsolata.....	32
2.6.4. Aszkorbát-deficiens mutánsok	32
2.6.5. Az aszkorbát és a glutation kapcsolata.....	33
2.6.6. A glutation (GSH).....	34
3. CÉLKITŰZÉSEK	36
4. ANYAGOK, MÓDSZEREK ÉS A KÍSÉRLETI RENDSZER ISMERTETÉSE.....	38
4.1. Növények nevelési paraméterei.....	38
4.2. Alkalmazott kezelések.....	38
4.3. Alkalmazott módszerek	39
4.3.1. Vízháztartási paraméterek vizsgálata	39
4.3.2. K ⁺ (⁸⁶ Rb ⁺) felvétel mérése	39
4.3.3. Az elemtartalmak meghatározása atomabszorpciós spektroszkópiával	39
4.3.4. A fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása	39
4.3.5. Klorofill és karotinoid tartalmak meghatározása.....	40
4.3.6. Az abszcizinsav tartalom mérése kompetitív ELISA-val	40
4.3.7. Az abszcizin-aldehid oxidáz (AO) (EC 1.2.3.1) aktivitás mérése aktivitás gélben.....	41
4.3.8. Az összes cukortartalom, a szacharóz, a glükóz és a fruktóz meghatározása.....	41
4.3.9. A szorbitol tartalom meghatározása	42
4.3.10. Az aldóz redukáz (ALR) (EC 1.1.1.21.) enzim aktivitásának meghatározása nyers növényi kivonatból ..	42
4.3.11. Poliaminok analízise HPLC-vel	42

4.3.12. Prolin tartalom meghatározása	43
A szabad prolin tartalmat Bates (1973) szerint határoztuk meg. Kb. 1 g friss növényi anyagot homogenizáltunk 3 %-os vizes szulfoszalicilsavban. A szűrt homogenátumot (2 ml) reagáltattuk 2 ml savas ninhidrinnel és ecetsavval 100°C-on 1 óráig, és a reakciót leállítottuk jeges vízfürdőben. A reakcióelegyet 4 ml toluollal extraháltuk és erősen vortexeltük 10-15 s-ig. A toluol tartalmú kromofórt a vizes fázisból kivontuk és melegítettük szobahőre. Az abszorbanciát felvettük 520 nm-en, toluolt használva vakként. A prolin koncentrációt ($\mu\text{mol g}^{-1}$ friss tömeg) standard görbe alapján határoztuk meg.	
4.3.13. Malondialdehid (MDA) tartalom mérése	43
4.3.14. Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása	43
4.3.14.1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1).....	43
4.3.14.2. Kataláz (KAT)(EC 1.11.1.6)	44
4.3.14.3. Guajakol peroxidáz (POD) (EC 1.11.1.7)	44
4.3.14.4. Glutathion reduktáz (GR) (EC 1.6.4.2)	44
4.3.14.5. APX-aszkorbát peroxidáz (EC 1.11.1.11)	45
4.3.15. Nem enzimatis antioxidánsok vizsgálata fotometriás módszerrel	45
4.3.15.1. Az összes aszkorbát és a redukált aszkorbát tartalom meghatározása	45
4.3.15.2. Összes glutathion és oxidált glutathion tartalom meghatározása	46
4.3.16. Protoplasztok készítése paradicsom növények leveléből, majd a protoplasztok kezelése.....	47
4.3.17. Protoplaszt életképesség vizsgálata sejt vitalitást jelző festékkel (FDA-fluorescein diacetát)	48
4.3.18. A H_2O_2 felszabadulás detektálása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztokban	49
4.3.19. Protoplaszt NO (nitrogén-monoxid) tartalom meghatározása DAF-2DA (diamino fluorescein diacetát) festékkel	49
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	51
5.1. A szalicilsav, mint allelopatikus anyag.....	51
A szalicilsav hatása paradicsom növények vízháztartására.....	
5.2. A sóstressz akklimatizáció folyamatai a szalicilsavval előkezelt növényekben.....	55
5.2.1. Ozmotikus adaptáció: inorganikus ozmotikumok akkumulációja	
5.2.2. Stresszrezisztencia markerek változása: fotoszintetikus pigmenttartalmak, fluoreszcencia indukciós paraméterek, lipidperoxidáció a SA-előkezelt paradicsomban a sóstressz alatt.....	
5.2.3. Organikus ozmotikumok: szénhidrátok akkumulációja	
5.2.4. Az abszcizinsav tartalom változása az előkezelések hatására és a sóstressz alatt	
5.2.6. Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigéngyökök eltávolítása.....	
5.2.6.1. Enzimatis antioxidáns védekezési rendszer.....	
5.2.6.2. Nem enzimatis antioxidáns védekezési rendszerek	
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	98
7. SUMMARY	102
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	106
9. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	107
10. MELLÉKLETEK.....	127
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	131

12. DÍJAK, ELISMERÉSEK: 133

Rövidítések jegyzéke

AAO	abszcizinaldehid oxidáz
ABS	abszcizinsav
ALR	aldóz reduktáz
BHT	butilált hidroxitoluol
KAT	kataláz
DHA	dehidroaszorbát
DHAR	dehidroaszorbát reduktáz
DPI	difenilén jodónium
DTNB	5,5'-ditio-bisz(2-nitro-benzoésav)
DTT	ditiothreitol
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
GSSG	glutation-diszulfid, oxidált forma
GST	glutation S-transzferáz (EC 2.5.1.18)
MCSU	Mo-kofaktor szulfuriláz
MDA	monodehidroaszorbát
MDHAR	monodehidroaszorbát reduktáz
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium-bromid
NBT	tetrazólium kék (nitroblue tetrazolium)
NCED	9- <i>cisz</i> -epoxikarotinoid dioxigenáz
NHE	Na^+/H^+ antiporter a vakuólum membránon
NPQ	a klorofill <i>a</i> fluoreszcencia nem fotokémiai kioltási paramétere
NSC	nem szelektív kation csatorna
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
POD	guajakol peroxidáz
PSII	2. fotokémiai rendszer
PVPP	polivinil-polipirrolidon
qP	fotokémiai fluoreszcencia kioltás

ROS	„reactive oxygen species”, reaktív oxigénformák
SA	szalicilsav
SIPK	szalicilsav-aktivált protein kináz
SOD	szuperoxid dizmutáz
SOS1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter a plazmamembránon
SOS2	Ser/Thre protein kináz
SOS3	kalmulinszerű Ca ²⁺ -kötő fehérje
ZEP	zeaxantin epoxidáz

1. Bevezetés

A magas sókoncentrációtól származó sóstressz a jelenleg művelés alatt álló területek egyharmadát érinti, így rendkívül fontos a sótolerancia mechanizmusának megismerése, stressztoleráns fajok szelektálása, vagy biotechnológiai módszerekkel való előállítás. A sótolerancia javítására a paradicsom esetében is rendelkezésre állnak a hagyományos nemesítési módszerek, próbálkoztak genetikailag módosított növényekkel és gyakori a nevelési feltételek változtatása is, amely sótürebbé teheti a kérdéses genotípust (Cuartero és mtsai, 2006). Ez utóbbi szintén hagyományosnak tekinthető, olyan edzési eljárásokat jelent, amelyek növelik a növénykének abiotikus stressztoleranciáját. Ilyenek például a csíranövény korban alkalmazott előzetes sókezelés (Cayuela és mtsai, 2001), szárazságstressz (Gonzalez-Fernandez, 1996), illetve lehet javítani az oltványok sóstressz toleranciáját sótüre alanyra történő oltással (Santa-Cruz és mtsai, 2002; Estañ és mtsai, 2005). A szalicilsav kezelést (SA), mint a sóstressz akklimatizációt javító kémiai edzést, kísérleteink előtt nem alkalmazták egyértelműen sikeresen, hiszen a hatás sokszor ellentétessé vált, és a SA kezelés gátolta az ezt követő csírázást vagy a vegetatív fejlődést.

A SA szerepe jól ismert a biotikus stressztolerancia jelátviteli folyamatában. Az utóbbi években azonban egyre több bizonyíték merül fel a különféle abiotikus stresszfaktorok elleni védekezésben betöltött funkciójáról is (Yalpani és mtsai, 1994; Janda és mtsai, 1999; Mishra és Choudhury, 1999; Bezrukhova és mtsai, 2001; Larkindale és Knight, 2002; Ananieva és mtsai, 2004). A külsőleg adott SA sóstressz ellen nyújtott védő hatásáról már több munka született, viszont az eredmények ellentmondóak voltak, mivel a SA hatása függ a kezelés módjától, a növény fejlődési stádiumától és a koncentráció nagyságától. Magas ($> 10^{-3}$ M) SA koncentrációk kivédhetetlen oxidatív stresszt jelentenek a növény számára, viszont az általunk alkalmazott alacsonyabb koncentrációkkal (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) olyan edzési eljárás dolgozható ki, amely lehetővé teszi a munkámban alkalmazott sóstresszrel (100 mM NaCl) szembeni tolerancia kialakítását talaj nélküli kultúrákban nevelt paradicsomban.

Munkámban célul tűztem ki az alacsony koncentrációban és hosszútávú előkezelésben alkalmazott SA hatásainak vizsgálatát paradicsom növények sóstressz akklimatizációjára.

A SA szekunder metabolit, amely a növényi fenolgyeületek csoportjába tartozik. Allelopatikus anyagnak tekinthető, mivel gátolhatja a környezetében élő más fajok csírázását, gátolja

növekedésüket is, aminek egyik oka, hogy szabályozza a növények vízháztartását csökkentve a vízpotenciált és a sztómakonduktanciát. Hasonló hatást feltételeztünk a paradicsomnál is, ahol 10^{-7} M és 10^{-4} M SA előkezelés hatására csökkenés történt a K^+ ($^{86}Rb^+$) felvételben, a káliumtartalomban és a kezelés hatására a vízpotenciál is negatívabbá vált a hajtásban. A vízpotenciálcsökkenés következtében megnőtt a SA előkezelt növényekben az abszcizinsav (ABS) stresszhormon koncentrációja, ami sztómazáródást eredményezett mindkét SA koncentráció esetében. Az irodalmi adatoktól eltérően a kísérleteinkben azonban az alacsony koncentrációban és hosszútávú előkezelésben alkalmazott SA hatására megtörtént az ozmotikus és/vagy térfogati adaptáció és ezt követően a vízpotenciál (ψ_v) növekedése az előkezelések végére. A vízháztartással kapcsolódó paraméterek változása (ψ_v , ozmotikus potenciál, ψ_π , sztómakonduktancia csökkenés) a két előkezelésként alkalmazott SA koncentrációnál nagyon hasonló volt.

Az ozmotikus adaptáció ellenére az ABS koncentrációja a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növényekben továbbra is szignifikánsan megemelkedett, ami lehetővé tette az ABS jelátviteli út tartós bekapcsoltságát, és az ABS-indukálta védekezési mechanizmusok aktiválódását ennél a koncentrációnál. Az ABS bioszintézisének szabályozódása tehát nemcsak a SA-által kiváltott hidraulikus és ozmotikus stressz által, hanem más tényezők által is szabályozott a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt paradicsomban. Mivel az ABS bioszintézis utolsó lépését az abszcizinaldehid oxidáz (AAO) enzim katalizálja, nem denaturáló poliakrilamid gélben vizsgáltuk meg az enzimaktivitás változásait. Eredményeink alapján a gyökérben négy, a hajtásban két erőteljes, gyakran egybeeső sáv mutatható ki. Szignifikáns AAO aktivitás fokozódás történt az előkezelések hatására, ami elsősorban a 10^{-4} M SA-nál jelentős, így feltételezhető, hogy a SA-indukált ABS akkumulációban az AAO-ra gyakorolt pozitív regulációs hatásnak is szerepe van.

Sikeres akklimatizáció csak a 10^{-4} M SA előkezelt növényekben történt a 100 mM NaCl által indukált sóstresszel szemben, ami sem a kontroll, sem a 10^{-7} M-os SA-val előkezelt mintáknál nem következett be. A sóstressz alatt, néhány halofita vagy halofita jellegű paradicsom fajhoz hasonlóan, a nátriumionok az előkezelt növények hajtásában akkumulálódtak és ozmotikumként működtek, de a 10^{-4} M-os előkezelésnél nem voltak megfigyelhetőek a többlet nátrium káros tünetei. Ez jól bizonyítható a különböző stresszmarkerek kontrollhoz közelítő értékeivel a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt mintákban a sókezelést követően. A fotoszintézis primer fotokémiai folyamatai (F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP) is a kontrolléval azonos, vagy jobb hatékonysággal

működtek. A sóstressz alatt az előkezelt növényekben a levelek nagyobb ABA akkumulációját követte a megemelkedett putreszcin és karotinoid tartalom, valamint a csökkent lipidperoxidáció.

Az ozmotikus stressz kivédése a hajtásban az inorganikus ozmotikumként ható nátriumion akkumuláció mellett kompatibilis ozmotikumok, így oldható cukrok felhalmozódásával valósult meg. A levelekben elsősorban glükóz és fruktóz, a gyökérben a szacharóz járult hozzá a sejtek ozmotikus potenciáljához. A kompatibilis ozmotikumok közül levélben a szorbitol tartalom megemelkedését is tapasztaltuk az előkezelt növényekben. Mivel a szorbitol a mért koncentrációk mellett nem lehet számottevő az ozmotikus adaptáció kialakításában, feltételezhető, hogy a szorbitol szintézisét is katalizáló aldóz redukáz aktivitás növekedése a NADPH reciklizációjában lehet jelentős.

A szalicilsav az irodalomból ismert módon mindkét koncentrációnál gátolta a paradicsom hajtásában a kataláz aktivitást, ami összhangban van azzal, hogy az előkezelés alatt reaktív oxigénformák (ROS), így $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 keletkeznek. Ennek következtében a növényekben aktiválódnak az antioxidáns védőmechanizmusok. Céлом volt az antioxidáns védekezési rendszer enzimatis és nem enzimatis komponensei változásának vizsgálata a sóstressz 1 hete alatt, az aszkorbát-glutation ciklus egyes elemeinek nyomonkövetése. Megállapítottam, hogy a hajtás és a gyökér eltérő oxidatív stresszválaszának alapjául elsősorban az szolgálhat, hogy a nem enzimatis antioxidánsok, így a glutation és az aszkorbinsav mennyisége a 10^{-4} M-os SA kezelés hatására elsősorban a gyökérben emelkedik meg szignifikánsan sóstressz alatt. Ugyanitt szignifikánsan megemelkedik a rendszer visszaredukálódását szabályozó glutation redukáz (GR) aktivitás is.

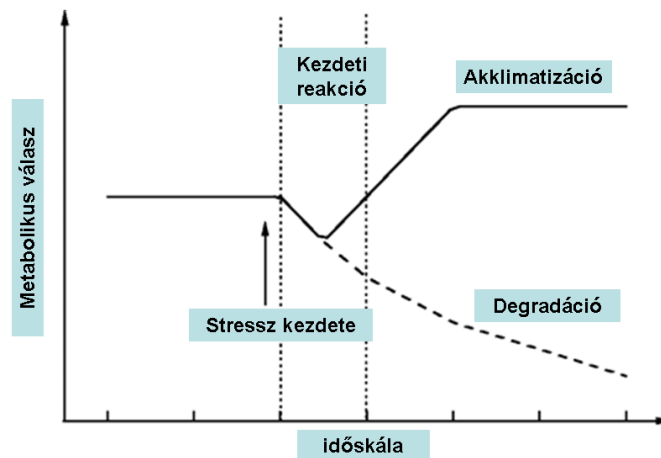
Ha a reaktív oxigénformák mennyisége túllépi a kioltó mechanizmusok kapacitását, az oxidatív stressz programozott sejthalált (PCD) indukál. Protoplasztokon, mint sejtszintű modell rendszeren vizsgálható a SA lehetséges szerepe a PCD-ben, ehhez különböző festési eljárások és gátlószerek állnak rendelkezésre. A prolin, mint a SA előkezelések után a sóstressz alatt felhalmozódó kompatibilis ozmotikum az irodalmi adatok alapján védi a fotoszintetikus apparátust, valamint ROS kioltóként is működhet. Alacsony koncentrációban alkalmazott prolin javította a paradicsom protoplasztok életképességét, amit FDA festéssel határoztam meg. Két különböző prolin koncentráció alkalmazásával megvizsgáltam a prolin lehetséges szerepét az oxidatív stressz kivédésében, ehhez a NO és a H_2O_2 szinteket határoztuk meg, és gátoltuk a H_2O_2 keletkezését difenilén jodónium, a NADPH oxidáz és más, H_2O_2 -ot generáló flavoprotein

enzimek gátlószere segítségével. A szalicilsav előkezelések hatására akkumulálódó, a sótolerancia kialakításában résztvevő anyagok (ABS, prolin, oldható cukrok, szorbitol) közötti interakció a paradicsom mezofillum sejtjeiben sóstresszt követően hozzájárulhat az általunk detektált tolerancia kialakításához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Stresszfolyamatok és a sóstressz

A stressz, mint fogalom meghatározása Selye János nevéhez fűződik. Definíciója szerint „az élő szervezetek valamennyi adaptációs reakciójának a stressz a foglalat, azaz a stressz egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, amely magában foglal minden nem-fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül” (Selye, 1956). A stressznek tehát sajátos ismertető jelei vannak, és a különféle, fajlagos, a stresszorra jellemző, specifikus hatást kiváltó folyamatok válaszreakcióinak egy része azonos. A stresszhatásra bekövetkező tünetegyüttes az adaptációs szindróma, amely egymást követő folyamatokból épül fel: Canon-féle vészreakció, ellenállás vagy rezisztencia, kimerülés (1. ábra).



1. ábra: A növényi stresszválasz általános sémája (Larcher, 1994.)

Lichtenthaler (1996) szerint minden olyan körülmény vagy anyag, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére vagy fejlődésére, stressznek tekinthető. Növényi stresszhatást különböző természetes és antropogén stresszfaktorok válthatnak ki.

A gyenge stressz hatását az akklimatizáció, a rezisztenciát fokozó és javító mechanizmusok részben kompenzálják. Az erős stressz jelentős károkat okozva végső soron a növényi sejt és egyed halálához is vezethet.

A Selye-féle általános stresszelmélet több kutatás által beigazolódott (Lichtenthaler, 1996). Stressz hatására az élő szervezet anyagcseréjében, így a növényekben is bizonyos reakcióutak 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 lejátszódó molekuláris szintű változások a szervezetben, amit összefoglaló néven oxidatív stresszhatásnak is neveznek. Az oxidatív stressz kiváltói főleg a reaktív oxigénformák (angol rövidítéssel: ROS), de általánosan megállapítható, hogy a legtöbb stressznek van oxidatív komponense is (Asada, 1994; Foyer és Harbinson, 1994), amely indukálja a növények antioxidáns védekezési rendszerét.

A növényélettani vizsgálatok közül a stresszkutatások kimagasló fontosságát napjainkban több tényező is indokolja: a globális klímaváltozás, felmelegedés; a szikes, sós talajok kialakulása; az arid (sivatagos) zónák kiterjedése, környezetszennyezés valamint az az igény, hogy olyan stressznek ellenálló növényfajták legyenek előállíthatók, amelyek kedvezőtlen környezeti feltételek mellett is megfelelő terméshozamot képesek produkálni.

2.2. A sóstressz : a Na^+ akkumuláció és tolerancia mechanizmusai növényekben

Ha a környezet sókoncentrációja meghaladja a növények optimális fejlődéséhez szükséges koncentráció értéket, sóstresszről beszélünk. A talajoldatokban levő ionok közül a Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , és a Cl^- ionok járulnak hozzá leginkább a teljes szalinitáshoz, természetesen ehhez járul a Na^+ ion is, amely szodicitás esetén önmagában okozza a sóstresszként ható magas sókoncentrációkat legtöbbször klorid anionnal.

A sóstressz a jelenleg művelés alá vont területek egyharmadát érinti (Flowers és Yeo, 1997), ami a Föld felszínének megközelítőleg 6 %-a (Szabolcs, 1994). Természetes élőhelyek is rendelkezhetnek magas sótartalommal, így az ár-apály által érintett tengerparti zónák, sós mocsarak, száraz, félsivatagi vidékeken kialakuló, visszahúzódó felszíni vizek parti zónái (Kaszpi-tenger, Holt-tenger) és a mérsékelt égövi szikes területek növényei. A világon a

mezőgazdaságilag művelt területek 40 %-án a talaj magas sótartalma a növénytermesztés eredményességét fokozódó mértékben csökkenti. Hazánkban különösen nagy arányban, az ország területének 10 %-án fordulnak elő sós területek, amelyek további terjedése éghajlati és emberi hatásra várható. Az ilyen területeken használt öntözővíz szintén magas sókoncentrációval bír (900 mg l⁻¹). Amellett, hogy a termesztett növények sótoleranciájának fokozása a fentiek miatt óriási gyakorlati jelentőségű, a sótolerancia kutatása a növénybiológiai alaptudományokat is nagyban gazdagítja: a génszabályozástól az ásványi anyagok felvételéig sokféle területet felölel. A sóstressz kutatása gyarapítja a szárazság- és a hidegstresszel kapcsolatos ismereteinket is, mivel szoros összefüggés mutatkozik e három abiotikus stressz között. Fontos feladat a sótolerancia mechanizmusának megismerése, valamint olyan növények szelekciója, esetleg transzgénikus növények előállítása, amelyek ezeken a területeken gazdasági növényként termesztethetők.

Munkámban a NaCl magas koncentrációi által okozott stresszre használom a sóstressz kifejezést. A növényi sótűrés kutatásában azonban mindig szem előtt kell tartani, hogy sokgénés tulajdonságról van szó. Valószínű tehát, hogy a sótolerancia kialakításához a növény egyes szerveinek jól szabályozott együttműködésére van szükség. A sótolerancia vizsgálatához kitűnő objektumot jelentenek a halofita növényfajok, amelyek megfigyelése révén megismerhetjük a növények természetes adaptációs mechanizmusait. Hasonlóképpen kevés az ismeretünk azokról a speciális feltételekről, melyekkel a magas sótartalmú talajok nagyobb hányadát kitevő szódás talajokon élő növényeknek kell megbirkózniuk.

A növényeket sótoleranciájuk szerint több kategóriába oszthatjuk. A halofita, sókedvelő növények csoportja 200 és 500 mM NaCl koncentráció mellett is képes növekedésre. Ezen csoporton belül az euhalofiták optimális növekedésükhöz magas, akár 300 mM-os NaCl koncentrációt is igényelnek. A második csoportba több halofita és néhány glikofita génusz tartozik, ezek közös jellemzője az erőteljes növekedésgátlás 200 mM-os NaCl oldaton, illetve a növekedés megszűnése e koncentráció fölött, de még mindig képesek külső tünetektől mentes vegetatív fejlődésre és termésképzésre. A harmadik csoportba tartozó glikofita növények számára a 80 mM-os vagy annál nagyobb NaCl koncentráció már mérgező, citoplazmájukban felborul az ionegyensúly, súlyos stressztüneteket mutatnak, illetve e fölött a koncentráció fölött el is pusztulnak (Flowers és mtsai, 1997; Hasegawa és mtsai, 2000). A sóstressz által kiváltott primér hatás a Na⁺ ionok citoplazmába való belépése után az ionegyensúly felborulása (Zhu, 2001). A

magasabbrendű növények citoplazmája 100-200 mM K^+ -ot és 1-10 mM Na^+ -ot tartalmaz, amely 200 mM-os külső Na^+ koncentrációnál 80 mM-ig is emelkedhet. A Na^+ ionok mérgezőek a sejt számára, megbontják a fehérjék szorosan kötött hidrátburkát, ezáltal azok elveszítik natív konformációjukat, helyettesítik az enzimek kofaktoraként szolgáló K^+ ionokat, és legtöbbször enzimaktivitás gátlást idéznek elő.

A Ca^{2+} -ra vonatkozó ionegyensúly felborulása pedig a K^+/Na^+ felvétel szelektivitását csökkenti azáltal, hogy megszünteti a Ca^{2+} gátló hatását a Na^+ citoplazmába történő belépését is közvetítő, kis affinitású K^+ transzporter fehérjére és a feszültségtől független K^+ csatornára (VIC, voltage independent channel)(Maathuis és Amtmann, 1999).

Az akklimatizáció során tehát elsődleges a citoplazma ionegyensúlyának a helyreállítása. Ez a Na^+ transzport szabályozásán keresztül valósul meg. A Na^+ belépése a gyökérsejtek citoplazmájába történhet még az ún. nem szelektív kationcsatornán (NSC) keresztül (Amtmann és Sanders, 1999), de a nagy affinitású K^+ transzporter fehérje (HKT1) is szállít Na^+ ionokat (Rubio és mtsai, 1995). A Na^+ kizáródik a citoplazmából, ha a transzporterek K^+ - Na^+ szelektivitása nagy, és a káliumiont részesítik előnyben a nátriummal szemben. A citoplazma nátriumion tartalmát csökkentik azok a transzporter molekulák is, amelyek a sejt-kompartimentumok, így a vakuólum illetve az apoplast felé, aktív transzporttal pumpálják ki a Na^+ iont. Ezek az ún. Na^+ - H^+ -antiporter fehérjék, amelyek közül a plazmamembránban lokalizálódó fehérjét SOS1-nek nevezik, a vakuólum membránhoz kötött pedig NHX (NHE) transzporter családnak. A Na^+ transzport mechanizmusát molekuláris szinten legjobban a sóstresszre különösen nagy érzékenységet mutató *Arabidopsis* SOS (salt overly sensitive) mutánsok segítségével ismertük meg (Zhu és mtsai, 1998).

A Na^+ belépése a plazmamembránon keresztül a citoplazmába valószínűleg a sóstressz szenzorául is szolgál, és ennek következtében megemelkedik a citoplazma szabad Ca^{2+} ion koncentrációja. A kalcium jelet a kalmodulinszerű, SOS3 kalcium szenzor fehérje érzékeli, ami ezáltal aktiválódik, és kötődik a SOS2 Ser/Thre protein kinázhoz. A SOS3 kötődése után aktiválódó SOS2 kináz foszforilálja, ezáltal aktiválja a SOS1-et, a Na^+ -ot a citoplazmából kijuttató transzport fehérjét. A citoplazmatikus Na^+ koncentrációt ugyancsak csökkenti a hasonló mechanizmussal működő, a tonoplastban lokalizálódó, Na^+ - H^+ NHX antiporter fehérjék csoportja. Így már a gyökérsejtekben is több hatékony mechanizmus működik a citoplazmatikus $[Na^+]$ csökkentésére. További lehetőség a gyökér terhelésének mérséklésére a Na^+ hajtásba

irányuló transzportja a xilémen keresztül. Az így hajtásba kerülő Na^+ a mezofillum sejtekben hasonló transzporter fehérjék közvetítésével ugyanúgy kompartmentalizálódhat, mint a gyökérben. Ez egyben azt is eredményezi, hogy a vakuólumban felhalmozódó Na^+ ion szervesetlen ozmotikumként is szolgál. Ez különösen a halofitákra jellemző, míg olyan glikofita növényben, mint a paradicsom, a hajtásban sok nátriumot akkumuláló, természetett fajták inkább szenzitívnek bizonyultak (Juan és mtsai, 2005). Ebben az esetben a nátrium akkumuláció az oxidatív stressz következtében a plazmamembrán szelektivitásának csökkenésével, ezt követően vízvesztéssel és vízpotenciál csökkenéssel, majd a levélöregedési folyamatok beindulásával járt. A vad paradicsomfajok között azonban kifejezetten halofita karakterű, Na^+ -ot szervesetlen ozmotikumként akkumuláló fajokat is találunk, mint amilyen például a *Solanum peruvianum* és a *S. pennellii* (Rus és mtsai 1999; Chen és mtsai, 2001).

A sóstressz hatására az egyik elsőként kialakuló változás a turgornyomás csökkenése miatt bekövetkező sejtmegegyülés gátlás, amelyhez kapcsolódik a sztómák záródását követően a fotoszintézis hatékonyságának csökkenése és a csökkent széndioxid asszimiláció. A Calvin-ciklus enzimeit és a fotofoszforiláció folyamatait is sóérzékenyek (Chaves és mtsai, 2009).

A másodlagos hatások közül legfontosabb a megnövekedett külső sókoncentráció következtében kialakuló ozmotikus stressz. Az ozmotikus stressz káros hatásainak kivédését az ozmotikus homeosztázis helyreállítása jelenti. Ennek egyik eleme a szervesetlen ozmotikumok koncentrációja, de rendkívül fontos az ún. kompatibilis ozmotikumok szintézise is. Ezek közé tartoznak az alacsony molekulású szénhidrátok (szacharóz, glükóz, fruktóz, trehalóz), a cukoralkoholok (mannitol, szorbitol, ononitol, pinitol), a szerves savak és aminosavak (pl. prolin), vagy a kvaterner ammónium származékok (glicinbetain, β -alaninbetain, prolinbetain, stb.) (Szegetes és mtsai, 2000). A sótolerancia kialakítására irányuló hagyományos és géntechnikai nemesítés egyik legfontosabb irányvonala az ozmotikusan aktív szerves vegyületek szintézisének mesterséges fokozása. E molekulák némelyike normális anyagcsere-folyamatokban is részt vesz vagy szabályozó szerepet tölt be, így felhalmozásuk e folyamatokra is kihatással lehet. Az ozmoprotektív vegyületek felhalmozásával-, átalakításával kapcsolatos ismereteink jelentős része sejt kultúrák, levélszegmensek, prokarióta rendszerek vizsgálatából származik. A kompatibilis ozmotikumok azokban a kompartmentumokban szolgálnak ozmotikumként, ahol a fehérjék szerkezete megőrzendő, így a citoplazmában, kloroplastisban, mitokondriumokban. Gyakran ozmoprotektív szerepük is van, tehát elősegítik a makromolekulák natív

térszerkezetének fennmaradását azáltal, hogy helyettesítik a szorosan kötött vízmolekulákat a makromolekulák felszínén és antioxidánsként is funkcionálhatnak (Tari és mtsai, 2003b; Ashraf és Harris, 2004).

Az ozmotikus stressz növényfajtól illetve fajon belül alfajtól vagy genotípustól függően indukálja ezen kompatibilis ozmotikumok bioszintézisében szereplő kulcsenzimek expresszióját, amely biztosítja az adott genotípus sikeres akklimatizációját a szélsőséges körülmények között. Ilyen kulcsenzim lehet például az aldo-keto reduktázok csoportja, amelyek ozmotikus stressz hatására fokozott expressziót mutathatnak, illetve új izoenzimeik expresszálódhatnak. Működésük eredményeképpen cukoralkoholok szintetizálódnak, mint például az aldóz-6-foszfát reduktáz által katalizált reakcióban a szorbitol-6-P, amelyből a 6-os helyzetű foszfátcsoport egy foszfátáz enzim által katalizált lehasítása után szorbitol keletkezik (Zhou és mtsai, 2002). A 150 mM NaCl-dal kezelt *Solanum tuberosum*-ban az inozitol a raffinóz családba tartozó oligoszacharidok szintézisét katalizáló enzimek génjeinek upregulációja következtében, a megnövekedett raffinóz poolból származik (Legay és mtsai, 2009).

A sóstressz által indukált másodlagos folyamatok között másik elem az abiotikus stresszorok nem-specifikus hatásaként jelentkező oxidatív stressz. A reaktív oxigénformák elsősorban azokban a redox folyamatokban keletkeznek, ahol az elektrontranszport túl gyors a természetes elektronakceptorként szereplő biológiai molekula reoxidációjához képest (Vranová és mtsai, 2002). Ilyenkor megfelelő redoxpotenciálú donor esetén az elektront a molekuláris O_2 is felveheti, ami szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot -}$) képződéséhez vezet. A folyamat olyan redox reakciók sorozatát indítja el, ami hidrogén-peroxid (H_2O_2), hidroxil gyök vagy protonáció után hidroperoxil gyök keletkezését eredményezi. A ROS jelentős forrása sóstressz alatt a fotoszintetikus és a mitokondriális elektrontranszportlánc. A fotoszintézis 2. fotokémiai reakcióit követő töltésrekombináció után a triplet állapotú *P680 a gerjesztési energiát átadhatja az oxigén molekulának, ami az igen reaktív szinglet oxigén (1O_2) keletkezéséhez vezet. A fotoszintetikus elektrontranszport során 2. fotokémiai rendszerben keletkező szinglet oxigén mellett az 1-es fotokémiai rendszer (PSI) is hozzájárul a ROS kialakulásához. A PSI közvetlenül adhat át elektronokat a molekuláris oxigénnek, generálva ezáltal a $O_2^{\cdot -}$, majd az ebből keletkező H_2O_2 képződését a kloroplasztisban. A fotoszintetikus elektrontranszport végső elektronakceptora, a NADPH pool túlredukáltságának elkerülésére a C_3 -as növényekben kialakult a fotorespiráció jelensége, amely a még mindig reaktív H_2O_2 képződéséhez vezet a peroxisómákban. Más

esetben, így az *Arabidopsis*-ban a ROS akkumulációja sóstressz alatt a plazmamembránhoz kapcsolt NADPH oxidázok aktiválódásának eredménye (Leshem és mtsai, 2007; Sakamoto és mtsai, 2008).

A membránokat, nukleinsavakat, fehérjéket degradáló és inaktíváló reaktív oxigénformák eltávolítása a sikeres akklimatizáció egyik legfontosabb feltétele. A membránlipidek peroxidációját, a proteinek oxidációját, az enzimgátlást valamint a DNS és RNS károsodást okozó, a kioltó mechanizmusokat túllépő oxidatív stressz programozott sejthalálhoz vezet. (A reaktív oxigénformák eltávolításában szerepet játszó rendszerekről a 2.6 pontban beszélünk részletesen.)

A sóstressz akklimatizáció harmadik fontos szakasza a káros anyagcseretermékeket eltávolító, detoxifikáló mechanizmusok aktiválódása. A glutation nemcsak antioxidánsként tölt be fontos szerepet, hanem a detoxifikáló mechanizmusoknak is meghatározó tényezője (Noctor és mtsai, 1998b; 2002). Jónéhány detoxifikáló enzim GSH-függő, ezek közül legnagyobb jelentősége talán a glutation S-transzferázoknak (GST) van. A GST-k aktívak a herbicid detoxifikációban és szintén fontos tényezők a transzgenikus dohány növények chilling és sóstressz toleranciájában (Roxas és mtsai, 1997; Basantani és Srivastava, 2007). Az apoptózis szabályozóiként is működhetnek (Kampranis és mtsai, 2000). A GST-k elektrofil szubsztrátokhoz GSH-t kötnek, majd a glutationált metabolitot az ún. „ATP-kötő kazettával rendelkező” ABC transzporterek a vakuólumba szállítják. A GST-k ilyen módon központi szerepet töltenek be a xenobiotikumok detoxifikálásában, természetes szubsztrátjaik közül az auxinokat, citokinineket és az antociánokat kell megemlíteni (Edwards és mtsai, 2005).

Az antocianinok nem-enzimatisz szubsztrátjai a GST-knek, és miután kötődnek az enzimekkel, a vakuólumba transzportálódnak (Mueller és mtsai, 2000). Ezeknek a vízdékony antioxidánsoknak a mennyisége szintén megnőtt sóstressz esetén paradicsom növényekben (Eryilmaz, 2006), és akkumulációjukat bizonyítottuk SA előkezelés hatására és az ezt követő sóstressz alatt a Rio Fuego paradicsom fajtában is (Szepesi és mtsai, 2008). Az antocianinok nemcsak hatékony ROS-kioltók, de felülszabályozzák a *phi*-típusú GST-eket a humán retinális pigment epiteliális sejt kultúrákban (Milbury és mtsai, 2007). *In vitro* szignifikánsan gátoltak egy GST izoenzimet, amit rozs növényből tisztítottak (Zachariah és mtsai, 2000), így modulálhatják a GST-k aktivitását. Néhány GST gén, pl. a GST6, *Arabidopsis*-ban is szabályozódik SA vagy H₂O₂ által. A GST6 promótere tartalmaz egy 20 bpnyi oktopin szintáz (*ocs*) elemet, ami kötőhelye a

bZIP fehérjéknek, de válaszol a H₂O₂-ra is, így a GST6 promótere indukálódik gyökerekben SA és H₂O₂ által (Chen és Singh, 1999). Néhány GST izoenzim és az antocianinok szintézise is indukálható H₂O₂-dal (Lois, 1994).

A stressz hatására indukálódó izoenzimeknek szerepük lehet a citotoxikus alkenálok konjugálásában. Ezek a vegyületek, mint például a 4-hidroxinonenál, a membránok oxidatív destrukciója következtében keletkeznek, rendkívül toxikusak, és a GST-k egy csoportja (*phi*-GST-k) képes a detoxifikálásukra pl. *Sorghumban* (Gronwald és Plaisance, 1998). GSH-val működnek az aktívan lélegző növényi sejtekben keletkező formaldehid és a metilglioxál detoxifikálásában szereplő enzimek, a formaldehid dehidrogenáz illetve a glioxaláz I, valamint a citotoxikus hidroperoxidokat, többek közt zsírsav hidroperoxidokat GSH-val alkohollá redukáló glutation peroxidázok is (Dixon és mtsai, 1998). Detoxifikációs funkciót betölthetnek az aldo-keto-reduktázok is, amelyek egyik nem túl régen bizonyított funkciója, hogy redukálják a lipidperoxidáció mérgező termékeként keletkező aldehideket, így a 4-hidroxinonenált (Oberschall és mtsai, 2000).

A sikeres akklimatizációban fontos szerepe van a stresszor hatására indukálódó génexpressziós változásoknak, amelyeket különböző stresszhormonok szintézisének fokozódása is közvetíthet. Ezek közül az egyik legfontosabb az abszcizinsav (ABS).

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

2.3. Az abszcizinsav, mint általános stresszhormon

2.3.1. Az abszcizinsav bioszintézis szabályozása abiotikus stresszorok által

A környezeti hatásokra a növények részben a génexpressziós mintázatuk megváltoztatásával válaszolnak, mely végső soron sejt-, illetve növény szintű adaptív válaszokhoz vezet. Az abiotikus stresszhatásokra, az ionos és nem ionos ozmotikus stresszre, illetve a szárazság következményeként szintetizálódó ABS fontos szabályozója a gyors és a hosszútávú válaszreakcióknak. Az ABS leggyorsabban kialakuló hatása a sztómák záródása, amit a talaj

víztartalmának további csökkenésével a hajtásnövekedés gátlása követ (Wilkinson és Davies, 2002). A talajban kialakuló szárazság vagy a sóstressz hatására először a gyökérben fokozódik az ABS szintézis és emelkedik meg az ABS koncentráció. Ezt követi a hormon transzportja a xilémen keresztül a hajtásba, ahol sztómazáródást indukál. A szárazságstressz alatt a sztómazárósejtek tehát elsősorban a zárósejt apoplastjában kialakuló ABS koncentrációra reagálnak, ami nem feltétlenül mutat közvetlen korrelációt a levelek endogén ABS tartalmával (Correira és Pereira, 1995).

Az erősebb vízhiány a levél ABS szintézisét is fokozza (Wilkinson és Davies, 2002), az abszcizinaldehid oxidáz (*AAO3*) és a MoCo szulfuriláz (*ABA3*) gének expressziója dehidrációra és magának az abszcizinsavnak a hatására is indukálódik a levelekben (Xiong és mtsai, 2001).

Az ABS a növényekben a C40-es karotinoidokból képződik, és szintézisének kezdeti lépései a kloroplasztiszhoz (gyökérben a plasztiszhoz) kötődnek. A β -karotin hidroxilálódás útján zeaxantinná alakul, amely két lépésben, anteraxantinon keresztül violaxantinná epoxidálódik. A reakciót a zeaxantin epoxidáz (ZEP) enzim katalizálja, amely a kloroplasztisz sztrómájában található. A fenti reakciósornak a xantofill-ciklus részeként fontos szerepe van a kloroplasztiszban a fölösleges fényenergia disszipálódásában is (Eskling és mtsai, 1997). Az ABS közvetlen prekuzora az *all*-transz-violaxantinból vagy az *all*-transz-neoxantinből keletkező 9-*cisz*-violaxantin és a 9'-*cisz*-neoxantin, amit a 9-*cisz*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCED) izomerizációval xantoxinná, az abszcizinaldehid előanyagává alakít. Az ABS több lépésben közvetlenül az abszcizinaldehid oxidációjával alakul abszcizinsavvá, ezt a reakciót az abszcizinaldehid oxidáz (AAO) katalizálja. Az AAO molibdén kofaktor (MoCo)-tartalmú hidroxiláz, amelyet multigén család kódol, és az enzim többféle szubsztrátot elfogadva többféle fiziológiai folyamatban szerepelhet (Mendel és Hänsch, 2002).

A paradicsom (*Solanum lycopersicum* Mill. L.) *flacca* nevű mutánsa ABS deficiens, és a mutáció az AAO enzim Mo-kofaktorát szulfuriláló MoCo-szulfuriláz (MCSU) aktivitását érinti (Sagi és mtsai, 1999). Sagi és mtsai (1999) a paradicsom levélben kettő, gyökérben négy izoenzim jelenlétét detektálták aldehid oxidáz (AO) aktivitásgélben, indol-3-aldehid szubsztráttal. Megállapították, hogy a sztómazáródást nem mutató, ezért állandóan hervadt fenotípusú *flacca* mutánsban az ABS tartalom minimális. A hormon hiányát az aktivitás gélben a gyökérből és a hajtásból is hiányzó legkisebb mobilitású fő sáv, az ún. AO1 aktivitásának hiánya okozza. Immunoblottal a fő sáv három fehérjére bontható. Az AO1 aktivitás tehát közvetlenül

meghatározta a szövetek ABS tartalmát. Min és mtsai (2000) három feltételezett funkcionális AO gént klónozott (TAO1, TAO2 és TAO3) paradicsomból, és vizsgálták a gének szövetspecifikus expresszióját, amely jó összhangban volt az aktivitás gélben kapott eredményekkel. NaCl hozzáadása a gyökérközeghez indukált egy gyors, átmeneti és szövetspecifikus emelkedést az árpa növények leveleinek ABS tartalmában, de ez 24 óra múlva a kezeletlen szintre csökkent (Fricke és mtsai, 2006).

