

**Sóstressz és szalicilsav indukálta élettani folyamatok
összehasonlító vizsgálata paradicsomban:
akklimatizáció vagy programozott sejthalál**

Ph.D. értekezés

Poór Péter

Témavezető: Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma

Tanszékvezető egyetemi docens



Biológia Doktori Iskola

Növénybiológiai Tanszék

SZTE TTIK

2013

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A programozott sejthalál (PCD) növényekben	9
2.1.1. A sejthalálról általában	9
2.1.2. A növényi sejthalál típusainak csoportosítása	10
2.1.2.1. A szenescencia	11
2.1.2.2. Az autofágia	13
2.1.2.3. A hyperszenzitív reakció (HR)	14
2.2. A PCD indukciójában szereplő utak és azok főbb komponensei növényekben	15
2.2.1. Reaktív oxigénformák (ROS)	16
2.2.2. Reaktív nitrogénformák	19
2.2.3. Kalcium	21
2.2.4. A mitokondriumban és az endoplazmatikus retikulumban (ER) bekövetkező változások	22
2.2.5. MAPK kaszkád	24
2.2.6. Az ionhomeosztázis megváltozása, kálium kieresztés	25
2.2.7. Proteázok és a vakuólum	25
2.2.8. A sejtmagban történő változások: a DNS feldarabolódása	27
2.3. A sóstressz-indukálta sejthalál növényekben	27
2.4. Az etilén hatásai és szerepe a növényi PCD-ben	31
2.5. A szalicilsav hatásai és szerepe a növényi PCD-ben	33
3. Célkitűzések	41
4. Anyagok és módszerek	43
4.1. Intakt növényeken végzett kísérletek	43
4.1.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése	43
4.1.2. A hidrogén-peroxid kvantitatív és kvalitatív meghatározása	43
4.1.3. A szuperoxid gyökanion kvalitatív meghatározása	44
4.1.4. Fotoszintetikus paraméterek meghatározása	44
4.1.4.1. A sztómakonduktancia mérése	44

4.1.4.2. A CO ₂ asszimiláció meghatározása a külső CO ₂ koncentráció függvényében.....	44
4.1.4.3. A CO ₂ asszimiláció meghatározása a külső fényintenzitás függvényében.....	45
4.1.4.4. A klorofill <i>a</i> fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása	45
4.1.4.5. A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása	46
4.1.4.6. Az összcukortartalom meghatározása.....	47
4.1.5. Az etilénprodukción meghatározása	47
4.1.6. Az életképesség meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban.....	47
4.1.7. A ROS produkció meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban.....	48
4.1.8. Az NO produkció meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban.....	48
4.1.9. <i>In silico</i> módszerek (gének kiválasztása, homológiafa készítése, promóteranalízis).....	49
4.1.10. RNS izolálás, DNáz kezelés, cDNS írás, qRT-PCR.....	50
4.1.11. Az elemtartalom meghatározása	51
4.1.12. A fehérjetartalom meghatározása	51
4.1.13. A proteázaktivitás meghatározása azokazeinnel és zselatin-SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE)	52
4.1.14. Az életképesség meghatározása elektrolit kieresztés (EL) alapján.....	52
4.1.15. DNS fragmentálódás vizsgálata agaróz-gélelektroforézissel.....	53
4.2. Zárósejteken végzett kísérletek.....	53
4.2.1. Az epidermisznyúzatok előkészítése és kezelése	53
4.2.2. A zárósejtek életképességének meghatározása.....	54
4.2.3. A sztómanyitottság meghatározása.....	54
4.2.4. A zárósejtek ROS produkciójának meghatározása festéssel	54
4.2.5. A zárósejtek NO produkciójának meghatározása festéssel	54
4.2.6. A zárósejtek klorofill <i>a</i> fluoreszcencia indukciós paramétereinek meghatározása ..	55
4.2.7. A sztómazáródás jelátviteli komponenseinek vizsgálata.....	55
4.3. Sejtszuszpénzióval, mint modellrendszerrel végzett kísérletek.....	56
4.3.1. Kalluszindítás paradicsom növényből	56
4.3.2. Sejtszuszpénzió készítése kalluszból és a kísérletek beállítása	56
4.3.3. A sejtszuszpénzió frisstömeg gyarapodásának mérése.....	57
4.3.4. Sejtszuszpénzió pH-jának és elemtartalmának meghatározása	57
4.3.5. Sejtszuszpénzió életképességének meghatározása festéssel.....	58
4.3.6. Sejtszuszpénzió életképességének meghatározása ionkieresztés alapján	58
4.3.7. Nukleáris változások detektálása TUNEL módszerrel	58
4.3.8. Sejtszuszpénzió DNS fragmentálódásának vizsgálata gélelektroforézissel	59

4.3.9. Sejtszuspenzió etilénprodukciónak meghatározása	59
4.3.10. Sejtszuspenzió ROS produkciójának meghatározása festéssel	59
4.3.11. Sejtszuspenzió NO produkciójának meghatározása festéssel	60
4.3.12. A sejthalál indukció jelátviteli komponenseinek vizsgálata	60
4.4. Az adatok feldolgozása és értékelése.....	60
5. Eredmények	61
5.1. A reaktív oxigénformák indukciója és a fotoszintetikus hatékonyság megváltozása 6 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben.....	61
5.2. A szalicilsav közvetlen hatása a sztómaműködésre paradicsomlevél epidermisznyúzatán	68
5.3. A sejthalál indukció főbb komponenseinek vizsgálata 6 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben.....	73
5.3.1. Az etilénprodukción, ROS, NO és az életképesség változása	73
5.3.2. Génexpressziós változások: az SA jelátvitelében szereplő, a patogenezissel kapcsolatos <i>SIPR1</i>	74
5.3.3. Génexpressziós változások: az antiapoptotikus <i>Bax Inhibitor-1</i> és a jelátvitelben szereplő <i>MAP3Kα</i>	75
5.3.4. Génexpressziós változások: a proapoptotikus <i>cisztein proteázok</i>	77
5.4. A sejthalál terminációja 24 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben.....	79
5.4.1. A proteázok aktiválódása	79
5.4.2. Az ionhomeosztázis megváltozása	82
5.4.3. Az életképesség megváltozása az ionkieresztés alapján, a DNS fragmentációja	83
5.5. A sejthalál indukciójának és jelátviteli komponenseinek vizsgálata paradicsom sejtszuspenzióban.....	85
5.5.1. Növekedési kinetikák és elektrolit kieresztés	85
5.5.2. A sejtek elemtartalmának megváltozása	86
5.5.3. A PCD detektálása és kvantifikálása	87
5.5.4. Az etilénprodukción, ROS, NO és az életképesség változása	89
6. Eredmények értékelése	93
6.1. A sejthalál indukciója és a fotoszintetikus hatékonyság megváltozása a paradicsom növényekben	93
6.2. A szalicilsav hatása a sztómaműködésre paradicsomlevél epidermisznyúzatán.....	95
6.3. A sejthalál indukció főbb komponenseinek vizsgálata a paradicsom növényekben	99
6.4. A sejthalál terminációja a paradicsom növényekben.....	103

6.5. A sejthalál indukciójának és jelátviteli komponenseinek vizsgálata paradicsom sejtuszuszenzióban.....	105
7. Összefoglalás	112
8. Summary	116
9. Irodalomjegyzék	120
10. Mellékletek	137
11. Publikációs lista	143
11.1. Tudományos közlemények referált folyóiratokban	143
11.2. Posztterek és konferencia előadások.....	144
12. Köszönetnyilvánítás.....	147
13. Nyilatkozat.....	148