Meg kell jegyeznünk, hogy az AO izoenzimok elnevezése között van némi konfúzió. Az *Arabidopsis aba3* mutánsa ABS deficiens. Az *Arabidopsis*-ban ez a mutáció az AO aktivitáshoz szükséges S-ligand beépülését katalizáló MoCo szulfuriláz enzim mutációját jelenti (Schwartz és mtsai, 1997). A lúdfűben az *ABA3* gén által kódolt fehérjét AAO3-nak nevezik. Az *Arabidopsis*-ban található négy aldehyd oxidáz gén (*AAOI-4*) közül az *AAO3* kódolja az abszcizinaldehydet ABS-sé alakító izoenzimet (Sekimoto és mtsai, 1998; Seo és mtsai, 2000). Az AAO3 homodimer fehérje natív gélben az izoformák közül a legkisebb mobilitású. Az AAO3 homodimer és az AAO3/AAO2 heterodimer fehérje, amely a második legkisebb mobilitású sáv, elfogadja az abszcizinaldehydet szubsztrátként, míg az AAO2/AAO2 homodimer nem (Koiwai, és mtsai, 2004).

A ZEP, az NCED és az AAO által katalizált reakciók az ABS bioszintézis regulációs pontjai. A ZEP és az NCED gének expresszióját növeli az ozmotikus, a só- és a szárazság stressz. Az *Arabidopsis*-ban a ZEP, a MCSU és AAO3 gének expresszióját pedig az előbbi stresszorokon túl maga az ABS is fokozza (Xiong és mtsai, 2002; Yesbergenova és mtsai, 2005, Ma és mtsai, 2006). Emelkedett AAO aktivitás szintén megfigyelhető sóstressznek kitett borsó növények leveleiben és gyökerében (Zdunek-Zastocka, 2008).

Ennek alapján az ABS bioszintézisében az ozmotikus stressz komponenst is tartalmazó stresszhatásokra egy pozitív visszacsatolós modell alakítható ki, amely szerint az NCED enzim ozmotikus stressz hatására történő aktiválódása mérsékelt ABS koncentrációnövekedést eredményez. Ez azután a ZEP és AAO aktiválásával gyors és erőteljes hormon koncentrációnövekedéshez vezet, mint ahogyan ez a fiziológiai kísérletekben tapasztalható.

Az ABS kiemelt szerepet tölt be a sóstressz jelátvitelben, és számos sóreszponzív gén erősen indukálódik ABS hatására. Szabályozó géneket és jelátviteli komponenseket kódoló géneket (pl. *DREB2A*, *MYB* és *NAC* gének) vagy a celluláris védelemben résztvevő géneket (*LEA* gének vízmegkötő, ionkötő vagy chaperon funkciókkal) azonosították az ABS-függő vagy ABS

által indukált korai válasz gének között (Fujita és mtsai, 2006). Az S-adenozil-metionin dekarboxiláz, ami egy lényeges enzime a poliaminok (spermidin, Spd; spermin, Spm) bioszintézisének, sókezelés hatására indukálódott paradicsom növények gyökerében (Ouyang és mtsai, 2007). Továbbá, az arginin dekarboxiláz és spermidin szintáz (*Zmspd* 1,2), a poliaminok szintézisének további kulcsenzime is transzkripcionális szinten, ABS által szabályozódnak (Jiménez-Bremont és mtsai, 2007). A poliamin akkumuláció a növények adaptív válaszának tekinthető sóstresszt követően. Mint polikationok, a poliaminok képesek kötődni olyan anionokhoz, mint a DNS, RNS, a foszfolipidek negatív töltései, stabilizálva ezeket a makromolekulákat és a membránokat.

2.3.2. A xantofill ciklus valamint az ABS bioszintézis és jelátvitel kapcsolata

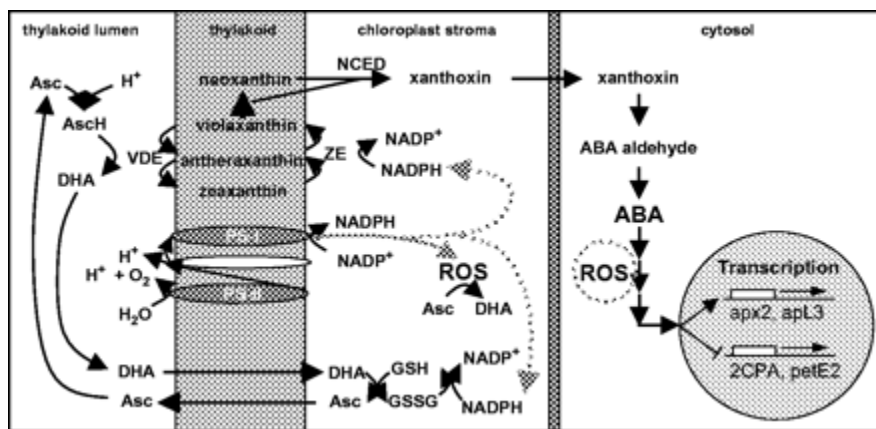
A fotoszintetikus apparátusban hatékony megoldások alakultak ki a fotoszintetikus folyamatok által nem hasznosuló fényenergia többlet eltávolítására. Erre azért van szükség, mert nagy fényintenzitáson vagy az abiotikus stresszorok hatásaként a fotoszintetikus elektrontranszport lánc túlredukáltsága következtében az elektron a molekuláris O₂-re adódhat, amely a korábbiakban leírtak szerint ROS generálásával oxidatív stresszt vált ki. A növényt érő fényenergia feleslege tehát destruktív folyamatokhoz vezet, amit fotoinhibíciónak nevezünk.

Az excitált klorofill-*a* által elnyelt fényenergia leadódhat fluoreszcens fény- és hő kibocsátás formájában és felhasználódhat a fotokémiai reakciókban. Mindkét utóbbi csökkenti a fluoreszcenciát. A fluoreszcencia kioltásának fotokémiai (qP) vagy nem fotokémiai, hődiszippációs útja (qN vagy NPQ), és ezek egymáshoz viszonyított aránya információt szolgáltat a fotoszintetikus apparátus működésének hatékonyságáról.

Az abszorbeált fényenergia leadásának egyik legfontosabb részét jelenti a hő formájában történő energiadiszippáció. Az egyik védelmi lehetőség a két fotokémiai rendszer közötti energiaeloszlás szabályozása, ez úgy valósul meg, hogy a 2-es fotokémiai rendszer fénybegyűjtő komplexe (LHCII) foszforilációt követően a PSI-hez kapcsolódik. A gerjesztési energia nem fotokémiai kioltásához a fény bekapcsolása után a sztróma és a lumen közötti pH gradiens kialakulása is hozzájárul.

A keletkező szabad gyökök és redukált oxigénformák kioltását a kloroplasztisz nem enzimatisz antioxidáns rendszerei, a tokoferol, aszkorbinsav, karotinoidok végezhetik, de fontos szerepe van a ROS kioltásban a 2.6. pontban részlezett enzimatisz rendszereknek is.

A karotinoidok azonban speciális védőfunkcióval is rendelkeznek, amelyet a xantofill ciklus tesz lehetővé. A fény bekapcsolása után a lumen pH-jának csökkenése aktiválja az elsősorban az LHCII-höz kötődő xantofilok interkonverzióját. Ezt a folyamatot a magasabbrendű növényekben a lumenben lokalizálódó, redukált aszkorbinsav koenzimmel működő violaxantin de-epoxidáz (VDE) enzim katalizálja. Az enzimet az alacsony, 5,2-es pH aktiválja, aminek következtében kapcsolódik a tilakoid membránhoz (Eskling és mtsai, 1997) és kétlépéses reakcióban a violaxantint (V) anteraxantinon (A) keresztül zeaxantinná (Z) alakítja (Büch és mtsai, 1994; Hager és Holocher, 1994; Pfündel és Bilger, 1994).



2. ábra. Az abszcizinsav (ABA) bioszintézis regulációja a fotoszintézis által. A violaxantin de-epoxidázt (VDE) aktiválja a tilakoid lumen savanyodása és a redukált, protonált aszkorbinsav (AscH) jelenléte, míg a zeaxantin epoxidáz (ZE) NADPH-t igényel. Fotooxidációs feltételek mellett a redukált aszkorbát a ROS kioltó folyamatokban is felhasználódik és dehidroaszkorbáttá (DHA) alakul. A violaxantinból (neoxantinból) izomerizáció után a 9-*cis*-epoxikarotinoid dioxigenáz (NCEO) xantoxint, az ABA bioszintézis intermedierjét hozza létre. Az ABA reaktív oxigénformák, mint jelátviteli komponensek közvetítésével génexpressziót indukál (Baier és Dietz, 2005).

A ciklus zárását a kloroplasztisz sztrómában található, NADPH-függő zeaxantin epoxidáz (ZEP) teszi lehetővé, amelynek pH optimuma 7,5 körüli értéknél van. A zeaxantin mennyisége jól korrelál a hődisszipáció fokozódásával, egyben tehát jó fluoreszcencia kioltó. A V+A+Z pool

nagysága és a ciklus hatékony működése tehát fontos részét képezi az abiotikus stresszorokhoz való akklimatizációs folyamatoknak. A violaxantin de-epoxidáz enzim működéséhez szükség van a dehidroaszorbát pool folyamatos visszaredukálódására és a redukált aszorbát lumenbe irányuló transzportjára, ennek hiányában a ciklus szétkapcsolttá válik (Baier és Dietz, 2005).

A violaxantin akkumulációja serkenti az abszcizinsav szintézist. Az aszorbinsav bioszintézis mutánsokban, amelyek a vad típus aszorbinsav tartalmának csupán 30 %-ával rendelkeznek, az NCED expressziójával párhuzamosan az endogén ABS tartalom is megemelkedik (Pastori és mtsai, 2003). A fotoszintetikus elektrontranszporttól függő ABS bioszintézis mellett az ABS jelátvitel is redox-regulált (Meinhard és Grill, 2001).

Az ABS viszont megnöveli jóhéhány antioxidáns enzim, így az aszorbát peroxidáz 2 (*APX2*) (Cheong és mtsai, 2002; Chang és mtsai, 2004) és a kloroplasztisban lokalizált glutation peroxidáz (*GPXI*) (Milla és mtsai, 2003) expresszióját.

2.4. A prolin, mint kompatibilis ozmotikum hatásai

A prolin (Pro) az egyik leggyakrabban előforduló ozmolit, amely felhalmozódik baktériumokban, moszatokban, gerinctelen állatokban és növényekben is víz-, illetve sóstressz során. Sótoleráns növényekben élesen megnő a Pro szintje. A Pro bioszintézise glutaminból vagy ornitinből történik, de az endogén Pro szintet a katabolizmus sebessége is meghatározza. A glutaminsavból történő Pro bioszintézis sebességmeghatározó enzime a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS), amelynek expresszióját (*P5CS1*) *Arabidopsis*-ban fokozza a só- és ozmotikus stressz (Székely és mtsai, 2008).

A Pro védi a membránokat és fehérjéket a magas inorganikus sókoncentráció és az extrém hőmérsékleti értékek károsító hatásaival szemben, szabályozza a citoszolikus pH-t és hidroxil gyök kioltóként is működik (Matysik és mtsai, 2002).

A glutaminsavból kiinduló Pro bioszintézis során a P5CS NADPH-t fogyaszt, a keletkező Pro azonban visszaalakulhat P5C-vá. A megfelelő lépést katalizáló Pro dehidrogenáz NADP⁺-t használ, így szabályozza a redox töltést, azaz a NADP⁺/NADPH redox rendszer redukáltsági állapotát, aminek fontos szerepe lehet az anyagcsere szabályozásában (Delauney and Verma 1993).

Lehetséges, hogy a Pro abszolút mennyiségénél fontosabb a bioszintézis és lebontás körforgása a környezeti stresszhatásokhoz való adaptálódásban, mivel ez is hozzájárul a NADP⁺ szint fenntartásához. A többi ozmolithoz hasonlóan a stresszhatás megszűnését követően a Pro lebontása is szén-, nitrogén- és energiaforrássul szolgálhat a növekedés helyreállításához (Lea, 1993).

A sótoleranciára való nemesítés során a szerves ozmotikumok, így a Pro szintézisének géntechnológiai úton való fokozása csak korlátozott eredményekkel kecsegtet. Egyetlen ozmoprotektív vegyület fokozott és állandó szintézise a növény sótoleranciáját nem feltétlenül növeli, sőt, ellenállóképességét csökkentheti az erőforrásoknak más vegyületek szintézisétől való elirányítása miatt. Valószínűnek látszik, hogy a sótolerancia az ozmoprotektív vegyületek szintézisének közvetlen fokozása révén nem növelhető, vagy az ily módon létrehozott fajták és változatok szabadföldi környezetben nem nevelhetők (Deuschle és mtsai, 2001). A SA is növelte a Pro akkumulációt a normál vagy sóstresszelt búza növényekben (Shakirova és mtsai, 2003).

2.5. Szalicilsav fiziológiai hatásai növényekben

A szalicilsav (SA, *o*-hidroxibenzoésav) elsősorban a biotikus stresszorok hatására a magasabbrendű növényekben kialakuló ún. hiperszenzitív reakcióban szereplő jelátviteli komponensként volt ismeretes (Raskin, 1992).

Mikróbák is képesek a szintézisére. A *Mycobacterium smegmatitis* 3,6 mg (g száraz tömeg)⁻¹ nap⁻¹ mennyiségben szintetizálja a SA-t (Hudson és Bentley, 1970). A termesztett növények rhizoszférájában található mikroorganizmusok is szintetizálnak SA-t, és megtalálható a növények gyökérzetének exudátumában is (Chou és Patrick, 1976). A kukorica és a mungó bab rhizoszférájában 31 és 141 µg SA-t találtak 100 g száraz talajban (Pareek és Gaur, 1973).

Allelopatikus anyagoknak nevezzük azokat a mikroorganizmusok vagy a növények által a gyökérközegbe kiválasztott vegyületeket, amelyek a szomszédos növények növekedését gátolják. Mivel a szalicilsav és más benzoésav származékok erőteljesen befolyásolják más növények növekedését, allelopatikus anyagnak tekinthetők. A növekedésgátló hatást részben annak tulajdonították, hogy a SA hat a növények vízháztartására. A szalicilsav kezelés a hajtás és gyökér növekedésének gátlását okozta, csökkentette a hajtás száraz tömeget különböző fajokban, és gátolta az aktív ionfelvételt (Harper és Balke, 1981). Exogén szalicilsavval kezelt szója

növények a kontrollnál alacsonyabb vízpotenciált és kisebb sztómakonduktanciát mutattak (Barkosky és Einhellig, 1993). A SA növekedésgátlást és sztómazáródást okozott lóbabban (Manthe és mtsai, 1992), gátolta a plazmamembránban lokalizálódó H^+ -ATP-áz aktivitását (Bourbouloux és mtsai, 1998) és a K^+ , Mg^{2+} , Cl^- valamint SO_4^{2-} felvételét (Baziramakenga és mtsai, 1994). Vita van azonban abban a vonatkozásban, hogy a szalicilsav milyen fiziológiai folyamatok gátlásával éri el az allelopatikus a hatást. Az egyik elképzelés szerint ez a jelenség a SA sztómaregulációra és ezen keresztül a szomszédos növény vízháztartására gyakorolt hatásának a következménye (Barkosky és Einhellig, 1993), míg más elképzelés szerint a sztómazáródást sokkal kisebb SA koncentrációk kiváltják, mint amelyek szignifikánsan gátolják a növekedést (Manthe és mtsai, 1992).

A vízháztartás mellett a SA hat a fotoszintézisre is. Árpában 100 μ M-os SA kezelés csökkentette a levél növekedését, a klorofill- és fehérjetartalmakat, a fotoszintézis maximális sebességét és a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz (Rubisco) aktivitását (Pancheva és mtsai, 1996). Ezzel ellentétben a SA búzában fokozta a fotoszintetikus elektrontranszportot (Sahu és mtsai, 2002), és előkezelésben alkalmazva feloldotta a fotoszintézisgátló herbicid, a paraquat által indukált gátlást a széndioxid fixációra (Ananieva és mtsai, 2002). Az exogén SA kezelés fokozta a CO_2 fixálás sebességét, a Rubisco és a foszfoenol-piroszőlősav karboxiláz enzim aktivitását Cd stressz alatt kukoricában (Krantev és mtsai, 2008) és borsóban (Popova és mtsai, 2008).

Fontos szerepe van a szalicilsavnak az oxidatív stresszel kapcsolatos folyamatokban. Az egyik első enzim, amelyről bizonyították a SA gátló hatását, a H_2O_2 -t bontó kataláz volt (Chen és mtsai, 1993; Dat és mtsai, 1998), bár később kiderült, hogy ez a gátlás csak egyes izoenzimek esetében érvényesül (Horváth és mtsai, 2002). Részben a SA kataláz gátló hatásával magyarázták a H_2O_2 -t szintjének megemelkedését és az oxidatív stresszt indukáló hatást, amely a biotikus stresszfolyamatokban a hiperszenzitív reakcióhoz vezet. A H_2O_2 koncentrációjának megnövekedéséhez *Arabidopsis*-ban a SOD aktivitás fokozódása is hozzájárul, míg ugyanebben a növényben a SA az ugyancsak H_2O_2 -t bontó aszcorbát peroxidáz (APX) gátolta a hajtásban (Rao és mtsai, 1997). Az 1 mM SA megemelte a szuperoxidgyök generáló enzim, a NADPH oxidáz aktivitását búza növényekben (Agarwal és mtsai, 2005).

Részben a szubletális oxidatív stressz generálásával, és ennek következtében a redox-regulált, antioxidáns enzimek expressziójának fokozásával hozzák összefüggésbe a SA-nak azon

hatásait, amelyeket az abiotikus stresszorok hatásainak mérséklése kapcsán tapasztalhatunk. A SA előkezelés fokozta a növények rezisztenciáját az UV-B sugárzással és az ózonnal (Yalpani és mtsai, 1994), a paraquattal (Ananieva és mtsai, 2004), a hőstresszel (Larkindale és Knight, 2002), a hidegstresszel (Janda és mtsai, 1999), a vízhiánnyal (Bezrukhova és mtsai, 2001), valamint nehézfémstresszel (Mishra és Choudry, 1999) és szárazsággal (Horváth, 2007) szemben.

A korábbi vizsgálatokban a SA hatásai a sóstressz vonatkozásában ellentmondásosak voltak, mivel a hormont olyan növekedési fázisban alkalmazták, amikor esetleges ABS szintézist serkentő hatása gátolja a csírázást. A 100 mM NaCl kezelés alatt nagyobb mértékű oxidatív károsodás lépett fel a vad típusban, mint a SA-hiányos transzgenikus *Arabidopsis* vonalban, ami expresszálja a szalicilsav hidroxiláz (*NahG*) gént (Borsani és mtsai, 2001a). A túl kisméretű növény számára alkalmazott túl nagy koncentráció sem vezetett a sóstresszel szembeni rezisztencia tartós fokozódásához (Shakirova és mtsai, 2003). Exogén SA megakadályozta a sóstressz-indukált növekedésgátlást a sótoleráns búza genotípusban, de a sóérzékenyben ez nem történt meg (Arfan és mtsai, 2007). A só és PEG-6000 indukált ozmotikus stressz által kiváltott károsodás mérséklődött paradicsom növényekben hosszútávú szalicilsav előkezelést követően, és a csak ozmotikus stressznek kitett növények alacsonyabb SA koncentrációra is válaszoltak (Tari és mtsai, 2002b; Szepesi és mtsai, 2005).

A talajban lévő SA koncentrációk nagyságrendekkel alacsonyabbak az irodalmi áttekintésben felsorolt hivatkozások nagy részében használt koncentrációkhoz képest ($5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} M). A növényekben azonban környezeti stresszhatásra kialakulhat olyan SA koncentráció, ami a 10^{-4} M-os exogén SA oldatból felvételre kerül (Freeman és mtsai, 2005). Ezért kísérleteinkben a SA-t jóval alacsonyabb koncentráció intervallumban használtuk (10^{-8} - 10^{-4} M), és hosszú időtartamú előkezeléseket végeztünk.

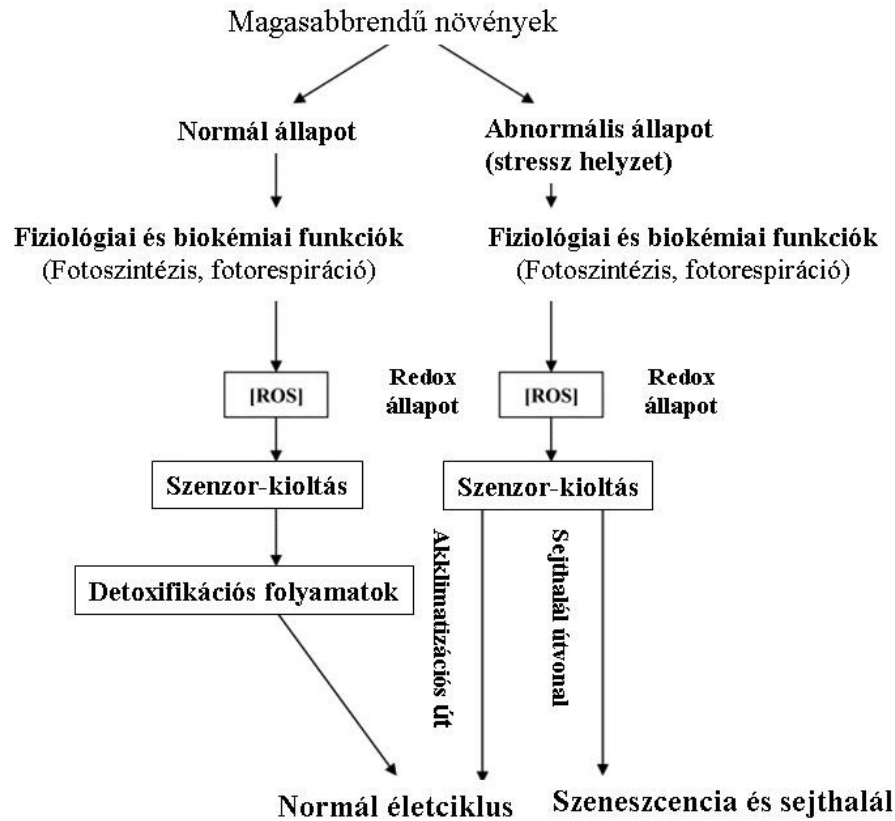
Az allelopatikus hatást kiváltó szalicilsav tehát hozzájárulhat a növények általános stresszrezisztenciájának fokozódásához.

2.6. Az oxidatív stressz

Mint az aerob élet evolúciós következménye, a molekuláris oxigén részleges redukciójával reaktív oxigén gyökök, szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxil gyök (HO_2^{\cdot}), H_2O_2 és hidroxil gyök (OH^{\cdot}) (ROS) keletkeznek. Az oxidatív stressz ezeknek a reaktív oxigénformáknak a toxikus

hatását jelenti. A reaktív oxigénformák különböző kémiai tulajdonságúak. A $O_2^{\cdot-}$ mérsékelten reakcióképes, rövid életidejű forma, ami nem képes a membránokon keresztüli diffúzióra. A hidroperoxil gyök a $O_2^{\cdot-}$ protonálódásával keletkezik, át tud lépni a biológiai membránokon, és lipid hidroperoxidok kialakításával képes a lipidek auto-oxidációjának iniciálására. Az OH^{\cdot} a legreaktívabb, ami a H_2O_2 redukciójával a Fenton reakcióban keletkezik, és képes valamennyi biomolekulával reakcióba lépni (Vranová és mtsai, 2002). A H_2O_2 viszonylag stabil, és a növényi szövetekben μ mólos koncentrációban is felhalmozódhat. A H_2O_2 képes a membránokon keresztüli mozgásra az akvaporinokon keresztül (Pastori és Foyer, 2002).

Az enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok a ROS kioltásával megvédik a sejteket az oxidatív károsodástól. Az antioxidáns védekezési rendszerekben és enzimkofaktorként betöltött szerepük mellett, az antioxidánsok befolyásolják a növényi növekedést és fejlődést is, a mitózistól és sejtelongációtól kezdve az öregedésig és a programozott sejthalálig (PCD). Legfontosabb, hogy kellő információt nyújtanak a sejt redox állapotáról és szabályozzák a génexpressziót, ami kapcsolódik az abiotikus és biotikus stresszválaszokhoz, így optimalizálják a védelmet és túlélést. A ROS és a ROS-antioxidáns kölcsönhatás, mint a különböző jelekre aktiválódó metabolikus kapcsoló, a metabolizmusból és a környezet változásaiból ered és szabályozza az akklimatizációs folyamatok vagy a sejthalál programok indukcióját.



3. ábra A fő antioxidánsok és a redox jelátvitel kapcsolt folyamatai a növényekben.

Optimális környezeti feltételek mellett a többkomponensű antioxidáns rendszer a növényi sejteket hatékonyan megvédi a ROS káros hatásaitól. Olyan környezeti stressz helyzetekben azonban, mint a szárazság, a sóstressz vagy patogéntámadás, a ROS képződése fokozódik, a celluláris antioxidáns kapacitás lecsökken és oxidatív stressz lép fel. Feltételezzük, hogy néhány környezeti stresszre megemelkedett tolerancia érhető el az oxidatív stressz elleni hatékony védekezési mechanizmussal rendelkező növényben. Ezt a feltételezést erősíti meg a következő megfigyelések:

- (i) a környezeti stresszhelyzetek növelik az antioxidáns enzimek aktivitásait és/vagy a transzkriptumok szintjeit,
- (ii) a megemelkedett antioxidáns aktivitás korrelál a megnövekedett oxidatív stressz toleranciával, és

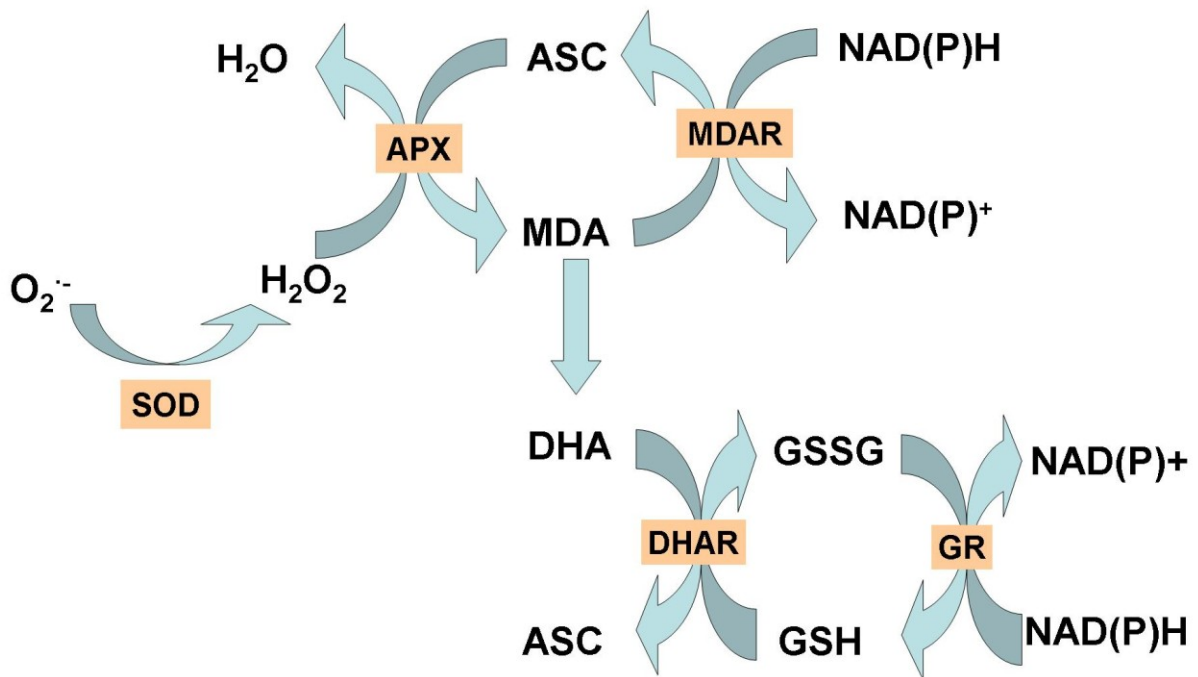
(iii) enyhe környezeti stressz alatt a növények megerősítik védelmi mechanizmusait, és sokkal toleránsabbá válnak más stresszekre (kereszt-tolerancia) (Bowler és Fluhr, 2000; Szalai és mtsai, 2009).

A növényekben három fő ROS-produkáló rendszert tartanak számon: (i) a kloroplasztiszban és a mitokondriumban található elektrontranszport rendszerek, (ii) egyes peroxidázok, a NADPH oxidáz, a xantin oxidáz, a lipoxigenáz, a glikolsav oxidáz és az amin oxidázok, (iii) olyan fotoszenzibilizáló molekulák, mint a klorofill (Dat és mtsai, 2000). Vízhányos állapotban maga az ABS lehet az apoplastikus H_2O_2 produkció legfőbb induktora (Hu és mtsai, 2006). Becslések szerint a növények által fogyasztott oxigén 1 %-a metabolizálódik ROS-ként a különböző sejtes kompartmentumokban.

Az enzimatis inaktiváló mechanizmusok elsőként említhető lépése a $O_2^{\cdot-}$ -t protonfelvétellel H_2O_2 -dá és O_2 -né alakító szuperoxid dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1). Az enzim különböző izoformái csaknem minden sejt-kompartimentumban, így a kloroplasztiszban (Cu-ZnSOD, Fe-SOD), mitokondriumban (Mn-SOD), a citoszolban (Cu-ZnSOD) és a peroxiszómában (Mn-SOD) is előfordulnak (Alsher és mtsai, 2002). A kloroplasztiszban lokalizálódó SOD által generált H_2O_2 -ot az aszkorbát peroxidáz alakítja vízzé, miközben az aszkorbát monodehidroaszkorbát gyökké (MDHA) oxidálódik. Ez utóbbi reakció részét képezi az ún. Halliwell-Asada ciklusnak (Asada, 1997).

A ciklus három egymástól függő redox párból áll össze: az aszkorbát/dehidroaszkorbát (AA/DHA), a glutation/oxidált glutation (GSH/GSSG) és a NADPH/NADP⁺ redox pár (May és mtsai, 1998). A ciklusban szereplő enzimek, az aszkorbát peroxidáz (APX, EC 1.11.1.11), a monodehidroaszkorbát reduktáz (MDHAR, EC 1.6.5.4), a dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR, EC 1.8.5.1) és a glutation reduktáz (GR, EC 1.6.4.2) felelősek az AA, a GSH és a NADPH redox ciklusáért (Noctor és mtsai, 1998).

2.6.1. A Halliwell-Asada-Foyer ciklus



4. ábra. Az aszkorbát-glutation ciklus (Halliwell-Asada-Foyer ciklus) folyamatai.

Az aszkorbát-glutation ciklus több sejtkompartimentumban, így a kloroplasztiszban, a mitokondriumban, a peroxiszómában és a citoszolban is működik. Az APX működésének eredményeként a H_2O_2 vízzé redukálódik, miközben MDHA keletkezik. A monodehidroaszkorbát redukciójára, vagyis a redukált aszkorbát pool helyreállítására végső soron a NADPH koenzim redukáló ekvivalensei használnak fel az MDHA reduktáz enzim katalizálta reakcióban. Az MDHA aszkorbáttá és dehidroaszkorbáttá is diszproporcionálódhat, amelyet a DHAR redukál vissza GSH-tól függő reakcióban. A kloroplasztiszban, az MDHA gyök szintén képes redukálódni aszkorbáttá a tilakoidhoz kötött, redukált ferredoxin által, ami hatékonyabb, mint az MDHAR általi redukció.

Az oxidált glutation (GSSG) redukcióját a glutation reduktáz (GR) végzi NADPH koenzimmel. Az aszkorbát pool redukáltsági fokának fenntartásában tehát döntő szerepe van a glutation pool nagyságának és redukáltsági fokának. A glutation azonban részt vesz a H_2O_2 eltávolításában is a glutation peroxidáz által katalizált reakcióban.

A hidrogén-peroxidot közvetlenül bontja vízzé és molekuláris oxigénné a peroxiszómában lokalizálódó kataláz (KAT, EC1.11.1.6). Bár az APX és a KAT egyaránt képes a H₂O₂ eltávolítására, funkciójuk nem teljesen azonos, mivel az APX sokkal nagyobb affinitást mutat a szubsztráthoz (μM-os nagyságrend), míg a KAT, amely mM-os szubsztrát koncentrációnál működik hatékonyan, inkább stresszfolyamatokban válik jelentőssé (Mittler, 2002).

A KAT több izoenzimmel rendelkezik. A KAT1 és a KAT2 a peroxiszómában lokalizálódik, míg a KAT3 mitokondriális enzim. Az ABS, a H₂O₂, a szárazság és a sóstressz indukálta a *KAT1* expresszióját *Arabidopsis*-ban, míg a *KAT2* és *KAT3* az ABS és a sóstressz hatására indukálódott (Xing és mtsai, 2007).

Az AA-GSH ciklus működése lehetővé teszi a glutation és az aszkorbát redukált, azaz aktív formáinak folyamatos regenerációját, és így szabályozza a citoplazmában a redox potenciált.

Az aszkorbát a legtöbb sejt-kompartimentumban jelen van, és létezik néhány útvonal, ami azt biztosítja, hogy az aszkorbát reciklizációja problémamentes legyen. Ha zavar történik az egyik útvonalban, akkor a többi útvonal képes a celluláris aszkorbát redox állapotának fenntartására. Mivel az apoplast kevés glutationt és DHAR-t tartalmaz, az apoplastban is található DHA-nak újra be kell lépnie a sejtbe, hogy aszkorbáttá redukálódhasson. Elegendő DHAR hiányában a DHA irreverzibilisen hidrolizál 2,3-diketogulonsavvá (Chen és Gallie, 2006). A DHAR enzim expressziójának változása befolyásolta a citoszolikus és apoplastikus aszkorbát redox állapotát is, hiszen a DHAR túlexpresszáltatása dohánylevelekben növelte az aszkorbát redukált formájának mennyiségét, míg a DHAR szupressziójának ellentétes volt a hatása. Ezek az eredmények azt feltételezik, hogy a DHAR sebességmeghatározó mennyiségben expresszálódik és jelentősen hozzájárul a celluláris aszkorbát redox állapotának stabilizálásához, legalábbis levelekben (Chen és Gallie, 2004; 2005).

2.6.2. Nem enzimikus antioxidánsok: az aszkorbinsav

Az aszkorbinsav a növények egyik fő antioxidáns vegyülete, ami képes detoxifikálni a reaktív oxigénformákat és fenntartani a fotoszintetikus funkciókat. Az aszkorbát kofaktorként működik enzimekben, mint a prolil- és lizil-hidrolázok, a xantofill ciklusban működő violaxanthin deepoxidáz, és a 2-oxosav-függő dioxigenázok, amelyek például az abszcizinsav és gibberellin növényi hormonok szintézisében is szerepelnek. Az aszkorbát részt vesz a fejlődési folyamatok

szabályozásában, mint például a sejtciklus vagy a sejtmegegyülés, a fotoprotekcióban és a fotoszintézis regulálásában, és olyan enzimek aktivitásának megőrzésében, amelyek proszotikus csoportként átmeneti fémionokat tartalmaznak. Aktív olyan antioxidáns folyamatokban is, amikor közvetlenül reagál a hidroxil gyökökkel, szuperoxiddal, szinglet oxigénnel és a hidrogén-peroxiddal (Noctor és mtsai, 1998b; Smirnoff és mtsai, 1996; Gupta és mtsai, 1999).

Az oxidált/redukált aszkorbát arányának növekedése néha stressz tünet lehet, hiszen a növény az antioxidáns oxidációjával válaszol a kialakult stresszhelyzetre.

2.6.3. Az aszkorbát és a H₂O₂ kapcsolata

A hidrogén-peroxid (H₂O₂) jelátvivő intermedierként működik a redox regulált reakciókban, és intermedierje az ABS-indukált jelátvitelnek is, ami sztómazáródáshoz vezet (Desikan és mtsai, 2001; Wendehenne és mtsai, 2004). A H₂O₂ tehát az ABS-indukált sztómazáródás közvetítője, eközben azonban nem emelkedik meg a koncentrációja toxikus mértékben, mivel a *KATI* expressziója is indukálódik ABS által. A kataláz aktivációja ezáltal negatív feedback szabályozója lehet a H₂O₂ jelátvitelnek. Exogén H₂O₂ kezelés indukálja a NO képződését is (Xing és mtsai, 2008). Az ABS-indukált NO szintézis elsősorban a H₂O₂ képződéstől függ, a H₂O₂ eliminálása vagy szintézisének gátlása meggátolja a NO képződést is (Bright és mtsai, 2006).

A DHAR-t ektopikusan expresszáló növények zárósejtjeiben az aszkorbát pool redukáltsága nagyobb mértékű, csökkent hidrogén-peroxid szintek detektálhatók, és csökkent a zárósejtek válaszadóképessége a H₂O₂-ra és ABS-ra. Ennek eredménye a sztómák nyitottságának növekedése (Chen és Gallie, 2004).

2.6.4. Aszkorbát-deficiens mutánsok

Arabidopsis thaliana aszkorbát-deficiens *vtc1* mutánsa a mutációt a GDP-mannóz pirofoszforiláz enzim génjében hordozza és a vad típus aszkorbát tartalmának mindössze 25-30 %-át akumulálja anélkül, hogy megváltozna az aszkorbát redox állapota. A mutáns növények hiperszenzitívek voltak ózonra, kéndioxidra, UV-B fényre, valamint lassabb hajtásnövekedést mutattak, kisebb leveleket fejlesztettek és csökkent a hajtás friss és száraz tömege is. (Colville és Smirnoff, 2008). A *vtc1* növények nem mutatnak jelentős különbséget a klorofill-*a*

fluoreszcenciában ezen körülmények között, a nem fotokémiai kioltás, az NPQ csak kissé csökkent a *vtc1* mutáns leveleiben. Nem volt változás a H₂O₂ mennyiségében sem.

A citoszolikus APX expressziója megnőtt a mutáns növényekben, a kloroplaszt APX izoformák vagy nem változtak vagy kicsit csökkentek.

A *vtc2* mutáns *Arabidopsis* növények a vad típus aszkorbát szintjének csak 10-30 %-át tartalmazták. A mutánsok krónikus fotooxidatív stresszt mutattak magas fényen és kifehéredtek, mikor áttették őket alacsonyról magas fényintenzitásra, amihez társult még a megnövekedett lipidperoxidáció és fotoinhibíció is. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy az alacsony aszkorbát tartalom nem képes javítani a fotoszintetikus aktivitást és oxidatív stresszt eredményez.

A celluláris aszkorbát abszolút mennyiségén kívül meghatározó még a stressz akklimatizáció szempontjából az aszkorbát redox állapota (azaz a redukált aszkorbát aránya az összes aszkorbáthoz képest). A dehidroaszkorbát redukálódásáért a DHAR enzim felelős, így szabályozza a celluláris aszkorbát redukáltsági fokát. Ez viszont hat a sejtnak a környezeti stresszre adott válaszára és toleranciájára. A DHAR enzim aktivitása a legnagyobb mértékű a fiatal levelekben. A DHAR enzim expressziójának gátlása jelentős klorofill-*a* veszteséget eredményezett, csökkent a Rubisco nagy alegységének mennyisége (RbcL) és a CO₂ asszimiláció szintje is ezekben a növényekben. Ennek következményeként, csökkent a levélexpanzió és a levél szárazanyag tartalma. A felgyorsult klorofill veszteség, illetve az RbcL és LHCII fehérjék mennyiségének csökkenése a fotoszintetikus funkciók mérséklődéséhez vezetett, és elkezdődött a levelek öregedése. Ezzel szemben a megnövelt DHAR expresszió magasabb klorofill, RbcL és LHCII tartalmakat eredményezett, így javultak a fotoszintetikus funkciók és a levélöregedés később kezdődött. A DHAR aktivitás fordítottan arányos volt a lipiperoxidációval, ezzel is mutatva, hogy a DHAR védelmet nyújt a reaktív oxigénformák károsító hatása ellen.

2.6.5. Az aszkorbát és a glutation kapcsolata

Az aszkorbát és a glutation redox állapotának változása egymással szoros kapcsolatban áll. A redukált glutation (GSH) elektrononként funkcionál a DHAR enzim reakciójához, ami az aszkorbátot regenerálja a dehidroaszkorbát redukációján át az aszkorbát-glutacion ciklus részeként. A GSH oxidált formája, az oxidált glutation (GSSG), ebből a reakcióból képződik, és ezt követően egy NADPH-függő GSSG reduktáz által redukálódik. Megállapították, hogy a GR túltermelő növényekben magasabb volt az aszkorbát mennyisége a levelek szöveteiben és a

növények nagyobb toleranciát mutattak az oxidatív stresszel szemben. Ezekkel az adatokkal mutat egyezést az az eredmény is, hogy a csökkent GR aktivitás megemelkedett stresszérzékenységgel párosult (Leipner és mtsai, 1999).

Ennek némileg ellentmond, hogy azok a növények, amelyek a kontroll GSH értékének csak 20 %-át tartalmazták, nem mutattak megváltozott toleranciát az oxidatív stresszre (May és mtsai, 1998). Továbbá, vannak olyan helyzetek, mikor az aszkorbát és a glutation külön-külön fejti ki a hatását.

2.6.6. A glutation (GSH)

A redukált glutation a növényekben is nagy mennyiségben jelenlevő, alacsony molekulásúlyú tiol (May és mtsai, 1998). Normál helyzetben elsősorban redukált formában van jelen (GSH), és csak kis része van oxidált állapotban (GSSG) (Noctor és mtsai, 2002). A GSH a növényi sejten belül többféle funkcióval rendelkezik. A GSH a növényekben redukált kénraktár, és ennek következtében fontos szerepe van a cisztein –SH csoportok redukált formájának fenntartásában is. A GSH nem enzimatikusan is reagál a szinglet oxigénnel, a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel (Kuzniak és mtsai, 2001), így az egyik legfontosabb nem enzimátikus antioxidáns.

A GSH fő funkciója az oxidatív stressz elleni védelemben az aszkorbát újra redukálása az AA-GSH ciklusban (Noctor és mtsai, 1998a), ezáltal közvetetten részt vesz a H₂O₂ koncentráció szabályozásában a növényi sejtekben (Kocsy és mtsai, 2001a). A nehézfémek által okozott stressz kivédésében a GSH szerepe kettős. Egyrészt prekuzora a fitokelatinoknak, a nehézfém ionokat komplexáló peptideknek, másik fő funkciója a nehézfém stressz által generált reaktív oxigénformák eliminálása (Noctor és mtsai, 2002). A glutation S-transzferázok szubsztrátjaként részt vesz a detoxifikációs folyamatokban.

Az oxidatív stresszel szembeni sikeres akklimatizációt meghatározza a glutation pool nagysága (Tari és mtsai, 2002a), de fontos a redukált és oxidált forma egymáshoz viszonyított aránya is (Kocsy és mtsai, 2004). A GSH szintézis regulációs pontját jelentő enzimet, a γ -glutamilcisztein szintetáz (γ-ECS-t) túltermelő transzgenikus nyárfá növények megemelkedett glutation szinteket mutattak, ami arra utal, hogy az enzim aktivitásának növekedése feloldja a GSH szintézis limitáltságát nyárfában (Strohm és mtsai, 1995; Noctor és mtsai, 1996). A növényekben a γ -ECS transzkripcionális kontrollja mellett (Schäfer és mtsai, 1997) poszt-

transzlációs mechanizmusok is hozzájárulhatnak a fokozott aktivitáshoz (May és mtsai, 1998). Mindezek együttesen mérsékelt GSH tartalom emelkedéshez vezettek.

A különböző abiotikus stresszorok jelentősen módosítják a GSH/GSSG arányt. Rézstressz hatására (de Vos és mtsai, 1992) és magas sókoncentráció következtében (Kellös és mtsai, 2008) jelentősen növekedett az oxidált forma mennyisége hólyagos habszegfűben, illetve kukoricában.

A glutationtartalom növekedése, ami társul az aszkorbát tartalom növekedésével egy koordinált egyensúlyt feltételez a két antioxidáns között, ami a DHAR által lehet kapcsolt. A különböző nem enzimatisz antioxidánsok pooljai között regulációs kapcsolat áll fenn, ami biztosítja, hogy az egyik antioxidáns hiányát a másik mennyiségének növekedése kompenzálja (Colville és Smirnov, 2008).

A ROS hatására aktiválódó enzimek biokémiai indikátorok lehetnek az oxidatív stressz elleni védekezésben betöltött szerepük alapján, és aktivitásuk emelkedése tükrözheti az adott növényi szervben kialakuló oxidatív stressz mértékét.

Kimutatták, hogy a SA gátolja a kataláz és az aszkorbát peroxidáz antioxidáns enzimeket dohányban, ezáltal növeli a H₂O₂ tartalmakat és a ROS mennyiségét (Durner és Klessig, 1997). Az antioxidáns enzimek ilyenfajta gátlása a SA által kevésbé kifejezett más növényfajokban, mint pl. a szójában (Sánchez-Casas és Klessig, 1994) vagy *Arabidopsis*-ban (Rao és mtsai, 1997) ahol a SA fiziológiás koncentrációban (<100 µM) nem gátolta jelentősen a katalázt vagy az aszkorbát peroxidázt (Rao és mtsai, 1997).

3. Célkitűzések

A biotikus stresszhatások során képződő, és annak kivédésében szerepet játszó szalicilsavról (SA) ismert, hogy eredményesen javította a növények abiotikus stresszorokkal szembeni ellenállóságát. A szalicilsav magas ($> 5 \cdot 10^{-4}$ M-os) koncentrációi a H_2O_2 -ot bontó kataláz gátlása miatt fokozzák az oxidatív stresszt, ugyanakkor azonban a hajtás oxidatív stresszel szembeni rezisztenciája is nő azáltal, hogy aktiválódhatnak a reaktív oxigénformák kioltásában szerepet játszó enzimek. Kísérleteink egyik alapgondolata az volt, hogy a szalicilsav, mint allelopatikus anyag, a fenti vizsgálatokban használt koncentrációknál jóval alacsonyabb koncentrációtartományban fejti ki hatását a növényekre, és a növények kitettsége is jóval hosszabb időtartamú. Ezért a szalicilsav előkezeléseket 10^{-7} M és 10^{-4} M SA koncentrációkkal és hosszú időtartamú kísérletekben (3 hét) végeztük. Tesztnövényként kitűnő modellnek bizonyult a termesztett paradicsom (*Solanum lycopersicum* Mill. L. cv. Rio Fuego), hiszen nagyüzemi termelése talaj nélküli kultúrában is történhet, ahol néha feltűnően jelentkezik a talajlakó baktériumok hiányából következően az indukált szisztémikus rezisztencia hiánya. A talajlakó mikroorganizmusok és allelopatikus hatást kiváltó növények gyökérexudátumában lévő szalicilsav kis mértékű, indukált stresszrezisztenciát okozhat.

Paradicsom (*Solanum lycopersicum* Mill. L.) növények sótoleranciájának fokozása

Kérdésként vetődik fel tehát, hogy az allelopatikus hatást kiváltó SA koncentrációk befolyásolják-e, s ha igen, milyen mechanizmussal a növények sóstresszel szembeni rezisztenciáját?

- Okoz-e az irodalmi adatoknak megfelelő változást, vagyis vízpotenciál csökkenést a hosszú időtartamú szalicilsav előkezelés, milyen változások történnek a paradicsom vízháztartási paramétereiben, vízpotenciáljában, ozmotikus potenciáljában?
- Történik-e SA előkezelés hatására ozmotikus adaptáció? Fokozza-e a SA a szerves ozmotikumok akkumulációját és esetlegesen szerves ozmotikumok szintézisét? Ha igen, melyek ezek a szerves ozmotikumok illetve ozmoprotektív anyagok, amelyek elősegítik az ozmotikus adaptációt sóstressz alatt?

- Mi a szerepe a SA-nak az akklimatizáció sikerességét meghatározó abszcizinsav bioszintézisének indukciójában és az ABS tartalmak változásában? Hat-e az előkezelés az egyik regulációs pontot jelentő abszcizinaldehid oxidáz aktivitásra? Hogyan változik az ABS koncentráció a sóstressz alatt?
- Hogyan változnak a stresszrezisztencia markerek, a klorofill-*a* fluoreszcenciaindukációs paraméterek, klorofill a/b arány és a lipidperoxidáció a 100 mM-os NaCl-dal kiváltott sóstressz alatt az előkezelt paradicsomokban?
- Hogyan hat a SA előkezelés az ABS által indukált védőmechanizmusok aktiválódására sóstressz alatt? Hogyan változik a poliaminok és a prolin koncentrációja az előkezelt növényekben?
- Hogyan hat a SA az enzimatis és nem enzimatis antioxidáns védőmechanizmusokra, így az aszkorbinsav és a glutation redukált és oxidált formáinak mennyiségére és a detoxifikációban szerepet játszó enzimek aktivitására? Vizsgáltuk továbbá, hogy miképpen befolyásolja az előkezelés ugyanezeket a paramétereket a sóstressznek kitett növényekben.
- A SA előkezelések hatására akkumulálódó prolin fontos kompatibilis ozmotikum és antioxidáns. Vizsgáltuk, hogy a különböző prolinkoncentrációk hogyan hatnak a paradicsom levélből izolált protoplasztok életképességére. Mikroszkópos festésekkel vizsgáltuk meg a sóstressz hatását prolin különböző koncentrációival kezelt protoplasztokon a nitrogén-monoxid és hidrogén-peroxid képződésére, és vizsgáltuk, hogy a kezelések milyen koncentrációviszonyok mellett javítják, vagy csökkentik a protoplasztok életképességét.
- A paradicsom antioxidáns védekező mechanizmusai sóstressz alatt összehasonlíthatók-e szárazságstresszre toleráns bab genotípusok válaszaival?
- A fentiek figyelembevételével jelen munka egyik célja volt a SA által indukált akklimatizációs folyamatok összehasonlítása a sótoleráns, vad paradicsom faj, a *Solanum pennellii* sóstresszre adott, az irodalomban leírt válaszreakcióival.

4. Anyagok, módszerek és a kísérleti rendszer ismertetése

4.1. Növények nevelési paraméterei

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* L. cvar Rio Fuego paradicsom növényeket vizsgáltunk. A magokat három napig, sötétben csíráztattuk 26 °C-on. Csírázás után a növények kéthetes korukig perlitben növekedtek, majd hidroponikus körülmények között, tápoldatban fejlődtek hathetes korukig. A tápoldat a következő elemeket tartalmazta: 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , és mikroelemeket (10^{-6} M MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-7}$ M ZnSO_4 , 10^{-7} M CuSO_4 , 10^{-7} M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10^{-5} M H_3BO_4), $2 \cdot 10^{-5}$ M Fe-EDTA, a tápoldat pH-ja 5,8 volt. A tápoldatot hetente kétszer cseréltük. A növények a következő nevelési paraméterek mellett fejlődtek: 12 órás nappali, 12 órás éjszakai periódus, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 55-60 %-os relatív páratartalom.

Az antioxidáns védekezési rendszer összehasonlítására bab növényeket (*Phaseolus vulgaris nanus* L.) használtunk fel. A magokat 1,0% NaOCl oldatban sterilizáltuk 30 percig és termosztátban 25 °C-on csíráztattuk. 2 nap múlva a csíranövénykéket műanyag edényekbe ültettük, ami 3 kg kerti homok és perlit 3:1 arányú keverékét tartalmazta. A növények üvegházban fejlődtek 14 órás nappali megvilágításban, 25/22 °C nappali/éjszakai hőmérséklet és 55-65% relatív páratartalom mellett. A fényintenzitás $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt. A növényeket naponta öntöztük és a szárazságstresszt a 14 napos növényeknél kezdtük alkalmazni vízmegvonással. A kísérlet végére a talaj víztartalom a teljes vízmegkötő képesség 40 %-ra csökkent le. Méréseinket a 3 hetes növények kifejlett primer levelein végeztük 7 nappal az öntözés megszakítása után. 5 genotípust kaptunk a Bánát Agráregyetemtől és bevontuk még kísérleteinkbe egy természetett, szárazságtűrő bab genotípust is (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Unidor (Phv 52)).

4.2. Alkalmazott kezelések

A szalicilsav előkezelés a növények 4 hetes korától 7 hetes koráig tartott, előzetes kísérletek alapján kiválasztott alacsony, 10^{-7} M és egy magasabb, 10^{-4} M-os koncentrációkkal. A sókezelést a növények 7 hetes korában 100 mM NaCl hozzáadása jelentette, a mintavétel a sókezelés előtt és

után 7 nappal történt meg. A méréseinket a gyökerekből és a csúcstól számított két legfiatalabb, de már teljesen kifejllett levélből végeztük.

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. Vízháztartási paraméterek vizsgálata

A levelek vízpotenciálját nyomáskamra segítségével (PMS Instruments Co., Corvallis, Oregon, USA), a sejt extraktum ozmotikus potenciálját automata ozmométerrel mértük (Digital Automatic Osmometer, Mikro GMS), a sztómakonduktanciát a levelek adaxiális és abaxiális felszínének közepén steady-state porométerrel (PMR-2, *PP Systems*) határoztuk meg.

A szövetek relatív víztartalmát a $100 \times (\text{friss tömeg} - \text{száraz tömeg}) / (\text{teljesen telített szövet tömege} - \text{száraz tömeg})$ egyenlet alapján, a relatív növekedési sebességet a $(\text{teljes növény friss tömege } t_1 \text{ időpontban} - \text{a teljes növény tömege } t_0 \text{ időpontban}) / \text{a teljes növény tömege } t_0 \text{ időpontban}$ képlet szerint számoltuk.

4.3.2. K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) felvétel mérése

A K^+ felvétel monitorozásához $^{86}\text{Rb}^+$ izotópos jelölést alkalmaztunk (Zsoldos és mtsai, 1993). A felvételi oldat 1 mM KCl-ot, 0,5 mM CaCl_2 -ot és 185 kBq/l aktivitású $^{86}\text{RbCl}$ izotópot tartalmazott. A 3 hetes paradicsom növényeket a felvételi oldatban egyidejűleg vagy az izotópos felvételt megelőzően 24 óráig 10^{-7} M SA és 10^{-4} M SA-val kezeltük. A felvételi kísérlet időtartama 6 óra volt. A kísérletek értékelését PACKARD PRIAS PL folyadék szcintillációs számlálóval végeztük.

4.3.3. Az elemtartalmak meghatározása atomabszorpciós spektroszkópiával

Az elemtartalmak meghatározása Hitachi Z-8200, Zeeman polarizált spektrofotométerrel, lángatomionizálással, levegő-acetilén láng alkalmazásával történt (Tari 2003/04.).

4.3.4. A fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása

A klorofill fluoreszcencia-méréseket pulzus amplitúdó-modulált fluoriméter, PAM-2000 (Walz, Effeltrich) segítségével végeztük. A 20 percig sötétadaptált mintákon az F_v/F_m -et, az F_0 -t, a fényadaptált mintákon az effektív kvantumhasznosítást $((F_m' - F_s)/F_m' = \Delta F/F_m')$, Φ_{PSII} , az elektrontranszport sebességét (ETR), a steady state fluoreszcenciát (F_s), a fotokémiai kioltási paramétert ($qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$) és a nem fotokémiai kioltást ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$) határoztuk

meg. A mérőfény intenzitása 0,5, a szaturációs pulzus intenzitása $3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt, míg az aktív fény erőssége $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Váradí és mtsai, 2000).

4.3.5. Klorofill és karotinoid tartalmak meghatározása

A klorofill és a karotinoid pigmenttartalmak meghatározásánál Lichtenthaler (1987) módszerét használtuk fel. A klorofilok kivonása két fázisban történt. 25 mg tömegű levélszövethez 1,5 ml 100%-os acetont adtunk hozzá, és 24 órán keresztül állni hagytuk. Ezután lecentrifugáltuk (15000 rpm, 15 perc, 4°C), majd a felülúszót félretéve, 1,5 ml 80%-os acetonnal ismét 24 órás extrakciónak vetettük alá a mintát. A kísérlet végén 80%-os acetonnal valamennyi mintát 3 ml-re egészítettünk ki. Az abszorpcióméréseket KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével végeztük. Az extraktumok pigmenttartalmait 470, 646,8 és 663,2 nm-en mért abszorpciók alapján számítottuk ki a következő képletek alapján:

$$Kl-a = 12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}$$

$$Kl-b = 21,50 \cdot A_{646,8} - 5,10 \cdot A_{663,2}$$

$$Kl-a+b = 7,15 \cdot A_{663,2} + 18,71 \cdot A_{646,8}$$

$$\text{Karotinoidok} = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot Kl-a - 85,02 \cdot Kl-b) / 198$$

A pigmentek mennyiségét $\mu\text{g/g}$ friss tömegre vonatkoztattuk.

4.3.6. Az abszcizinsav tartalom mérése kompetitív ELISA-val

A növényi anyagot 100 mM-os NaHCO_3 és metanol 20:80 (v:v) elegyében 100 ml-ként 1 mg butilált hidroxitoluolt (BHT) tartalmazó pufferrel extraháltuk. 1 g növényi anyagra 15 ml hideg extraháló puffert számítottunk. Az extrakciós elegyet 48 óráig 4 °C-on a növényi anyagon hagytuk, majd a homogenizátumot hűtött centrifugában 12 000 g-vel, 4°C-on, 20 percig centrifugáltuk. Az üledéket újabb 5 ml hideg extrakciós pufferrel extraháltuk 24 óráig. Centrifugálást követően a felülúszókat egyesítés után vákuum evaporátor segítségével 4°C-on bepároltuk. A mintát 2 ml ioncserélt vízzel vettük fel, majd Phytodetek, ABA kompetitív ELISA kit segítségével (Cat. Number: PDK 09347/0096) határoztuk meg az abszcizinsav tartalmakat. A standard görbét (+) cisz/transz abszcizinsav felhasználásával a gyártó által, leírt módon, 0,0064-1000 pmól ml⁻¹ ABS koncentráció intervallumban készítettük el. Az alkalikus foszfatázzal jelzett ABS (tracer) és a növényi extraktumban levő ABS kompetitíven kötődik a mikrokád falát fedő

antitesthez. Az alkalikus foszfatáz reakció aktivitását 405 nm-en mértük Dynatech ELISA leolvasó segítségével (Szepesi és mtsai, 2009).

4.3.7. Az abszcizin-aldehid oxidáz (AO) (EC 1.2.3.1) aktivitás mérése

A növényi kivonat elkészítését Sagi és mtsai (1999) módszere alapján végeztük. A minta 1 g-ját jégben hűtött rendszerben 2 ml extrakciós pufferben eldörzsöltük. A puffer 1 mM-os EDTA-t, 1 mM-os dithiothreitol, 5 mM-os redukált glutationt, 0,5 mM-os L-ciszteint, 5 μ M FAD-ot, 8 μ l 2 mM-os antipain, 2 μ l 100 mM-os fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) és 4 μ l 20 mM-os $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott 500 mM-os TRIS-HCl (pH 8,3) pufferben. A növényi szövet és a puffer aránya 1:2 (w:v) volt a gyökerek, 1:6 (w:v) a hajtás esetében. Centrifugálást követően a felülúszót gélelektroforézisre használtuk.

A fehérjetartalom meghatározása után (Bradford, 1976) a hajtásból 400 μ g, a gyökérből 100 μ g fehérje került felvitelre zsebenként a poliakrilamid gélre. Az elektroforézist 7,5 %-os natív poliakrilamid gélben 3 óráig, 4°C-on végeztük (Laemmli, 1970). Ezután a gél 0,2 M-os foszfátpufferben (pH 7,5) mostuk 10 percig, amit enyhe rázás mellett az enzimreakció szubsztrátjaival történő kezelés követett szobahőmérsékleten. Szubsztrátként 1 mM-os indol-3-aldehydet vagy α -naftaldehydet használtunk 0,1 mM fenazin metosulfátot és 1 mM MTT-t (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium-bromid)-ot tartalmazó, 0,1 M-os TRIS-HCl pufferben (pH 8,0). A keletkező színreakció kvantifikálását KODAK Elektroforézis Dokumentációs és Analízis Rendszer (EDAS) 290 felhasználásával, KODAK 1D Image Analysis szoftver (Eastman Kodak Company, 2000-2001) segítségével végeztük.

4.3.8. Az összes cukortartalom, a szacharóz, a glükóz és a fruktóz meghatározása

A cukortartalmak mérésére a friss növényi anyagot folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, és 2 mM HEPES pufferrel 80 %-os etanolban (pH 7,5) homogenizáltuk. A mintákat 1 óráig 80 °C-os vízfürdőben extraháltuk, majd centrifugálás után az üledéket további 5 ml pufferrel extraháltuk. A teljes extraktumot vákuum bepárlóban 45 °C-on szárazra pároltuk. A bepárolt mintákat 3 ml desztillált vízben 0,3 g polivinil-polipirrolidon (PVPP) hozzáadásával vettük fel, amelyet 30 perces centrifugálás követett. Az összecsukor mennyiségének meghatározására a Dubois-féle (1956) fenol-kénsavas módszert használtuk.

A szabad glükóz, fruktóz és szacharóz mennyiséget a Boehringer-Mannheim/R-Biopharm 0 716 260 katalógusszámú, a NADPH UV-abszorpcióján alapuló szacharóz, glükóz, fruktóz meghatározására kidolgozott teszttel végeztük a gyártó utasításai alapján.

4.3.9. A szorbitol tartalom meghatározása

A szorbitol meghatározását a Boehringer-Mannheim/R-Biopharm 0 670 057 katalógusszámú szorbitol/xilitol meghatározására kidolgozott teszttel végeztük. A reakció alapelve, hogy a D-szorbitol a NAD⁺ koenzimmel működő szorbitol dehidrogenáz enzim katalizálta reakcióban D-fruktózzá alakul. A reakció egyensúlya a fruktóz képződés felé akkor tolódik el, ha a keletkező NADH-t folyamatosan eltávolítjuk. A NADH oxidációját a diaforáz enzim végzi jódnitrotetrazólium klorid szubsztráttal. A NADH-val sztöchiometrikusan keletkező formazán abszorpciója 492 nm-nél mérhető.

4.3.10. Az aldóz reduktáz (ALR) (EC 1.1.1.21.) enzim aktivitásának meghatározása nyers növényi kivonatból

A 0,5 g növényi anyagot hűtött dörzscsészében 2,5 ml homogenizáló eleggyel (0,1 M-os pH 7-es foszfát puffer, 0,2 mM PMSF, 10 mM dithiothreitol (DTT)) 1% (w/v) polivinil-polipirrolidon (PVPP) jelenlétében eldörzsöltük, majd 20 percen keresztül 12 000 g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. Az enzim aktivitását a NADPH fogyásával fotometriásan határoztuk meg 340 nm-en DL-glicerinaldehid, glükóz-6-foszfát vagy α -naftaldehid szubsztráttal. Az 1 ml végtérfogatú reakcióelegy 200 μ l enzimm kivonatot, 20 mM-os DL-glicerinaldehid vagy α -naftaldehid szubsztrátot, 50 mM-os, 7-es pH-jú foszfát puffert és 2 mM-os NADPH-t tartalmazott. A reakciót a NADPH hozzáadásával indítottuk, és az enzimaktivitás meghatározására az 1. és 2. perc között mért extinkcióváltozást használtuk fel. Egy egységnek azt az enzimmennyiséget tekintjük, amely 1 μ mol NADPH oxidációját katalizálja 1 perc alatt. A specifikus enzimaktivitást enzimegység (U) mg^{-1} fehérje mértékegységben adtuk meg (Mundree és mtsai, 2000).

4.3.11. Poliaminok analízise HPLC-vel

A poliaminokat Flores és Galston (1982) módszerével a Tari és Csiszár (2003) által leírt protokoll szerint határoztuk meg. A növényi szöveteket 5 %-os perklórsavban homogenizáltuk 0 °C-on. Belső standard-ként 1 μ M-os diaminohexánt adtunk a mintákhoz. Centrifugálás után (4°C,

20 perc, 15 000g), a felülúszót 2 ml 2 M NaOH-val közömbösítettük. A poliaminokat benzoil-kloriddal származékká alakítottuk, majd a benzoil-poliaminokat 2x3 ml dietiléterrel extraháltuk. A szerves fázist szárazra pároltuk. A benzoil-poliaminokat HPLC-n (JASCO HPLC System, Japán), fordított fázisú oszlopon (Apex C18 5 μ ; 250x4,6 mm), acetonitril:víz 45:55 (v:v) elegyével választottuk el, és UV detektor segítségével 254 nm-en azonosítottuk.

4.3.12. Prolin tartalom meghatározása

A szabad prolin tartalmat Bates (1973) szerint határoztuk meg. Kb. 1 g friss növényi anyagot homogenizáltunk 3 %-os vizes szulfoszalicilsavban. A szűrt homogenátumot (2 ml) reagáltattuk 2 ml savas ninhidrinnel és ecetsavval 100°C-on 1 óráig, és a reakciót leállítottuk jeges vízfürdőben. A reakcióelegyet 4 ml toluollal extraháltuk és erősen vortexeltük 10-15 s-ig. A toluol tartalmú kromofórt a vizes fázisból kivontuk és melegítettük szobahőre. Az abszorbanciát felvettük 520 nm-en, toluolt használva vakként. A prolin koncentrációt ($\mu\text{mol g}^{-1}$ friss tömeg) standard görbe alapján határoztuk meg.

4.3.13. Malondialdehid (MDA) tartalom mérése

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

4.3.14. Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása

4.3.14.1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1)

A növényi szöveteket (1 g) folyékony N₂-ben fagyasztottuk, és jégen 3 ml extrakciós pufferben homogenizáltuk (1 mM EDTA-t, 1 mM PMSF-et, 13 mM metionint és 1 % PVPP-t tartalmazó 50 mM-os foszfát puffer, pH 7,0), majd 20 percen keresztül 12 000 g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. A 3 ml-nyi reakcióelegy 50 μl enzimkivonatot, 50 mM-os nitroblue tetrazóliumot (NBT) és 0,2 mM-

os riboflavint tartalmazott. A 15 perc után keletkezett formazán extinkcióját 560 nm-en mértük. A SOD aktivitást az NBT riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukciójának gátlása alapján határoztuk meg (Dhindsa és mtsai, 1981). Egy enzimegység azt az enzimmennyiséget jelenti, amely az NBT redukciójának 50 %-os gátlását okozza fény jelenlétében. Az enzimaktivitást $U\text{ perc}^{-1}\text{g}^{-1}$ friss tömeg egységben adtuk meg

4.3.14.2. Kataláz (KAT)(EC 1.11.1.6)

Az enzimaktivitást a SOD-nál leírtak szerint preparált növényi kivonat 100 μl -ét, 50 mM-os 7,0-es pH-jú foszfát puffert ill. 1 %-os H_2O_2 -ot tartalmazó, 3 ml térfogatú reakcióelegyben mértük. A H_2O_2 bomlását 240 nm-en, az 1. és 2. perc között mért extinkcióváltozásból határoztuk meg. Egy enzimegység (U) az az enzimmennyiség, mely 1 μmol H_2O_2 elbontását katalizálja 1 perc alatt (Upadhaya és mtsai, 1985).

4.3.14.3. Guajakol peroxidáz (POD) (EC 1.11.1.7)

Az enzimaktivitást a SOD-nál leírtak szerint preparált növényi enzimkivonatból határoztuk meg. A 25 μl fehérjekivonatot, 1 %-os guajakolt, 50 mM-os 7-es pH-jú foszfát puffert és 1 mM-os EDTA-t 1,5 ml végtérfogatban tartalmazó elegyben a reakciót 1 %-os H_2O_2 oldat hozzáadásával indítottuk, majd az enzimaktivitást a 470 nm-en mért abszorpció 1 perc alatti növekedéséből számítottuk. Enzimegységnek az 1 μmol tetraguaiakol képződését 1 perc alatt katalizáló enzimmennyiséget tekintjük (Upadhaya és mtsai, 1985).

4.3.14.4. Glutation reduktáz (GR) (EC 1.6.4.2)

A reakcióelegy a SOD-nál leírtak szerint preparált 50 (hajtás) vagy 100 μl (gyökér) fehérjekivonatot, 2 mM-os NADPH-t, 20 mM-os GSSG (glutation diszulfid)-ot tartalmazott 0,2 M-os 7-es pH-jú foszfát pufferben, 0,75 ml végtérfogatban. A reakciót 3 mM-os 5,5'-ditio-bis(2-nitro-benzoészav) (DTNB) hozzáadásával indítottuk, amelyet a GR által katalizált reakcióban keletkezett GSH redukál, és az extinkcióváltozást 412 nm-en 1 percig mértük. Egy enzimmennyiség az az enzimmennyiség, amely 1 μmol GSSG redukcióját katalizálja egy perc alatt (Smith és mtsai, 1988; Csiszár és mtsai, 2004).

4.3.14.5. APX-aszkorbát peroxidáz (EC 1.11.1.11)

Az aszkorbát peroxidáz enzim meghatározása Nakano és Asada (1987) protokollja szerint történt. A fagyasztott minták extrahálását 50 mM-os kálium foszfát pufferben végeztük (pH 7,0), amibe még 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 % PVP és 1 mM redukált aszkorbát került. A homogenátumot Eppendorff-centrifugában 14000 rpm-en, 4°C-on, 20 percig centrifugáltuk. Méréshez a felülúszót használtuk.

A reakcióelegy 50 mM-os kálium foszfát puffert (pH 7,0), 0,25 mM redukált aszkorbátot, 10 µl enzimkivonatot tartalmazott. A reakciót 5 µl 200 mM H₂O₂ hozzáadásával indítottuk. A mérés kvarcküvetében 290 nm hullámhosszon történt. A kapott OD értékeket az aszkorbát nem specifikus degradációjával korrigáltuk. A specifikus aktivitás számítása 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ extinkciós koefficiens használatával történt.

4.3.15. Nem enzimatis antioxidánsok vizsgálata fotometriás módszerrel

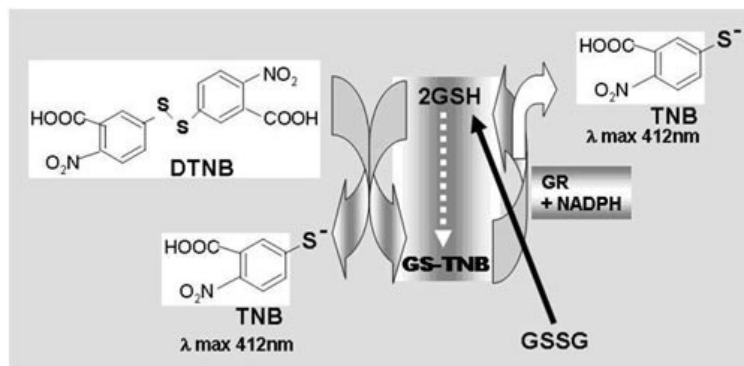
4.3.15.1. Az összes aszkorbát és a redukált aszkorbát tartalom meghatározása

Az összes aszkorbát és a redukált aszkorbát meghatározását Law és mtsai (1983) által kidolgozott módszer leírása szerint végeztük. A növényi mintákat 5 %-os triklórecetsavban (TCA) homogenizáltuk, majd 6000 rpm-en 20 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót használtuk tovább az összes, a redukált és a dehidroaszkorbát meghatározásához. Az összes aszkorbát méréséhez 100 µl 10 mM dithiothreitol (DTT) adtunk a félkémcsövekhez és inkubáltuk az elegyet szobahőn 10 percig, ezzel a lépéssel redukáltuk az összes dehidroaszkorbátot aszkorbáttá.

Ezt követően 30 másodpercig 100 µl 0,5% N-etil-maleimidet (NEM) adtunk a reakcióelegyhez. A redukált aszkorbát meghatározásához a DTT és a NEM helyett 200 µl tisztított vizet adtunk. Minden félkémcsőhöz 500 µl 10% TCA-t, 400 µl 43% H₃PO₄-ot, 400 µl 4% α-α'-bipiridilt és 200 µl 3% FeCl₃-ot adtunk. Vortexelés után 37°C-on inkubáltuk a mintákat 1 órán keresztül. Az oldatok optikai denzitását 525 nm-en mértük KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével. Az aszkorbát tartalmak meghatározásához standard görbét készítettünk redukált aszkorbáttal. A dehidroaszkorbát mennyiségét az összes aszkorbát és a redukált aszkorbát tartalom különbsége adta meg.

4.3.15.2. Összes glutation és oxidált glutation tartalom meghatározása

Az összes glutation és oxidált glutation mennyiségét Griffith (1980) módosított módszere szerint határoztuk meg. A módszer alapja egy olyan enzimátikus reciklizálás, ami a glutation redukáz enzim működésén alapszik (5. ábra). A TNB keletkezés rátája egyenes arányban áll a reciklizáló reakcióval, ami viszont szintén egyenesen aránylik a minta GSH koncentrációjához. A TNB keletkezés kinetikájának követése spektrofotométer segítségével 405 nm hullámhosszon lehetővé teszi a minta GSH tartalmának pontos meghatározását. Az oxidált glutation tartalom meghatározása ugyanezen az alapelven működik annyi különbséggel, hogy 1 órán át 2-vinilpiridint adtunk az extraktumhoz, hogy elimináljuk a glutation redukált formáját. Standardként oxidált glutationt használtunk. A reakcióelegy tartalmazott 0,1 M-os Na-foszfát puffert (pH 7,5), 1 mM DTNB oldatot és 1 mM NADPH-t és a növényi enzimkivonatot. A reakció az élesztő enzim (GR baker's yeast, Sigma) hozzáadásával indult (enzimaktivitás: 1 unit/ml). A mérés 405 nm hullámhosszon történt KONTRON Uvikon Double-Beam spektrofotométer segítségével. Az 1 perc alatti abszorbancia változából határoztuk meg a glutationok mennyiségét, standardként oxidált glutationt felhasználva. A redukált GSH mennyiségét úgy kaptuk meg, hogy az összes glutation mennyiségéből kivontuk az oxidált glutation mennyiségét.



5. ábra: A redukált glutation (GSH) és az oxidált glutation (GSSG) kvantitatív meghatározásának módszere az enzimátikus reciklizáló módszer felhasználásával (Rahman és mtsai, 2007)

A GSH reakcióba lép az Ellman reagenssel (DTNB=(5,5'-ditio-bisz(2-nitrobenzoésav)) , hogy TNB (5-tio-2-nitrobenzoésav) és GS-TNB (a GSH és a TNB konjugátuma) keletkezzen. A GS-TNB aztán redukálódik redukált glutationná és GSSG-vé a GR és a NADPH által (reciklizáció). A keletkezett TNB mennyisége mérhető 405-412 nm hullámhosszon.

4.3.16. Protoplasztok készítése paradicsom növények leveléből, majd a protoplasztok kezelése

Kontroll paradicsom növények csúcshoz közeli, fiatal leveleit ollóval levágtuk. Szacharózos K3 oldatot tartalmazó Petri csészékbe 3-3 szép levelet gyűjtöttünk. A levelet fonákkal felfelé helyeztük a Petri csészékbe, és éles szike segítségével 2-3 mm-es csíkokra vágtuk, a főeret pedig kivágtuk. Az ily módon elkészített leveleket áttettük másik, szacharózos K3-at tartalmazó Petri csészékbe fonákkal lefelé, és kb. 10 percig tartottuk benne. Ezután leszívtuk a K3-at Pasteur pipetta segítségével és kb. 10-15 ml 2 %-os, celluláz R-10-et (Sigma) és 0,5 %-os macerozim R-10 (Sigma) sejtfallbontó enzimeket tartalmazó 0,4 M-os szacharózos K3 oldatot (pH=5,5) pipettáztunk a Petri csészékbe. Másnap reggel Pasteur pipettával óvatosan összekevertük az enzimes levélkivonatot, majd átpipettáztuk steril acélszűrőn kis Erlenmeyer lombikokba. A lombikok tartalmát átpipettáztuk Wassermann csövekbe úgy, hogy a tetejükről 2-3 ml hiányozzon. Ezután egy pipettányi W5 mosóoldatot rétegeztünk rá és kupakkal lezártuk. Kis fordulaton 5 percig centrifugáltuk, a protoplasztok a 2 réteg között, gyűrűben gyűltek össze. Ezután a protoplasztokat a felső réteggel átszívtuk újabb Wassermann csövekbe, és ismét feltöltöttük W5 mosóoldattal. Ezután ismét a lehető legkisebb fokozaton kb. 5 percig centrifugáltuk őket, aminek a hatására a protoplasztok végül leülepedtek a csövek aljára. Végül a W5 oldatot leszívtuk és a mintákat feltöltöttük a kívánt térfogatra a paradicsom protoplasztok tárolására alkalmas pufferrel.

Ezt követően kezeltük meg a protoplasztokat egyrészt 10^{-7} M és 10^{-4} M szalicilsav oldatokkal, 100 mM-os NaCl-dal, valamint különböző koncentrációjú prolin oldatokkal (1 mM és 100 mM) és a protoplasztok életképességét vizsgáltuk 2,5 illetve 5 óra elteltével. Mértük az egyes kezelések hatására bekövetkező változásokat a H_2O_2 és NO tartalmakban.

A kezelésekre használt anyagokat a protoplasztok fenntartására használt pufferben oldottuk fel. A sókezelés hatásának tanulmányozásakor 100 mM-os NaCl kezelést adtunk a már izolált protoplaszt kultúrához, amivel együtt azonos ozmotikus koncentrációval csökkentettük az inkubáló oldat mannitol tartalmát. Ezzel egyidőben alkalmaztuk a szalicilsavas kezelést is, melyek közül az előkísérletek során a növényeknél már hatásosnak bizonyult 10^{-4} M-os és 10^{-7} M-os koncentrációkat választottuk ki.

A K3 oldat összetétele

25 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -t és 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t 100 ml tisztított vízben kell feloldani, ebből 1 ml-t teszünk a törzsoldatba. A K3 oldatot lefagyasztva tároljuk. Használat előtt a K3-hoz hozzáadjuk a szacharózt (0,4 M) és beállítjuk a pH-t (5,5). A W5 mosóoldatot a K3 oldathoz hasonlóan szintén lefagyasztva tároljuk. Használat előtt a pH-t 5,8-ra állítjuk.

4.3.17. Protoplaszt életképesség vizsgálata sejt vitalitást jelző festékkel (FDA-fluoreszcein diacetát)

Az életképesség meghatározása

Az élő és nem élő sejtek elkülönítésére 10 μM fluoreszcein-diacetát (FDA, Sigma) festéket alkalmaztunk. Az eljárás azon alapszik, hogy a fluoreszcein diacetát apoláros molekula, amely könnyen áthatol a membránok lipidfázisán. Ezt a festéket az élő sejtek felveszik, majd az intracelluláris térben levő aspecifikus észterázok elhidrolizálják, ami által a nem fluoreszcens FDA-ból fluoreszcens szabad fluoreszcein keletkezik, ami hidrofil karaktere miatt nem tud kiáramlani az ép sejtmembránnal rendelkező sejtéből. Ezzel szemben az elpusztult sejtek vagy nem hidrolizálják az FDA-t, mert enzimeik inaktiválódtak, vagy ha hidrolizálják is, abban az esetben a szabad fluoreszcein áramlik ki a sejtéből. Tehát ennek a festési eljárásnak az alkalmazásakor az élő sejtek mutatnak fluoreszcenciát, az elpusztult sejtek pedig nem.

Paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok esetében a festéket az egyes kezelések alkalmazása után 2,5 illetve 5 órával adtuk a protoplaszt kultúrákhoz, majd az 5 perces inkubáció után a felesleges festék eltávolítása érdekében 5 perces mosást alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyelést ezek után Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük el. Az excitáció hullámhossza $\lambda=495 \text{ nm}$, fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai, 2003). A felvételek készítésénél protoplasztoknál 20x-os objektívet alkalmaztunk. Az expozíciós idő mindig azonos, protoplaszt kultúráknál 773 ms volt. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR). A protoplasztok életképességének elemzése nagy teljesítményű számítógép segítségével, az Axiovision 4.5 nevű programmal történt.

4.3.18. A H₂O₂ felszabadulás detektálása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztokban

Az egyes kezelések hatására bekövetkező H₂O₂ felszabadulást egy arra alkalmas fluoreszcens festékkel 10 μM 2,7-diklorofluorescein-diacetáttal (DC-FDA) detektáltuk. A festék zöld fluoreszcenciát mutató formája a H₂O₂ jelenlétét jelzi a sejtben. A festés 15 percen keresztül történt, 37 °C-on. Ezután 1 percen belül 2-szer mostuk a protoplasztokat W5 pufferrel. Ezután vizsgáltuk a protoplasztok általi H₂O₂ produkciót Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az excitáció hullámhossza λ=495 nm, fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai, 2003). Az expozíciós idő mindig azonos volt, 553 ms. A felvételek készítésénél 40-szeres objektívet alkalmaztunk. A protoplasztokról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR). A H₂O₂ zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a pixel intenzitást, ami a H₂O₂ tartalommal arányos. A H₂O₂ kioltását a negatív kontroll készítésekor 1 mM aszkorbáttal végeztük.

4.3.19. Protoplaszt NO (nitrogén-monoxid) tartalom meghatározása DAF-2DA (diamino fluorescein diacetát) festékkel

Az egyes kezelések hatására felszabaduló NO-ot egy arra alkalmas fluoreszcens festék segítségével a diamino-fluorescein diacetáttal (DAF-2-DA, 10 μM) detektáltuk. A festés 30 percen keresztül történt, szobahőmérsékleten, sötétben. Ezután egyszer mostuk a paradicsom protoplasztok tárolására alkalmas pufferrel, 5 percen keresztül, majd vizsgáltuk a protoplasztok NO produkcióját Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az excitáció hullámhossza λ=495 nm, fluoreszcencia mérése 515 nm-nél történt (Räthel és mtsai, 2003). Az expozíciós idő mindig azonos volt, 3,01 s. A felvételek készítése során 40-szeres nagyítású objektívet alkalmaztunk. A protoplasztokról fotót készítettünk nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR). A NO zöld fluoreszcenciája alapján megmértük a pixel intenzitást, ami a NO tartalommal arányos. Az értékelés minden esetben az Axiovision 4.5 nevű program segítségével történt. A NO kioltására negatív kontrollként cPTIO-t alkalmaztunk.