Rövidítések jegyzéke

A	CO ₂ asszimiláció
ABS	Abszcizinsav
ACC	1-aminociklopropán-1-karbonsav
ACO	1-aminociklopropán-1-karbonsav oxidáz
ACS	1-aminociklopropán-1-karbonsav szintáz
AS	Aminosav
ASA	Aszkorbinsav (Ascorbic acid)
AOX	Alternatív oxidáz
ATG	Autofágiához kapcsolt gének
AVG	Aminoetoxivinilglicin
AVR	Avirulens
BA	N ⁶ -Benziladenin
BI-1	Bax Inhibitor-1
[Ca ²⁺] _{cit}	Citoplazmatikus kalcium koncentráció
CaM	Kalmodulin
Ccp	CO ₂ kompenzációs pont (CO ₂ compensation point)
CDPK	Kalcium-függő protein kináz
CE	Karboxilációs hatékonyság (Carboxylation efficiency)
Ca	Külső (ambient) CO ₂ koncentráció
CPT	Kamptotecin
cPTIO	2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid
DAB	Diamino-benzidin
DAF-2DA	4,5-diaminofluoreszcein-diacetát
DAMP	Sérüléshez kötött molekuláris mintázat (Damage-associated molecular pattern)
DEP	Dietil-pirokarbonát
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DPI	Difenilén-jodónium klorid
EGTA	Etilén-glikol-tetraecetsav
ER	Endoplazmatikus retikulum
ET	Etilén
E-64	<i>transz</i> -epoxiszukcinil-L-leucilamido(4-guanidino)bután
FDA	Fluoreszcein-diacetát
FT	Friss tömeg
Fv/Fm	A második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása
GA	Gibberellinsav
GC	Guanilát cikláz
GB5	Gamborg féle vitaminok
H ₂ DCFDA	2',7'-dikloro-fluoreszcein-diacetát
HR	Hiperszenzitív reakció
I _k	Minimális telítő fényintenzitás
IP ₃	Inozitol 1,4,5-trifoszfát
JA	Jázmonsav (Jasmonic acid)
KAT	Kataláz enzim
KOR	Kifelé egyenirányító K ⁺ csatorna
Lcp	Fény kompenzációs pont (Light compensation point)
MAMP	Mikróbához kötött molekuláris mintázat (Microbe-associated molecular pattern)
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MC	Metakaspáz (Metacaspase)

MS	Murashige és Skoog-féle alap tápsókeverék
NAA	1-Naftilecetsav (1-Naphthylacetic acid)
NBT	Nitrotetrazólium-kék
NO	Nitrogén-monoxid
NOS	Nitrogén-monoxid szintáz
NOX	NADPH-oxidáz
NP	Nyitó puffer
NPQ	A nem fotokémiai kioltási paraméter (Non-photochemical quenching)
NPR1	„Non expressor of PR1”
NR	Never ripe (etilén receptor) paradicsom mutáns
NR	Nitrát-reduktáz
Ns	Nem szignifikáns
NSCC	Nem-szelektív kation csatorna
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PCD	Programozott sejthalál (Programmed cell death)
PD98059	2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-one
PLD	Foszfolipáz D
PPFD	Fotoszintetikus foton áram sűrűség (Photosynthetic photon flux density)
PR	Patogén kapcsolt gének/fehérjék (Pathogene related genes/proteins)
PS	Foszfatidil-szerin
PSI	Az első fotokémiai rendszer
PSII	A második fotokémiai rendszer
PTP	Permeabilitási pórus komplex (Permeability transition pore)
PTP1	Tirozin specifikus fosztafáz 1
Put	Putreszcin
Q	Kvantumhasznosítás (Quantum yield)
qP	Fotokémiai kioltás
Rd	Sötétlélegzés (Dark respiration)
Rel. ETR	Relatív fotoszintetikus elektrontranszport
ROS	Reaktív oxigénformák (Reactive oxygen species)
RT	Reverz transzkriptáz
SA	Szalicilsav (Salicylic acid)
SABP	Szalicilsav-kötő protein (Salicylic acid-binding protein)
SAG	Szenescenciához kapcsolt gének (Senescence associated genes)
SAR	Szisztematikusan szerzett rezisztencia (Systemic acquired resistance)
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SIPK	Szalicilsav-indukált protein kináz (Salicylic acid-induced protein kinase)
SNP	Nátrium-nitroprusszid (NO generátor)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz enzim
SOS	Salt overly sensitive lúdfű mutáns
SZT	Száraz tömeg
STS	Ezüst-tioszulfát (Silver thiosulfate)
TCA	Triklórecetsav (Trichloroacetic acid)
TUNEL	Terminális deoxinukleotidil transzferáz-mediálta biotin-dUTP végjelzés
Yield	A második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása
VDAC	Feszültségű függő anion csatorna (Voltage dependent anion channel)
VPE	Vakuoláris processzálo enzim
WIPK	Sebzés-indukált protein kináz (Wound-induced protein kinase)
W-7	N-(6-Aminohexil)-5-kloro-1-naftalin-szulfonamid hidroklorid

1. Bevezetés

A programozott sejthalál (PCD) az élőlények különböző szervezeti szintjein működő, genetikailag determinált, természetes folyamat, mely az embriógenézistől a szaporodáson át számos alkalommal fontos eleme az egyedfejlődésnek. A PCD azonban nemcsak az élőlények fejlődésének, hanem a stresszhatások elleni védekezési folyamatainak is integráns része. Az állatokhoz hasonlóan a növényeknél is megkülönböztethetünk az egyedfejlődés során bekövetkező (pl. levél morfogenezis, szenescencia) és a környezet által indukált (pl. patogéntámadás, hyperszenzitív reakció) sejthalált. Noha a PCD sajátos fiziológiai, biokémiai és morfológiai változásokkal jellemezhető a különböző szerveződési szintű élőlényekben, a növényeknél ez számos esetben eltér az állati sejtekben lejátszódó folyamatoktól, amelyek pontos mechanizmusa jelenleg az állati PCD-vel szemben még kevésbé ismert.

Az abiotikus stresszorok közül a sóstressz által indukált PCD-t már sokoldalúan vizsgálták; ez a mezőgazdasági termelést is gyakran limitáló abiotikus stresszor ionikus-, ozmotikus- és oxidatív stressz generálásával indukálhatja a sejthalált (Joseph és Jini 2010). A biotikus stressz során a patogének támadásával szemben lokális és szisztematikus védelmi reakciók aktiválódnak a növényekben, amiben a szalicilsavnak (SA) kulcsfontosságú szerepe van. Az SA a biotróf patogénnel szembeni védekezést jelentő hyperszenzitív reakció (HR) jelátviteli komponense, amely során a fertőzött és a körülöttük lévő sejtek az SA által generált oxidatív robbanás következtében programozottan elhalnak (Hayat és mtsai. 2010). Ezzel szemben azonban a korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy szubletális koncentrációjú SA előkezeléssel fokozni lehet a paradicsom növények abiotikus stressz, köztük a sóstressz toleranciáját is (Tari és mtsai. 2002; Szepesi és mtsai. 2005; Szepesi 2009; Gémes 2011).

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, milyen különbségek figyelhetők meg a sóstressz akklimatizációt javító szubletális SA koncentrációval történő előkezelés hatására, valamint a magasabb koncentrációk programozott sejthalált indukáló folyamatai között. Milyen biokémiai, fiziológiai és génexpressziós különbségek vannak a még éppen tolerálható és a PCD-t indukáló hatású NaCl koncentrációk között, továbbá mik a különbségek az abiotikus sóstressz és a biotikus stresszben szerepet játszó SA által indukált PCD mechanizmusa között?

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *A programozott sejthalál (PCD) növényekben*

2.1.1. A sejthalálról általában

A PCD fő formáját az állati sejteknél az apoptózis képviseli, ami egy evolúciósan konzervált, genetikailag determinált biológiai folyamat. Főbb folyamatai a következők lehetnek: halálreceptorok aktiválódása (TNF, Fas, TRAIL), a plazmamembrán hólyagosodása („blebbing”), a foszfatidilszerin (PS) áthelyeződése a plazmamembrán külső oldalára, a sejt zsugorodása, a citokróm c kiszabadulása a mitokondrium borító membránok közötti belső térből, a kaspázok aktivációja. A kaspázok (Caspases: cysteine-dependent **asp**artate-specific protein**ases**) olyan proteázok, melyek aktív centrumában cisztein van és a szubsztrát fehérjét aszparaginsav utáni pozícióban hasítják. Az apoptózis végső fázisában történik a DNS internukleoszómális hasítása (180-200 bp), a kromatin kondenzációja, apoptotikus testek, membránnal határolt vezikulák kialakulása és végül az elpusztult sejtfragmentumok fagociták általi bekebelezése. A PCD-ben résztvevő sejtek gyulladás előidézése nélkül, aktívan szabályozott körülmények között felszámolják magukat (Savill és Fadok 2000). E reguláció hiánya különböző patológiás állapotokhoz vezet, mint például az autoimmun betegségek vagy a rák. Az apoptózis két fő típusa a külső (extrinsic), azaz a receptor közvetített és a belső (intrinsic), azaz mitokondrium által közvetített útvonal; köztük átfedés is lehetséges (Jin és El-Deiry 2005). A PCD másik fő formája a nekrozis, amely során az állati sejtek megduzzadnak, a membránintegritásuk megszűnik, és tartalmuk a környező térbe ürül, mely a környező szövetek gyulladását okozza. A nekrozis esetén azonban nem figyelhető meg a sejtmag kondenzációja és a DNS fragmentálódása, szemben az apoptózissal (Kopper és Fésűs 2002).

Az állati és a növényi sejthalál között számos hasonlóság, de jelentős különbségek is megfigyelhetők. A növényi sejteknél többek között jelenleg még nem ismertek sejthalál receptorok és a növényi szervezetben fagocitózissra specializálódott sejtek sem találhatók (Danon és mtsai. 2000).

Az állati apoptózis során a sejtmembrán aszimmetrikussága megszűnik, és a normál állapotban kizárólag a belső membrán részét képező foszfatidilszerin áthelyeződik a külső membránra, amit az Annexin V fluoreszcens festékkel lehet detektálni. Ez a folyamat nemcsak állati sejtek esetében játszódik le, hanem dohánynövény sejteknél is megfigyelték kamptotecinnel (CPT) előidézett sejthalál során (Danon és mtsai. 2000).

Az állati sejtekkel ellentétben a növényeknél nem a sejtek zsugorodása, hanem a citoplazma zsugorodása figyelhető meg, többek között oxálsav vagy sókezelést követően 24 órán belül (Errakhi és mtsai. 2008; Wang és mtsai. 2010b). A PCD során a növényi sejtek mikrotubulus hálózata is átrendeződik, depolimerizálódik (Smertenko és Franklin-Tong 2011).

Megfigyelhető növényi sejtek esetében is a mitokondrium borítómembránjai közül a citokrómtól való kieresztése, például SA kezelést követően (Garcia-Heredia és mtsai. 2008).

Növények esetén a proteázok, kiemelten egyes, kaszkádba nem rendeződő ciszteín proteázok bírnak kulcsfontosságú szereppel a proteolitikus folyamatokban, ellentétben az állati sejtekkel, ahol a kaszpázok és az általuk alkotott kaszkádrendszer a sejthalál iniciálója és végrehajtója is (Sanmartín és mtsai. 2005).

Az állati sejtekre jellemző kromatin kondenzáció és DNS fragmentáció szintén megfigyelhető növényekben, ami kimutatható agarózgélben a DNS „létra” kialakulásával ill. ún. TUNEL (terminális deoxinukleotidil transzferáz-közvetített biotin-dUTP végjelzéses) módszerrel fluoreszcens mikroszkóp segítségével (Lam 2004; van Doorn és Woltering 2005; Gunawardena 2008; van Doorn 2011).

2.1.2. A növényi sejthalál típusainak csoportosítása

A növényi PCD-t attól függően, hogy milyen jel váltja ki, két nagy csoportra lehet osztani: a környezet által indukált (pl.: lizogén aerenchyma kialakulása, hiperszenzitív reakció) és a fejlődés során szabályozott sejthalálra (levél morfogenezis, virágzás, gyökérfejlődés, mirigyek kialakulása, szenescencia). A fejlődéskor végbemenő PCD-t belső jelek, ezzel szemben az előzőt külső tényezők, biotikus és abiotikus stresszorok váltják ki (Woltering 2004; Gunawardena 2008).

A növényi PCD morfológiai és biokémiai szempontok szerint történő csoportosítása az utóbbi időben jelentős változásokon ment keresztül; még nem olyan jól definiált, mint az állati PCD. Van Doorn és Woltering (2005) morfológiai szempont szerint három csoportba osztotta a növényi sejthalált: autofág, apoptózisszerű és nem lizoszomális, vagy nekrotizisszerű PCD. Gunawardena (2008) a növényi sejthalált citológiai tulajdonságok alapján három csoportra bontotta: gyors, apoptózis szerű PCD, szenescenciához kapcsolt PCD, valamint a központi vakuólum korai szétszakadásához köthető PCD. A növényi PCD morfológiai típusainak meghatározása és csoportosítása az utóbbi években sok vitát váltott ki (Cacas és Diamond 2009 vs. Love és mtsai. 2009). 2011-ben az egymással szemben álló iskolák képviselői közösen két

csoportra osztották fel a növényi PCD-t. Az egyik a „vakuoláris PCD”, melynek főbb biokémiai jellemzői az autofágikus aktivitás, a vakuólum savasodása, a citoszkeleton újrendeződése, a „vakuoláris processzáló enzim” (VPE) aktiválódása. A másik út a „nekrózis”, amire jellemző a mitokondriális membrán permeabilizálódása (MMP), a respiráció csökkenése, az ATP szint csökkenése, reaktív oxigén- (ROS) és nitrogénformák akkumulálódása (van Doorn és mtsai. 2011). Van Doorn (2011) későbbi munkájában már „autolitikus” és „nem autolitikus” növényi PCD-ről ír. Az „autolitikus” PCD-hez tartozik többek között a fejlődés, a közepesen erős abiotikus stressz és a szenescencia által kiváltott PCD. Az autofágiát ide sorolja, de megjegyzi, hogy számos példa van, amikor az autofágia késlelteti a PCD-t. A „nem autolitikus” PCD-hez sorolja a HR-indukált PCD-t.

Ezek alapján a dolgozatban az „autolitikus” PCD-hez tartozó szenescencia és autofágia, és a „nem autolitikus” PCD-hez tartozó HR főbb jellemzőit írjuk le.

2.1.2.1. A szenescencia

A szenescencia a növényekben bekövetkező lassú sejthalál, amely magába foglalja a sejtek rendezett elpusztulását az idős szövetekben, és lehetővé teszi a tápanyag újrafelhasználását ezekből a részekből, a növény többi részének túlélése érdekében (Love és mtsai. 2008; Krupinska és Humbeck 2008). Szervszintű öregedéskor fokozódik a proteáz aktivitás, amely során két fontos folyamat mehet végbe. Az egyik, amikor a nitrogén újraelosztása történik az öregebb levelek (forrás) és a fiatalabb levelek, valamint a gyökér és a termés között (felhasználó hely). A másik folyamat, az általános „protein turnover”, ami alatt a növekedés során felhalmozódott fehérjék degradálódnak, és a szenescencia-indukált új fehérjék szintetizálódnak (pl. a glutamin-szintetáz aktivitás fokozódása) (Quirino és mtsai. 2000; Noodén 2004).

A szenescenciát belső és külső faktorok pl. exogén növényi hormonokkal történő kezelés, árnyékolás, extrém hőmérsékletváltozás, patogéntámadás, UV-B sugárzás és az ózon indukálhatja (Quirino és mtsai. 2000; Love és mtsai. 2008).

A szenescencia tipikus jele a levelek klorofill tartalmának csökkenése és a sárgulás, amely során a klorofill egyik bomlásterméke (Buchanan és mtsai. 2000; Quirino és mtsai. 2000; Noodén 2004) és a kloroplasztisz gerontoplasztisszá történő átalakulása (Thomas és mtsai. 2003; van Doorn 2005) indukálhatja a PCD-t. Ezáltal a fotoszintézis aktivitása és a

RUBISCO fehérje kis és nagy alegységének és az ezt kódoló RNS-eknek a mennyisége is csökken (Chandlee 2001; Palma és mtsai. 2002).

A fotoszintézis aktivitásának csökkenése azonban nemcsak az öregedési folyamatokat befolyásolja, hanem a fotoszintézis termékeinek, a cukroknak a metabolizmusát is (Love és mtsai. 2008).

A szeneszscencia során számos szeneszscenciához kapcsolt gén expressziója fokozódik, amit lúdfűben SAG-nak, „senescence-associated” géneknek nevezünk. Köztük olyanok is találhatóak, amelyek nagy hasonlóságot mutatnak különböző cisztein proteázok szekvenciáival (Buchanan és mtsai. 2000).

A szeneszscenciát számos hormon és környezeti tényező szabályozza: indukálja az etilén, jázmonsav, SA, gátolja a fény és a citokininek (Love és mtsai. 2008).

Az abszcizinsav (ABS) szerepe a különböző szervekben, szövetekben eltérő lehet a folyamatban. Az aleuron sejtrétegben a gibberellinsav (GA) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) részt vesz a sejtekben bekövetkező sejthalál indukciójában a tápanyag mobilizálásakor, az ABS és a nitrogén-monoxid (NO) viszont hozzájárul a sejtek életképességének fenntartásához, ami más szövetekben a PCD indukálásához is vezethet (Love és mtsai. 2008).