4.3.20. Statisztikai analízis

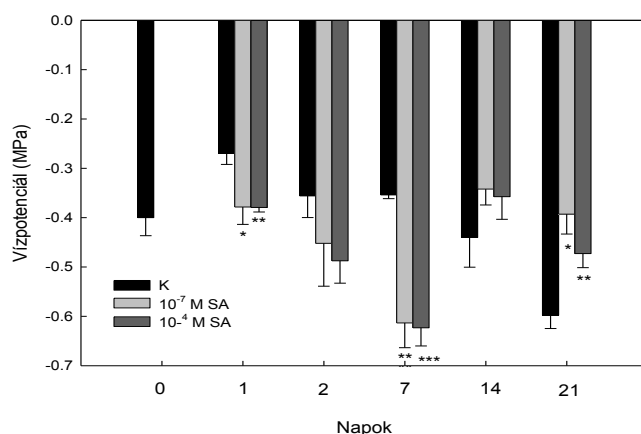
A kísérleteket háromszor ismételtük. A feltüntetett adatok 3-6 egymástól függetlenül készített ismétlés átlagai a standard hibával. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket Student-féle t -teszttel állapítottuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken SigmaStat 3.11 nevű szoftver használatával. Más esetben ugyanezen program segítségével a varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk $P \leq 0.05$ tekintve szignifikánsnak.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A szalicilsav, mint allelopatikus anyag

A szalicilsav hatása paradicsom növények vízháztartására

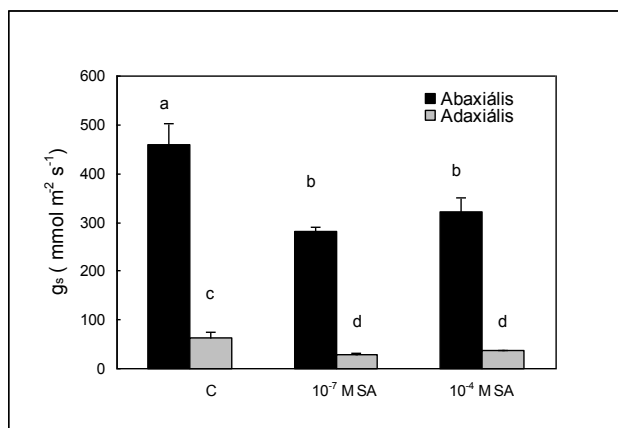
A mikrobiális tevékenység vagy a szomszédos növények gyökérexudációja következtében a talajban megjelenő allelopatikus hatású szalicilsav hat a növények vízháztartására, amelyet a SA kezelés után bekövetkező vízpotenciál (VP), ozmózisos potenciál (OP) és falnyomás potenciál (T, turgor) változása jelez.



6. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) kezelés hatása a 4 hetes paradicsom növények vízpotenciál változására az idő függvényében (Átlag±SE, n=10, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).

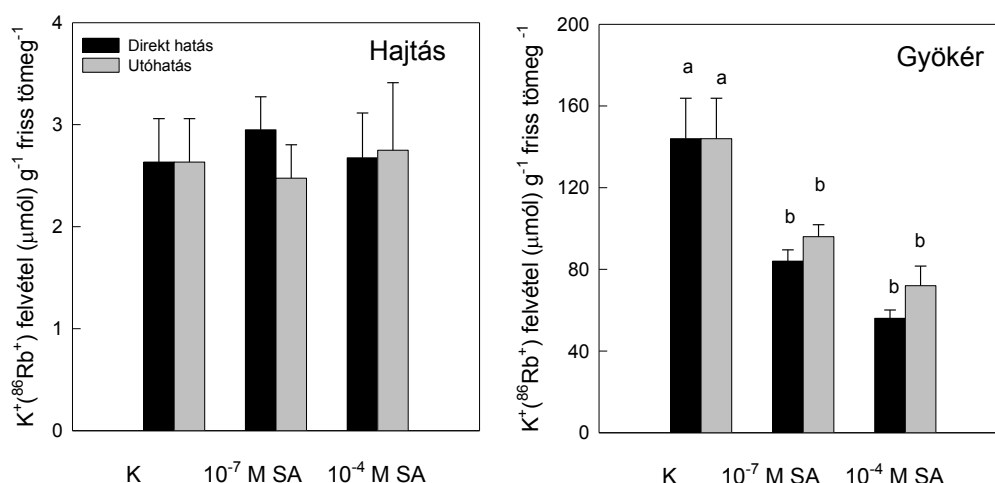
Ha négyhetes paradicsom növényeket kezeltünk 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA-val, a vízpotenciál a kezelés következtében először mindkét SA koncentrációnál jelentősen csökkent. A csökkenés maximuma 1 hét után volt mérhető, majd a kezelt növényekben egy valószínűsíthető ozmotikus és/vagy térfogati adaptáció után a 21. napra a kontrollnál magasabb vízpotenciál értékek alakultak ki. (6. ábra)

Ugyanakkor mindkét alkalmazott SA koncentráció jelentősen gátolta a sztómakonduktanciát a levelek mindkét felszínén (7. ábra).



7. ábra: 1 hetes szalicilsav kezelés hatása a 4 hetes paradicsom növények teljesen kifejlett, legfiatalabb leveleinek adaxiális és az abaxiális felszínén mért sztómakonduktanciákra. (Átlag±SE, n=10). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Mivel az irodalmi adatokból ismert, hogy a SA viszonylag magas koncentrációkban depolarizálja a plazmamembránt és ennek következtében gátolja az aktív iontranszportot, ezért megvizsgáltuk az általunk alkalmazott alacsony (10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA) koncentrációk hatását is a K^+ ($^{86}Rb^+$) felvételre 24 órás előkezelés után, vagy a K^+ felvételi oldatban, az izotóppal egyidőben történő alkalmazáskor (utóhatás, direkt hatás). Ismeretes, hogy a K^+ az egyik legfontosabb anorganikus ozmotikum a növényi sejtekben, ami a szövetek vízmegtartó képessége szempontjából alapvetően fontos (8. ábra).

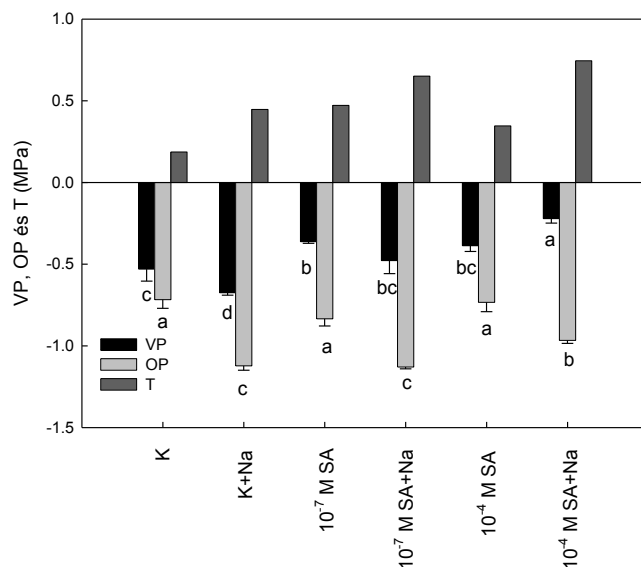


8. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) elő- és egyidejű kezelése hatása a 4 hetes paradicsom növények K^+ ($^{86}Rb^+$) felvételére a gyökérben és a hajtásban. Az izotóp felvétele 1 óráig történt. Közvetlen vagy direkt hatás: fekete oszlop; előkezelés, vagy utóhatás: szürke oszlop (Átlag±SE, n=4). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg. A 0,05 valószínűségi szinten nem különböző átlagértékeket nem jelöltük.

Megállapíthatjuk, hogy rövid időtartamú kísérletben a SA mind előkezelés formájában, tehát utóhatásként, mind közvetlenül szignifikánsan gátolja a K^+ ($^{86}Rb^+$) felvételét, amit a gyökérfelvétel mutat (8. ábra). Ezen időtartam alatt a hajtásban még nem alakul ki szignifikáns különbség a K^+ tartalomban. Megállapítható azonban, hogy a SA a használt alacsony koncentrációnál is csökkentheti a K^+ felvételt, ami csökkenti a gyökér vízmegtartó kapacitását. Ez a későbbiekben a hajtásra is áttevődik, és ott jelentős vízpotenciál csökkenést okoz.

Az átmeneti ozmotikus stressz azonban akklimatizációs mechanizmusok beindulását eredményezi még a sóstressz előtt, az előkezelt növényekben a vízpotenciál magasabb a kontrollénál.

Ennek eredményeképpen a SA vízpotenciált növelő hatása 1 hétig 100 mM-os NaCl-dal történő kezelés után is megmarad. A sóstressznek kitett kontroll növényekhez képest a 10^{-4} M SA előkezelés után magasabb víz- és ozmotikus potenciált mértünk az előkezelt növények csúcsi, teljesen kifejlett leveleiben, amelynek eredményeképpen a víz- és ozmotikus potenciálok mintaátlagából számított falnyomás potenciál (a turgor) is magasabb ezekben a szövetekben (9. ábra).



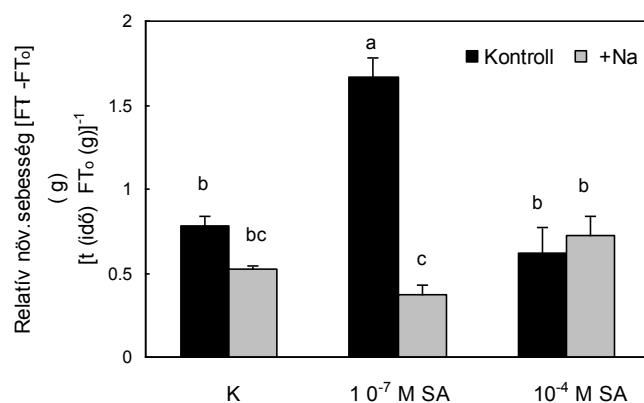
9. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények vízháztartási paramétereinek változására 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=10, VP=vízpotenciál, OP=ozmotikus potenciál, T=turgornyomás (MPa)). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével a víz- és ozmotikus potenciálok értékeire külön-külön határoztunk meg.

Az allelopatikus hatású SA tehát átmenetileg valóban hat a paradicsom növények vízháztartására, amelyet azonban hosszabb inkubáció után a sejtek ozmotikus és/vagy térfogati adaptációja követ. A SA kezelések hatására növekedésgátlás is kialakult, ez látható a gyökérhossz adatokból sóstresszt követően. Megállapíthatjuk, hogy a SA előkezelés szignifikáns megnyúlás és tömeggyarapodás gátlást csak 10^{-4} M-nál, a sztómazáródást indukáló koncentrációknál jóval magasabb koncentrációban okozott.

1. táblázat: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelések hatása a paradicsom növények hajtás és gyökér növekedésére, friss tömeg értékeire és relatív víztartalmára egy hetes, 100 mM-os NaCl-dal kiváltott sóstressz után (Átlag \pm SE, n=10). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P\leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

	Hajtáshossz (cm)	Gyökérhossz (cm)	Friss tömeg növény ⁻¹ (g)	RWC (%)
Kontroll (K)	23.4 \pm 0.2 ^a	19.0 \pm 0.6 ^a	22.5 \pm 1.7 ^a	88.3 \pm 2.7 ^a
K + NaCl	19.9 \pm 1.0 ^b	21.2 \pm 0.8 ^a	16.6 \pm 1.8 ^b	78.2 \pm 0.4 ^c
10^{-7} M SA	22.8 \pm 1.7 ^{ab}	17.4 \pm 0.8 ^{ab}	19.4 \pm 1.7 ^{ab}	84.7 \pm 0.6 ^{ab}
10^{-7} M SA + NaCl	19.8 \pm 0.9 ^b	16.1 \pm 2.0 ^{ab}	12.6 \pm 1.2 ^b	82.8 \pm 0.6 ^b
10^{-4} M SA	22.6 \pm 1.4 ^{ab}	8.5 \pm 2.5 ^c	15.9 \pm 1.8 ^b	86.2 \pm 1.6 ^{ab}
10^{-4} M SA + NaCl	19.9 \pm 1.1 ^b	10.5 \pm 4.1 ^c	16.0 \pm 2.0 ^b	81.7 \pm 1.2 ^{bc}

A sóstressz önmagában jelentős növekedésgátlást eredményezett a kontroll és a 10^{-7} M-os SA-val előkezelt növényekben, a 10^{-4} M-os koncentrációnál azonban nem tapasztaltunk további növekedésgátlást a sóstressz hatására, és nagyobb volt a levelek relatív víztartalma is a sókezelt kontrollhoz képest (1. táblázat).



10. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények relatív növekedési sebességére 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=10). Fekete oszlopok: kontroll és SA kezelt

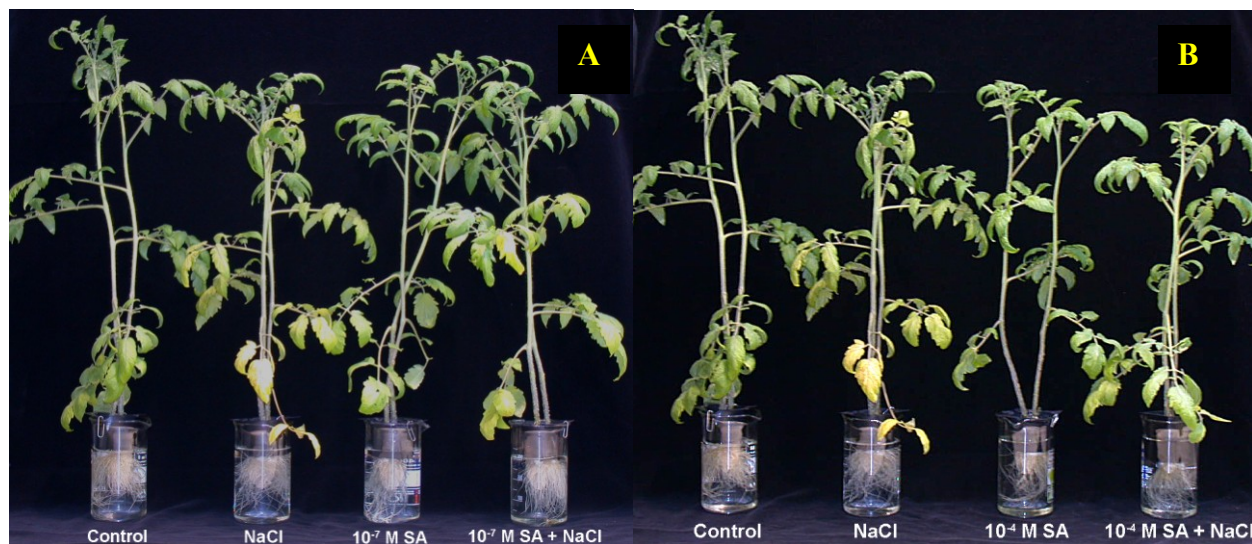
növények; szürke oszlopok: sóstresszelt növények. A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A 10^{-4} M SA előkezelés megnövelte a növények stresszor hatása alatti relatív növekedési sebességét is, ami az akklimatizáció sikerességének első jele lehet (10. ábra).

5.2. A sóstressz akklimatizáció folyamatai a szalicilsavval előkezelt növényekben

5.2.1. Ozmotikus adaptáció: inorganikus ozmotikumok akkumulációja

Hasonlóan az irodalomban talált időfüggvényekhez, a 100 mM-os NaCl kezelés már egy hetes periódus után jól látható morfológiai változásokat eredményez az előkezeletlen növényekben. Különösen szembevető a növekedés gátlása és az alsó levelek erőteljes sárgulása, amely a 7.-10. nap között a csúcsi levelek érkezőtti régióira is kiterjed. Ez egy intenzív Na^+ akkumulációhoz kapcsolódik, amely jelentős mind a gyökérben, mind a hajtásban (11. ábra).



11. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények növekedésére 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően. A: Kontroll, 100 mM NaCl-dal, 10^{-7} M-os SA-val és 10^{-7} M-os SA+100 mM-os NaCl-dal kezelt növények. B: Kontroll, 100 mM NaCl-dal, 10^{-4} M-os SA-val, és 10^{-4} M-os SA+100 mM-os NaCl-dal kezelt növények.

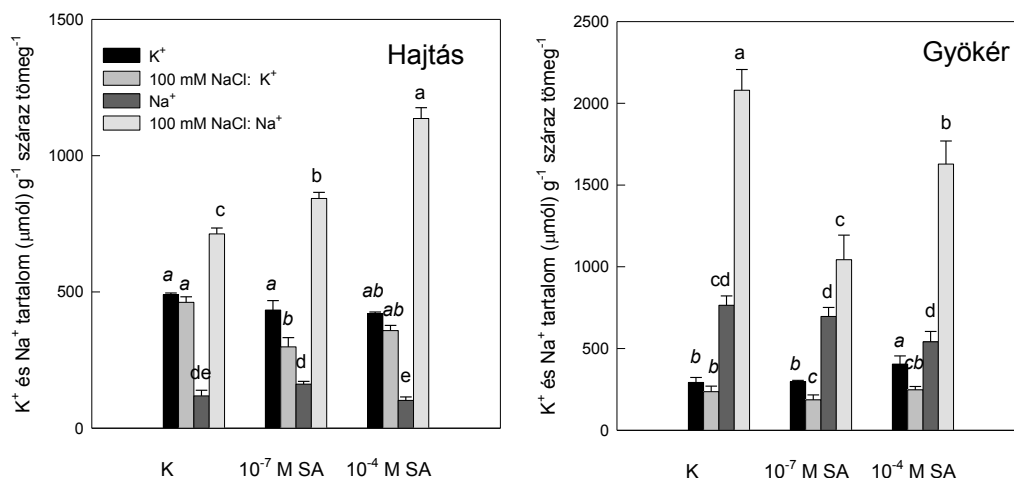
Bár a K^+ felvételt az SA gátolja, 3 hetes előkezelés után, a héthetes paradicsom növényekben valószínűleg a transzportfolyamatok K^+ hiányra bekövetkező aktiválódása miatt a gyökérben a

kálium tartalmak már nem különböznek szignifikánsan a kontrolltól, a hajtásban azonban alacsonyabb K^+ koncentrációkat mértünk (2. táblázat). A legfontosabb makroelemek, a félmikroelem vas valamint a Na^+ koncentrációja nem különbözött szignifikánsan a kontroll növényekétől az előkezelés után.

2. táblázat: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 7 hetes paradicsom növények gyökérzetének és levelének K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} és Fe^{2+} $\mu\text{mol g}^{-1}$ száraz tömegben megadott tartalmaira (Átlag \pm SE, n=4). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P\leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

	K	Na	Ca	Mg	Fe
Gyökér					
Kontroll	893.9 \pm 21.6 ^{ns}	195.5 \pm 13.6 ^{ns}	156.0 \pm 11.0 ^{ns}	441.7 \pm 7.3 ^{ns}	15.8 \pm 0.6 ^{ns}
10^{-7} M SA	786.9 \pm 3.5 ^{ns}	196.9 \pm 16.5 ^{ns}	168.3 \pm 10.0 ^{ns}	435.6 \pm 17.5 ^{ns}	17.7 \pm 1.0 ^{ns}
10^{-4} M SA	842.3 \pm 48.4 ^{ns}	154.2 \pm 11.6 ^{ns}	180.9 \pm 22.6 ^{ns}	394.5 \pm 19.5 ^{ns}	17.8 \pm 0.7 ^{ns}
Hajtás					
Kontroll	791.5 \pm 73.1 ^a	80.6 \pm 5.3 ^{ns}	473.3 \pm 12.1 ^{ns}	235.4 \pm 7.2 ^{ns}	2.6 \pm 0.7 ^{ns}
10^{-7} M SA	561.4 \pm 40.0 ^b	111.5 \pm 10.3 ^{ns}	439.4 \pm 30.4 ^{ns}	197.5 \pm 14.8 ^{ns}	1.9 \pm 0.3 ^{ns}
10^{-4} M SA	564.8 \pm 32.9 ^b	87.0 \pm 8.7 ^{ns}	432.0 \pm 5.8 ^{ns}	186.0 \pm 15.7 ^{ns}	1.7 \pm 0.0 ^{ns}

Az egyhetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően a kontroll növényekben a sóstressz nem csökkenti szignifikánsan a K^+ akkumulációt sem a hajtásban, sem a gyökérben, a vizsgált genotípus K^+ transzporterei tehát jól megkülönböztetik a két iont. A K^+ tartalom csökkenése azonban szignifikáns a SA-val előkezelt növényekben a 100 mM-os NaCl jelenlétében (12. ábra, fekete és világosszürke oszlopok).



12. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények levelének és gyökérének kálium és nátrium tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=4). A különböző

betűvel jelzett oszlopok az ANOVA-t követő Duncan teszt alapján 0,05 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek. A tesztet a K^+ és Na^+ tartalmakra külön végeztük el.

A Na^+ tartalmak jelentősen növekedtek a sóstressz alatt (12. ábra, sötétszürke és legvilágosabb szürke oszlopok). Az előkezelt növények gyökerében ez a kontrollénál szignifikánsan kisebb értéket jelentett, míg a hajtás nátrium tartalma az előkezelések hatására megnövekedett. A SA előkezelés tehát megváltoztatta a Na^+ hajtás:gyökér közötti eloszlását, a felvett nátrium nagyobb része kerül a hajtásba az előkezelt növényekben. Különösen jelentős ez a 10^{-4} M-os SA előkezelésnél. Ez ugyanakkor csökkenti a gyökér Na^+ terhelését, ami a detoxifikációs mechanizmusok sikeressége szempontjából rendkívül fontos. Ez a K^+/Na^+ arányok változásában is jól tükröződik (3.táblázat).

Míg a gyökérben az előkezelés hatására sóstressz alatt alacsonyabb K^+ tartalmak mellett is megmarad a K^+/Na^+ arány, a hajtásban a nátrium akkumuláció miatt ez az arány jelentősen csökken. Hasonló változások figyelhetők meg, jól elkülöníthetően a *S. lycopersicum*tól, már egy hetes sóterhelést követően a halofita karaktert mutató, sótoleráns vad paradicsom fajokban, mint pl. a *S. peruvianum*ban vagy a *S. pennellii*ben (Rus és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2001). A sótoleráns vad fajok képesek a nátrium akkumulálására a levél mezofillum sejtjeinek vakuólumában, ott azt ozmotikumként használva nagy relatív víztartalmat tartanak fenn, és növekedésük a sóterhelés ellenére fennmarad.

3. táblázat: A K^+/Na^+ arány változása 10^{-7} M vagy 10^{-4} M SA-val előkezelt paradicsom növényekben 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően. Az adatokat az iontartalmak átlagaiból számítottuk.

	K ⁺ /Na ⁺ arány	
	Hajtás átlaga	Gyökér
Kontroll (K)	4.14	0.38
K + NaCl	0.67	0.14
10^{-7} M SA	2.52	0.43
10^{-7} M SA + NaCl	0.36	0.18
10^{-4} M SA	4.12	0.56
10^{-4} M SA + NaCl	0.31	0.15

A SA által előidézett változások a termesztett paradicsomfajta nátrium akkumulációját a halofitákéhoz tette hasonlónvá. A hajtásba transzportált Na^+ -ot nemcsak ozmotikumként használja (9. ábra), hanem sóstressz alatt a turgor által indukált növekedést is jobban fenntartja a 10^{-4} M-os

SA-val előkezelt növény, mint a sóstressznek kitett kontroll (10. ábra). Mindezek ellenére azonban a növények nem mutatták a sóstressz károsító hatást jelző stresszmarkerek növekedését.

5.2.2. Stresszrezisztencia markerek változása: fotoszintetikus pigmenttartalmak, fluoreszcencia indukciós paraméterek, lipidperoxidáció a SA-előkezelt paradicsomban a sóstressz alatt

A SA előkezelés önmagában erőteljesen gátolhatja a fotoszintézist (Pancheva és mtsai, 1996). Ennek egyik oka a sztómakonduktancia csökkenése, és ezt követően a CO₂ fixáció gátlása a kezelt növényekben.

Az általunk használt SA koncentrációknál a fotoszintézis fényreakciói azonban nem gátlódnak drámaian, ahogyan azt a fluoreszcencia indukciós paraméterek, köztük az F_v/F_m változatlansága, az effektív kvantumhasznosítás, a $\Delta F/F_m'$ (Φ_{PSII}) SA előkezelés hatására történő növekedése, a fotokémiai (qP) és a nem fotokémiai kioltás (NPQ) arányának a fotokémiai javára történő eltolódása mutatja (4. táblázat). (Leggyakrabban az $(1-qP)/NPQ$ arányát szokták megadni).

4. táblázat: A klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paraméterek (F_v/F_m arány, a qP, a Φ_{PSII} és az NPQ) változása 7 napos, 100 mM-os NaCl kezelést követően a 10⁻⁷ M és a 10⁻⁴ M-os SA-val előkezelt paradicsom növények fiatal, kifejtett leveleiben (Átlag±SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

	F_v/F_m	qP	Φ_{PSII}	NPQ
Kontroll (C)	0.765±0.01 ^{ns}	0.582±0.05 ^a	0.252±0.01 ^{bc}	0.599±0.01 ^a
K + NaCl	0.773±0.01 ^{ns}	0.447±0.03 ^b	0.232±0.02 ^c	0.607±0.01 ^a
10 ⁻⁷ M SA	0.784±0.01 ^{ns}	0.625±0.06 ^a	0.349±0.03 ^a	0.538±0.01 ^{ab}
10 ⁻⁷ M SA + NaCl	0.764±0.00 ^{ns}	0.561±0.01 ^a	0.311±0.01 ^{ab}	0.534±0.01 ^b
10 ⁻⁴ M SA	0.775±0.00 ^{ns}	0.519±0.02 ^{ab}	0.298±0.02 ^{ab}	0.508±0.02 ^b
10 ⁻⁴ M SA + NaCl	0.793±0.01 ^{ns}	0.637±0.02 ^a	0.374±0.02 ^a	0.549±0.03 ^b

Az F_v/F_m változatlansága arra utal, hogy a SA kezelés és a sóstressz által kiváltott oxidatív stressz nem okozott olyan változást a kloroplasztiszban, ami jelentős fotoinhibíciót eredményezne. A PSII primer fotokémiai folyamatainak hatékonysága, az effektív kvantumhasznosítás és a qP növekvő értékei az NPQ-val szemben a sótoleráns növényekre jellemző változások. A sóstresszelt kontroll növényekben az előkezelttel szemben ugyanakkor kisebb volt az effektív

kvantumhasznosítás valamint a fluoreszcencia kioltásában nagyobb volt a hődisszipáció (NPQ) aránya, mint a fotokémiai folyamatoké.

A SA előkezelés után a paradicsom növények fluoreszcencia indukciós paramétereiben történő változások a különböző fajok toleráns genotípusaiban figyelhetők meg. Mivel a sóstressz esetén a jól akklimatizálódó fajták megőrzik a hajtás vízpotenciálját, ezért a sótoleráns fajtákra a magas qP/qN (NPQ) arány jellemző. Ezt mutatták ki sótoleráns rizs genotípusok esetén sóstressz alatt, ahol nagyobb effektív hatékonyságot (Φ_{PSII}) és kisebb nem fotokémiai kioltást (NPQ) mutattak ki, mint a szenzitív genotípusban (Dionisio-Sese és Tobita, 2000). A rizs sótoleranciáját fokozni lehetett a kloroplasztisz glutamin szintetázát kódoló transzgén túlexpresszáltatásával. Ez utóbbi a fotorespirációs kapacitást növeli meg a fotorespiratórikus ammónia eltávolításával. Az elektrontranszport túlredukáltságának kiküszöbölésével a fotorespiráció jelentős szerepet kap a sóstressz tolerancia kialakításában a transzgenikus rizs növényekben, ami a Φ_{PSII} és a qP növekedésében is megnyilvánul (Hohsida és mtsai, 2000).

Csökkenett a 10^{-4} M-os SA előkezelés hatására a klorofill-($a+b$) tartalom, viszont nőtt a $Kl-a/Kl-b$ arány (5. táblázat), mivel az SA előkezelés inkább a $Kl-b$ destrukcióját fokozta. Az egyhetes sókezelés a kontrollhoz képest lecsökkentette a $Kl-a/Kl-b$ arányt, ez a tendencia azonban az előkezelt növényekben megfordult. A fotoszintetikus pigmentek szintézisének gátlása és /vagy degradációjának fokozódása jellemző a szárazság, de különösképpen a sóstressz alatt. Ez elsősorban a $Kl a/b$ kötő protein, a PSII fénybegyűjtő antennájának mennyiségi csökkenéséből adódik (Jones, 1985). A degradáció általános fokozódása pedig adaptív hatású is lehet, mivel a növény a fénybegyűjtés csökkenésével a fotoinhibíciós károsodást csökkenti (Keiper és mtsai, 1998).

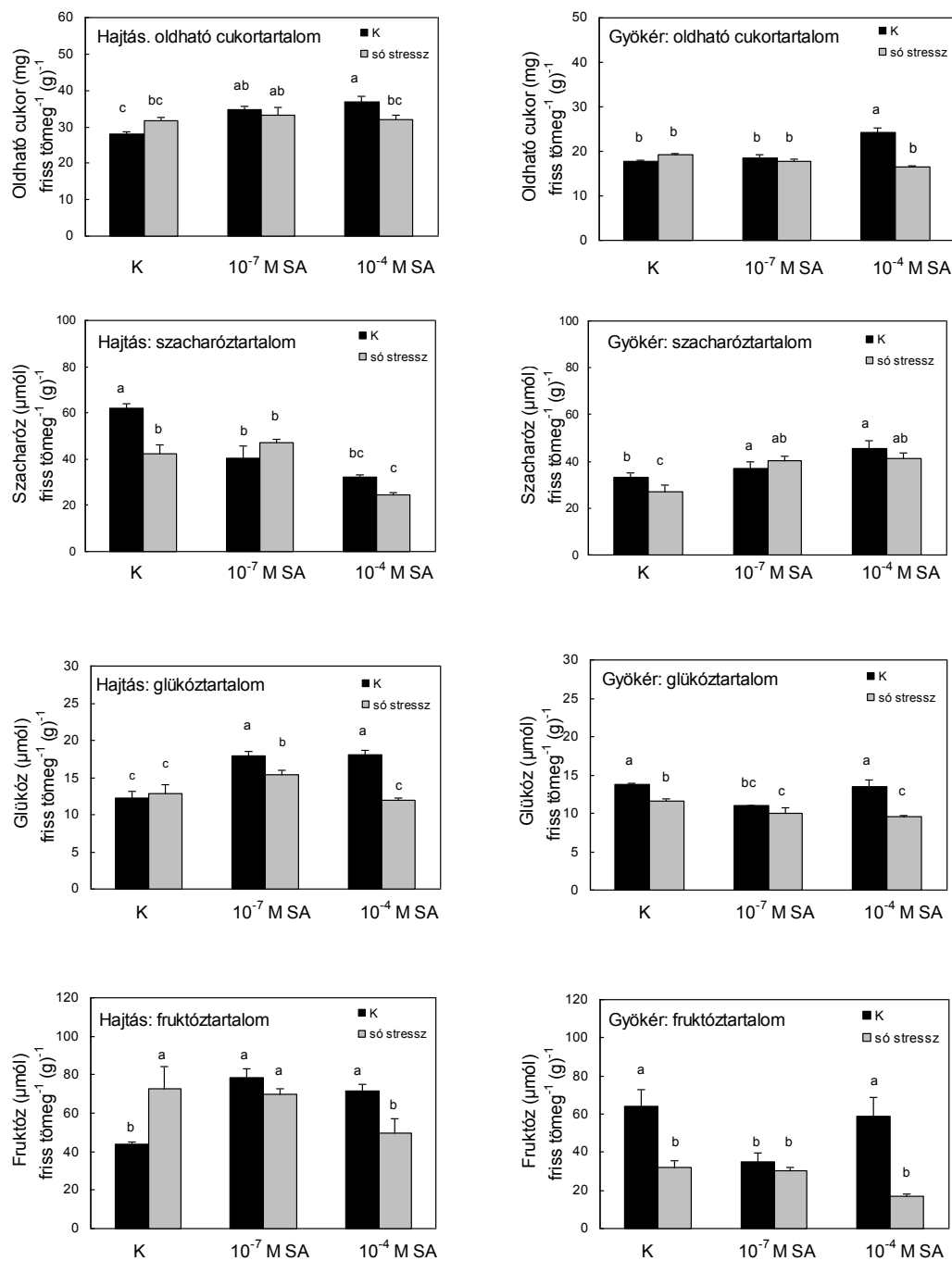
5. táblázat: A klorofill-($a+b$) és az összes karotinoid tartalom $\mu\text{g g}^{-1}$ friss tömeg, a malondialdehid (MDA) tartalom $\mu\text{mol g}^{-1}$ friss tömeg értékben valamint a $Kl-a/Kl-b$ arány SA-val előkezelt, fiatal paradicsom levelekben egy hetes, 100 mM-os NaCl kezelés után (Átlagok \pm SE, n=6). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

	Kl ($a+b$)	Kla/Klb	Karotinoidok	MDA
Kontroll (K)	1716.0 \pm 59.0 ^a	2.14 \pm 0.07 ^b	248.2 \pm 18.2 ^a	0.33 \pm 0.03 ^a
K + NaCl	1319.1 \pm 27.9 ^b	2.00 \pm 0.08 ^b	156.5 \pm 3.6 ^c	0.36 \pm 0.06 ^a
10^{-7} M SA	1485.8 \pm 40.2 ^b	2.40 \pm 0.03 ^a	249.2 \pm 13.3 ^{ab}	0.28 \pm 0.03 ^a
10^{-7} M SA + NaCl	1387.1 \pm 150.3 ^b	2.49 \pm 0.05 ^a	199.6 \pm 29.6 ^{bc}	0.18 \pm 0.01 ^b
10^{-4} M SA	1799.9 \pm 54.1 ^a	2.28 \pm 0.08 ^a	283.8 \pm 17.1 ^a	0.34 \pm 0.06 ^a
10^{-4} M SA + NaCl	1442.9 \pm 28.8 ^b	2.37 \pm 0.08 ^a	205.4 \pm 10.9 ^{ab}	0.20 \pm 0.02 ^b

Szignifikánsan megemelkedett viszont a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növények karotinoid tartalma sóstressz alatt. Ez azon túl, hogy a karotinoidok fontos antioxidánsok, a sótoleráns paradicsom genotípusok fiziológiai markerének is adódott. Ugyancsak rezisztenciamarker a stresszor hatása alatt csökkent lipidperoxidáció is, amit a szignifikánsan kisebb malondialdehid tartalom tükröz (Juan és mtsai, 2005). Hasonló eredményeket kaptak sóstressz hatására a *S. pennellii* leveleiben is (Shalata és mtsai, 2001).

5.2.3. Organikus ozmotikumok: szénhidrátok akkumulációja

A SA előkezelés hatására mind a hajtásban, mind a gyökérben megnő az oldható cukrok mennyisége. Ez a hatás az előkezelés kezdetekor, 7 hetes korban is megfigyelhető (Poór, 2007).



13. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények összes oldható cukor, szacharóz, glükóz és fruktóz tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). A

különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Ez a 10^{-4} M-os SA előkezelés esetén a csökkent abszolút növekedéssel is kapcsolatban lehet.

Eltérő tendenciát mutat azonban az egyes hexózok és a szacharóz koncentrációjának változása. A hajtásban a szacharóz koncentrációja csökken az előkezelés hatására, majd tovább csökken a sóstressz alatt. A gyökérben ezzel szemben az előkezelés megemeli a szacharóz koncentrációt, és ez a tendencia megmarad a 100 mM-os NaCl jelenlétében is. Ez jó összhangban van azzal, hogy a szénhidrátok szacharóz formában transzportálódnak a gyökérbe, és itt sóstressz alatt szerves ozmotikumként funkcionálnak.

Ezzel szemben a hexózok, a glükóz, de különösképpen a fruktóz mennyisége megemelkedik az előkezelt növények hajtásában, amely emelkedés mértéke a sókezelés hatására ugyanitt kissé csökken. A gyökérben a 10^{-7} M-os SA előkezelés hatására elsősorban a fruktóz koncentrációjában történt szignifikáns csökkenés, míg a sóstressz a hexóz tartalmakat általánosságban is csökkentette a gyökérben (13. ábra). A különböző ozmotikumok a szövetek víztartalmára vonatkoztatott koncentrációjából számítható az az ozmotikus potenciál, amivel az adott ozmotikum a szerv vízpotenciáljához hozzájárul. Ezeket a számításokat elvégeztük, és az oldható cukrok által kifejtett ozmotikus potenciált MPa-ban adtuk meg. Megállapítható, hogy a hajtásban a szénhidrátok által kifejtett ozmotikus potenciál a sóstressszelt kontrollhoz vált hasonlónvá, vagy még negatívabbá már az előkezelés alatt.

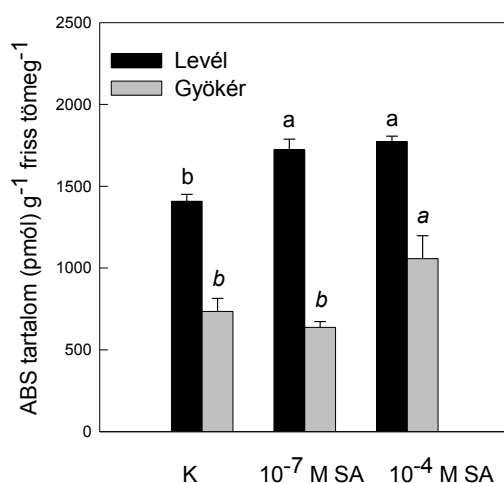
6. táblázat: A K^+ , a Na^+ és az oldható cukrok hozzájárulása az ozmotikus potenciálhoz 8 hetes, SA-val előkezelt, paradicsom hajtásban egy hetes, 100 mM-os NaCl kezelés után. Az adatokat a megfelelő anyagok átlagos mennyiségének (μmol / friss tömeg) a hajtás szöveti átlagos víztartalmára vonatkoztatott koncentrációjából számítottuk. A koncentrációk (mol / L) MPa értékre történő átalakítása Sgherri és mtsai (2001) alapján történt.

	Ozmotikus potenciál (MPa)		
	K^+	Na^+	Oldható cukrok
Kontroll (K)	-1,80	-0,43	-0,79
K + NaCl	-1,51	-2,26	-0,87
10^{-7} M SA	-1,55	-0,61	-0,98
10^{-7} M SA + NaCl	-1,14	-3,14	-0,94
10^{-4} M SA	-1,67	-0,41	-1,05
10^{-4} M SA + NaCl	-1,29	-4,08	-0,89

Az előkezelt növények tehát a 100 mM-os NaCl kezelés által kiváltott ionos ozmotikus hatást a sóstresszhez akklimatizált növényekre jellemző szénhidrát tartalom mellett kapják (6. táblázat).

5.2.4. Az abszcizinsav tartalom változása az előkezelések hatására és a sóstressz alatt

Mindkét alkalmazott SA koncentráció vízpotenciált csökkentő és oxidatív stresszt fokozó hatása, valamint a SA hatására indukálódó gyors sztómazáródás nyomán feltételeztük, hogy az előkezelések módosíthatják a paradicsom növények ABS tartalmát.



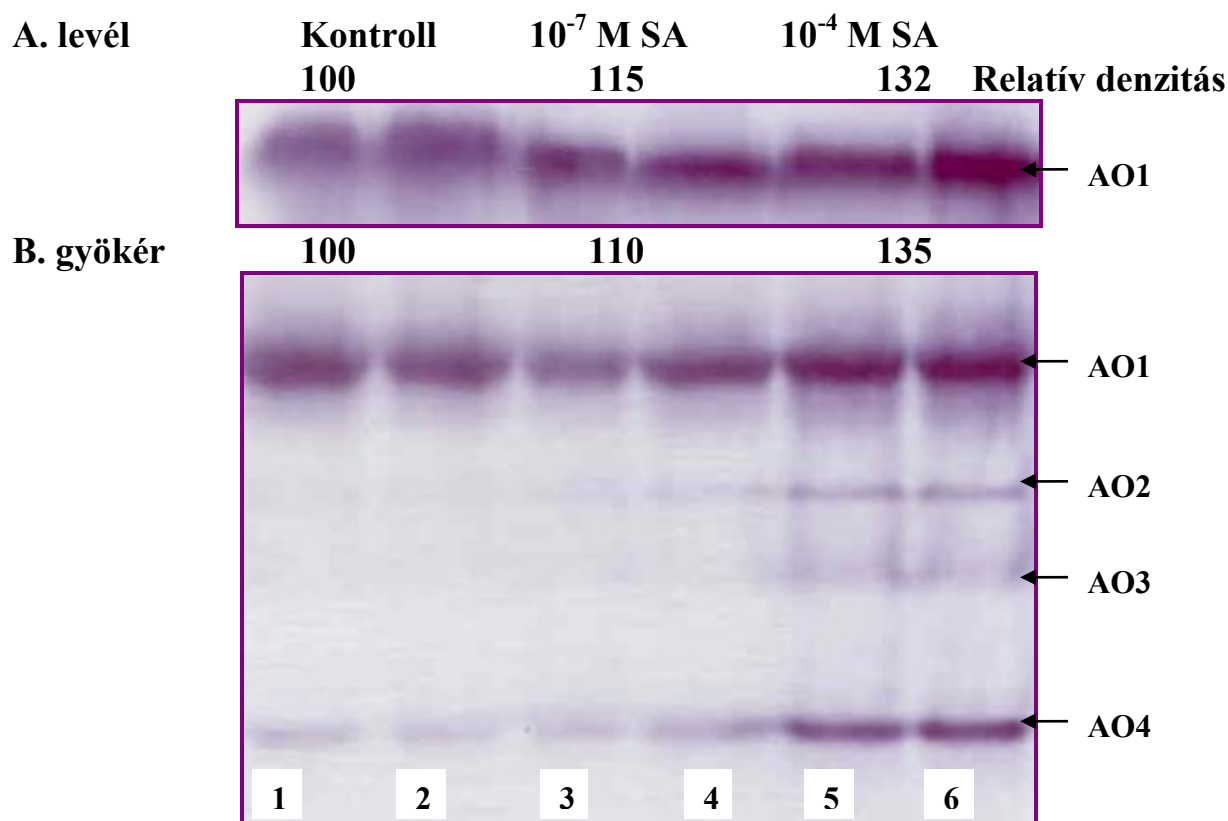
14. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása 7 hetes paradicsom növények hajtásának és gyökérzetének abszcizinsav tartalmára (Átlag±SE, n=4) A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A SA kezeléseket követően 6 óra múlva már szignifikáns emelkedést figyelhettünk a levelekben. Ennek valószínűleg a vízpotenciál csökkenés és az ezzel járó hidraulikus jel az előidézője (Szepesi és mtsai, 2009). Az ozmotikus adaptáció ellenére a SA előkezelés végén még mindig szignifikánsan magasabb ABS koncentrációkat mértünk, ami a gyökérben és a hajtásban is megfigyelhető volt 10⁻⁴ M SA kezelésnél (14. ábra). Ez egyrészt arra utal, hogy a SA nemcsak az ozmotikus stresszen keresztül indukálja az ABS szintézisét. Másrészt azzal a következménnyel jár, hogy az előkezelés végén az ABS indukálta jelátvitel is aktiválódhat a SA előkezelt növényekben.