A citokininek késleltetik a szeneszscenciát (Chandlee 2001; Love és mtsai. 2008), de ennek az ellenkezője is ismert, amikor a nagy mennyiségben alkalmazott citokinin (6-benzilaminopurin) serkenti a PCD-t (Carimi és mtsai. 2004). A gyökércsúcs a citokinin szintézis fő helye, éppen ezért az itt végbemenő stresszhatások determinálják a növény sorsát (van Doorn 2005).

Az etilén (ET) pozitív regulátora a szeneszscenciának. Lúdfű *ore9* mutánsban lassul a szeneszscencia folyamata, mert hibás az ET, ABS és metil-jázmonsav jelátvitel (Kuriyama és Fukuda 2002). Az *old1* mutáns lúdfűben, ahol az ET jelátvitel gátolt, a levelek életképessége nagyobb, mert a SAG gének expressziójának indukciója késleltetett (Greenberg 1996).

A jázmonsav (JA) az ET-nel egymást erősítve indukálja a szeneszscenciát. A hormon szerepét igazolta a folyamatban, hogy az exogén JA kezelés indukálta a szeneszscenciát zabban, de a JA érzéketlen *coi1* mutánsban ez elmaradt (Love és mtsai. 2008).

Ultrastrukturális vizsgálatok bebizonyították, hogy a szeneszscencia során megfigyelhetőek a PCD tipikus jellemzői. Orzácz és Granell (1997) DNS fragmentációt mutattak ki a beporzás nélkül maradt borsó bibe sejtjeiben, valamint apoptotikus jellegzetességeket figyeltek meg a szíromlevelek szeneszscenciája során. A szerzők leírták továbbá a szeneszscenciával kapcsolatosan működő ET által szabályozott DNS fragmentációt is.

Ezek az eredmények közvetlen bizonyítják, hogy a növények természetes öregedési folyamatai során is indukálódik a PCD.

2.1.2.2. Az autofágia

Az autofágia a sejtek önmérsztése (self-eating), amely során a citoplazmatikus komponensek a vakuólumban bomlanak le. Természetes folyamat, amely a növények fejlődése során a kezdetektől, az embriogenezistől kezdve a szeneszscenciáig végbemehet egyes sejtekben (van Doorn 2005). Az autofágia fontos szerepet tölt be a tápanyagok mobilizálásában, cukor- és nitrogén éhezés esetén és a levelek öregedésekor (Bassham 2007; Hofius és mtsai. 2011), ugyanis korlátozott tápanyag ellátáskor teljes kloroplasztiszok és a belőlük származó RUBISCO autofágiával degradálódik a szeneszscencia kialakulásakor (Wada és mtsai. 2009).

Love és mtsai. (2008) a növényi PCD csoportjainak kialakítására tett kísérletük során az autofágiát a sejthalál egy lassabb módjának írták le, amelynek morfológiai kritériuma a kromatin kondenzálódása és a citoplazma erős autofágikus vakuolizálódása (Cacas és Diamond 2009). Az autofagoszóma a citoplazmában képződő, kettős membránnal körülvett képlet, amely fuzionálhat az endoszómákkal, végül a vakuólummal. A vakuólumból kiszabaduló hidrolázok eredményeként a sejttartalom megemésztődik, valamint ezzel egyidőben a tonoplaszt degradálódik (Bassham 2007).

Állatokban és növényekben az autofagoszóma kialakulásához nélkülözhetetlen az *ATG* gének expressziója (*AUTOPHAGY*), amelyek erősen konzerváltak, és az élesztő 18 *ATG* gőnje közül a legtöbbet már azonosították a növényekben is (Meijer és mtsai. 2007). Számos lúdfő *atg* mutánsban nem működik az autofágia jelensége, de mindegyik normális életjelenséget mutat tápanyagban gazdag feltételek mellett. Ezek a mutánsok azonban a tápanyagok hiányára rendkívül szenzitívek, ekkor ugyanis néhány *ATG* gén expressziója indukálódik (Yoshimoto és mtsai. 2009). Az *ATG6* gén elcsendesítése dohány növényben csökkent autofágiát és dohány mozaik vírussal fertőzött részekén kiterjedt klorotikus sejthalált indukált (Liu és mtsai. 2005). Az *ATG* gének hiánya más típusú sejthalálformához (Love és mtsai. 2008-as nomenklatúrája szerint „apoptózis-szerű” sejthalálhoz) vezet táplálékhiány és patogénfertőzés esetén (Love és mtsai. 2008).

Az *atg2* és *atg5* mutánsok nagy mennyiségben akumulálnak SA-t. Yoshimoto és mtsai. (2009) bizonyították, hogy az *atg5* mutáció által indukált korai szeneszscencia gátolható az *atg5* és *NahG* (szalicilát-hidroxilázt kódoló gén) ill. *sid2* (SA bioszintézisben szereplő gén) vagy

NPR1 duplamutánsokban. Az autofágia tehát negatívan szabályozza az SA akkumulációját, jelátvitelét és szerepét a gyors HR-ben. A növényi hormonok közül a JA és az ET pozitívan szabályozza a folyamatot, és szintén megfigyelhető a ROS és H₂O₂ produkció növekedése is (Love és mtsai. 2008).

2.1.2.3. A hiperszenzitív reakció (HR)

A szeneszcenciával szemben a HR során a PCD gyors sejtelhalást eredményez, így képezve akadályt a patogénfertőzés továbbterjedése előtt (Dangl és mtsai. 2000). A növényeknek ugyanis az állatokkal szemben nincsen olyan immunrendszere, ahol speciális sejtek (pl. makrofágok) megtámadnák, legyengítenék és eltávolítanák a különböző patogéneket. Ehelyett a növények több védekezési stratégiája közül az egyik a PCD indukálása. A gyors HR valamilyen patogén (pl. dohánymozaik vírus, *Pseudomonas syringae*, *Vigna unguiculata*) vagy patogén által kiválasztott molekula (elicitor) (pl. AAL-toxin, viktorin, fumonisin B1) okozta infekció körül alakul ki (Van Doorn és Woltering 2005). Bizonyos lúdfű mutánsok, mint az *acd2* (accelerated cell death 2) és az *lsd* (lesions simulating disease) patogén támadása nélkül, spontán aktiválják a HR folyamatát (Greenberg 1996).

A fertőzésre adott növényi válasz három szakaszból áll: a kórokozó felismeréséből, a jelátviteli folyamatok megindításából és végül a védekezési program megvalósulásából (Scheel 1998). Az immunválasz kialakulásának előfeltétele, hogy a patogén avirulencia (*avr*) génjének fehérjetermékét a növény rezisztencia (*R*) génje által kódolt fehérje közvetve vagy közvetlenül felismerje. Az így aktivált jelátviteli program aktiválja a védekezési mechanizmusokat a fertőzés helyén illetve a szisztémikusan szerzett rezisztenciának (SAR) nevezett folyamaton keresztül gátat szab a patogén szaporodásának a nem fertőzött szövetekben is (Brodersen és mtsai. 2005). Az elsődleges védelmi vonalat az ún. „mintafelismerő receptorok” (pattern recognition receptors: PRRs) jelentik, melyek a mikróbához (MAMP) vagy a sérüléshez kötött (DAMP) molekuláris mintázatot felismerik és immunválaszt generálnak. A PPR-ek transzmembrán receptor-szerű kinázok (RLK), melyek külső doménja leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmaz, intracelluláris kináz doménja a MAPK kaszkádon keresztül a MAMP okozta immunválaszt eredményezi (Coll és mtsai. 2011). Rezisztens növényekben, vagyis az inkompatibilis gazda-kórokozó kapcsolatban végbemenő gyors sejtelhalással járó HR azonban eltér a nekrozistól, mert genetikailag programozott és a gazdasejtben aktív metabolizmust igénylő folyamat (Asai és mtsai. 2000). Morel és Dangl (1997) szerint a HR a védelem utolsó

lépése, amikor egyes sejten belüli jelek átlépnek egy bizonyos határértéket és visszafordíthatatlanul indukálódik a PCD.