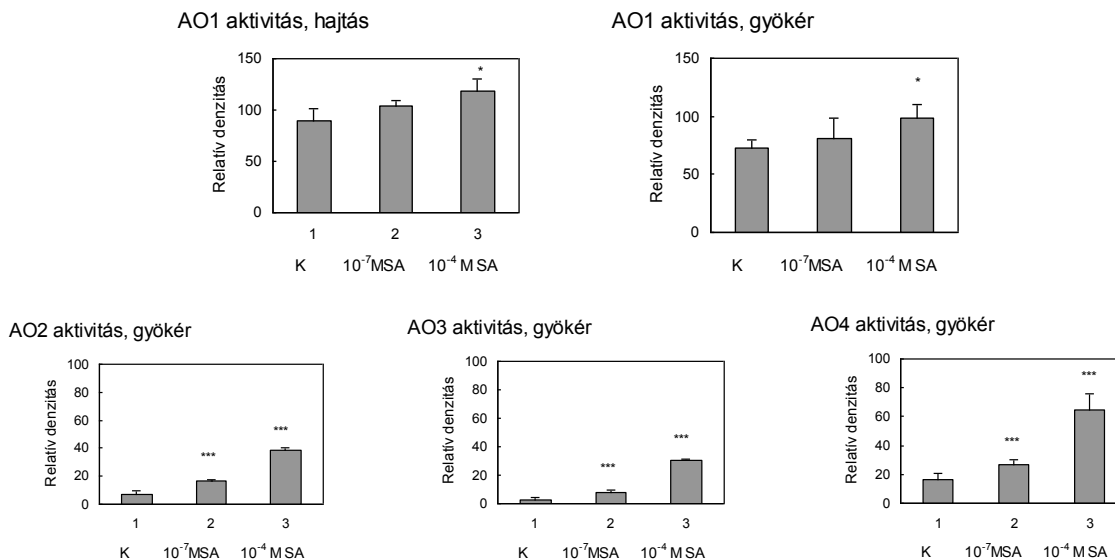
Mivel az ABS bioszintézis utolsó lépését, az abszcizinaldehyd-ABS átalakulást katalizáló enzim, az AAO1 határozza meg a keletkező ABS mennyiségét, ezért vizsgáltuk az enzim

aktivitásának változását nem denaturáló poliakrilamid gélben. Az általunk vizsgált izoenzimek elfogadták az α -naftaldehidet és az indol-3-aldehidet is szubsztrátként. Természetes szubsztrátként szolgálhat az indolecetsav prekursora is, amelyet a legkisebb mobilitású, AAO1 izoenzim oxidál.

Az enzimaktivitások kvantifikálása után megállapítottuk, hogy a gyökérben 4, a hajtásban két erőteljes, gyakran egybeeső sáv mutatható ki. Az *Arabidopsis*hoz hasonlóan a fősáv (AAO1) a gyökérben is 3 alsávra tagolható (15. ábra).



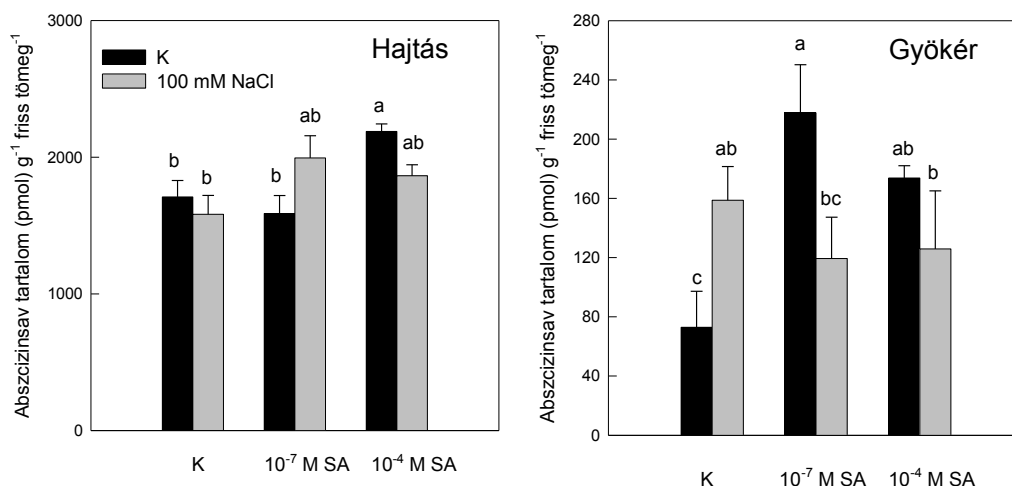
15. ábra: Az aldehid oxidáz izoenzimek (AAO1-4) aktivitásának változása 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA előkezelt paradicsom növények levelében (A) és gyökereiben (B) aktivitás gélben. Az enzim szubsztrátjaként 1 mM-os α -naftaldehidet használtunk. Minták: Kontroll, 1., 2.; 10^{-7} M SA, 3., 4.; 10^{-4} M SA: 5. és 6. csík.



16. ábra: Az aldehid oxidáz izoenzimek (AAO1-4) aktivitásának változása 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA előkezelt paradicsom növények levelében (A) és gyökereiben (B) aktivitás gélben. A géleket KODAK EDAS rendszer segítségével kvantifikáltuk. Az enzim szubsztrátjaként 1 mM-os α -naptaldehidet használtunk. A *-gal jelölt kezelt minta a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.

Ezek az eredmények hasonló képet mutattak, mint a Sagi és mtsai (1999) által szintén paradicsomból, immunoblottal készült minták. Az idézett cikkben azonban az immunreakció minden egyes fősávban több csíkot adott, ami utalhat a kérdéses fehérjék többféle izoformájára is. Jó összhangban van ez a megállapítás a gyökérben és a hajtásban mért ABS tartalmakkal (14. ábra).

A sókezelés csak a kontroll gyökér ABS tartalmát növelte meg, más esetben a Na^+ felvételét követően a megnövekvő vízpotenciál a hormontartalom csökkenését eredményezte (17. ábra).



17. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények hajtásának és gyökérzetének abszcizinsav tartalmára 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=4) A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A gyökerekben szintetizálódó ABS a xilémtranszport révén gyorsan a hajtásba transzlokálódik, ahol kifejti hatását a sztómaregulációra. A sókezelést követően a kontrollnál nagyobb ABS koncentráció már elegendő arra, hogy mindkét SA koncentrációnál sztómazáródás történjen.

A hajtásban az előkezelések nyomán magasabb ABS szinteket találtunk, itt tehát már a sókezelés előtt egy ABS-indukált génexpresszió lehetősége is fennállt. Az ABS által indukált jelátviteli út aktivitása és a hormon által indukált génexpresszió igen fontos a sóstressz-akklimatizáció szempontjából, amelyek közül példaként a szerves ozmotikumok (pl. prolin, szorbitol) vagy a poliaminok szintéziséhez szükséges kulcsenzimek indukcióját említhetjük.

Paradicsomban két mutáns gént fedeztek fel, amelyek működése feltétlenül szükséges a sikeres sóstressz akklimatizációhoz. A *tss1* mutáns hiperszenzitív a Na^+ -ra, a mutáció a nagy affinitású K^+ transzporter működését érinti. A *tss2* lokusz hiperszenzitív a Na^+ -ra és általánosan az ozmotikus stresszre, és az ABS jelátvitelt gátolja (Borsani és mtsai, 2001b). Az ABS jelátvitel gátlása tehát érzékennyé tesz a növényeket a sóstresszel szemben.

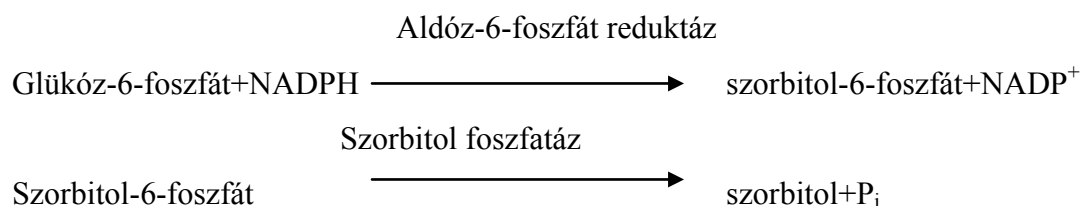
Eredményeink azt mutatják, hogy a SA az ABS szintézis és az AAO aktivitásának fokozásával, ennek eredményeként az ABS tartalom növelésével az ABS jelátvitel bekapcsolásával fejtheti ki az ABS-szerű hatást még az előkezelés alatt.

5.2.5. Egyéb védekezési mechanizmusok

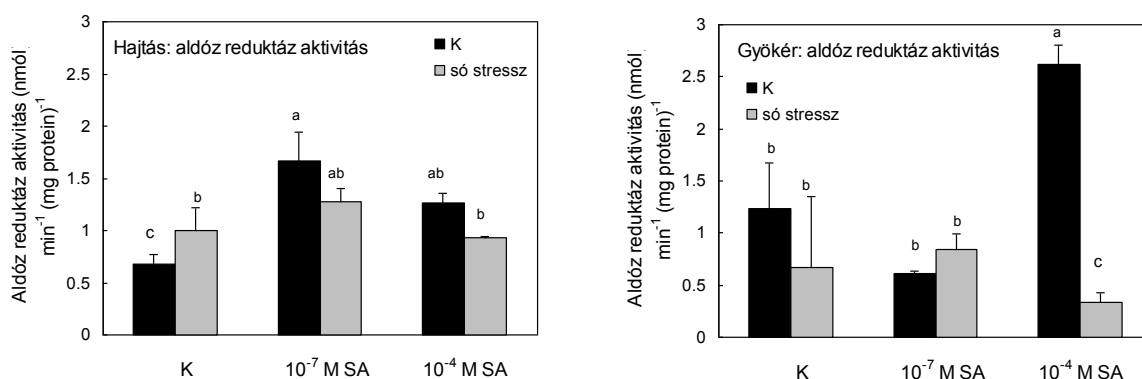
5.2.5.1. Szorbitol akkumuláció és aldóz reduktáz (ALR) aktivitás

Az ozmotikus adaptációban különböző cukoralkoholok is részt vehetnek. A paradicsom levélben és a termésben is kimutatható a szorbitol (Schauer és mtsai, 2005), nem ismeretes azonban a SA hatása a szorbitol szintézisére és akkumulációjára.

Az aldo-keto reduktázok enzimsaládja többféle enzimátikus reakciót katalizál. Az egyik legrégebben ismert az először a *Rosaceae* családban kimutatott reakció (Loescher, 1987).

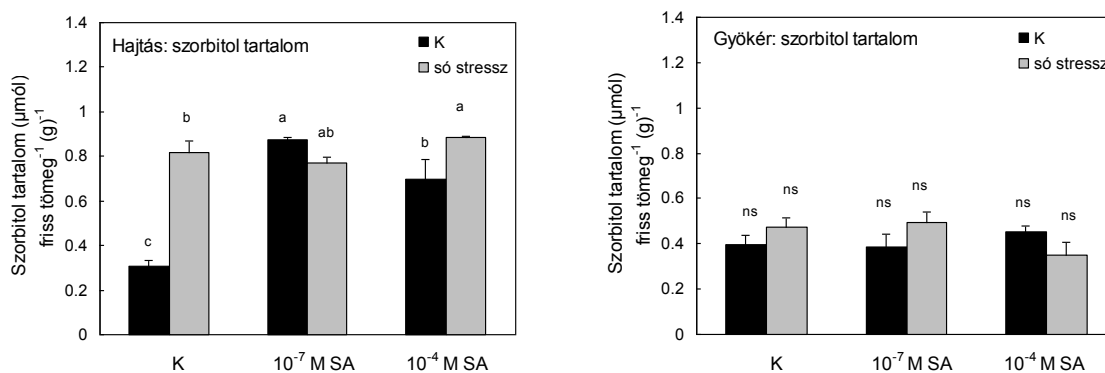


A SA előkezelés a hajtásban szignifikánsan megemelte az enzim aktivitását, ez a gyökerekben a 10^{-4} M-os koncentrációnál történt meg. A hajtásban a kontrollhoz viszonyított magas enzimaktivitás a sókezelt mintákban is megmaradt. Ezzel szemben a gyökerekben a sókezelés hatására inkább csökkent az enzimaktivitás (18. ábra).



18.ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények a levél és a gyökér aldózreduktáz aktivitására gliceraldehid szubsztráttal 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Az ugyanezen mintákból származó szorbitol tartalmak a hajtásban közelítőleg követték az ALR aktivitás változásait. A gyökérben a SA előkezelések nem okoztak szignifikáns szorbitol-tartalom változást, és ez csak minimálisan módosult a NaCl jelenlétében is (19. ábra).



19.ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények levelének és a gyökérzetének szorbitol tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3) A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A keletkezett szorbitol mennyisége azonban, hasonlóan az irodalmi adatokhoz, nem elegendő arra, hogy ozmotikumként számításba jöhessen. Nagyobb jelentősége lehet annak, hogy a szorbitol szintézis hozzájárul a redukált NADPH oxidációjához, ami stresszor hatása alatt fontos lépés a NADP⁺ reciklizációja szempontjából. A szorbitol többek között antioxidánsként is szerepelhet.

Az aldo-keto reduktázok szupercsaládjába tartozó enzimeknek azonban más, a stressz akklimatizációban fontos szereppel bíró tagja is van. Srivastava és mtsai (1995) mutatták ki, hogy szarvasmarha aldóz reduktáz enzim elfogadja szubsztrátként a 4-hidroxinonenált, a lipidperoxidáció citotoxikus termékét. Oberschall és mtsai (2000) bizonyították a dohányba beépített lucerna aldóz/aldehyd reduktáz gén ozmotikus és oxidatív stressz valamint ABS általi indukálhatóságát és megállapították, hogy a transzformáns növények csökkent lipidperoxidációt és jelentős szárazságtűrést mutattak. Másik fontos, az aldóz reduktázokhoz kapcsolható detoxifikáló funkció a metilglioxál acetollá, majd propándiollá történő redukciója (Vander Jagt és mtsai, 1992). A detoxifikáló funkciók aktiválódása a SA előkezelt paradicsomokban, különösen a megemelkedett szorbitol tartalmat nem mutató gyökerekben, szintén hozzájárulhat a sikeres akklimatizációhoz.

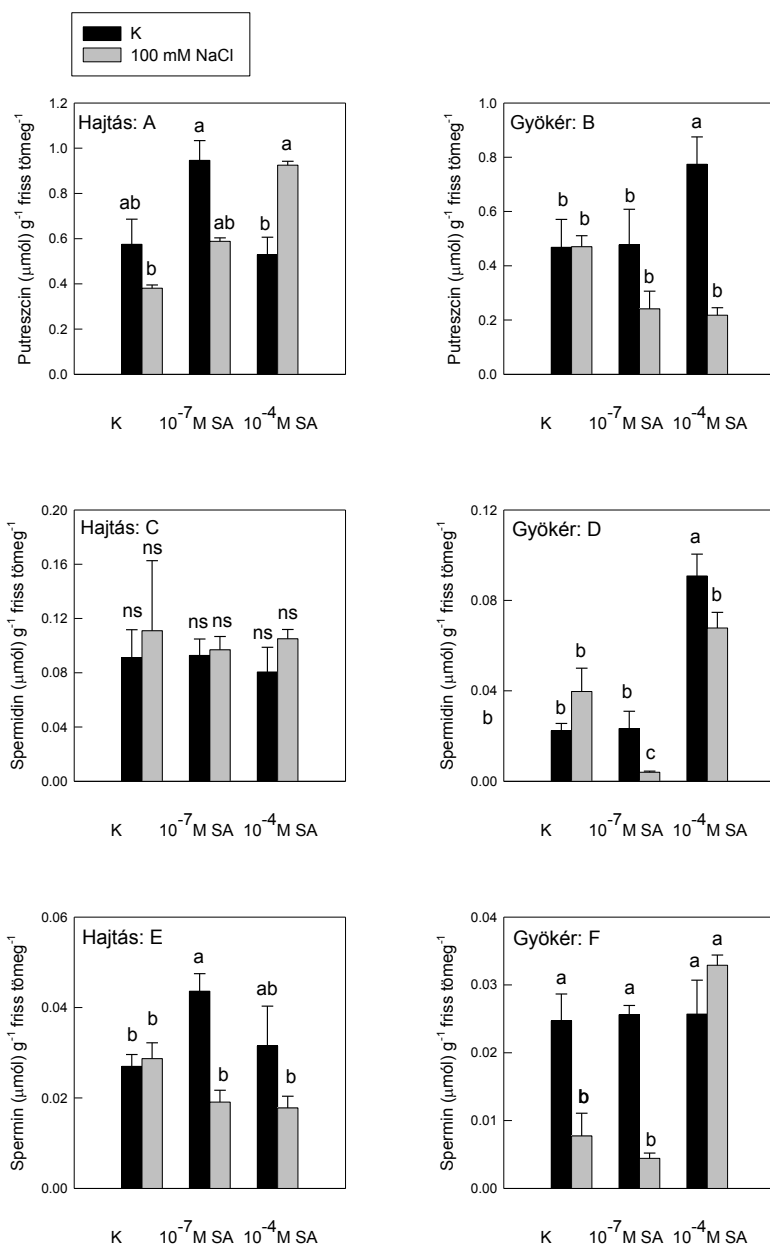
5.2.5.2. A poliaminok, mint a sóstressz akklimatizáció komponensei

A poliaminok spektrumában megfigyelhető változás igen lényeges a sóstresszel szembeni ellenállóság kialakulásában. Továbbá a poliaminok bioszintézisének olyan kulcsenzimeit, mint az arginin dekarboxilázt vagy spermidin szintázt kódoló géneket az ABS transzkripcionális szinten regulálja (Jimenez-Bremont és mtsai, 2007). Fontos tényezői az antioxidáns védőmechanizmusoknak, ami részben közvetlen ROS kioltó hatásuk következménye, ugyanakkor szerepet játszanak az antioxidatív enzimek aktiválásában. A Put nagyon hatásosnak bizonyult az APX, a GR és a SOD aktivitásának fokozásában Virginia fenyő kallusz szövetekben (Tang és Newton, 2005). A poliaminok ugyanakkor gátolták a hiperszenzitív reakció ROS-generáló enzimét, a NADPH oxidázt dohány mikroszóma frakcióban, ezáltal mérsékeltek a O_2^- képződését. A leghatékonyabb ebből a szempontból a Spm volt (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005).

A poliaminok, mint polikationok, kapcsolódnak a nukleinsavakhoz, foszfolipidekhez, fehérjékhez és egyéb anionos komponensekhez a sejtben, az ezzel együttjáró védő funkciót már említettük. Különösen fontos a plazmamembrán integritásának és szelektív permeabilitásának a megőrzése. Put-tal kezelt paradicsom levelek hidegstressz rezisztenciája jelentősen megemelkedett azáltal, hogy a poliamin jelenlétében megmaradt a plazmalemma szelektív permeabilitása, míg Put nélkül a sejtek kieresztették elektrolit tartalmukat (Kim és mtsai, 2002).

Növekedett a Put tartalom 200 mM-os NaCl kezeléskor a *S. pennellii* sótoleráns paradicsom fajban, míg a *S. lycopersicum* a Put tartalom csökkenését írták le hasonló körülmények között (Santa-Cruz és mtsai, 1999). Megállapíthatjuk tehát, hogy a 10^{-4} M-os SA előkezelés a természetett paradicsom levélben a toleráns vad fajhoz hasonló változást idézett elő a sótolerancia kialakulásához döntően hozzájáruló Put akkumulációban (20. ábra).

A 10^{-4} M-os SA előkezelés hatására sóstressz alatt a gyökerekben a Spm szintje maradt különösen magas. A Spm akkumuláció olyan halofita fajokra jellemző adaptív tulajdonság, mint a *Mesembryanthemum crystallinum* (Shevyakova és mtsai, 2006).

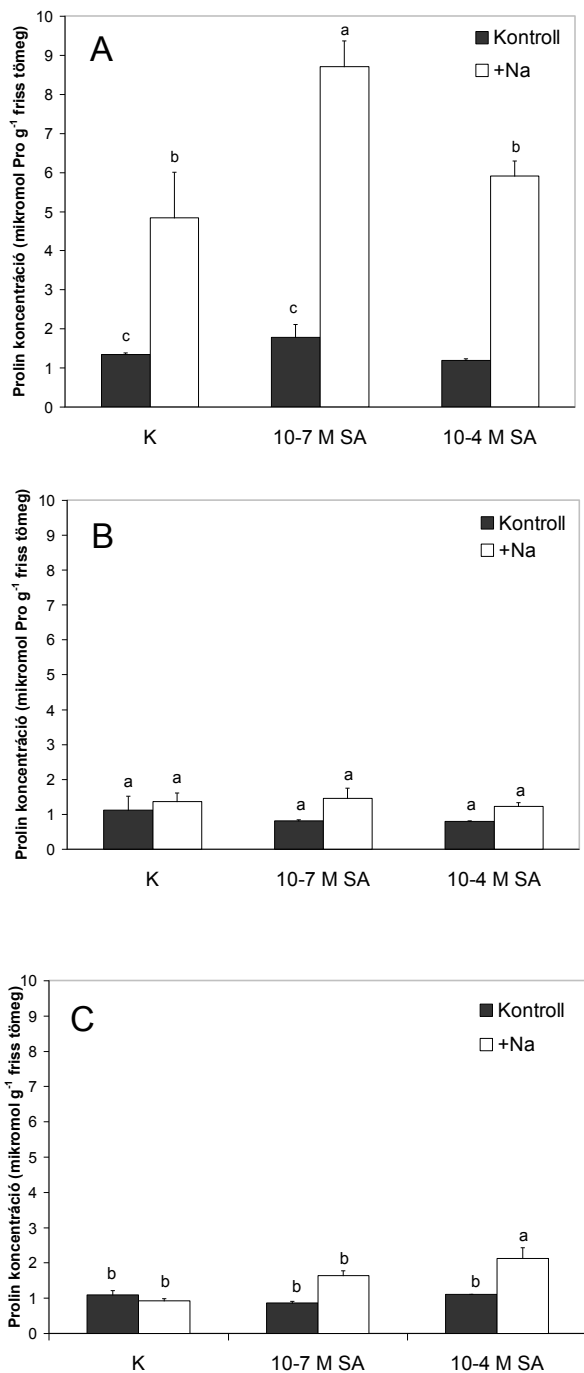


20. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények levélének és a gyökérzetének putreszcín (A,B), spermidin (C,D) és spermin (E,F) tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.2.5.3. Prolin koncentráció változása sóstresszt követően

A prolin jó kompatibilis ozmotikumnak bizonyult szárazság- és sóstressz alatt sok növényfajban és szintén hatékony antioxidánsként is. A prolin akkumuláció tünetként jelentkezhet a levélrepedés alatti károsodás és fehérje degradáció következményeként, valamint hozzájárulhat a sikeres ozmotikus adaptációhoz. A SA előkezelések nem fokozták a prolin

akkumulációt egyik növényrészben sem, viszont sókezelés után a fiatal levelekben megnőtt a prolin tartalom különösen a 10^{-7} M SA előkezelte növények fiatal hajtásában. A 10^{-4} M SA kezelt növények gyökerében is növekedés volt tapasztalható (21. ábra).

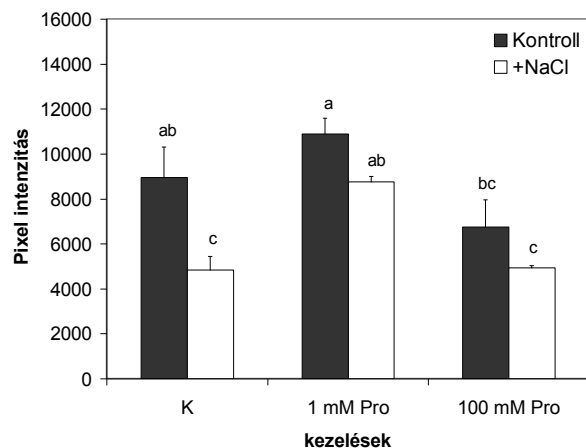


21. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának (A jelű ábra), alsó levelének (B jelű ábra) és a gyökérzetének (C jelű ábra) prolin tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést

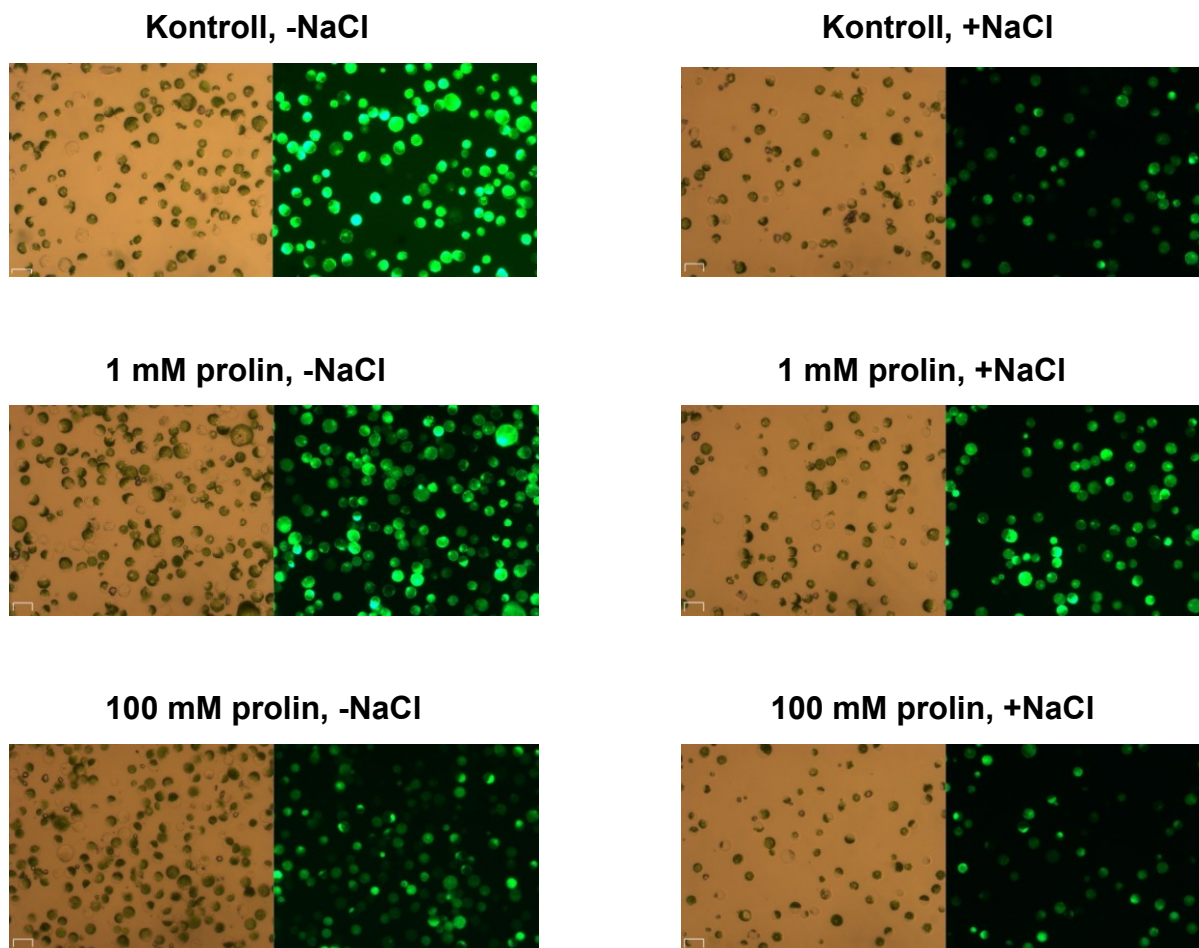
követően (fehér oszlopok) (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Madan és mtsai (1994) megállapították, hogy *Brassica juncea* növényben a sóstressz hatását a prolin tartalomra és a Δ^1 -pirrolin-5 karboxilát (P5C) reduktáz aktivitásra befolyásolta a hajtás fejlettségi állapota. A prolin koncentráció és a P5C reduktáz aktivitás a fiatal hajtásokban volt a legmagasabb és lineárisan csökkent a levelek öregedésével. Saját eredményeink szerint a 10^{-7} M SA kezelt növények fiatal levelében akkumulálódott prolin a szenescencia tüneteként jelentkezik, amit alátámaszt az a tény is, hogy a 10^{-7} M SA előkezelést kapott növények sikertelenül adaptálódtak a sóstresszhez. A 10^{-4} M SA kezelt növényeknél a gyökérben tapasztaltunk prolin akkumulációt, ami segíthette az ozmotikus adaptáció kialakulását a SA-előkezelte növényekben sóstresszt követően.

Okuma és mtsai (2004) beszámoltak arról, hogy a sóstressz alatt külső prolin kezelés alkalmazásával nem történt meg a NaCl-indukált sejtnövekedés gátlás. A K^+/Na^+ arány változatlansága mellett a prolin csökkentette a sóstressz káros hatásait valószínűsíthetően az antioxidáns védő szerepe miatt BY-2 dohány sejtszuszpenziós sejtekben. Szintén BY-2 sejtekben mutatták ki, hogy NaCl stressz hiányában az exogén módon alkalmazott Pro gátolta a növekedést és sejthalált indukált, viszont NaCl stresszt követően javította a sejtnövekedést (Deuschle és mtsai, 2004). A Pro képes volt gátolni az apoptózis-szerű sejthalált a gomba patogén *Colletotrichum trifolii*-ban különböző stresszek alatt, ami megnövekedett KAT aktivitással volt magyarázható (Chen és Dickman, 2005). Akhter Banu és mtsai (2009) kimutatták, hogy a KAT és POX gének megnőtt expressziója sóstressz alatt prolin jelenlétében hozzájárulhatott a sejthalál csökkenéséhez a ROS szint csökkentése által BY-2 sejtekben. Munkánkban egy alacsony (1 mM) és egy magas (100 mM) prolin koncentrációt választottuk ki előzetes kísérleteink alapján. FDA festés segítségével megállapítottuk, hogy az 1 mM Pro nem csökkentette a mezofillum protoplasztok életképességét, ezzel szemben a 100 mM Pro kezelés mérsékelt életképesség csökkenést okozott. Sókezelést követően az 1 mM Pro kezelt protoplasztoknak nem csökkent az életképessége, sőt növekedett a sókezelt kontrollhoz képest, és megállapítható, hogy az életképesség 100 mM Pro kezelés esetén sem változott szignifikánsan a sókezelt kontrollhoz viszonyítva a (22. és 23. ábra).

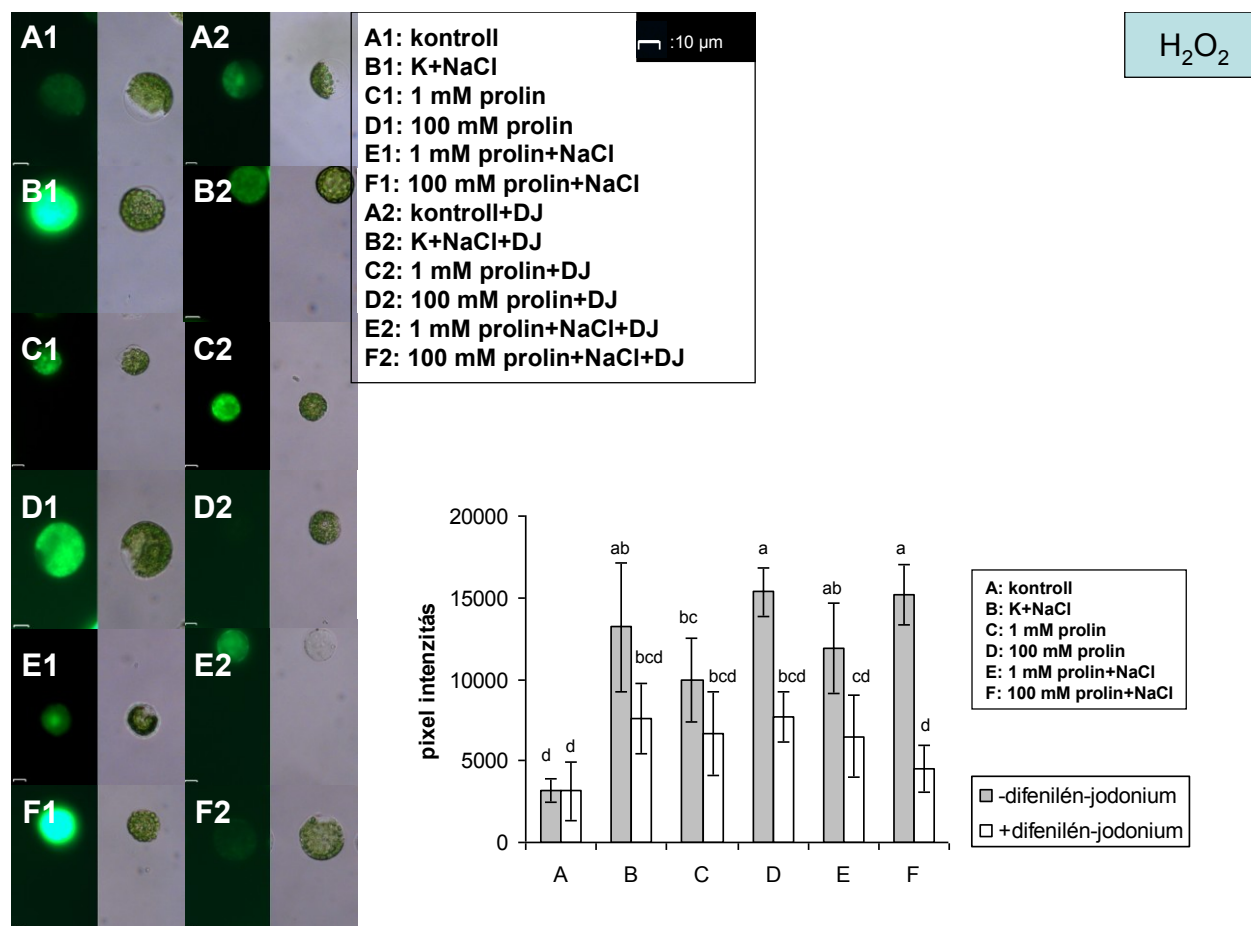


22. ábra: A 100 mM NaCl hatása eltérő prolin koncentrációkkal kezelt paradicsom protoplasztok életképességére (Átlag± SE, n=10). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P<0,05 valószínűségi szinten, amit Tukey teszt segítségével határoztunk meg.

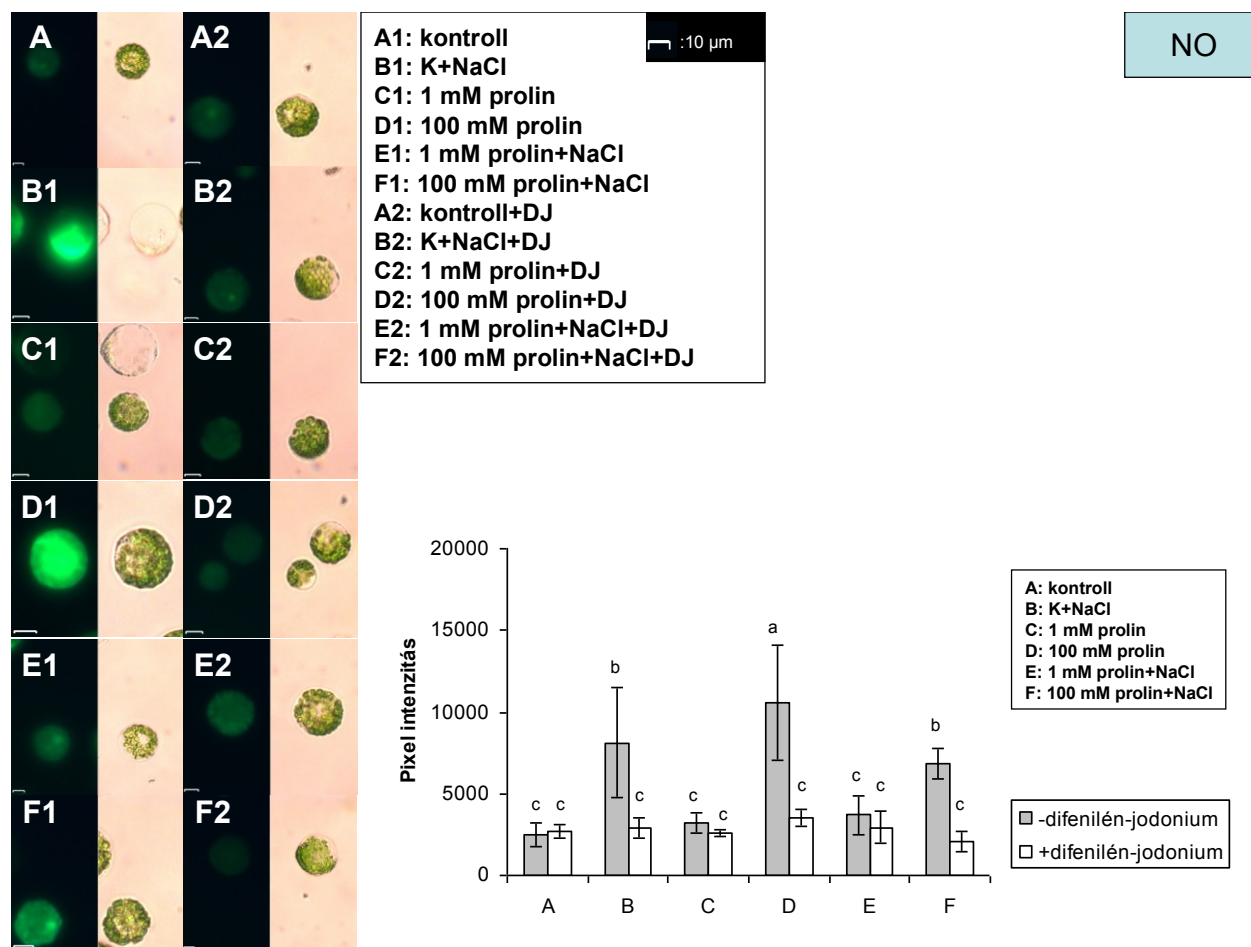


23. ábra: A 100 mM NaCl hatása eltérő prolin koncentrációkkal kezelt paradicsom protoplasztok életképességére. A paradicsom protoplasztokat FDA-val festettük meg. Mércse=10 µm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter felhasználásával készítettük (10-es filter exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm).

Mivel a prolinnak ismert az antioxidáns szerepe is, paradicsom protoplazmákkal végeztünk kísérleteket annak megválaszolására, hogy az eltérő prolin koncentrációk hogyan hatnak a NO és hidrogén-peroxid szintekre. Ezért NO és H₂O₂ festést alkalmaztunk, amit difenilén jodóniumos gátlás mellett is elvégeztünk. A difenilén jodónium (DPI) hozzáadásával gátolni tudtuk a szuperoxid gyökkanion előállításáért legnagyobb mértékben felelős enzimeket, a NADPH és mitokondriális NADH oxidázt, a xantinoxidázt vagy a poliamin oxidázt. A prolin kezelések mindkét koncentrációban megemelték a hidrogén-peroxid szinteket a kontrollhoz képest, nagyobb mértékű volt a H₂O₂ koncentráció növekedés a 100 mM Pro kezelés esetében. Sókezelést követően nem volt szignifikáns eltérés a sókezelt kontrollhoz képest egyik Pro koncentrációnál sem (24. ábra). A Pro által indukált H₂O₂ csak részlegesen volt gátolható DPI-vel, ami azt mutatja, hogy a ROS forrásai DPI-vel nem gátolható enzimek is lehetnek ebben az esetben. A NO szint nem változott szignifikánsan az 1 mM Pro kezelés esetében, viszont a 100 mM NaCl hatására és a 100 mM Pro kezelésre szignifikáns növekedést tapasztaltunk. Sóhatásra a NO szint az 1 mM Pro kezelésnél nem változott a só nélküli állapothoz viszonyítva, viszont a 100 mM Pro esetében a NO szint a 100 mM NaCl-dal kezelthez volt hasonló (25. ábra). Az életképesség csökkenése tehát azoknál a kezeléseknél figyelhető meg, ahol a H₂O₂ mellett a NO is magas marad, vagyis a 100 mM NaCl, a 100 mM Pro és a 100 mM Pro+NaCl esetén. Ez utóbbi mintánál azonban a Pro kezelés nem fokozza a sóhatást.



24. ábra: 100 mM-os NaCl, 1 és 100 mM-os prolin, valamint a két prolin koncentráció és a sóstressz együttes hatása paradicsom mezofillum protoplasztok hidrogén peroxid tartalmára. Az üres oszlopok a difenilén jodónium gátló hatását mutatják. A paradicsom protoplasztokat 10 μM DC-FDA-val festettük meg. Mércse=10 μm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter felhasználásával készítettük (10-es filter exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm). (Átlag± SE, n=10) A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten, amit a Tukey teszt segítségével határoztunk meg.



25. ábra: 100 mM-os NaCl, 1 és 100 mM-os prolin, valamint a két prolin koncentráció és a sóstressz együttes hatása paradicsom mezofillum protoplasztok NO tartalmára. Az üres oszlopok a difenilén jodónium gátló hatását mutatják. A paradicsom protoplasztokat 10 μ M DAF-2DA-val festettük meg. Mércse=10 μ m. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter felhasználásával készítettük (10-es filter exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm). (Átlag \pm SE, n=10) A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Tukey teszt segítségével határoztunk meg.

5.2.6. Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigéngyökök eltávolítása

5.2.6.1. Enzimatiskus antioxidáns védekezési rendszer

A szalicilsavról közismert, hogy oxidatív stressz generálásával programozott sejthalált indukál a hiperszenzitív reakció során (Raskin, 1992). Az abiotikus stresszorokkal szembeni védőhatását is az antioxidáns enzimrendszer aktiválásával magyarázzák. Vizsgáltuk a legfontosabb, a reaktív oxigénformák eltávolítását katalizáló enzimek aktivitását a SA-val előkezelt növényekben az egyhetes sókezelés időtartama alatt napi lebontásban és 3 növényi szervben, fiatal hajtásban, alsó levélben és gyökérben.

5.2.6.1.1. Kataláz (KAT) enzim aktivitása

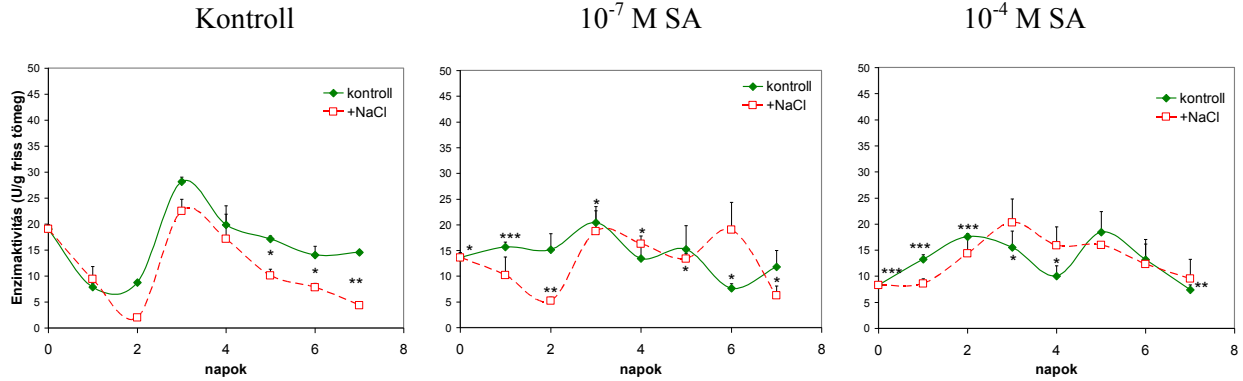
A kataláz az egyik legfontosabb enzim, mely a sejtekben keletkező hidrogén-peroxidot lebontja. A lecsökkent katalázaktivitás hatására hidrogén-peroxid szint növekedés lép fel, aminek eredményeképpen más antioxidáns enzimek aktiválódhatnak. Az ábrák összetettségére való tekintettel az előkezeléseket és a hozzájuk tartozó sóstressszelt mintákat külön diagrammon ábráztuk, a szignifikás eltéréseket azonban mindig az aznapi abszolút kontrollhoz viszonyítottuk.

A SA-val előkezelt fiatal levelekben csökkent kataláz aktivitásokat mértünk a 100 mM-os NaCl-dal történő kezelés kezdetekor az abszolút kontrollhoz viszonyítva és végig a kísérlet 3. napjától. (26. ábra). A 10^{-4} M-os SA kezelés az alsó levelek KAT aktivitását azonban szignifikánsan emelte. Átmenetileg, mindkét SA kezelésnél volt a gyökérzetben a kontrollt meghaladó enzimaktivitás. Sókezelés után a fiatal kontroll levelekben az enzim aktivitása a 2. naptól kezdve a kísérlet végéig a kontroll alatt maradt. A sóstressz az SA előkezelt levelekben is csökkentette a KAT aktivitást, ami a kísérlet végén az abszolút kontroll alatt maradt, nem különbözött viszont a saját, SA-előkezelt kontrolljaitól. Az alsó levelekben az enzimaktivitások jóval kisebbek. Legjelentősebb különbség, hogy a 100 mM-os NaCl kezelés a kontrollban mérsékelten, az SA előkezeléseknél, különösen 10^{-4} M-nál tartósan és nagyobb mértékben emelte meg a KAT aktivitást, ami ennél a koncentrációnál hatékony H_2O_2 bontásra utal.

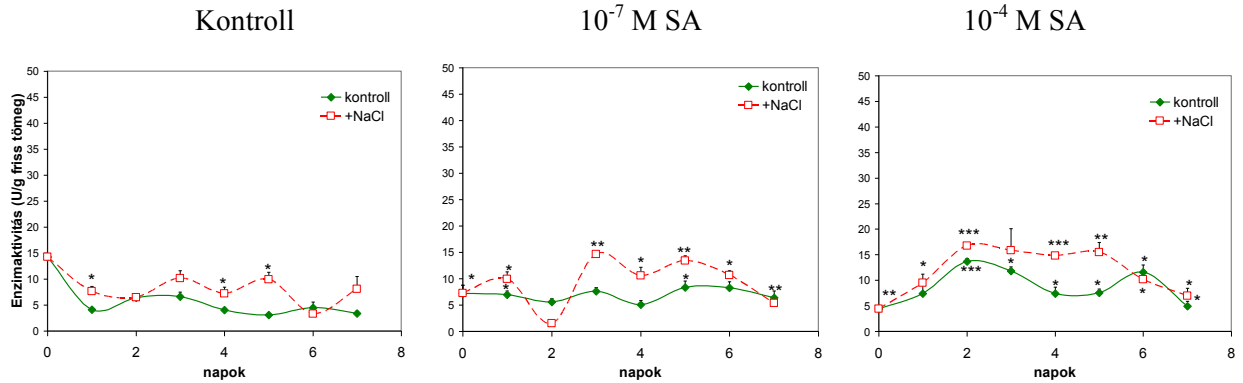
A gyökerekben az előkezelés végén mért enzimaktivitások nem különböztek a kontrolltól. Ugyancsak nem csökkent jelentősen és jól leírható tendencia szerint a KAT aktivitás az előkezelt

gyökerekben, és NaCl kezelés hatására sem. Az idő függvényében felvett görbén egy-egy mintavételnél, de nem tendenciaszerűen adódtak különbségek.

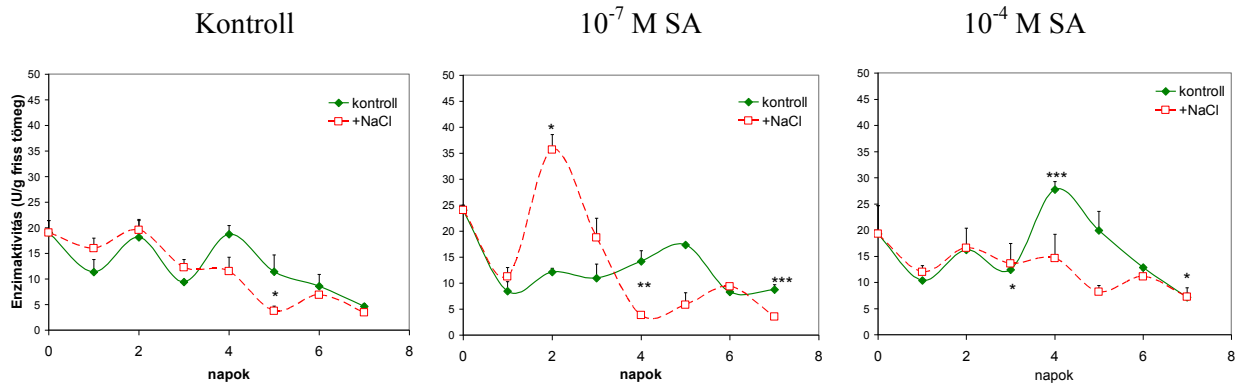
Fiatal levél KAT enzimaktivitása:



Alsó levél KAT enzimaktivitása:



Gyökér KAT enzimaktivitása:



26. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének kataláz aktivitásának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik). Az enzimaktivitás mértékegységének az $U\ g^{-1}$ friss tömeg értékét alkalmaztuk.

A megemelkedett SA szinttel rendelkező mutánsokban magasabb kataláz aktivitásokat mutattak ki, (Mateo és mtsai, 2006), ami feltételezi azt a koncepciót, hogy a SA emelt hidrogén-peroxid szinteket alakít ki, amire a sejt hosszabb távon megnövekvő kataláz aktivitással reagál. Ez a jelenség tételezhető fel a 10^{-7} és 10^{-4} M SA kezelt növények alsó leveleiben a sóstresszt követően, itt történt egy kismértékű kataláz aktivitás emelkedés. A gyökérben nem csökkent jelentősen, az extrahálható kataláz aktivitás, sőt a kísérlet végén a kontroll értékénél szignifikánsan magasabb volt, azaz a gyökér mindvégig képes volt a keletkezett hidrogén-peroxid KAT általi átalakítására.

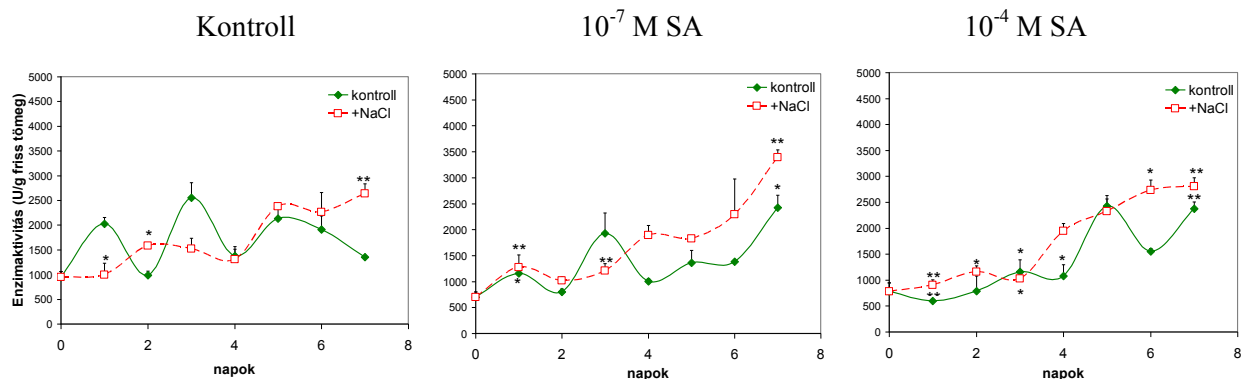
5.2.6.1.2. Peroxidáz (POD) enzim aktivitás

A POD és a GR működését szintén serkenti a SA *in vivo* (Dat és mtsai, 1998; Janda és mtsai, 1999). A vizsgált enzimaktivitások általában jelentős fluktuációt mutatnak az egyes mintavételi pontokon, habár a mintavételeket azonos időpontban végeztük. A görbék a többszöri ismétlés ellenére sem egyenes lefutásúak, így az extrahálható enzimaktivitás értékek valószínűleg kapcsolatban vannak az endogén cirkadián ritmusok stressz hatására történő változásaival.

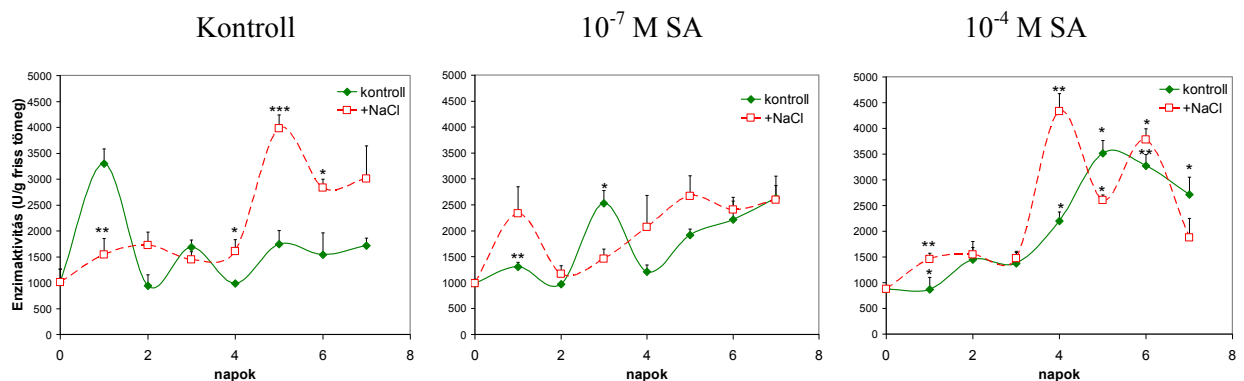
A POD aktivitások a fiatal levelekben nem változtak jelentősen az előkezelések hatására, itt a 7. mintavételi napon kaptunk kissé megemelkedett aktivitást. A sóstressz csak a kísérlet végén okozott szignifikáns aktivitás övekedést, ami a 10^{-7} M-os SA előkezelésnél volt a legjelentősebb és az akklimatizációt javító 10^{-4} M-nál kisebb mértékű. Az alsó levelekben jóval nagyobb a POD aktivitás növekedése a 10^{-4} M-os előkezelésnél, mint a csúcsi levélben. Jelentősen megnövekedett POD aktivitások mérhetők a kontroll levelekben 100 mM NaCl hatására, míg ez a növekedés a kisebb SA koncentrációnál minimális, a nagyobbánál pedig egy erős aktivitás emelkedést követően csökkenő tendenciát mutat.

A gyökérben mért enzimaktivitások a kontrollhoz képest jelentősen növekednek, és emelkedő tendenciát mutatnak az előkezelések hatására. A sókezelés ezt a tendenciát nem változtatja meg jelentősen azzal a kivétellel, hogy a kontroll gyökérben megmarad az emelkedő POD aktivitás, míg az előkezeltekben a kísérlet végére sóstressz alatt lecsökken. Megállapítható, hogy az átmenetileg megemelkedő peroxidáz aktivitás is hozzájárulhat a sóstressz alatt a ROS inaktiválásához, a kísérlet végére csökkenő tendencia akklimatizáció kialakulását tükrözheti a 10^{-4} M-os előkezelésnél (27. ábra).

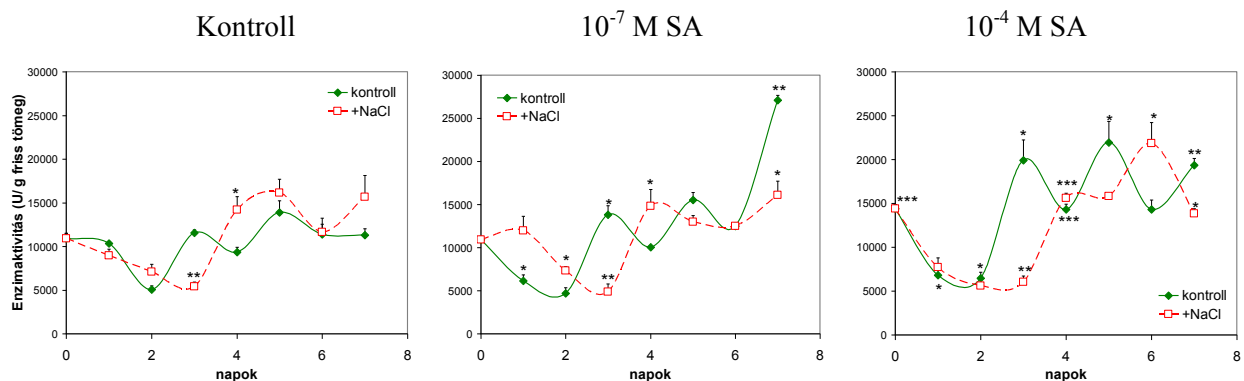
Fiatallévél POD enzimaktivitása:



Alsó levél POD enzimaktivitása:



Gyökér POD enzimaktivitása:



27. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levélének és gyökerének guajakol peroxidáz enzim aktivitásának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik). Az enzimaktivitás mértékegységének az U g⁻¹ friss tömeg értéket alkalmaztuk.

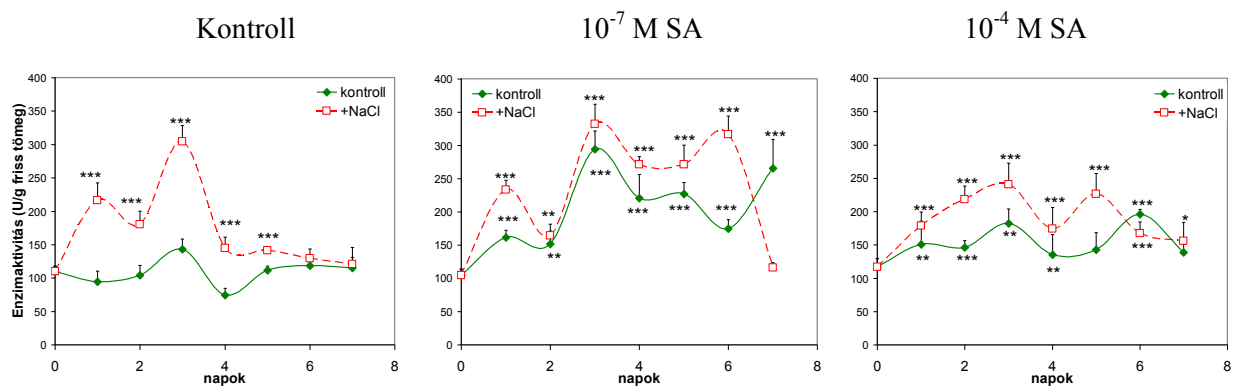
5.2.6.1.3. Szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitás

A szalicilsav serkenti a Cu- és Zn-SOD enzim aktivitását *Arabidopsis*-ban, mely hozzájárulhat a H₂O₂ szint emelkedéséhez (Rao és mtsai, 1997).

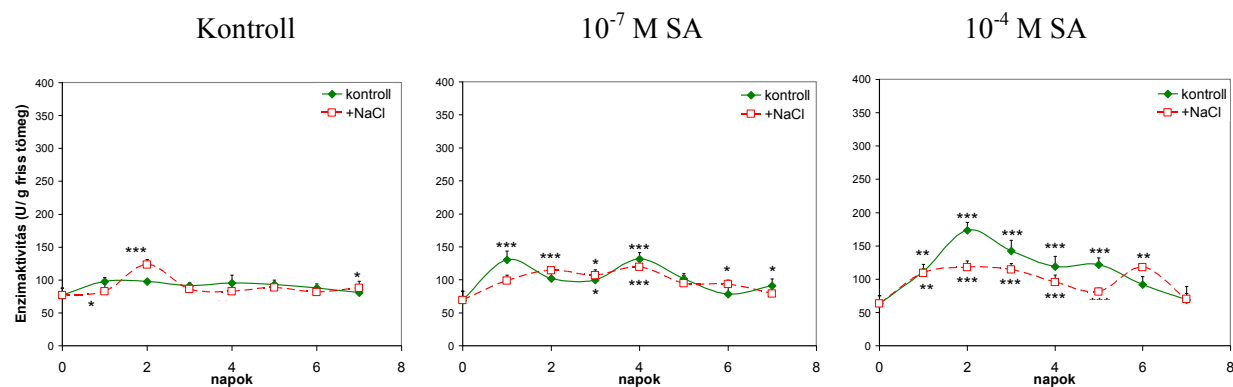
A 100 mM-os NaCl kezelés a fiatal levelekben a kontrollhoz képest több mint kétszeresére emelte a SOD aktivitást. A 10⁻⁷ M SA kezelt növények fiatal leveleiben jelentősen megemelkedett az extrahálható SOD enzimaktivitás és ez még fokozotabb volt a sókezelés hatására, bár a 7. napra a só nélküli érték alá csökkent. A 10⁻⁴ M SA kezelés kismértékű növekedést eredményezett a fiatal levelekben, ami a sókezelés hatására szignifikánsan megemelkedett, de ez a kísérlet végére lecsengett, és általában alacsonyabb maradt, mint a sókezelt kontroll (28. ábra). A kezelt növények alsó leveleiben enyhe növekedés tapasztalható SA hatására, ez jelentősebb 10⁻⁴ M-nál. A sóstressz az aktivitásokat minimálisan változtatta meg az előkezelésekhez képest, ez a 10⁻⁴ M-os SA-nal gátlás volt.

A SOD aktivitás a 10⁻⁷ M SA növények gyökerében emelkedett jelentősen a kontrollhoz képest, és a 7. napon kiugróan magas enzimaktivitásokat mértünk. A sóstressz mérsékelten emeli a SOD aktivitást a kontrollban, a 10⁻⁷ M SA előkezelt gyökerekben viszont a kezdeti aktivitásnövekedés lecsengett a 4. nap után. A 10⁻⁴ M SA előkezelt gyökerekben nem volt jelentős a SOD aktivitás növekedés a sókezelés hatására sem. Összegezve elmondható, hogy mind a fiatal hajtásban és a gyökérben a 10⁻⁷ M SA a SOD enzimaktivitás növekedésével jelentősen megnöveli a reaktív oxigénformák mennyiségét, míg a 10⁻⁴ M SA koncentráció nem okoz jelentős változást a kontroll növények értékeihez képest.

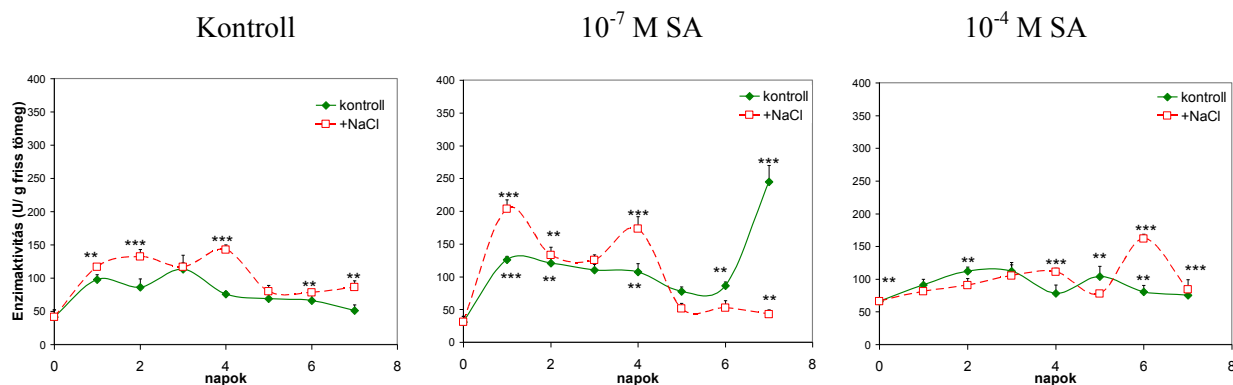
Fiatal levél SOD enzimaktivitása:



Alsó levél SOD enzimaktivitása:



Gyökér SOD enzimaktivitása:



28. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének szuperoxid dizmutáz enzim aktivitásának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag \pm SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik). Az enzimaktivitás mértékegységének az U g⁻¹ friss tömeg értékét alkalmaztuk.

5.2.6.1.4. Aszkorbát peroxidáz (APX) enzim aktivitása

Az APX az aszkorbát-glutation ciklus egyik elemeként fontos szerepet játszik a celluláris H₂O₂ detoxifikációjában, ami a szuperoxid dizmutációjának toxikus terméke.

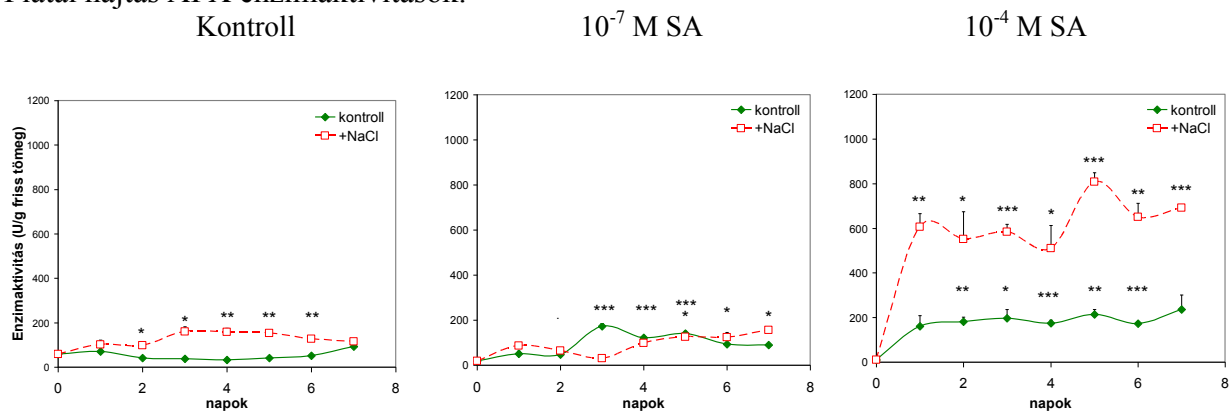
Mittova és mtsai (2000) összehasonlították a termesztett paradicsom (*S. lycopersicum*) és a vadon növény, sőtűró paradicsom (*S. pennellii*) gyökerének sóstresszre adott oxidatív válaszait és azt kapták, hogy a sóstressz által indukált oxidatív stressz elleni védelem a SOD, APX és POD enzimek megemelkedett aktivitásaival magyarázható.

A 10⁻⁷ M SA előkezelés egyik növényi szervben sem okozott APX enzimaktivitás emelkedést, sőt a gyökérben sóstresszt követően jelentős csökkenés következett be. Ez arra utal, hogy a 10⁻⁷ M SA előkezelés a változatlan APX és magas SOD aktivitás miatt nem volt hatékony a celluláris hidrogén peroxid eliminálásában (29. ábra).

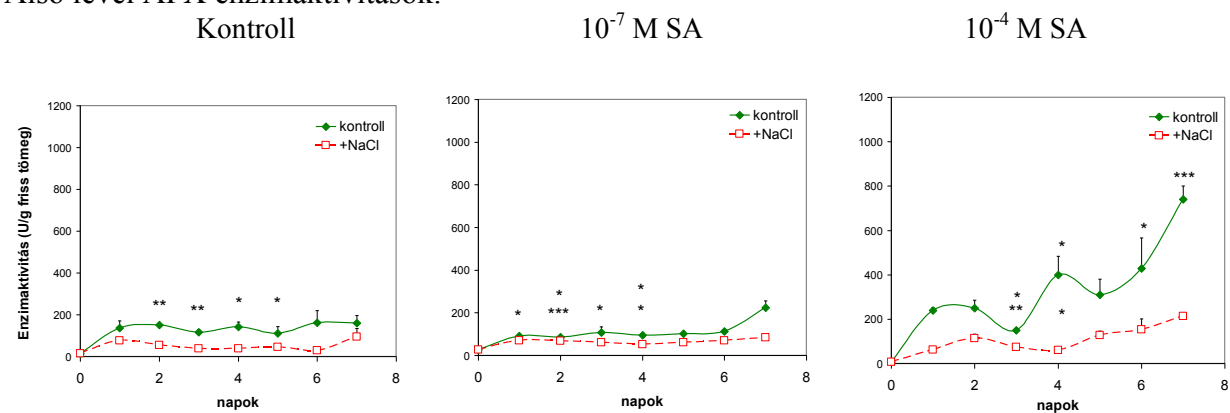
A 10⁻⁴ M SA előkezelés már a sóstressz előtt a kontrollhoz viszonyítva jobban megemelte az APX aktivitást, sókezelést követően pedig még szembetűnőbb volt az enzimaktivitás emelkedés. Az előkezelt növények alsó levelében az alap APX aktivitás megnövekedett ugyan, de ez a sókezelés után szignifikánsan lecsökkent. A gyökérben szintén nagy volt az előkezelés hatására bekövetkező APX aktivitásemelkedés, és a sóstresszt követően a sókezelés 7. napjára az előkezelt gyökér aktivitása fölé emelkedett (29. ábra).

Megállapítható, hogy a 10⁻⁴ M SA előkezelés során a különösen a gyökerekben jelentősen megemelkedett APX aktivitás lehetővé tette a H₂O₂ sikeres detoxifikációját, és ez az egyik legfontosabb tényezője a fenti SA koncentráció sóstressz akklimatizációt fokozó hatásának.

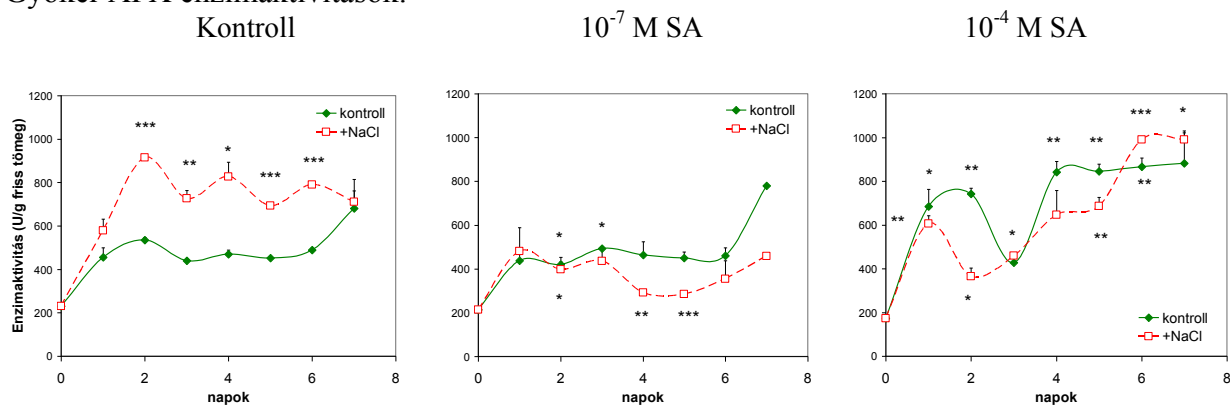
Fiatal hajtás APX enzimaktivitások:



Alsó levél APX enzimaktivitások:



Gyökér APX enzimaktivitások:



29. ábra: 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levélének és gyökerének aszkorbát peroxidáz enzim aktivitásának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik). Az enzimaktivitás mértékegységének az U g⁻¹ friss tömeg értékét alkalmaztuk.

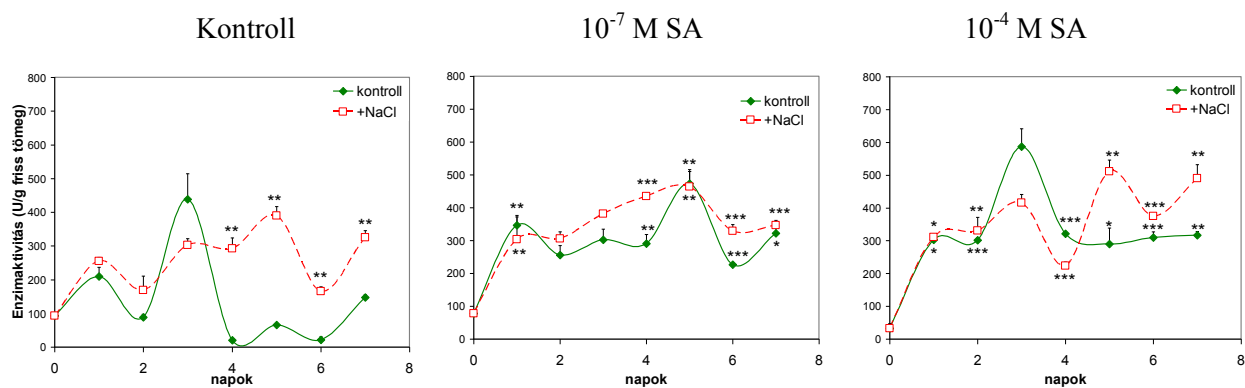
5.2.6.1.5. Glutation reduktáz (GR) enzim aktivitása

A SA előkezelések hatására a dehidroaszorbinsav glutationnal történő redukcióját végző DHAR aktivitását kiegészítő, a DHAR reakcióban keletkező GSSG-t redukáló glutation reduktáz aktivitása a fiatal levélben a SA előkezelt növényekben jelentősen megemelkedett a kontrollhoz képest, ez átmenetileg a legnagyobb értéket a 10^{-4} M-os kezelésnél érte el. A sóstressz az alap GR aktivitást jelentősen megemelte a kontrollban, ez az emelkedés a 10^{-4} M SA előkezelt hajtásban sóstressz hatására még nagyobb volt. Ez a GSSG hatékonyabb redukciójára utal sóstressz alatt a nagyobb SA koncentrációval előkezelt növények fiatal leveleiben. Az alsó levelekben minimális GR aktivitások voltak mérhetőek. A 10^{-7} M SA előkezelés nem emelte meg a kontrollhoz képest a GR aktivitásokat, viszont a sóstressz alatt kis aktivitásnövekedés volt tapasztalható.

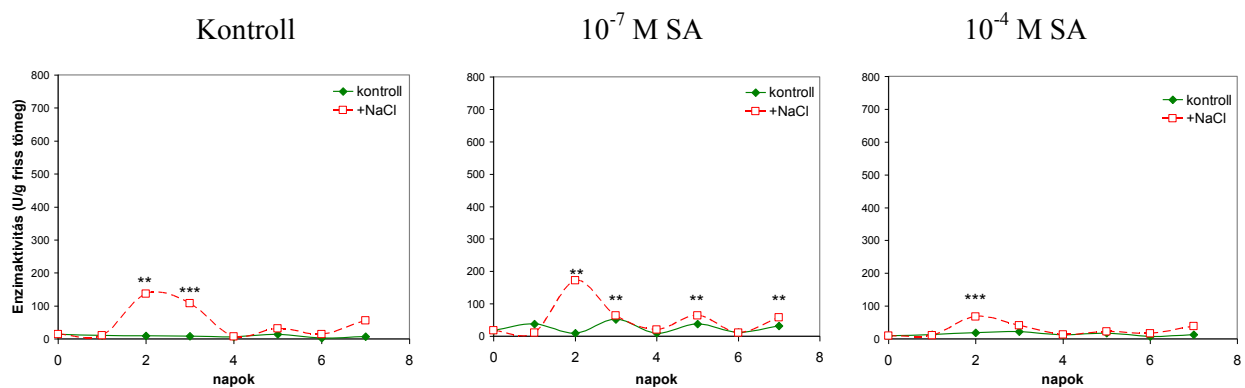
A gyökérben az előkezelések szintén emelték a GR aktivitást. Ezt a sókezelés minden esetben fokozta, különösen magas aktivitások alakultak ki a 10^{-4} M SA előkezelt növények gyökerében, azaz a glutation redukálása hatékony volt mind az előkezelés, mind az azt követő sókezelés ideje alatt. A 10^{-4} M SA előkezelt növények gyökerében detektált GR enzimaktivitás növekedés jól korrelált a GSH tartalom változásával sóstresszt követően. (30. ábra).

Összefoglalásként megállapítható, hogy azoknál a kezeléseknél, ahol a sóstressz károsító hatásai jelentkeznek, a fiatal levelekben és a gyökerekben magas SOD aktivitás (K, 10^{-7} M SA), átmenetileg (10^{-7} M SA, fiatal levél, gyökér,) vagy tartósan csökkent KAT aktivitás (K, fiatal levél) figyelhető meg sóstressz alatt. Ezekben a mintákban (K, 10^{-7} M SA fiatal levél, gyökér) sóstressz alatt tartósan magas marad a POD aktivitás, ami azonban hozzájárulhat a H_2O_2 elbontásához. A 10^{-4} M-os, az akklimatizációt elősegítő kezelésnél a magas POD aktivitások a kísérlet végére lecsökkennek, ami az akklimatizáció sikerére utal. A H_2O_2 átalakításához a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt fiatal levelekben a sóstressz hatására, a gyökerekben pedig az előkezelés következtében megemelkedett APX aktivitás is döntően hozzájárul. Az antioxidáns enzimek működéséhez és egyes nem enzimikus antioxidánsok redukált állapotának fenntartásához szükséges GR rendkívül magas alapaktivitása és a sóstressz általi indukáltsága tovább segíti a 10^{-4} M SA-val előkezelt növényekben a sóstressz akklimatizációt.

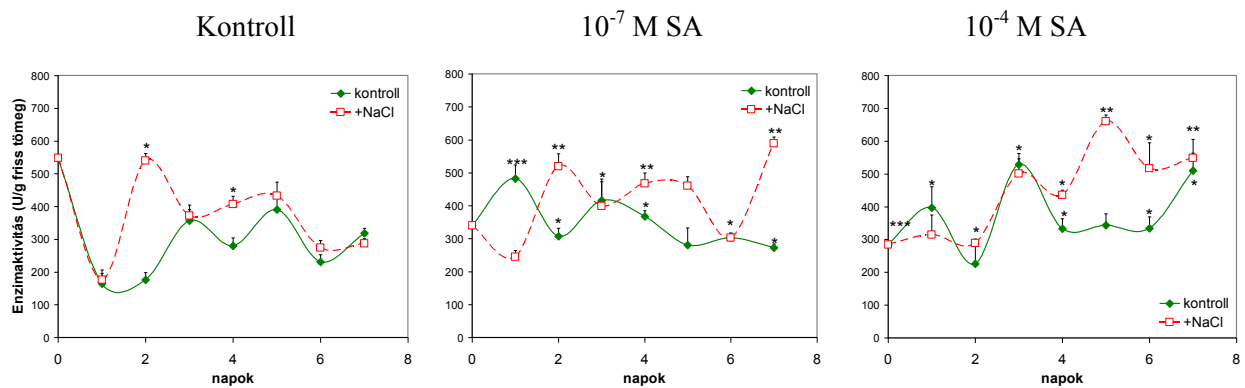
Fiatal levél GR enzimaktivitások:



Alsó levél GR enzimaktivitások:



Gyökér GR enzimaktivitások:



30. ábra: 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének glutation redukáz enzim aktivitásának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag \pm SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P\leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik). Az enzimaktivitás mértékegységének az U g⁻¹ friss tömeg értékét alkalmaztuk.

5.2.6.2. Nem enzimatis antioxiidáns védekezési rendszerek

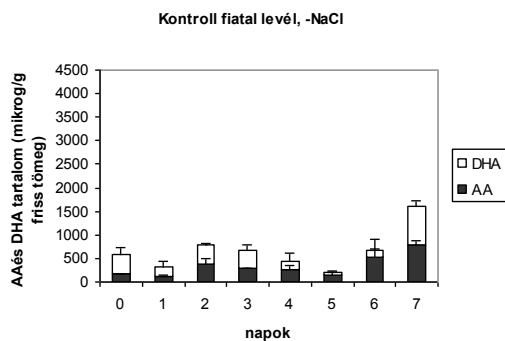
Az enzimatis komponensek mellett fontos szerepet tölthetnek be a nem enzimatis antioxiidáns vegyületek is, mint az aszkorbát és a glutation. Ezeknek az antioxiidánsoknak a redox állapota, azaz milyen arányban vannak redukált állapotban a teljes poolban, befolyásolja a sóstressz által kiváltott oxidatív stressz elleni védekezést. Ezért vizsgáltuk az idő függvényében az aszkorbát és dehidroaszkorbát, valamint a redukált és oxidált glutation koncentrációk változását a különböző SA koncentrációkkal előkezelt növények eltérő szöveteiben.

5.2.6.2.1.Redukált aszkorbát és dehidroaszkorbát tartalom változása sóstressz hatására

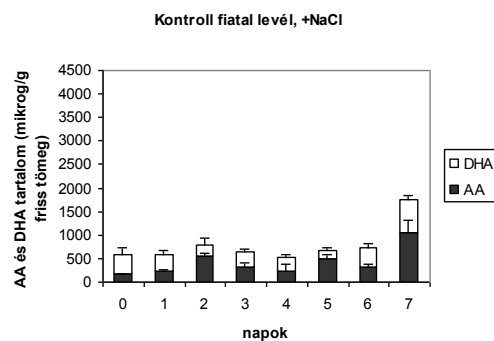
Az aszkorbát az egyik legfontosabb nem enzimatis antioxiidáns vegyület. A redukált és oxidált formájának egymáshoz viszonyított arányát nagymértékben befolyásolják a káros abiotikus stresszhatások. Az aszkorbát pool csökkenése bekövetkezhet az oxidatív stressz által, a sóstresszre kialakuló alacsony aszkorbát tartalom jele lehet az APX erőteljes részvételének a ROS kioltásban, mivel azt szubsztrátként képes felhasználni.