A HR során a gyors H_2O_2 produkcióval járó folyamatot oxidatív robbanásnak nevezzük. H_2O_2 forrása lehet a folyamatban többek között az alternatív oxidáz (AOX) és a plazmamembránhoz kötött NADPH-oxidáz is (Lam és mtsai. 2001). A HR során akkumulálódó ROS és H_2O_2 önmagában is indukálja a PCD-t (Overmyer és mtsai. 2003). Azáltal, hogy ez a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentrációt megemeli, a MAPK-k aktiválódásával kapcsolt sejthalált is serkenti (Levine és mtsai. 1996; Ren és mtsai. 2002). A ROS mellett a nitrogén-monoxid (NO) és a keletkező peroxinitrit is fokozza a sejthalál mértékét (Delledonne és mtsai. 2001). A kloroplasztiszoknak is kitüntetett szerepe van a HR-ban, egyrészt a ROS generálásában, hiszen sok esetben a HR kialakulásához fény szükséges. Másrészt különböző patogén effektoroknak a kloroplasztiszokhoz köthető jele van (Coll és mtsai. 2011).

A HR során megnövekedett SA akkumuláció és az általa generált ROS és NO azt bizonyítja, hogy az SA részt vesz a HR időbeli és térbeli kiterjedésének szabályozásában (Alvarez 2000).

A HR során a PCD olyan fő jellegzetességei figyelhetők meg a sejtekben, mint a szabad 3'-OH-végű DNS törések valamint, a sejtmag és a citoplazma kondenzációja (Greenberg 1996; Reape és McCabe 2008). A HR végbemenetelekor a plazmamembránban lokalizált H^+ pumpa aktiválódik, amit a patogének szintén aktiválhatnak (Greenberg 1996). Emellett a növényi vakuoláris proteázok, a VPE-k is aktiválódnak és indukálják a vakuólum gyors szétesését vírus által indukált HR során (Hatsugai és mtsai. 2004). Bizonyították azt is, hogy az I-es típusú metakaspázok (AtMC1) pozitív regulátorai a HR-nak. Az *Atmc1* kiütéses (knockout) mutáció ugyanis csökkentette az *Isd1* kettős mutánsokban a baktériumok és oomycéták indukálta HR-t, míg a II-es típusú metakaspáz negatív regulátora az I-esnek (Coll és mtsai. 2011).

2.2. A PCD indukációjában szereplő utak és azok főbb komponensei növényekben

Az állati apoptózis számos szabályozó és végrehajtó komponensére már sikeresen fény derült, amely ismereteket felhasználva lehetőség nyílt a növényi PCD további megismerésére. A növényi sejthalál bonyolult jelátvitelében olyan, részben állati sejtekben is működő folyamatok mennek végbe, mint a ROS és reaktív nitrogénformák képződése, a citoplazmatikus kalcium

koncentráció ($[Ca^{2+}]_{cit}$) növekedése, a mitokondriumok belső teréből a citokrómmal való kiszabadulása, a MAPK kaskád aktiválódása, az ionhomeosztázis megváltozása, a sejt tartalom proteolízise, a DNS fragmentálódása (Yakimova és mtsai. 2008). Ezeknek a folyamatoknak fő szabályozói a különböző növényi hormonok lehetnek, mint például az ET és az SA (Love és mtsai. 2008), melyeket külön is részletesen tárgyalunk.

2.2.1. Reaktív oxigénformák (ROS)

Oxidatív stressznek nevezünk minden olyan folyamatot, amikor reaktív oxigénformák (ROS) képződnek a sejtekben, olyan mértékben, amit a sejt enzimatikus és nem enzimatikus védelmi rendszere már nem képes eliminálni és amely oxigénformák egymásba alakulva hozzájárulnak a sejtalkotók és sejtek károsodásához. A ROS a PCD jelátvitelének fő komponensei, amelyek indukálhatják a letális folyamatokat, a fehérjék, lipidek, szénhidrátok és a DNS módosításán és/vagy károsításán keresztül (Mittler és mtsai 2004; Van Breusegem és Dat 2006; De Pinto és mtsai. 2012; Sierla és mtsai. 2013).

A ROS fiziológiai körülmények között is képződnek az aerob metabolikus folyamatok melléktermékeként az oxigén részleges redukciójával. A reaktív oxigénformákat három csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportot az oxigén szabadgyökök alkotják, a szuperoxid gyökanion ($\cdot O_2^-$), a hidroxil gyök ($OH\cdot$) és a hidroperoxil gyök ($HO_2\cdot$), melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek. A másik csoportba tartozik a hidrogén-peroxid (H_2O_2), amely további szabadgyök képzésre képes. A harmadik csoportba a rendkívül reakcióképes szinglet oxigén (1O_2) tartozik, amely szabadgyököt nem képez (Wojtaszek 1997; Vranová és mtsai. 2002; Asada 2006). A szinglet oxigén jelátvitelben betöltött szerepét lúdfűben vizsgálták. A szinglet oxigén drasztikusan megváltoztatja a génexpressziós mintázatot a lúdfű *flu* mutánsban, amiben a plasztiszból a sejtmagba történő jelátvitel vizsgálható. Az EXECUTER1 fehérje inaktiválásával csökkenteni lehetett a szinglet oxigén által szabályozott gének expresszióját, és emellett tisztázni az EXECUTER2 szerepét is, ami az EXECUTER1 aktivitását szabályozza (Van Breusegem és Dat 2006; Lee és mtsai. 2007). A ROS kémiai tulajdonságai nagyon eltérnek. A szuperoxid gyökanion mérsékelten reakcióképes, rövid életidejű oxigénforma, amely korlátozottan képes a membránokon keresztüli diffúzióra. A hidroperoxil gyök a szuperoxid gyökanion protonált formája, ami lipidoldékonyabb. A hidroxil gyök a legreaktívabb oxigénforma, ami a Fenton/Haber-Weiss reakciókban keletkezik és számos sejtben belüli makromolekulát irreverzibilisen módosíthat és sejtorganelleket károsíthat (Wojtaszek

1997; Vranová és mtsai. 2002; Asada 2006). A hidrogén-peroxid a szuperoxid gyökanyon dizmutációjával keletkezhet a SOD által katalizált reakcióban a molekuláris oxigénnel együtt. Lebontását a kataláz enzim (KAT) végzi, további enzimatis leontását az aszkorbát-peroxidáz is szabályozza a Halliwell-Asada ciklusban. A hidrogén peroxid viszonylag stabil molekula, amely a membránokon az akvaporinokon keresztül képes átdiffundálni (Wojtaszek 1997; Vranová és mtsai. 2002; Asada 2006; Moller és Sweetlove 2010). A ROS eliminálásában az enzimatis leontáson kívül nem enzimatis, vízdékony antioxidánsok, az aszkorbinsav (ASA) és a glutation (GSH)) is részt vesznek, melyek millimólos koncentrációban akkumulálódnak a kloroplasztiszokban (Foyer és Shigeoka 2011).

A hidrogén peroxid a legjobban tanulmányozott ROS, ami szignalizációs molekulaként szabályozza a stresszadaptációt, az egyedfejlődés egyes lépéseit és a sejthalált (Apel és Hirt 2004; Gechev és Hille 2005; Breusegem és Dat 2006; De Pinto és mtsai. 2012). A H_2O_2 -indukálta PCD esszenciális jelátviteli komponense a HR-nek, az allelopatikus növény-növény kölcsönhatásoknak és a szeneszenciának (Gechev és Hille 2005; Love és mtsai. 2008). Alvarez és mtsai. (1998) bizonyították a H_2O_2 szerepét az SA hatásához is kötődő SAR kialakításában, ahol is a H_2O_2 szükséges a védekezési gének, mint például a glutation-S-transzferáz (GST) és a patogén kapcsolt (PR) gének expressziójához. Exogén H_2O_2 kezelés önmagában is kiváltja a PCD-t, viszont magas koncentrációban alkalmazva PCD helyett nekrozist okozhat (Yao és mtsai. 2001). A H_2O_2 , mint szignál közvetítése a MAPK kaszkád aktiválódásán keresztül, a Ca^{2+} fluxus, a celluláris redox állapot módosulásával valamint más szignalizációs molekulákkal (NO) és hormonokkal (SA, ET) kölcsönhatva is megvalósulhat (Gechev és Hille 2005).

A PCD során szoros kapcsolat van a fitohormonok, a ROS és más szignalizációs molekulák, így az NO között (Overmyer és mtsai. 2005). Az SA és az ET például egy pozitív „feedback ciklus” részeként segítik elő a ROS-függő PCD-t, ugyanis a sejthalált mindkét hormon növekedett szintje kísérheti, és mindkét hormon emeli a ROS szinteket (Danon és mtsai. 2005). Az ABS a NADPH-oxidáz működésén keresztül generál H_2O_2 -ot, aminek fontos szerepe van a sztómazárásban is (Neill és mtsai. 2002.), emellett a H_2O_2 szükséges az ABS-indukálta szeneszencia indukciójához is rizsben (Hung és Kao 2004).

ROS képződését okozzák egyrészt abiotikus (pl. sóstressz, szárazság stressz, alacsony ill. magas hőmérséklet, tápanyaghiány, magas fényintenzitás, ozmotikus stressz, sebzés, ózon, UV) valamint biotikus stresszhatások (pl. patogén fertőzések) is (Overmyer és mtsai. 2003; Van Breusegem és Dat 2006; Wrzaczek és mtsai. 2009; Sierla és mtsai. 2013).

ROS számos helyen és módon keletkezhet a sejtekben, többek között a mitokondriumokban, a kloroplasztiszokban, peroxiszómában, plazmamembránhoz kötött folyamatokban és az apoplasztban (Jones 2000; Overmyer és mtsai. 2003; Ahmad és mtsai. 2008; Sierla és mtsai. 2013).

A mitokondriális elektrontranszportlánc működése közben az I-es és III-as komplex, valamint az alternatív oxidáz (AOX) katalizálja az elektronáramlást a molekuláris oxigénre, ahol szuperoxid gyökanion keletkezhet, ami H_2O_2 -vé dizmutálódhat (Lam és mtsai. 2001, Moller 2001). A mitokondriális oxidatív stressz a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozza, ami a PCD további lépéseinek, így a citokróm c kieresztésének fontos eleme (Vianello és mtsai. 2007).

A kloroplasztiszokban a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése közben nőhet meg a ROS mennyisége. Szinglet oxigén keletkezik a II-es fotokémiai rendszer (PSII) működése közben, szuperoxid gyök anion keletkezik az I. fotokémiai rendszer (PSI) működése során, amely CuZn-SOD hatására gyorsan átalakul H_2O_2 -vé a kloroplasztiszban (Asada 2006; Sierla és mtsai. 2013).

A fotoszintetikus elektrontranszport végső elektronakceptora, a NADPH pool túlredukáltságának elkerülése érdekében a C3-as növényekben kialakult az ún. fotorespiráció jelensége, amely során reaktív H_2O_2 képződik a peroxiszómákban. A peroxiszómák egyrétegű membránnal körülvett sejt szervecskék, ahol a fotorespiráció és az urea metabolizmusa zajlik. A ROS képződése mellett reaktív nitrogénformák is keletkeznek a peroxiszómákban, melyek jelmolekulaként funkcionálhatnak (del Río és mtsai. 2006).

A plazmamembrán lokalizált NADPH-oxidáz (NOX, Rboh) kulcsszereppel bír az oxidatív folyamatok kialakításában. A NADPH-oxidáz működése közben szuperoxid gyökaniont generál az apoplaszt felé, ami gyorsan átalakul H_2O_2 -vé (Lam 2004; Gechev és Hille 2005). A NADPH-oxidáz működésével járul hozzá a sejtről-sejtre történő ROS hullám kialakulásához a növényekben (Mittler és mtsai. 2011).

A sejtfal-kötött peroxidázok is megnövelik a ROS produkciót a HR során, különböző növény-patogén interakciók következményeként (Bindschedler és mtsai. 2006).

Az oxalát oxidáz és az amin oxidázok (poliamin-oxidáz, diamin-oxidáz) a H_2O_2 produkció növelésével szintén fokozzák a HR-t patogéntámadást vagy elicitor kezelést követően (Lane 2002; Yoda és mtsai. 2006).

A növényi sejtekben kifinomult stratégiák alakultak ki az intracelluláris ROS eliminálására, amelyeket két csoportra oszthatunk: az elkerülést elősegítő és a detoxifikáló mechanizmusok csoportjába. Előbbihez tartozó stratégia például a levelek pödrődése vagy a

PSII fotoinaktivációját okozó D1 protein degradációja, ami gátat szab a ROS túlzott termelődésének magas fényintenzitás esetén (Mittler 2002; Mullineaux és Karpinski 2002). A detoxifikáló mechanizmusokban számos ROS-t elimináló enzim (SOD, KAT, aszkorbát peroxidáz (APX)) vagy nem enzimatisz antioxiidáns (ASA, GSH, karotinoidok) vesz részt, amelyek kódoló génjeinek kiütésével vagy éppen túltermeltetésével bizonyítható a növényi növekedést, biotikus és abiotikus stresszvászokat szabályozó, intracelluláris ROS szintjeinek a fejlődési vagy stressz akklimatizációs folyamatok regulációjában betöltött szerepe (Wojtaszek 1997; Vranová és mtsai. 2002; Asada 2006; Foyer és Shigeoka 2011; De Pinto és mtsai. 2012). Ilyen például a KAT1 génjét csökkentve kifejező dohány növény, ahol H_2O_2 akkumulálódás és a sejthalál indukció figyelhető meg erős fényintenzitás alatt a paliszád parenchima sejtekben (Dat és mtsai. 2003). De Pinto és mtsai. (2006) emellett bizonyították, hogy a citoszolikus APX-nek kulcsszerepe van a sejtek védelmének vagy halálindukciójának szabályozásában, hasonlóképpen az ASA tartalomnak is. A GSH szint, valamint a GSSG/GSH arány pedig a mitokondriumok redox állapotával együtt meghatározza a citokróm c-függő PCD indukciót (Hancock és mtsai. 2001).

A különböző módokon az egyedfejlődés, abiotikus-, biotikus stressz során keletkezett ROS, nemcsak a sejtorganellumok károsításában vesznek részt, hanem jelmolekulaként is funkcionálhatnak. Erre a H_2O_2 a legalkalmasabb oxigénforma, mivel ez a leghosszabb életidejű és a membránokon is képes átdiffundálni az akvaporinok közvetítésével. H_2O_2 indukálja a MAPK kaszkádot, Ca^{2+} fluxust okoz, kinázokkal és foszfatázokkal hat kölcsön és specifikus gének expresszióját indukálja. A ROS által oxidált fehérjék másodlagos hírvivőként funkcionálhatnak a mitokondrium, kloroplasztisz, peroxiszóma vagy sejtorganellumok között és a sejtek génexpresszióját is megváltoztathatják (Moller és Sweetlove 2010).

2.2.2. Reaktív nitrogénformák

A reaktív nitrogénformák úgy, mint a nitrogén-monoxid (NO) és a peroxinitrit ($ONOO^-$) intra- és intercelluláris szignalizációs molekulaként részt vesznek számos biokémiai és fiziológiai folyamat szabályozásában, a fejlődéstől kezdve az abiotikus- és biotikus stresszvászokon át a PCD és a védelmi folyamatok szabályozásáig (Desikan és mtsai. 2004; Moreau és mtsai. 2010; Wang és mtsai. 2010c).

Az NO rövid életidejű, gáz halmazállapotú szabadgyök, amely koncentrációtól függően hírvivő és sejtkárosító funkcióval rendelkezik (Wang és mtsai. 2010c). 1992-ben az NO-t a

Science az „év molekulájának” választotta meg (Koshland 1992). Az NO szerepét számos humán betegségben (Alzheimer kór, Parkinson kór, agyvérzés stb.) leírták, majd a növénybiológiában Leshem és Harmaty (1996) és Delledone és mtsai. (1998) által a Nature-be írt cikk hozott robbanásszerű fellendülést az NO kutatásában. Az NO-t azonosították, mint jelmolekulát a HR során, a bakteriális- és virális patogénfertőzésre adott növényi válaszbán. Mára az NO által szabályozott jelátvitel számos eleme felderítésre került a növényekben, a fent leírt belső- és külső stimulusokat követően, mint például a növényi hormonok jelátvitelével való kapcsolata (ABS, SA, ET), a ROS-sal, Ca^{2+} és a MAPK kaszkáddal való interakciója és a sztómazárásban betöltött szerepe (Lamattina és mtsai. 2003; Neill és mtsai. 2003; Neill és mtsai. 2008). Az NO hatással van a fotoszintézisre is, ugyanis képes reverzibilisen gátolni a fotoszintetikus elektrontranszportláncot (Takahashi és Yamasaki 2002; Wodala és mtsai. 2008; Ördög és mtsai. 2013). Emellett az NO nemcsak keletkezhet a mitokondriumban a nitrition III-as és IV-es komplex általi redukciója során, hanem a mitokondrium fehérjeire is hatást gyakorolhat. Az NO ugyanis képes kötődni reverzibilisen a citokróm oxidázhoz. Ezáltal zavart okoz az elektrontranszportban, gátolja a respirációt és indukálja a szuperoxid gyökionion termelését, valamint képes az I-es komplexet S-nitrozilálni. Mindezek hozzájárulhatnak a PCD indukciójához (Gupta és mtsai. 2011).