Megállapítható, hogy a levelek aszkorbinsav tartalma a SA kezelése hatására megemelkedett, ez elsősorban a 10^{-7} M-nál jelentős. A gyökerekben mindkét SA előkezelés közel azonos mértékben emelte meg az aszkorbinsav poolt. A gyökérben általában nagyobb volt a DHA aránya az AA-hoz képest, mint a hajtásban, különösen a 10^{-7} M-os előkezelésnél (31., 32., 33. ábra).

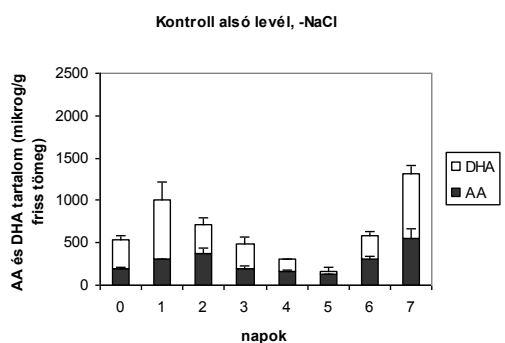
A kontroll növényekben és a 10^{-4} M-os előkezelt mintákban a sóstressz nem okoz lényeges változást az AA poolban, a 10^{-7} M-os előkezelésnél azonban mérsékelt csökkenés figyelhető meg a SA-kezelt kontrollokhoz képest. (32. ábra). A 10^{-7} M SA előkezelésnél azzal magyarázható az alacsony aszkorbát tartalom sóstressz alatt, hogy ennél a kezelésnél a nem enzimatis antioxiidáns védekezési rendszert jelentős mértékben használja a növény az antioxiidáns enzimek 5.2.6.1.4. pontban részletezett aktivitásváltozása miatt megemelkedett H_2O_2 inaktiválására.



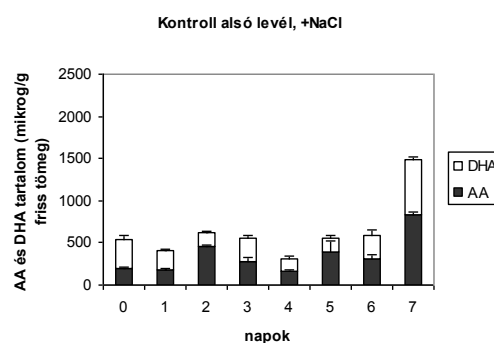
AA/DHA 0,38 0,48 0,94 0,7 0,98 3,54 1,28 0,92



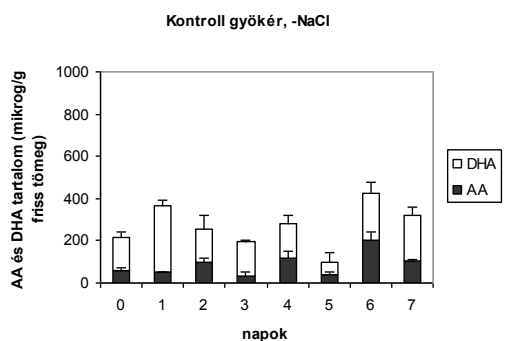
AA/DHA 0,38 0,62 2,37 1,02 0,83 2,79 0,82 1,52



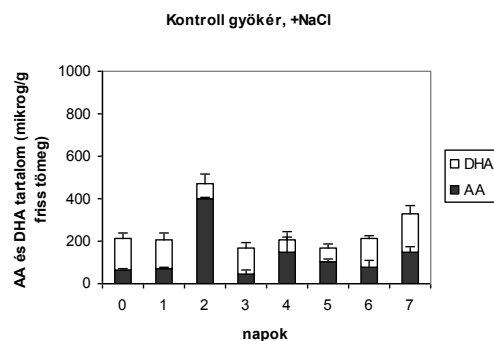
AA/DHA 0,54 0,43 1,08 0,65 1,11 2,52 1,07 0,71



AA/DHA 0,54 0,83 2,75 1,05 1,01 2,23 1,09 1,25

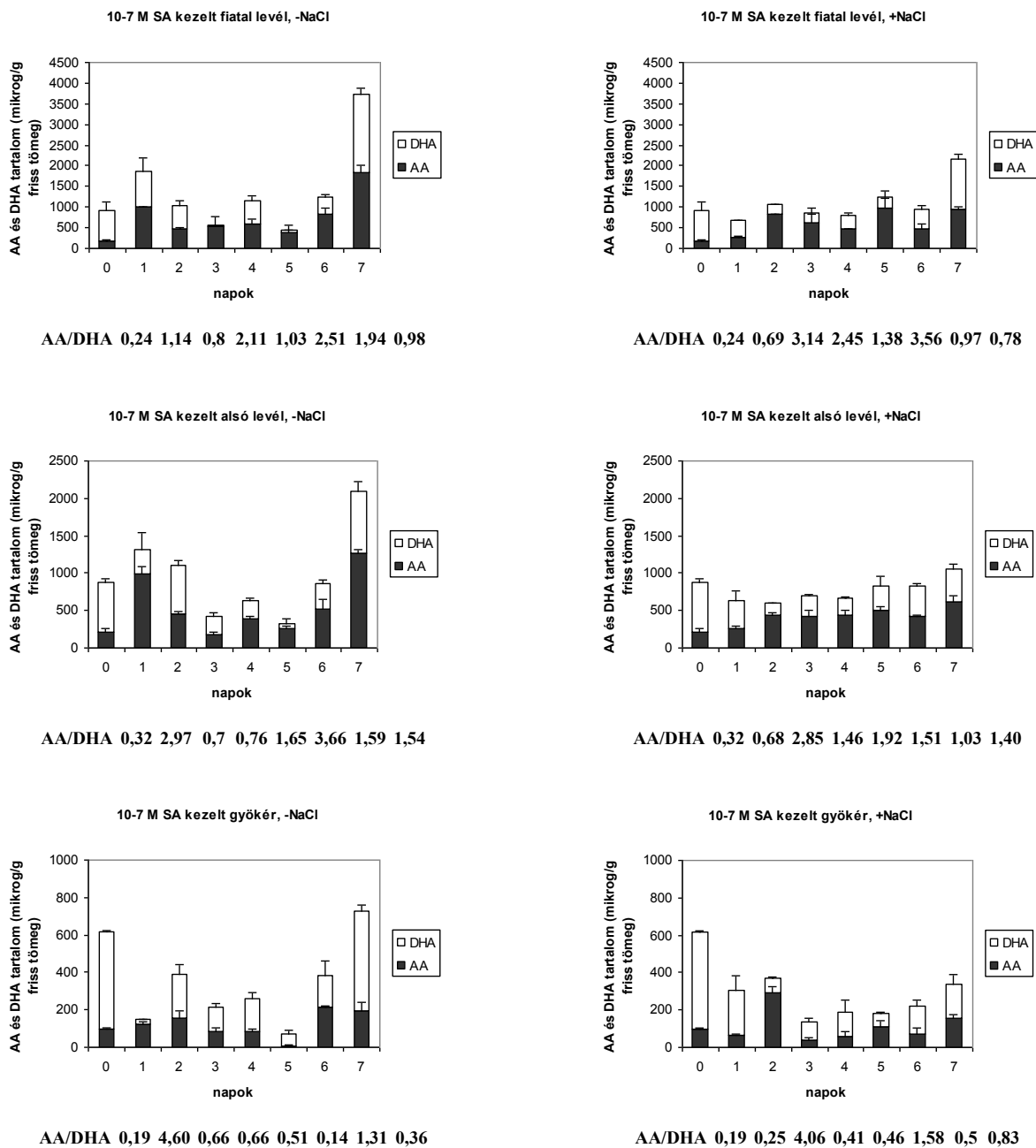


AA/DHA 0,4 0,16 0,61 0,21 0,71 0,77 0,88 0,46

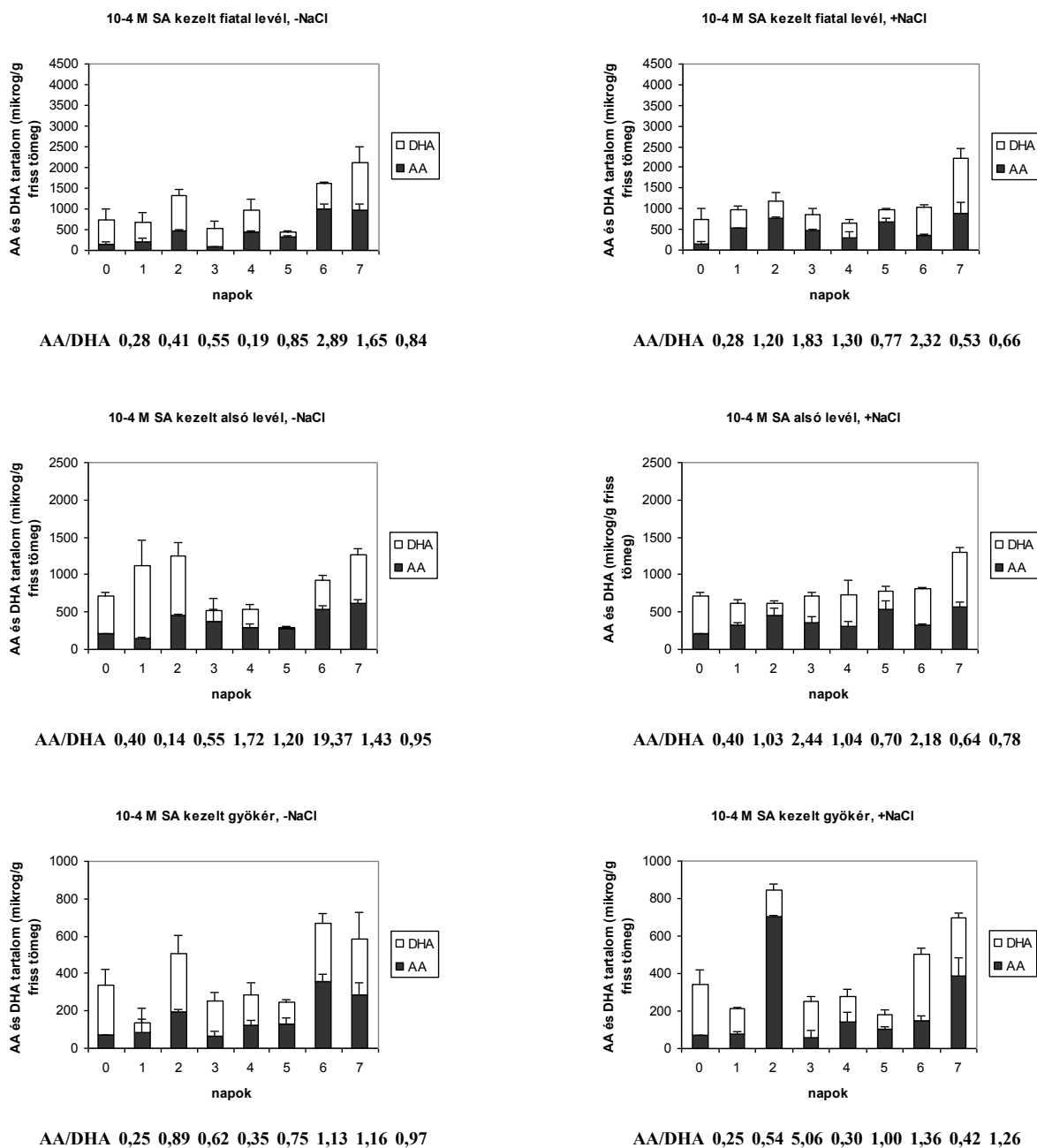


AA/DHA 0,4 0,49 5,51 0,33 2,61 1,74 0,58 0,82

31. ábra: A 8 hetes, kontroll paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének redukált aszkorbát (AA, fekete oszlop) és dehidroaszkorbát (DHA, fehér oszlop) tartalmának változása az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 7. és 8. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az AA/DHA arányt mutatják az egyes időpontokban.



32. ábra: 10⁻⁷ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének redukált aszkorbát (AA, fekete oszlop) és dehidroaszkorbát (DHA, fehér oszlop) tartalmának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 7. és 8. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az AA/DHA arányt mutatják az egyes időpontokban.



33. ábra: 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének redukált aszkorbát (AA, fekete oszlop) és dehidroaszkorbát (DHA, fehér oszlop) tartalmának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001(***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 7. és 8. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az AA/DHA arányt mutatják az egyes időpontokban.

5.2. 6.2.2. A glutation tartalom változása az előkezelések és az ezt követő sóstressz hatására

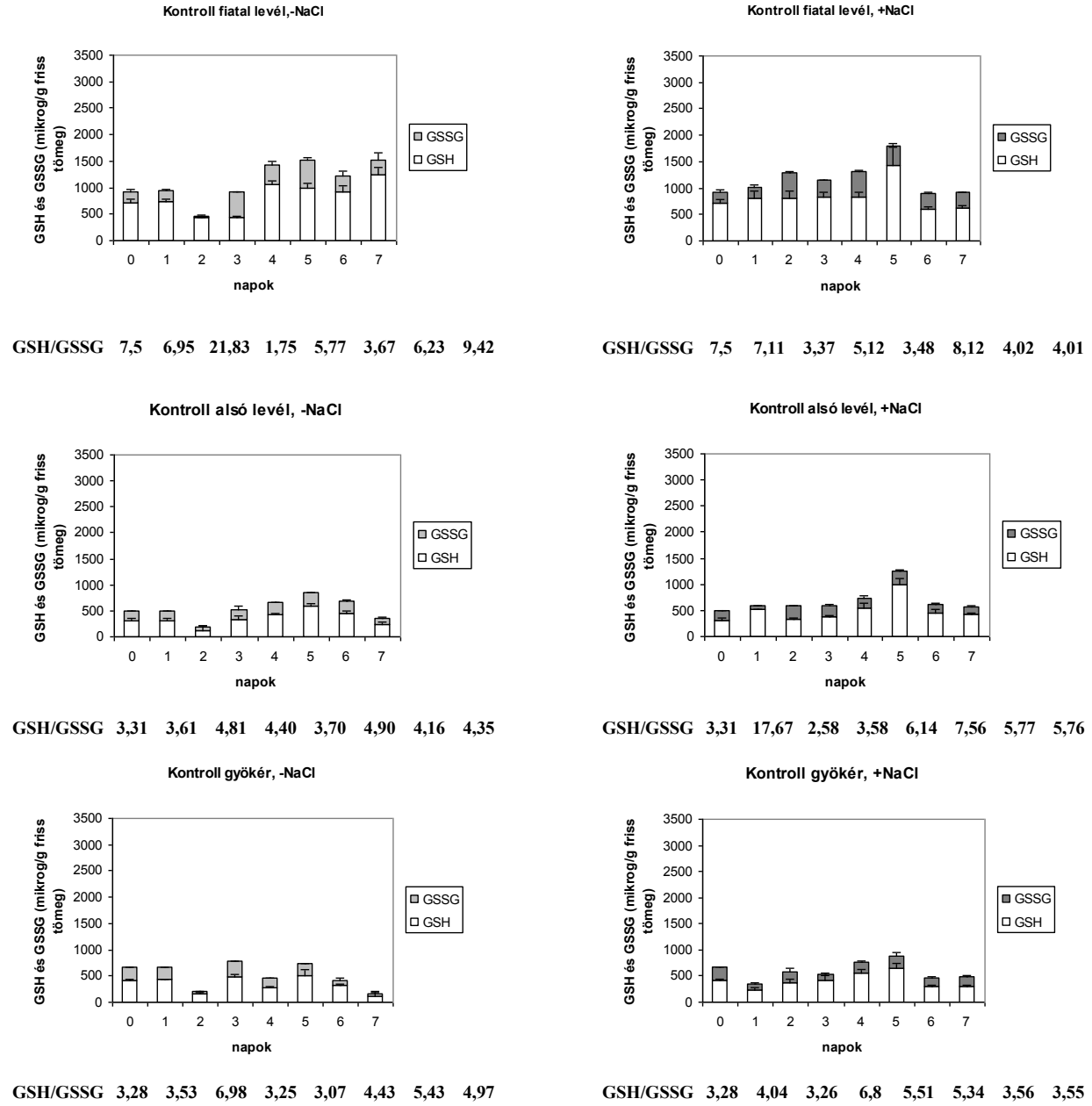
A glutation az antioxidáns védekezési rendszer egyik fő komponense és a sejt redox státuszának fő meghatározója (Mullineaux és Rausch, 2005). SA-deficiens, *NahG* rizs növényekben alacsony volt a GSH tartalom, ami magyarázat lehet arra a tényre, hogy ezek a növények nagyobb érzékenységet mutatnak oxidatív károsodásra. Ez magában foglalja annak a lehetőségét, hogy a SA szabályozza a GSH bioszintézisét rizsben (Kusumi és mtsai, 2006). Más irodalmi adatok alapján a szalicilsav és a redukált glutation képes egymás szintjének növelésére (Mateo és mtsai, 2006). Néhány *Brassicaceae* faj Ni toleranciájának analízise pozitív korrelációt derített fel a SA és a GSH szintek változása között (Freeman és mtsai, 2005). A GSH/GSSG arányban bekövetkező csökkenés másodlagos következménye lehet a sóindukált oxidatív stressznek.

A SA előkezelések jelentősen megemelték a teljes glutation tartalmat a mi kísérleti rendszerünkben is a levelekben, különösen a fiatalabbakban. Ez a hatás a gyökérben mérsékelt volt. A 100 mM-os NaCl-nak nem volt szignifikáns hatása a glutation poolra a kontroll növények különböző szerveiben, a fiatal levelekben pedig a sókezelés utolsó periódusában (6., 7. nap) csökkenés figyelhető meg a kontrollhoz képest. A GSH pool a SA előkezelések hatására jelentősen megemelkedett a levelekben, különösen a 10^{-7} M-os mintákban a sóstressz hatására. A gyökérben azonban csak a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt mintákban volt jelentős emelkedés a glutation poolban (34., 35., 36. ábra).

A redukált és oxidált glutation aránya jelentős napi ingadozást mutatott. Megállapíthatjuk azonban, hogy a 10^{-7} M-os előkezelésnél a levelekben a kísérlet végére a redukált forma aránya nagyobb volt, mint a kontrollban vagy a 10^{-4} M-os SA kezelésnél. A sókezelés után a fiatal levelekben a 10^{-7} M-os SA-val előkezelt mintákban volt a redukált glutation aránya a legmagasabb, míg a gyökérben a 10^{-4} M-os előkezelt minták esetén tartósan redukáltabb a glutation pool, mint a sókezelt kontrollban és a kisebb SA koncentrációnál. A glutation pool redukáltsága jó összhangban van ezeknél a növényeknél megfigyelt sótoleranciával.

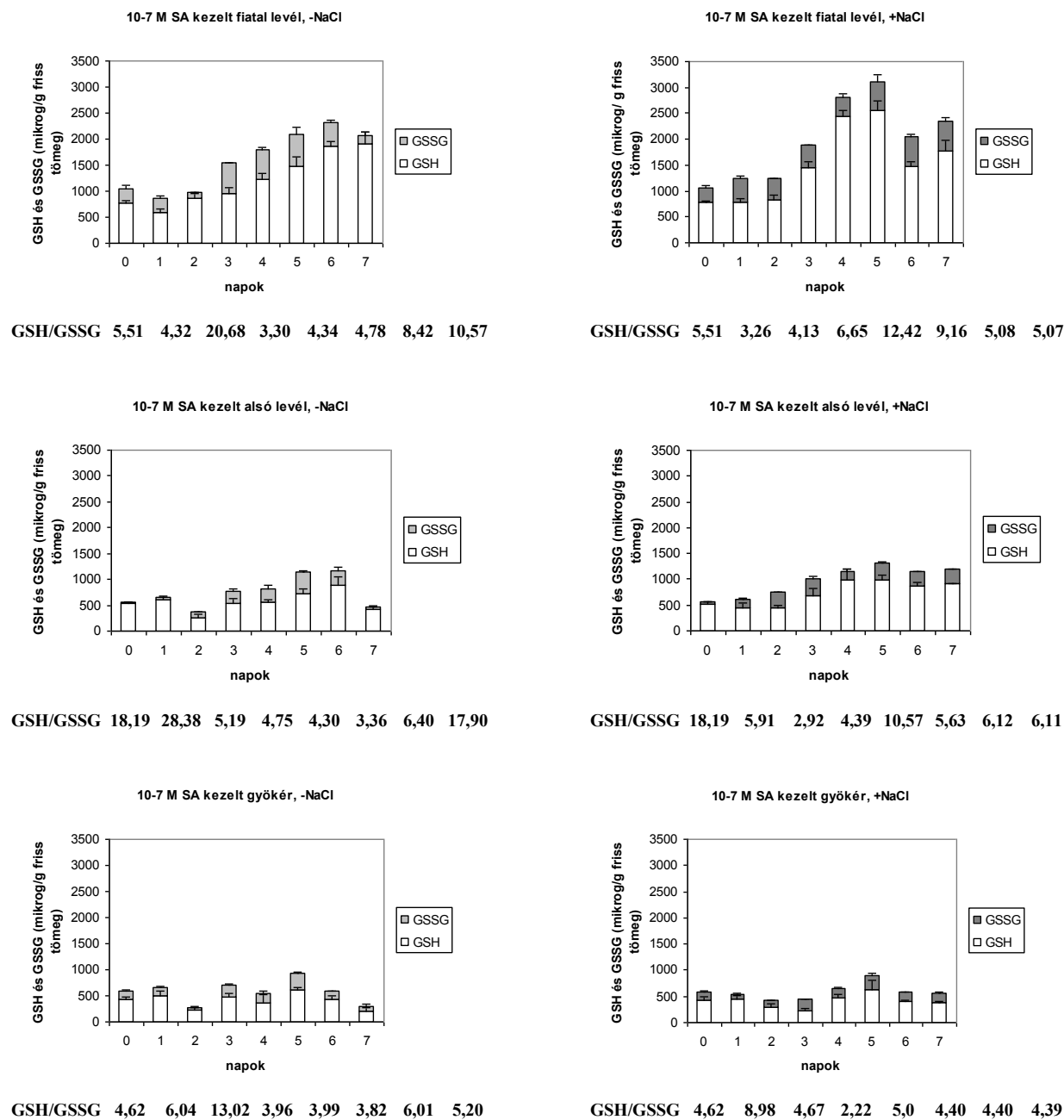
Összefoglalva a nem enzimatisz antioxidánsokkal kapcsolatos eredményeinket, a SA előkezelések tehát önmagukban, de a sóstressz alatt is jelentősen megemelték az AA és a GSH poolt a levelekben, a sóstressznek kitett gyökerekben azonban csak a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt mintákban találtuk a két nem enzimatisz antioxidáns koncentrációját nagyobboknak. Ez azt mutatja, hogy jelentős eltérések vannak a fiatal és az öreg levelek, valamint a gyökér és a hajtás antioxidatív válaszreakciói között. Mivel a sóhatásnak először a gyökér szövetei vannak kitéve,

ez a változás döntő jelentőségű a sikeres sóakklimatizáció szempontjából (36. ábra). Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a 10^{-4} M-os SA előkezelt növények a gyökerekben akkumulálták a nem enzimatis antioxiidánsokat, ami hatékony védelmet idézett elő a reaktív oxigénformák kioltásával. Ez különösen fontos, hiszen a magas sókoncentrációnak kitett gyökérben nagyon fontos a hatékony ROS inaktiválás a megfelelő növényi homeosztázis fenntartása érdekében.

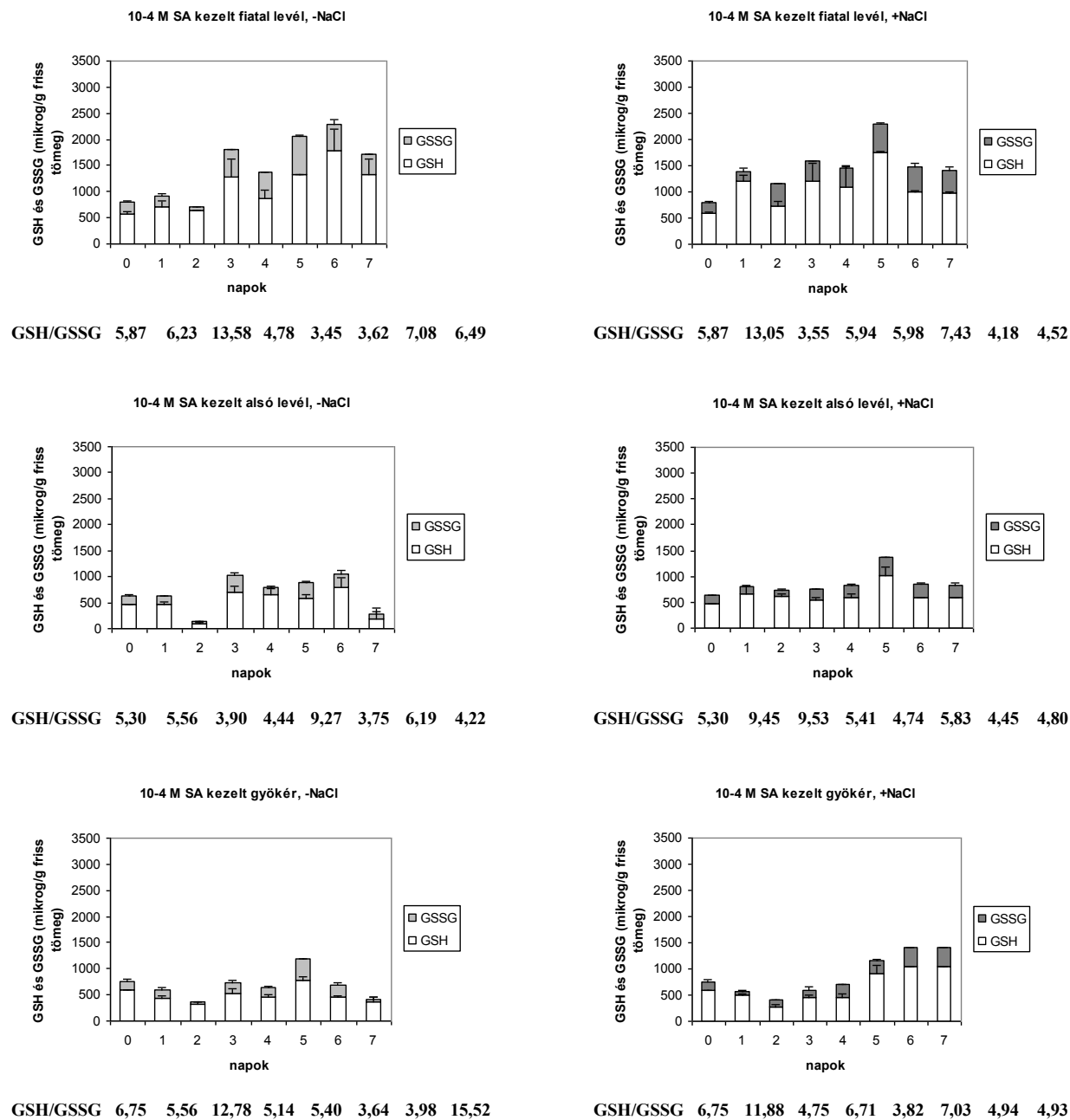


34. ábra: A 8 hetes, kontroll paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökérének redukált glutation (GSH, fehér oszlop) és oxidált glutation (GSSG, szürke oszlop) tartalmának változása az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*),

0,01 (**) vagy 0,001(***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 9. és 10. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az GSH/GSSG móljainak arányát mutatják az egyes időpontokban.



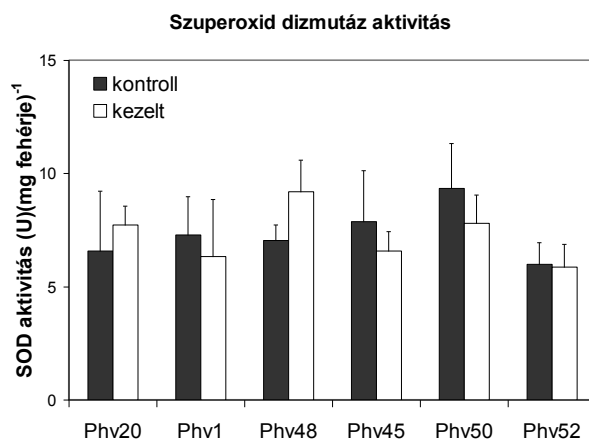
35. ábra: 10^{-7} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének redukált glutation (GSH, fehér oszlop) és oxidált glutation (GSSG, szürke oszlop) tartalmának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), 0,001(***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 9. és 10. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az GSH/GSSG móljainak arányát mutatják az egyes időpontokban.

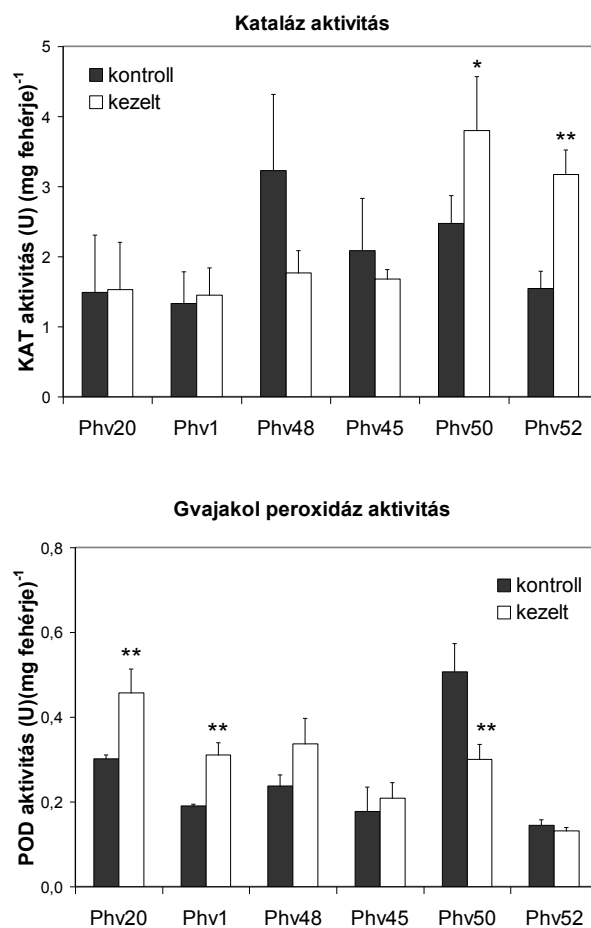


36. ábra: 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 8 hetes paradicsom növények fiatal hajtásának, alsó levelének és gyökerének redukált glutation (GSH, fehér oszlop) és oxidált glutation (GSSG, szürke oszlop) tartalmának változására az idő függvényében egy hetes, 100 mM NaCl kezelést követően. (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik, az ábrához tartozó statisztikát a mellékletben található 9. és 10. táblázat tartalmazza). Az ábrák alatt látható számok az GSH/GSSG móljainak arányát mutatják az egyes időpontokban.

5.2.6.3. Szárazságtűrő törpe bab növények oxidatív enzimei talajszárazságra adott válaszreakcióinak összehasonlítása a sóstressznek kitett, SA-előkezelt paradicsom növények oxidatív válaszaival

A következőben ismert szárazságtűrő és szenzitív törpe bab genotípusokkal egy hetes szárazságstressz hatását vizsgáló kísérleteink eredményeit hasonlítom össze a sóstressznek kitett, SA-kezelt paradicsom növényekben kapott oxidatív válaszok eredményeivel. Ennek az összehasonlításnak az a célja, hogy más, közismerten ozmotikus stressz toleráns genotípusokban megfigyelhető-e a 10^{-4} M-os SA kezelés hatásához hasonló válaszreakció. A szenzitív babfajták az ábra bal oldalán (Phv 20, Phv1, Phv 48), míg a toleráns bab genotípusok az ábra jobb oldalán láthatók (Phv45, Phv50, Phv52). Az enzimaktivitások szárazságstressz hatására bekövetkező változását a primér levélben mértük. Megállapítható, hogy a SOD aktivitás nem változott szignifikánsan a szárazság stresszt követően a különböző genotípusokban (Tari és mtsai, 2008). A KAT aktivitások nem változtak vagy csökkentek a stresszor hatására a szenzitív fajták primér levelében, ezzel egyidőben a toleráns fajták képesek voltak jelentősen megemelni KAT aktivitásukat, azaz hatékonyan tudták eliminálni a stressz hatására keletkezett hidrogén-peroxidot (37. ábra). A peroxidáz enzim aktivitása a szenzitív növények primér levelében emelkedett meg szignifikánsan, ezzel szemben a szárazságtűrő fajták esetében vagy nem változott vagy csökkent a POD aktivitás vízmegvonás után (37. ábra).





37. ábra: Törpe bab genotípusok oxidatív enzimeinek (SOD, KAT, POD) aktivitásának változása kontroll (fekete oszlop) és szárazság stresszt követően (fehér oszlop). (Átlag±SD, n=3, a *-gal jelölt kezelt minta a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik)

Ezek az eredmények hasonlóságot mutatnak azokkal az általunk bemutatott oxidatív válaszokkal, amiket paradicsomban mértünk. A H_2O_2 sikeres eltávolításában a sóstressz alatt is magas kataláz aktivitásnak van fontos szerepe, míg azok a paradicsom növények (a 10^{-4} M SA előkezelt minták), amelyek a kísérlet végére akklimatizálódtak, csökkenteni tudták a POD aktivitást leveleikben.

Érdekes összehasonlítás tehető, ha a kapott eredményeket a *Solanum pennellii*, vad, halofita paradicsomfaj 100 mM-os NaCl kezelés hatására adott antioxidatív válaszreakcióinak változásával vetjük össze, ahol markáns, és az idő függvényében azonos irányú változások következnek be a gyökerekben a sókezelést követő 5. nap után, mint a sóstressz akklimatizációt

elősegítő 10^{-4} M-os SA kezelés hatására (Shalata és mtsai, 2001). Az idézett szerzők az aszkorbát és a glutation pool szignifikáns emelkedését és az AA valamint a GSH redukált formáinak nagyobb arányát mutatták ki a 100 mM NaCl-dal kezelt *S. pennellii* gyökerében, mint a termesztett paradicsoméban. Hasonlóképpen, a vad paradicsomfajban csökkent lipidperoxidáció, kisebb MDA tartalom mérhető. A 10^{-4} M-os SA előkezelés a *S. lycopersicum* cvar Rio Fuego antioxidatív stresszválaszát a halofita vadfaj, a *S. pennellii*hez tette hasonlóvá.

6. Összefoglalás

Vizsgálataim célja az volt, hogy nyomonkövessük a hosszútávú előkezelésként alkalmazott szalicilsav hatását a paradicsom növények sóstressz akklimatizációjára. Megállapítottuk, hogy a 10^{-4} M-os szalicilsavas előkezelés alkalmas volt a paradicsom növények ionos ozmotikus stressz toleranciájának javítására, ezzel szemben a 10^{-7} M-os SA előkezeléssel nem értünk el eredményt. A dolgozatban a témával kapcsolatosan a következő új eredmények születtek:

1. Megállapítottuk, hogy a 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA előkezelés gátolta a legfontosabb szerves ozmotikum, a K^+ ($^{86}Rb^+$) felvételét. Mindkét általunk használt koncentráció szignifikáns vízpotenciál csökkenést okozott és sztómazáródást eredményezett a kezelést követő első héten a paradicsom növényekben. Ezzel szemben a növekedésgátlás csak a 10^{-4} M-os előkezelésnél figyelhető meg. A SA allelopatikus, növekedésgátló hatását ebben az esetben tehát nem a növények vízháztartására gyakorolt hatásán keresztül fejti ki.
2. Szerves ozmotikumok híján a gyökér nem tud a környezetből vizet felvenni csak abban az esetben, ha ozmotikumok akkumulációjával vagy térfogati adaptációval koncentrációja a sejtnedv, és a gyökér sejtjeinek vízpotenciálja a tápoldat vízpotenciálja alá csökken. Ez az ozmotikus stressz aktiválhatja szerves ozmotikumok szintézisét. Háromhetes SA előkezelés után a hajtás szöveteiben ozmotikus és/vagy térfogati adaptáció és ezt követően vízpotenciál növekedés történt. Ez elsősorban szénhidrátok, mint szerves ozmotikumok akkumulációja következtében vált lehetővé. Az előkezelés hatására mind a gyökérben, mind a hajtásban nőtt az oldható cukortartalom. Míg a gyökérben elsősorban a szacharóz, a levelekben a hexózok, a glükóz és a fruktóz akkumulálódott. A sóstressz tehát egy ozmotikusan adaptálódott növény szöveteit éri a 100 mM-os NaCl kezeléskor.
3. Bizonyítottuk, hogy a SA előkezelés az ozmotikus adaptáció ellenére is indukálja az ABS szintézisét, és szignifikánsan megemelkedett ABS koncentráció alakult ki a 10^{-4} M-os SA-val kezelt növények levelében és gyökereiben az előkezelés végére. Így már a második stresszor előtt aktiválódhat az ABS jelátviteli út és az ABS-indukált génexpresszió.

4. Megállapítottuk, hogy az ABS szintézisének fokozódása az abszcizinaldehid oxidáz AO1 izoenzime aktiválódásának következménye, amelynek aktivitása 10^{-7} M előkezelésnél mérsékelten, 10^{-4} M-os előkezelésnél pedig szignifikánsan megnő a gyökérben és a hajtásban. Megállapítottuk, hogy a SA az ozmotikus és sóstresszel szembeni védőhatását részben az ABS szintézis és akkumuláció előzetes fokozásával fejt ki.
5. Néhány fontos stresszmarker segítségével bebizonyítottuk, hogy a 10^{-4} M-os SA előkezelt növények fiziológiai paraméterei a 100 mM NaCl kezelést követően a sóstressznek kitett kontrollénál jobb értékeket mutattak. A fotoszintézis primér fotokémiai folyamatai (F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP) is a kontrolléval azonos vagy jobb hatékonysággal működtek, nőtt a K1-a/K1-b arány, a karotinoidok mennyisége, csökkent a lipidperoxidáció.
6. A SA előkezelt növények, különösen a 10^{-4} M-os koncentrációnál a Na^+ ionokat jelentős mértékben akkumulálták a hajtásban, és ott a nátrium szervesen ozmotikumként, a halofiták egy részére jellemző módon a vízpotenciál emelésében játszott szerepet.
7. A SA előkezelés mindkét koncentrációnál szignifikánsan megemelte az aldóz reduktáz aktivitást, és az AR által katalizált reakcióban keletkező szorbitol tartalmakat a hajtásban. Mivel a szorbitol mennyisége nem elegendő ahhoz, hogy számottevő szerepe legyen az ozmotikus adaptációban, az aldóz reduktáz aktivitás növekedésének nagyobb jelentősége lehet a NADPH reciklizációjában.
8. A SA előkezelt növények fiatalleveleiben sóstressz alatt szignifikáns prolin akkumuláció mérhető. Ez kompatibilis ozmotikumként adaptációs válasz is lehet, koncentrációtól függően azonban PCD-t is okozhat. Mezofill protoplasztok életképességét a 100 mM-os prolin kezelés mérsékelten, a 100 mM-os NaCl és a 100 mM prolinnal kombinált sóstressz szignifikánsan csökkentette. Az 1 mM-os prolinkezelés a sejtek életképességét javította sóstressz alatt is. Habár a sejtekben a H_2O_2 nem csökkent szignifikánsan, a NO nem emelkedett meg az 1 mM-os prolinnal kezelt sejtekben. Az életképesség csökkenése azoknál a kezeléseknél figyelhető meg, ahol a H_2O_2 mellett a NO is magas marad.

9. A 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növények hajtásában sóstressz alatt a putreszcin szintje emelkedett meg szignifikánsan, míg gyökerében sóstressz alatt magas maradt a spermidin és a spermin koncentrációja. Ezek a poliaminok nemcsak a ROS-t generáló NADPH oxidázt gátolhatják, hanem közvetlenül védik a makromolekulák (DNS, fehérjék, membránok) integritását Na^+ ionok jelenlétében. A sóstressz alatti magas spermin koncentrációk jellemzik a halofita fajokat is.
10. A SA előkezelés abiotikus stressz akklimatizációt javító hatásához nélkülözhetetlenek az antioxidáns rendszerekben bekövetkező változások. Ennek alapja az, hogy a SA koncentrációtól függően megemelheti a szövetek H_2O_2 koncentrációját. A sóstressz akklimatizáció sikerességének fokozását hosszútávú SA előkezeléssel saját eredmények tekinthetjük. Megállapítható, hogy azoknál a kezeléseknél, ahol a sóstressz károsító hatásai jelentkeznek, a fiatal levelekben és a gyökerekben magas SOD aktivitás (K, 10^{-7} M SA), átmenetileg (10^{-7} M SA, fiatal levél, gyökér) vagy tartósan csökkent KAT aktivitás (K, fiatal levél) figyelhető meg sóstressz alatt. Ezekben a mintákban (K, 10^{-7} M SA fiatal levél, gyökér) tartósan magas marad a POD aktivitás, ami azonban hozzájárulhat a H_2O_2 elbontásához. A 10^{-4} M-os, akklimatizációt elősegítő SA kezelésnél a magas POD aktivitások a kísérlet végére lecsökkennek, ami az oxidatív stressz csökkenésére utal.
11. Az eltérő SA előkezelések különböző módon befolyásolták az aszkorbát-glutation ciklus kulcsenzimének, az aszkorbát peroxidáznak az enzimaktivitásait. A 10^{-7} M SA előkezelt növények a változatlan APX mellett megmaradó magas POD aktivitás ellenére sem voltak hatékonyak a celluláris hidrogén-peroxid eliminálásában. Ezzel szemben a 10^{-4} M SA előkezelés megemelte az APX enzimaktivitásokat, ami a nem enzimatis antioxiidánsok magas koncentrációja mellett lehetővé tette a reaktív oxigénformák sikeres detoxifikációját.
12. Az antioxidáns enzimek működéséhez és egyes nem enzimatis antioxiidánsok redukált állapotának fenntartásához szükséges GR rendkívül magas alapaktivitása és a sóstressz általi indukáltsága tovább segíti a 10^{-4} M SA-val előkezelt növényekben a sóstressz akklimatizációt.

13. A SA előkezelések növelték a különböző növényi szervekben, de különösen a fiatal levelekben az aszkorbinsav és a glutation mennyiségét. Megállapítottuk, hogy szemben a többi kezeléssel, a 10^{-4} M-os SA előkezelt növények a gyökerekben akkumulálták a nem enzimatis antioxiidánsokat, az aszkorbinsavat és a glutationt sóstressz alatt, ami hatékony védelmet idézett elő a reaktív oxigénformák ellen. A kísérlet végére ugyanezekben a gyökerekben nagyobb arányban fordultak elő a nem enzimatis antioxiidánsok redukált formái, mint a sóstressznek kitett kontrollban. Ez különösen fontos, hiszen a magas sókoncentrációnak kitett gyökérben nagyon fontos a hatékony ROS inaktiválás a megfelelő növényi homeosztázis fenntartása érdekében.
14. A SA előkezelés a természetett paradicsomban a halofita vad paradicsomfajhoz, a *S. pennellii*hez hasonló fiziológiai változásokat indukált. Elősegítette a Na^+ hajtásba irányuló transzportját és ott szervesen ozmotikumként való felhasználását, ami a halofitákhoz hasonlóan megnövelte a relatív növekedési sebességet sóstressz alatt. A gyökérben a halofita fajhoz hasonlóan a 10^{-4} M-os SA előkezelt növényekben is a nem enzimatis antioxiidánsok, a glutation és aszkorbinsav jelentik az oxidatív stresszel szemben a fő védelmi vonalat.

7. Summary

Our aim was to study the effect of long-term SA pre-treatment on salt stress acclimation of cultivated tomato plants.

We stated that the exogenously applied 10^{-4} M SA was capable to improve the tolerance for ionic osmotic stress in tomatoes; however pre-treatment with 10^{-7} M SA was not successful.

The present study provides the following new results in this topic:

1. It was established that the 10^{-7} M and 10^{-4} M SA pre-treatment inhibited the uptake of potassium ($K^{+}/^{86}Rb^{+}$), one of the most important inorganic osmolytes. Both applied concentration caused significant decrease of water potential and resulted in stomatal closure on the first week of the pre-treatment in tomato plants. However, growth inhibition can be observed only in case of 10^{-4} M SA pre-treatment. We can conclude that SA at 10^{-4} M in this case caused an allelopathic growth inhibition independently of plant water status.
2. Roots can uptake water from the environment only if the cell content is concentrated by accumulation of osmolytes or volumetric adaptation, and the water potential of root cells decreases below the water potential of nutrient solution. This osmotic stress can activate the synthesis of organic osmolytes. After 3-week of SA pre-treatment in the shoot tissues an osmotic and/or volumetric adjustment and then a water potential increase occurred. This occurred principally due to the accumulation of carbohydrates. After pre-treatment the content of soluble sugars increased both in the roots and shoots. While in the roots sucrose, in the shoots hexoses, glucose and fructose accumulated and when the plants were exposed to 100 mM NaCl, the tissues had already been osmotically adapted in 10^{-4} M SA pre-treated plants.
3. It was proven that despite of osmotic adjustment SA pre-treatment also induces the synthesis of ABA and ABA concentration significantly increased in the roots and shoots of 10^{-4} M SA pre-treated plants at the end of pre-treatment. So the ABA signal pathway and ABA-induced gene expression could be activated before the second stressor.

4. It can be stated that the enhanced synthesis of ABA is a consequence of the activation of abscisic aldehyde oxidase, AO1 isoenzymes whose activities increased moderately after 10^{-7} M SA pre-treatment and significantly increased during the pre-treatment with 10^{-4} M SA in roots and shoots. We can conclude that SA evolved its protective effect against osmotic and salt stress partly by activating previously the ABA synthesis and accumulation.
5. With some important stress marker it was proven that physiological parameters of 10^{-4} M SA pre-treated plants after 100 mM NaCl exposure showed better values than salt stressed control. The primary photochemical processes of photosynthesis (F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP) functioned equally or better than that of the control, the Chl-*a*/Chl-*b* ratio and contents of carotenoids increased and the lipid peroxidation decreased in these plants.
6. Accumulation of Na^+ in mesophyll cells of SA pre-treated plants, particularly at 10^{-4} M SA and there act as inorganic osmolyte functioned to increase the water potential like in some halophyte species.
7. SA pre-treatment significantly increased the activity of aldose reductase at both concentrations and the sorbitol contents in the shoots formed in the reaction catalyzed by AR. Since the content of sorbitol is not enough to play a role in the osmotic adjustment, the increase of AR activity may have greater importance in the recycling of NADPH.
8. In the upper leaves of SA pre-treated plants we measured significant proline accumulation during salt stress. This may be an adaptive process but the excess of proline can cause programmed cell death depending on its concentration. The exposure to 100 mM Pro, 100 mM NaCl salt stress combined with 100 mM Pro decreased the cell viability of mesophyll protoplasts. 1 mM Pro application improved the cell viability during salt stress. Although the hydrogen peroxide contents did not decrease significantly in the cells, NO content was not enhanced in the 1 mM Pro treated cells. The decrease of cell viability can be observed at those treatments where the relative amount of NO was high along with the hydrogen peroxide content of tissues.

9. In the shoots of 10^{-4} M SA pre-treated plants during salt exposure the level of putrescine was enhanced significantly while in the roots concentrations of spermidine and spermine were high. These polyamines not only can inhibit ROS-generating NADPH oxidase but directly protect the integrity of macromolecules (DNA, proteins and membranes) in the presence of sodium ions. High spermine concentrations characterize the halophyte species during salt stress.

10. To improve abiotic stress acclimation SA has to affect antioxidant systems. This is based on the fact that depending on its concentration SA can enhance tissue hydrogen peroxide concentration. We were the first who described the improvement of salt stress acclimation by long-term SA pre-treatment. It can be stated that in those treatments when the salt stress induced damage, high SOD activity in the upper leaves and roots (C, 10^{-7} M SA), transiently (10^{-7} M SA, upper leaves, root) or permanently decreased CAT activity (C, upper leaves) can be observed during salt stress. In these samples (C, 10^{-7} M SA upper leaves, roots) POD activity was maintained at high level which can also contribute to the elimination of hydrogen peroxide. In the 10^{-4} M SA pre-treated plants high POD activities decreased to the end of the experiments which indicates a decrease of oxidative stress.

11. Different SA pre-treatments affect in a distinct way the enzyme activities of APX, the most important enzyme of ascorbate-glutathione cycle. 10^{-7} M SA pre-treated plants were not so efficient to eliminate cellular hydrogen peroxide than plants treated with 10^{-4} M SA due to constant low APX enzyme activities. In contrast of this, the 10^{-4} M SA pre-treatment enhanced an APX activity which along with high concentrations of non enzymatic antioxidants was capable to successfully detoxify the reactive oxygen species.

12. GR is essential for the function of antioxidant enzymes and for the effective reduction of non enzymatic antioxidants. The high GR basic activity and its induction by salt stress can cause the successful stress acclimation of 10^{-4} M SA pre-treated plants.

13. SA pre-treatments increased the contents of ascorbate and glutathione in the different parts of plants, mainly in the upper leaves. We can state that contrary to other treatments, 10^{-4} M SA

pre-treated plants accumulated non enzymatic antioxidants like ascorbate and glutathione in their roots during salt exposure which caused efficient protection against reactive oxygen species. This is very important because in the roots exposed high salinity, efficient ROS inactivation is very important in order to maintain the normal plant homeostasis.

14. SA pre-treatment induced some similar physiological changes in the cultivated tomatoes which are functioning in the halophyte wild tomato species, *S. pennellii* under salt stress. It can promote the transport of sodium ions to the shoots and the utilization of Na^+ as inorganic osmolyte, which occur as in the halophyte wild species of tomato. Na^+ accumulation contributed to an increased relative growth rate during salt stress in these plants. Similarly, in 10^{-4} M SA pre-treated plants the GSH and Asc were accumulated and represented the main protective line against oxidative stress.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezt a munkát köszönetképpen szeretném ajánlani családomnak, akik mindvégig támogattak és szeretetükkel és támogató áldozatvállalásukkal biztosítottak számomra stabil hátteret ahhoz, hogy a doktori disszertációm el tudjam készíteni.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Tari Irmának, hogy lehetőséget biztosított számomra a kutatómunkám elvégzéséhez és éveken át kiváló szakmai tudásával és hasznos tanácsaival segítette a doktori disszertációm elkészítését.

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

Szeretnék köszönetet mondani Gémes Katalinnak, Kolbert Zsuzsannának és Poór Péternek, hogy éveken keresztül baráti szeretetükkel segítették munkámat és támogattak a doktori disszertációm elkészítésében.

Köszönetet szeretnék mondani Kispálné Szabó Ibolyának, Ádámné Meszlényi Máriának és Tandari Máriának a kiváló asszisztenciáért és pozitív hozzáállásért, amit irántam és a munkám iránt tanúsítottak.

Köszönöm szakdolgozóimnak, Takács Zoltánnak és Orosz Gábornak a segítséget a kísérleteim kivitelezésében.

Nem utolsósorban köszönetet szeretnék mondani barátaimnak és a Növénybiológiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának és szakdolgozójának, akik bármilyen módon segítettek a doktori disszertációm elkészítését.

A Ph.D. dolgozatom az OTKA TO 38392 és az Oktatási és Kulturális Minisztérium Deák Ferenc Ösztöndíjpályázatának (2008/2009) pénzügyi támogatásával készült.

9. Felhasznált irodalom

Agarwal A., Sairam RK., Srivastava GC., Tyagi A., Meena RC.: Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings.-Plant Sci. 169: 559-570, 2005.

Akhter Banu MN., Hoque MA., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y.: Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress.-J Plant Physiol 166: 146-156, 2009.

Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S.: Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. – J. Exp. Bot. 53: 1331-1341, 2002.

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

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

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

Arfan, M., Athar, H.R., Ashraf, M.: Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress?- J. Plant Physiol. 164: 685-694, 2007.

Asada, K.: Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM, editors. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems. Boca Raton, FL: CRC Press; 77–104, 1994.

Asada, K.: The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. – In: Scandalios, J.G. ed. Oxidative stress and molecular biology of antioxidative defences. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 715-735, 1997.

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

Baier, M. és Dietz, K.-J.: Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. – J. Exp. Bot. 416: 1449-1462, 2005.

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

Basantani, M., Srivastava, A.: Plant glutathione transferases – a decade falls short. – Can J. Bot. 85: 443-456, 2007.

Bates, L.S.: Rapid determination of free proline for water stress studies.- Plant Soil 39: 205-207, 1973.

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

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

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

Borsani, O., Cuartero, J., Fernandez, J.A., Valpuesta, V., Botella, M.A.: Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. - Plant Cell 13: 873-887, 2001b.

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

Bowler, C., Fluhr, R.: The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. – Trends Plant Sci.: 241-246, 2000.

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.-Anal. Biochem 72: 248-254, 1976.

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

Büch, K., Stransky, H., Bigus, H.J., Hager, A.: Enhancement by artificial electron acceptors of thylakoid lumen acidification and zeaxanthin formation. – J. Plant Physiol. 144: 641-648, 1994.

Cayuela, E., Estañ, M.T., Parra, M., Caro, M., Bolarín, M.C.: NaCl pretreatment at the seedling stage enhances fruit yield of tomato plants irrigated with salt water. – Plant Soil 230: 231-238, 2001.

Chang, CC-C., Ball, L., Fryer, M.J., Baker, N.R., Karpinski, S., Mullineaux, P.M.: Induction of *ASCORBATE PEROXIDASE 2* expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but associated with changes in photosynthesis. – Plant J. 38: 499-511, 2004.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinhero, C.: Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanism from whole plant to cell. – Annals Bot. 103. 551-560, 2009.

Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F.: Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9533-9537, 1993.

Chen, W., Sing, K.: The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by *ocs* element. - Plant J. 19: 667-677, 1999.

Chen, HY, Zhang, JH, Zhuang, TM.: Evaluation of salt tolerance of the wild tomato species and its utilization. - East China Univ. Sci. Technol. 271: 51-55, (kínaiul, angol nyelvű ábrákkal és ábrafeliratokkal) 2001.

Chen, Z., Gallie, D.R.: The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. – Plant Cell 16: 1143-1162, 2004.

Chen C., Dickman MB.: Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*.- Proc Natl Acad Sci USA 102: 3459-3464, 2005.

Chen, Z., Gallie, D.R.: Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozon than increasing avoidance. – Plant Physiol. 138: 1673-1689, 2005.

Chen, Z., Gallie, D.R.: Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development and function. – *Plant Physiol.* 142: 775-787, 2006.

Cheong, Y.H., Chang, H-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S.: Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. – *Plant Physiol.* 129: 661-677, 2002.

Chou, C-H., Patrick, Z.A.: Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. – *J. Chem. Ecol.* 2: 369-387, 1976.

Colville, L., Smirnoff, N.: Antioxidant status, peroxidase activity and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana vtc* mutants.- *J. Exp. Bot.* 59: 1-12, 2008.

Correira, M.J., Pereira, J.S.: The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. – *J. Exp. Bot.* 46: 101-110, 1995.

Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asíns, M.J., Moreno, V.: Increasing salt tolerance in the tomato. – *J. Exp. Bot.* 57: 1045-1058. 2006.

Csiszár, J, M. Szabó, L. Erdei, L. Márton, F. Horváth, I. Tari: Auxin autotrophic tobacco callus tissues resist oxidative stress: the importance of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic calli. - *J. Plant Physiol* 161: 691-699, 2004.

Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M.: Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. – *Plant Physiol.* 116: 1351-1357, 1998.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.: Dual action of the active oxygen species during plant stress. -*Cellular and Molecular Life sciences* 57: 779-795, 2000.

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

De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H.: Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. – Plant Physiol. 98: 853-858, 1992.

Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Daschner, K., Binder, S., Frommer, W.B.: A nuclear gene encoding mitochondrial delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. – Plant J. 27: 345-356, 2001.

Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister S.: The role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation.- Plant Cell 16: 3413-3425, 2004.

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

Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R.: Glutathione-mediated detoxification systems in plants. – Current Opinion in Plant Biol. 1: 258-266, 1998.

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

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

Durner J, Klessig DF.: Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. J Biol Chem. 8: 28492–28501, 1997.

Edwards, R., Dixon, D.P.: Plant glutathione transferases. - Methods in Enzymology 41: 169-186, 2005.

Eskling, M., Arvidsson, P-O., Åkerlund, H-E.: The xanthophyll cycle, its regulation and components. Physiol. Plant. 100: 806-816, 1997.

Eryilmaz, F.: The relationship between salt stress and anthocyanin content in higher plants. - Biotechnol. Biotechnol. Eq. 20: 47-52, 2006.

Estañ, M.T., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T.J., Bolarín, M.C. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. – J. Exp. Bot. 56: 703-712, 2005.

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

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

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

Foyer CH, Harbinson J.: Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer C, Mullineaux P, editors. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of the Defense Systems in Plants. Boca Raton, FL: CRC Press; 1–42, 1994.

Freeman, J.L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A., Salt, D.E.: Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. – Plant Physiol. 137: 1082-1091, 2005.

Fricke, W., Akhilarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., Volkov, V.: The short-term growth response to salt of the developing barley. – J. Exp. Bot. 57: 1079-1095, 2006.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signalling networks. – Curr. Opin. Plant Biol. 9:436-442, 2006.

Gonzalez-Fernández, J.J.: Tolerancia a la salinidad en tomate en estado de plántula y en planta adulta. – Thesis Doctoral, Córdoba University, 1996.

Griffith, O.W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.-Anal.Biochem.106:207-211, 1980.

Gronwald, J.W.: Plaisance, K.L.: Isolation and characterization of glutathione S- transferase isozymes from sorghum. – Plant Physiol. 117: 877-892, 1998.

Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H.: Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*.-Physiol Plant 106:262-267,1999.

Hager, A., Holocher, K.: Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. – Planta 192: 581-589, 1994.

Harper, J.R., Balke, N.E.: Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. - Plant Physiol 68: 1349-1353, 1981.

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

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

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

Horváth, E., Szalai, G., Janda, T.: Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. – J Plant Growth Regul. 26: 90-300, 2007.

Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi Y., Tanaka, A., Takabe, T., Takabe, T.: Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthase. – Plant Mol. Biol. 43: 103-111, 2000.

- Hu, X., Zhang, A., Zhang, J., Jiang, M.: Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. – *Plant Cell Physiol.* 47: 1484-1495, 2006.
- Hudson, A.T., Bentley, R.: The incorporation of shikimic acid into mycobactin S and salicylic acid by *Mycobacterium smegmatitis*. – *Tetrahedron Lett.* 24: 2077-2080, 1970.
- Janda T., Szalai G., Tari, I. and Páldi, E.: Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) - *Planta* 208: 175-180, 1999.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz, O.A., Rodríguez-Kessler, M.: Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress.- *Plant Physiol. Biochem.* 45:812-821, 2007.
- Jones, C.A. :Grasses and Cereals. – John Wiley & Sons, New York 1985.
- Juan, M., Rivero, R.M., Romero, L., Ruiz, J.M.: Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. – *Environ. Exp. Bot.*, 54: 193-201, 2005.
- Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Togy, G., Kondi, G., Tschlis, P. N., Makris, A. M.: A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. - *J. Biol. Chem.*, 275: 29207-29216, 2000.
- Keiper FJ, Chen DM, De Filippis LF: Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of *Eucalyptus microcorys*.- *J Plant Physiol* 152: 564-573, 1998.
- Kellős, T., Tímár, I., Szilágyi, V., Szalai, G., Galiba, G., Kocsy, G.: Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. – *Plant Biol.* 10: 563-572, 2008.
- Kim, T.E., Kim, S-K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C.: ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). - *Physiol Plant* 115: 370-376, 2002.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C.: Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. – *Physiol. Plant.* 113: 158-164, 2001a.

Kocsy, G., Tóth, B., Berzy, T., Szalai, G., Jednákovits, A., Galiba, G.: Glutathione reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX156 in maize and soybean.-Plant Sci 160:943-950, 2001b.

Kocsy, G., Kobrehel, K., Szalai, G., Duviau, M-P., Buzás, Z., Galiba, G.: Thioredoxin h and glutathione as abiotic stress tolerance markers in maize. – Environ. Exp. Bot. 52: 1001-112, 2004.

Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomashu, T., Koshihara, T.: Tissue-specific localization of abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. – Plant Physiol. 134: 1697-1707, 2004.

Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L.: Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. – J. Plant Physiol. 165: 920-931, 2008.

Kusumi K., Yaeno T., Kojo K., Hirayama M., Hirokawa D., Yara A., Iba K.: Treatment with salicylic acid in the glutathione-mediated protection against photooxidative stress in rice.-Physiol Plant 128: 651-661, 2006.

Kuźniak, E., Skłodowska, M.: Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*.-Plant Sci 160:723-731, 2001.

Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.-Nature 227: 680-685, 1970.

Larcher, W.: Ökophysiologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 394, 1994.

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

Law M.Y., Charlse S.A., Halliwell B.: Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and paraquat.-Biochem J. 210: 899-903, 1983.

Lea, P.J. Nitrogen metabolism. In: Plant Biochemistry and Molecular Biology, P.J. Lea and R.C. Leegood, eds. John Wiley & Sons, New York, pp. 155-180, 1993.

Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J.F., Bohn, T., Hoffmann, L., Evers, D.: Transcript profiling in potato exposed to salt stress. – Plant Abiotic Stress Tolerance, International Conference, Vienna, Austria, 8-11 February 2009, Programme and Abstracts, pp. 154, 2009.

Leipner, J., Fracheboud, Y., Stamp, P.: Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. – Environ. Exp. Bot. 42: 129-139, 1999.

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

Lichtenthaler H.K.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes.- Methods Enzymol. 148: 350-382, 1987.

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

Loescher, W.H.: Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. – Physiol. Plant. 70:553-557, 1987.

Lois, R.: Accumulation of UV absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis*. - Planta 194: 498-503, 1994.

Ma F., Cheng L.: Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate-glutathione cycle.-Plant Sci. 166: 1479-1486, 2004.

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

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

Madan, S., Nainawatee, HS., Jain, RK., Malik, MS., Chowdhary JB.: Leaf position dependent changes in proline, pyrroline-5-carboxylate reductase activity and water relations in genetically stable salt tolerant somaclones of *Brassica juncea* L.- Plant and Soil 163: 151-156, 1994.

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

Mateo, A., Funck, D., Muhlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, P.: Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. – J. Exp. Bot. 57: 1795-1807, 2006.

Matysik, J., Alia, B.B., Mohanty, P.: Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. – Curr. Sci. 82: 525-532, 2002.

May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., Inzé, D.: Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development.-J. Exp. Bot. 49: 649-667, 1998.

Meinhard, M., Grill, E.: Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. – FEBS Letters 508: 443-446, 2001.

Mendel, R.R., Hänsch, R.: Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. – J. Exp. Bot. 53: 1689-1698, 2002.

Milbury, P. E., Graf, B., Curan-Celentano, J. M., Blumberg, J. B.: Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in APRE-19 cells. - Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 48, 2343-2349, 2007.

Milla, M.A.R., Marer, A., Huete, A.R., Gustafson, J.P.: Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signalling pathways. – Plant J. 36: 602-615, 2003.

Min, X., Okada, K., Brockmann, B., Koshiba, T., Kamiya, Y.: Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato. – Biochim. Biophys. Acta 1493: 337-341, 2000.

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

Mittler, R.: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. – Trends in Plant Sci. 7: 405-410, 2002.

Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M.: Activities of superoxide dismutase and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*.-Physiol Plant 110: 42-51, 2000.

Mueller, L. A., Goodman, D. C., Silady, R. A., Walbot, V.: AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid- binding protein. - Plant Physiol. 123: 1561-1570, 2000.

Mullineaux, PM, Rausch, T.: Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. –Photosynth Res 86: 459-474, 2005.

Mundree, S.G., Whittaker, A., Thomson, J.A., Farrant, J.M.: An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. – Planta 211: 693-700, 2000.

Nakano Y., Asada K.: Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical.-Plant Cell Physiol.28:131-140, 1987.

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 synthase. – Plant Physiol. 112: 1071-1078, 1996.

Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, Ch.H.: Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants.-J. Exp. Bot 49: 623-647, 1998a.

Noctor, G., Foyer, C.H.: Ascorbate and glutathione : keeping active oxygen under control.-Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279, 1998b.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer C.H.: Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling.-J. Exp. Bot. 53: 1283-1304, 2002.

Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Fehér, A., Dudits, D., Horváth, G.V.: A novel alfalfa aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stress. – Plant J. 24: 437-446, 2000.

Okuma, E., Murakami, Y., Shimoishi, Y., Tada, Y., Murata, Y.: Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions.- Soil Sci Plant Nutr 50: 1301-1305, 2004.

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

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

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

Pareek, S.P., Gaur, A.C.: Organic acids in the rhizosphere of *Zea mays* and *Phaseolus aureus* plants. – Plant and soil 39: 445-448, 1973.

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

Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G., Foyer, C.H.: Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. – The Plant Cell 15: 939-951, 2003.

Pfündel, E.E., Bilger, W.: Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. – Photosynth. Res. 42: 89-109, 1994.

Poór, P. Sóstressz akklimatizáció vizsgálata paradicsom növényeken szalicilsav előkezelést követően. – Szakdolgozat, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék, 41. old. 2007.

Popova, L., Maslenkova, L.T., Yordanova, R.Y., Ivanova, A.P., Krantev, A.P., Szalai, G., Janda, T.: Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. – *Plant Physiol. Biochem.* 47: 224-231, 2009.

Rahman I., Kode A., Biswas SK.: Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method.- *Nature Protocols* 1: 3159-3165, 2007.

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

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

Räthel TR, Leikert J Ju, Vollmar AM, Dirsch VM.: Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. - *Biol. Proced. Online*_5:136-142, 2003.

Rennenberg, H.: Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants.-*Phytochemistry* 21: 2771-2781, 1982.

Roxas, V.P., Smith, R.K. Jr., Allen, E.R., Allen, R.D.: Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress- - *Nat. Biotechnol.* 15: 988-991, 1997.

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

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

Sagi, M., Fluhr, R., Lips, S.H.: Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. – Plant Physiol. 120: 571-577, 1999.

Sahu, G.K., Kar, M., Sabat, S.C.: Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid.- Plant Biology 3: 321-328, 2002.

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

Sanchez-Casas, P., Klessig, D.F.: A Salicylic Acid-Binding Activity and a Salicylic Acid-Inhibitible Catalase Activity Are Present in a Variety of Plant Species. - Plant Physiol. 106: 1675–167, 1994.

Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarin, M.C.: Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species.- Plant Physiology and Biochemistry 37: 65-71, 1999.

Santa-Cruz, A., Martínez-Rodríguez, M.M. Perez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R., Bolarín, M.C. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. – Plant Sci. 162: 825-831. 2002.

Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A., és Fatkhutdinova, D.R.: Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity.-Plant Sci.164: 317-322, 2003.

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

Schäfer, H.J., Greiner, S., Rausch, T., Haag-Kerwer, A.: In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amounts for γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) and metallothionein (MT2). - FEBS Letters 404: 216-220, 1997.

Schauer, N., Zamir, D., Fernie, A.R.: Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. – J. Exp. Bot. 56: 297-307, 2005.

Schwartz, S.S., Leon-Kloosterzeil, K.M., Koorneef, M., Zeevaart, A.D.: Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. – Plant Physiol. 114: 161-166, 1997.

Sekimoto, H., Seo, M., Kawakami, N., Komano, T., Desloire, S., Liotenberg, S., Marion-Poll, A., Caboche, M., Kamiya, Y., Koshiba, T.: Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. – Plant Cell Physiol. 39: 433-442, 1998.

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

Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., Koshiba, T.: Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. – Plant J. 23: 481-488, 2000.

Shevyakova, N.I., Shorina, M.V., Rakitin, V.Y., Kuznyetsov, V.V.: Stress-dependent accumulation of spermidine and spermine in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* under salinity conditions. – Rus. J. Plant Physiol. 53: 739-745, 2006.

Sgherri, C., Milone, M.T.A., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to subsymptomatic copper doses. – J. Plant Physiol. 158: 1439-1447.

Smirnoff, N.: The function and metabolism of ascorbic acid in plants.-Ann. Bot. 78: 661-669, 1996.

Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A.: Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithio-bis(2-nitro-benzoic acid). – Anal. Biochem. 175: 691-699, 1988.

Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Shrivastava, S.K., Ansari, N.H.: Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. – Biochem. Biophys. Res. Comm. 217: 741-746, 1995.

Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K-J., Pruvost, C., Polle, A., Foyer, C.H., Rennenberg, H.: Regulation of glutathione synthesis in leaves of transformed poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthase. - Plant J. 7: 141-145, 1995.

Szaboles, I.: Soils and salinization. In: Handbook of Plant Crop Stress (ed. M. Pessaralaki), pp.3-11, Marcel Dekker, New York, 1994.

Szalai, G., Kellős, T., Galiba, G., Kocsy, G.: Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. – J. Plant Growth Regul. 28: 66-80, 2009.

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

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

Szepesi, Á., Csiszár, J., Gallé, Á., Gémes, K., Poór, P., Tari, I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. Acta Agron. Hung. 58: 129-138, 2008.

Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, L.M., Tari, I.: Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. - J. Plant Physiol. DOI:10.1016/j.jplph.2008.11.012, 2009.

Székely, Gy., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, Cs., Szabados, L.: Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. – Plant J. 53: 11-28, 2008.

Tang W., Newton RJ.: Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos.- Plant Physiology and Biochemistry 43: 760-769, 2005.

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

Tari, I., Csiszár, J., Szalai, G., Horváth, F., Pécsváradi, A., Kiss, G., Szepesi, Á., Szabó, M., Erdei, L.: Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. – Acta Biol. Szeged, 46: 556-56, 2002b.

Tari, I., Csiszár, J.: Effects of NO₂⁻ or NO₃⁻ supply on polyamine accumulation and ethylene production of wheat roots at acidic and neutral pH: implications for root growth. - *Plant Growth Regul.* 40: 121-128, 2003a.

Tari I.: Abaxial and adaxial stomatal density, stomatal conductances and water status of bean primary leaves as affected by paclobutrazol.-*Biol Plant* 47: 215-220, 2003/2004.

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

Tari, I., D. Camen, G. Coradini, J. Csiszár, E. Fediuc, K. Gémes, A. Lazar, E. Madosa, S. Mihacea, P. Poor, S. Postelnicu, M. Staicu, Á. Szepesi, G. Nedelea, L. Erdei: Changes in chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress responses of bush bean genotypes for selecting contrasting acclimation strategies under water stress. -*Acta Biol. Hung.* 59: 335-345, 2008.

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

Van der Jagt, D.L., Robinson, B., Taylor, K.K., Hunsaker, L.A.: Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal and diabetic complications. – *J. Biol. Chem.* 267: 4364-4369, 1992.

Váradí Gy., Darkó É., Lehoczki E.: Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* L. *Cronq.-Physiol Plant* 123: 1459-1469, 2000.

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

Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F.: Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. – *Current Opinion in Plant Biol.* 7: 499-455, 2004.

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

Xing, Y., Jia, W., Zhang, J.: AtMEK mediates stress-induced gene expression of *CAT1* catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. – *J. Exp. Bot.* 58: 2969-2981, 2007.

Xing, Y., Wensuo, Jia, W., Zhang, J.: AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signalling in *Arabidopsis*. – *Plant J.* 53: 440-451, 2008.

Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J.-K.: The *Arabidopsis LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurilase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. – *Plant Cell* 13: 2063-2083, 2001.

Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Zhu, J.-K.: Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. – *J. Biol. Chem.* 277: 8588-8596, 2002.

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

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

Yu, C.W., Murphy, T.M., Sung, W.W., Lin, C.H.: H₂O₂ treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. – *Funct. Plant Biol.* 29: 1081-1087, 2002.

Zachariah, V.T., Walsh-Sayles, N., Singh, B.R.: Isolation, purification, and characterization of glutathione S-transferase from oat (*Avena sativa*) seedlings. – *J. Protein Chem.*, 19, 425-430, 2000.

Zdunek-Zastocka E.: Molecular cloning, characterization and expression analysis of three aldehyde oxidase genes from *Pisum sativum* L. – *Plant Physiol. Biochem.* 46: 19-28, 2008.

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

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

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

Zsoldos F., Haunold E., Vashegyi Á., Herger P.: Nitrite in the root zone and its effects on ion uptake and growth of wheat seedlings.-Physiol Plant 89:626-631, 1993.

10. Mellékletek

Statisztikai analízis

Redukált aszkorbát <i>fiatal hajtás</i>		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	***	*	n.s.	**
2.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	*
3.nap		n.s.	***	n.s.	***	**
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		**	*	*	*	**
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
7.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.

Redukált aszkorbát <i>alsó levél</i>		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		***	**	n.s.	*	n.s.
2.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
3.nap		*	n.s.	*	n.s.	*
4.nap		n.s.	***	*	*	n.s.
5.nap		n.s.	*	**	**	*
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
7.nap		*	**	n.s.	n.s.	n.s.

Redukált aszkorbát <i>gyökér</i>		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
2.nap		**	n.s.	*	*	***
3.nap		n.s.	*	n.s.	*	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		*	n.s.	n.s.	*	*
6.nap		*	n.s.	*	n.s.	n.s.
7.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	*

7. táblázat: Páros t-teszt eredményei a paradicsom fiatal hajtás, alsó levél és gyökér redukált aszkorbát (AA) tartalmaira az egyhetes, 100 mM NaCl kezelést követően. A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség az aznapi kontroll kezeletlen mintához viszonyítva.

Dehidroaszorbát		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>fiatal hajtás</i>						
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2.nap		n.s.	n.s.	*	*	n.s.
3.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
4.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	*
7.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	*

Dehidroaszorbát		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>alsó levél</i>						
0.nap		-	***	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	*
3.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
5.nap		*	n.s.	n.s.	n.s.	*
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
7.nap		n.s.	n.s.	**	**	n.s.

Dehidroaszorbát		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>gyökér</i>						
0.nap		-	***	-	n.s.	-
1.nap		***	**	n.s.	*	**
2.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
3.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
4.nap		*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
7.nap		n.s.	***	n.s.	n.s.	**

8. táblázat: Páros t-teszt eredményei a paradicsom fiatal hajtás, alsó levél és gyökér dehidroaszorbát (DHA) tartalmaira az egyhetes, 100 mM NaCl kezelést követően. A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség az aznapi kontroll kezeletlen mintához viszonyítva.

Redukált glutation (GSH)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>fiatal hajtás</i>						
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	*	n.s.	n.s.	*
2.nap		*	**	***	n.s.	*
3.nap		*	*	*	n.s.	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		n.s.	n.s.	*	*	n.s.
6.nap		n.s.	**	n.s.	*	n.s.
7.nap		**	*	n.s.	n.s.	*

Redukált glutation (GSH)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>alsó levél</i>						
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		**	n.s.	n.s.	*	n.s.
2.nap		n.s.	n.s.	**	n.s.	**
3.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
5.nap		*	n.s.	*	n.s.	n.s.
6.nap		n.s.	*	**	n.s.	**
7.nap		**	n.s.	*	n.s.	**

Redukált glutation (GSH)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>gyökér</i>						
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		*	n.s.	n.s.	n.s.	*
2.nap		*	n.s.	n.s.	*	*
3.nap		n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
4.nap		*	n.s.	*	**	*
5.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	**
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.
7.nap		*	*	*	n.s.	*

9. táblázat: Páros t-teszt eredményei a paradicsom fiatal hajtás, alsó levél és gyökér redukált glutation (GSH) tartalmaira az egyhetes, 100 mM NaCl kezelést követően. A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség az aznapi kontroll kezeletlen mintához viszonyítva.

Oxidált glutation (GSSG)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>fiatal hajtás</i>						
0.nap		-	n.s.	-	n.s.	-
1.nap		n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
2.nap		***	n.s.	*	n.s.	***
3.nap		**	***	n.s.	***	***
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5.nap		n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
6.nap		n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.
7.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

Oxidált glutation (GSSG)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>alsó levél</i>						
0.nap		-	***	-	n.s.	-
1.nap		***	***	n.s.	n.s.	*
2.nap		**	*	**	n.s.	*
3.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.
5.nap		n.s.	***	**	**	**
6.nap		*	n.s.	n.s.	n.s.	**
7.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

Oxidált glutation (GSSG)		KxNaCl	10 ⁻⁷ M SA	10 ⁻⁷ M SAxNaCl	10 ⁻⁴ M SA	10 ⁻⁴ M SAxNaCl
<i>gyökér</i>						
0.nap		-	*	-	n.s.	-
1.nap		**	*	**	n.s.	***
2.nap		*	**	**	n.s.	*
3.nap		**	**	***	*	n.s.
4.nap		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
5.nap		n.s.	*	n.s.	***	n.s.
6.nap		*	n.s.	n.s.	n.s.	**
7.nap		n.s.	n.s.	*	n.s.	**

10. táblázat: Páros t-teszt eredményei a paradicsom fiatal hajtás, alsó levél és gyökér oxidált glutation (GSSG) tartalmaira az egyhetes, 100 mM NaCl kezelést követően. A *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik. Az n.s. jelölés esetén nem volt szignifikáns különbség az aznapi kontroll kezelt mintához viszonyítva.

11. Publikációs lista

1. **Szepesi Á**, Csiszár J., Gémes K., Horváth E., Horváth F., Simon L.M., Tari I (2009) Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. J. Plant Physiol. 166 (9): 914-925. **IF: 2.239**
2. Tari, I., D. Camen, G. Coradini, J. Csiszár, E. Fediuc, K. Gémes, A. Lazar, E. Madosa, S. Mihacea, P. Poor, S. Postelnicu, M. Staicu, **Á. Szepesi** G. Nedelea, L. Erdei (2008) Changes in chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress responses of bush bean genotypes for selecting contrasting acclimation strategies under water stress. Acta Biol. Hung. 59: 335-345. **IF: 0,447**
3. **Szepesi, Á.**, Csiszár, J., Gallé, Á., Gémes, K., Poór P., Tari I. (2008) Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. – Acta Agronomica Hungarica 58:(2) 129-138.
4. Tari, I. Kiss, Gy., Deér, AK, Csiszár, J., Horváth, F., Poór, P., **Szepesi, Á.**, Simon, LM. (2009 or 10) Salicylic induced increases in aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato under salt stress.-Submitted to Biol. Plantarum, **IF: 1,259**
5. Tari, I., Csiszár, J., Gémes, K., **Szepesi Á.** (2006) Modulation of Cu²⁺ accumulation by (aminoethoxyvinyl)glycine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone), the inhibitors of stress ethylene and polyamine synthesis in wheat genotypes. – Cer. Res. Com. 34: 989-996. **IF: 1.03**
6. **Á. Szepesi**, J. Csiszár, Sz. Bajkán, K. Gémes, F. Horváth, L. Erdei, A. Deér, LM. Simon, I. Tari (2005) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. – Acta Biol Szeged, 49: 123-125.

Tudományos folyóiratban megjelent konferencia absztraktok:

1. Gémes K, Poór P, Sulyok Z, **Szepesi Á**, Szabó M, Tari I (2008) Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego) under salt stress. Acta Biol Szeged 52 (1):161-162.

2. **Szepesi Á.**, Poór P, Gémes K, Horváth E, Tari I (2008) Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants. *Acta Biol Szeged* 52 (1):199-200.

Egyéb kiadványban megjelent konferencia absztraktok:

1. Gémes, K., **Szepesi, Á.**, Guóth, A., Tari, I. (2007) Role of photosynthetic performance in salt stress acclimation of tomato after salicylic acid pre-treatment. 2nd World Conference of Stress, 23-26 August, Budapest, Hungary, Book of Abstracts, pp. 213.
2. **Szepesi, Á.**, Gémes, K., Tari, I. (2007) Salicylic acid pre-treatment induced antioxidant defence processes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) during salt stress. RoS in Plants 2007, September 12-14, Gent, Belgium
3. **Szepesi, Á.**, Csiszár, J., Gémes K., Tari I. (2006) Salicylic acid improves the acclimation of tomato to high salinity by stimulating abscisic acid biosynthesis and accumulation. XV FESPB Congress of European Societies of Plant Biology, 17-21 July 2006, Lyon, France, Book of Abstracts, pp. 174.
4. **Szepesi, Á.**, Csiszár, J., Gémes, K., Tari I. (2006) Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*. - 3rd EPSO Conference, „Plant Dynamics: from Molecules to Ecosystems”, Visegrád, Hungary, 28 May – 1 June, 2006 Book of Abstracts, pp.163.
5. I. Tari, J. Csiszár, Á. Gallé, B. Bartha, F. Horváth, A. Pécsváradi, **Á. Szepesi**, D. Zeller, L. Erdei (2005) The role of ABA and NO in the drought stress acclimatisation mechanisms of wheat genotypes. XVII. International Botanical Congress, Vienna, Austria, Europe, 17-23 July 2005, Abstracts, pp. 253.
6. Tari, I., Csiszár, J., Horváth, F., Pécsváradi, A., **Szepesi, Á.**, Zeller, D., Erdei, L. (2004) Drought stress resistance of bean genotypes II.: Do drought-hardened plants suffer from fever?- Innováció és szakemberképzés az alkalmazott növénybiológiában. Zárójelentés. 19-36. old. Magyarország – Románia PHARE CBC Program (projekt szám: HU 2002/000,627,03-14). Román-magyar miniszimpózium.

7. Csiszár, J., Tari, I., **Szepesi, Á.**, Gallé, Á., Bartha, B., Bajkán, Sz., Zeller, D., Vashegyi, Á., Pécsváradi, A., Horváth, F., Lazar, A., Dorin, C., Staicu, M., Petolescu, C., Gabor, L., Erdei, L. (2004). Az antioxidáns védőmechanizmus egyes elemeinek vizsgálata zöldségfélékben szárazságstressz hatására. - Zárójelentés. 37-43. old. Magyarország – Románia PHARE CBC Program (projekt szám: HU 2002/000,627,03-14). Román-magyar miniszimpózium.
8. Tari, I., Csiszár, J., Gallé, Á., Bajkán, Sz., **Szepesi, Á.**, Vashegyi, Á. (2004) Élettani megközelítések gazdasági növények szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. Bot. Közlem. 90: 139-158.
9. Tari, I., Simon, LM., Deér, KA, Csiszár, J., Bajkán, Sz., Kis, Gy., **Szepesi, Á.** (2004) Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation. . – Acta Physiol. Plant. , The 14th FESPB Congress, August 23-27, 2004, Cracow, Poland, Book of Abstracts, pp. 237. (**IF: 0.379**)
10. **Szepesi, Á.**, Tari I. (2003) A fotoszintetikus hatékonyság szerepe a szalicilsavval előkezelt paradicsom növények sóstressz akklimatizációjában. – V. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia és Fotoszintézis Iskola, Noszvaj, 2003. szeptember 15-16. Abstracts, P15.

12. Díjak, elismerések:

MTA Szegedi Akadémiai Bizottság 2007. évi pályázata **II. díj**

Deák Ferenc Ösztöndíj pályázat 2008/2009 nyertese

Jelen Ph.D. értekezés elkészítését a TO38392 számú OTKA pályázat, valamint az Oktatási és Kulturális Minisztérium Deák Ferenc Ösztöndíj Pályázata (2008/2009) támogatta.