Moreau és mtsai. (2010) két fő csoportra osztja az NO szintézis mechanizmusát a növényekben. Az első az ún. „reduktív útvonal”, ide tartozik többek között a nitrát-reduktáz (NR) működése során a nitritből keletkező NO. Lúdfű *nia1* és *nia2* nitrát-reduktáz mutánsban igazolták, hogy a mutánsokban az NO termelés csökken mértékű, felvetve annak a lehetőségét, hogy az NR-nek szerepe van az NO termelésben. Ugyancsak keletkezik NO a nitritből a mitokondriális elektron transzportlánc működése közben, valamint a nem enzimatis hatásokra, savas pH-n és redukáló körülmények között ASA jelenlétében. A másik csoport az ún. „oxidatív útvonal”, ahova az arginin citrullinné történő átalakulása sorolható. A reakciót az NO szintáz (NOS) katalizálja állatokban. Feltételezték, hogy NOS-szerű aktivitás a növényekben is kimutatható (*Atnoa1* mutánsok), de az enzim megléte növényekben a mai napig nem bizonyított. Ide sorolható a poliaminok (spermin, spermidin) és a hidroxilamin által generált NO szintézis is.

Az NO-indukálta jelátvitel összetett hálózatot alkot. Egyrészt az NO kelatálni képes a guanilátcikláz (GC) porfirin gyűrűjében lévő vasatomot, így másodlagos hírvivők szintézisének serkentésével, a ciklikus guanozin-monofoszfátok (cGMP) és a ciklikus ADP-ribózon (cADPR) keresztül képes fiziológiai választ generálni (Lamotte és mtsai. 2005). Másrészt a cisztein tartalmú fehérjék S-nitrozilációjával és a tirozin nitrációval enzimaktivitást, ioncsatornák működését, transzkripciós faktorok aktivitását szabályozza, strukturális- és szignál fehérjékben okoz változást. Így az NO poszt-transzlációs módosításokkal meghatározott génexpressziós- és metabolikus

változásokat idéz elő és fiziológiai választ generál (Moreau és mtsai. 2010). Az NO képes megemelni a citoszólikus szabad Ca^{2+} szintet is, így a Ca^{2+} csatornák aktiválása révén a Ca^{2+} -függő protein kinázok (CDPK) és a Ca^{2+} -kalmodulin-függő proteinkinázok (CAM) aktiválásával jelátviteli utakat indít be (Lamotte és mtsai 2005).

Az NO-indukálta folyamatok koncentrációtól függően hozzájárulhatnak a sejtek védelméhez vagy éppen PCD-t indukálhatnak. Az NO antioxidánsként is funkcionálhat és késleltetheti a PCD-t árpa aleuron rétegében GA kezelést követően (Beligni és mtsai. 2002). Az NO az SA-val közösen határozza meg a növények immunitását azáltal, hogy az NO az SA jelátvitelében szereplő NPR1 fehérjét a 156-os ciszteinen és az SA-kötő fehérjét (SABP3) a 280-as ciszteinen keresztül S-nitrozilálja, ami az NPR1 esetén hozzájárul az oligomer forma fennmaradásához (Tada és mtsai. 2008; Spadaro és mtsai. 2010), míg mások szerint az NO donor GSNO kiváltja az NPR1 sejtmagi lokalizációját (Lindermayr és mtsai. 2010). Delledonne és mtsai. (1998) igazolták szerepét patogéntámadást követően a HR-ben, amikor is a sejtekben gyors NO és H_2O_2 produkciót detektáltak. Önmagában azonban a magas NO szint nem okoz sejthalált. Szuperoxid gyökánionnal (a dizmutáz reakcióval versengve) rendkívül káros származékká, peroxinitritté alakulhat, ami a fehérjéket, lipideket, RNS-t és a DNS-t is károsíthatja. A PCD mértékét tehát az NO:szuperoxid gyökánion arány határozhatja meg (Delledonne és mtsai. 2001). Corpas és mtsai. (2004) igazolták azt is, hogy a peroxiszómából származó ROS és NO részt vesz borsó levelek szeneszenciájának indukciójában.

Az NO emellett számos fehérjét képes a cisztein aminosavaikon keresztül S-nitrozilálni és azok funkcióját poszt-transzlációsán módosítani, köztük a fotoszintézisben résztvevő D2 fehérjét, a RUBISCO kis- és nagy alegységét, számos redox folyamatban részvevő enzimet (SOD, KAT, APX) és proteáz inhibitorokat (cisztein- és szerin proteáz inhibitor) (Lindermayr és mtsai. 2005; Kato és mtsai. 2012).

2.2.3. Kalcium

A citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) emelkedése a PCD jelátvitelének fontos komponense, a Ca^{2+} ugyanis másodlagos hírvivőként funkcionál a sejtek jelátviteli hálózatában. A hírvivő funkciót a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ emelkedése teszi lehetővé, ami a sejtorganellumokból (mitokondrium, endoplazmatikus retikulum (ER)), a vakuólum és a sejtfal apoplaztikus kompartmentjéből transzportálódik a citoplazmába. A citoplazmában jelentős mennyiségű Ca^{2+} kötődik a citoszkeletonhoz és a membránfelületekhez. Külső jel hatására a

kalciumcsatornák nyitódnak és a Ca^{2+} beáramlik a citoplazmába, majd a csatornák rögtön záródnak is. A kalciumionokat azután a Ca^{2+} -ATPázok pumpálják vissza az intracelluláris raktárakba vagy az apoplasztba. Ez az átmeneti szabad kalciumion koncentrációemelkedés néhány másodperctől több percig is eltarthat. Az intracelluláris membránokon lokalizálódó csatornák nyitásában és a jel különböző frekvenciájú és amplitúdójú hullámszerű terjedésében a vízdékony inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP_3) játszik szerepet, ami a csatornafehérjéhez való kapcsolódás után az endomembránokon található Ca^{2+} csatornákat nyitja. A kalcium jelátvitel eredményeképpen különböző génexpressziós változások történhetnek, melyek kialakításában a négy kalciumionnal komplexet alkotó kalmodulin (CaM) és az így alkotott komplex által aktivált proteinkinázok vehetnek részt a növényekben specifikus Ca^{2+} -függő protein kinázokkal (CDPK) együtt (Erdei 2004; Harper és mtsai. 2004).

Az oxidatív stressz is Ca^{2+} fluxusváltozást okoz, melyet a H_2O_2 szint további gyors emelkedése követ, ami a PCD-t fokozza (Rentel és Knight 2004). De Jong és mtsai. (2002) a kalciumcsatorna blokkoló LaCl_3 alkalmazásával igazolták a Ca^{2+} esszenciális szerepét a kamptotecin- (CPT) indukálta PCD folyamatában, ahol a sejthalál mértéke 75%-kal csökkent a blokkoló szer használatát követően. Yakimova és mtsai. (2008) szintén sikeresen tudták a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ emelkedésének és a CaM-nak a blokkolásával, EGTA kelátképző és W7 blokkoló szerek használatával a kadmium-indukálta PCD mértékét csökkenteni.

2.2.4. A mitokondriumban és az endoplazmatikus retikulumban (ER) bekövetkező változások

A mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum (ER) központi szerepet játszanak a PCD indukációjában, az ezt indukáló jelek észlelésében és olyan biokémiai folyamatok elindítójaként, amik a sejtek kontrollált pusztulásához vezetnek (Smaili és mtsai. 2003; Scott és Logan 2008).

A különböző PCD-t indukáló hatásokra a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ növekedés sejthalál szignálként változásokat indukál a mitokondriumokban (Smaili és mtsai. 2003). Az AOX fokozott működésének hatására oxidatív robbanás történik, aminek következtében a mitokondriális membránpotenciál összeomlik, az ATP tartalom csökken, a citokróm c kijut a mitokondrium kettős membránja közti térből a citoplazmába (Vianello és mtsai. 2007).

A citokróm c kieresztése a citoplazmába a növényi PCD közös eleme az állati apoptózissal. A citokróm c az állati sejtekben a kaszpáz kaszkádot aktiválja, kiáramolva a mitokondriumból az Apaf-1-gyel, a citoplazmában elhelyezkedő apoptotikus proteáz aktiváló

faktorról és a kaszpáz 9-el együtt az apoptoszóma kialakításában vesz részt, amely az effektor kaszpáz 3-at aktiválja. A citokróm c a terminális oxidáció elektrontranszportjának közvetítője a III és IV komplex között (Jones 2000), és kieresztésének egyik első megfigyelését növényekben Stein és Hansen (1999) tette, amikor kukorica sejtekben leírták ezt a folyamatot a PCD során. Chen és mtsai (2009) rizs gyökerében figyelték meg a citokróm c kiszabadulását a mitokondriumokból, valamint az ezzel együtt járó oxidatív robbanást és a DNS fragmentálódását. A citokróm c kieresztésének magyarázatára többféle elmélet létezik (Jones 2000; Lam és mtsai. 2001; Vianello és mtsai. 2007): Az állati apoptózis analógiájaként a citokróm c kieresztést magyarázzák a permeabilitási tranzíciós pórus (PTP: permeability transition pore) kialakulásával és nyitódásával, amit a magas Ca^{2+} szint és az alacsony ATP szint indukál, a ciklosporin A viszont (CsA) gátol. Ezen elmélet szerint a mitokondrium külső membránján bejutó víz a mitokondriumok duzzadásához vezet, aminek hatására a külső membrán dezintegrálódása után a citokróm c kijut a citoplazmába. Egy másik elmélet szerint a mitokondriumok nem duzzadnak meg, hanem az adenilát transzporter és a feszültség függő anion csatorna (VDAC) kapcsolódásával a mitokondrium membránon kialakuló PT póruson keresztül áramlik ki a citokróm c. A PCD során megfigyelték VDAC expressziójának növekedését is (Swidzinski és mtsai. 2004).

A VDAC szabályzásában a Bcl-2 fehérjecsalád is részt vesz. A PCD-ben betöltött szerepük alapján a fehérjecsaládot két csoportra osztják: proapoptotikus (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_S) és antiapoptotikus (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) tagokra, amelyek közül egyes fehérjék szabályozzák a VDAC-n keresztüli citokróm c kiáramlást a mitokondrium borító membránjai közti térből a citoplazmába (Danon és mtsai. 2000; Kopper és Fésűs 2002; Ishikawa és mtsai. 2011).

Az állati PCD-t szabályozó Bcl-2 fehérjecsalád tagjai közül, a proapoptotikus Bax homológját nem találták meg növényekben. Az állati sejtekben ez a fehérje a mitokondrium külső membránjához kapcsolódik és átjárhatóvá teszi azt a Ca^{2+} ionok számára. Ektopikusan expresszált Bax hatására a mitokondriális membránpotenciál összeomlását, ROS felszabadulást, a mitokondriumok morfológiájának megváltozását megfigyelték transzgénikus növényekben is (Kawai-Yamada és mtsai. 2005). Ezzel szemben a Bax Inhibitor1-nek (BI-1) homológját azonosították például lúdfüben (Watanabe és Lam 2006). A BI-1 egy evolúciósan konzervált, ER lokalizált, hét transzmembrán doménnel rendelkező sejthalál szupresszor, amit indukál a hő- és hidegstressz, patogéntámadás és a H_2O_2 kezelés (Watanabe és Lam 2009). A BI-1 az ER-stressz-indukálta PCD-ben játszhat szerepet, az intracelluláris Ca^{2+} fluxus és a lipidmetabolizmus szabályozásán keresztül (Ishikawa és mtsai. 2011). A H_2O_2 és az SA az

AtBI-1 mRNA akkumulációját okozta, és az AtBI-1 túltermeltetése csökkentette a Bax-indukálta ionkieresztést, valamint a H_2O_2 és SA okozta sejthalál mértékét lúdfű sejtszuszpenzióban (Kawai-Yamada és mtsai. 2004).

2.2.5. MAPK kaszkád

A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) evolúciósan konzerváltak, a növényi szerin/treonin protein kinázok specifikus csoportjába tartoznak. Központi szerepet játszanak a különböző extracelluláris- és intracelluláris jelek, köztük az abiotikus- és biotikus stresszorok és növényi hormonok (ABS, ET, SA, auxinok) szignál hálózatában. A MAPK-ok foszforilációs kaszkádot alkotva, egymás utáni sorrendben, egymást foszforilálva továbbítják a jelet. A jelátvitel a következő sorrendben történik: a MAP kináz kináz kináz (MAPKKK) aktiválja a MAP kináz kinázt (MAPKK), ami foszforilálja, ezáltal aktiválja a MAP kinázt (MAPK). Az aktivált MAPK pedig génexpressziós változásokat indukál a sejtmagban (Zhang és Klessing 2001; Jonak és mtsai. 2002).

A MAPK kaszkád részt vesz a H_2O_2 jel közvetítésében. A lúdfű MAPK-ok közé tartozó MEKK1-et a H_2O_2 és a sóstressz aktiválja, ami kettő MAPKK homológ (MKK1 és MKK2) aktivátora, és ami további MAPK-at aktivál (MPK4 és MPK6) (Teige és mtsai. 2004). A MEKK1 által indukált reakciósor közvetlen hat a WRKY53 transzkripciós faktorra, ami részt vesz az SA jelátvitelében és a szenescencia-indukált PCD-ben (Miao és mtsai. 2007). Egy másik jelátviteli út a lúdfűben az OXI1 szerin/treonin kináz közvetített jelátvitel, amit abiotikus stressz és a H_2O_2 indukál (Rentel és mtsai. 2004). Ennek is része az AtMPK3 és az AtMPK6 aktivációja, így ezek a kinázok is részt vesznek a H_2O_2 szabályozta biotikus- és abiotikus stresszválaszokban (Gechev és Hille 2005). Az oxidatív stressz-aktivált MAP tripla kináz 1 (OMTK1) egy másik specifikus, kizárólag H_2O_2 -indukálta (és nem abiotikus stressz által indukált) kináz, amely aktiválja a MAPK-ok közé tartozó MMK3-at, ami szintén PCD-t eredményez lúdfűben. Az MMK3-at az ET is aktiválhatja (Nakagami és mtsai. 2006). Jammes és mtsai. (2009) bizonyították, hogy az ABS hatására keletkező ROS a MAPK kaszkád elemein (MPK9 és MPK12) keresztül aktiválja az anion csatornákat a sztómákban. Asai és mtsai. (2008) leírták, hogy elicitor hatására keletkező NO produkció a SIPK/NTF4 MAPK-ok jelátvitelén keresztül történik dohányban.

2.2.6. Az ionhomeosztázis megváltozása, kálium kieresztés

Az ionok közül a Ca^{2+} mellett a káliumnak (K^+) van kitüntetett szerepe a PCD előidézésében, mivel olyan fiziológiai folyamatokban vesz részt, mint az egyes enzimek működésének szabályozása, a fotoszintézis, az ozmoreguláció és a sztóma működés (Marschner 2012). A K^+ túlzott mértékű kieresztése a citoplazmából a sejtekben a K^+ hiányából adódó működési zavart idéz elő. Ez aktiválhatja a cisztein proteázokat, amik a PCD végrehajtói a növényekben is (Shabala 2009). Hughes és Cidlowski (1999) kimutatta, hogy az intracelluláris K^+ veszteség az emlős sejtekben aktiválja az iniciátor kaspázokat és a nukleázokat az apoptózis során.

A K^+ fontosságát támasztja alá az is, hogy a PCD-vel szemben a sikeres akklimatizáció feltétele, hogy a sejtek megőrizték az optimális K^+/Na^+ arányukat például a sóstressz alatt (Maathuis és Amtman 1999). Stresszhatásokra a keletkező ROS képes aktiválni a plazmamembránban lokalizált H^+ -ATPázokat, amelyek részt vesznek az optimális Na^+/K^+ arány megőrzésében a Na^+/H^+ antiporterek aktiválásával, ezzel egyidejűleg az apoplast pH-jának csökkentésével (Zhang és mtsai. 2004; Joseph és Jini 2010). A stressz esetén megemelkedett ROS produkció emellett azonban reakcióba lép a telítetlen zsírsavakkal, és membránt alkotó lipidek peroxidációját, az ionok kieresztését, köztük a K^+ kieresztését eredményezheti a citoplazmából (Ahmad és mtsai. 2008).

2.2.7. Proteázok és a vakuólum

Az állati sejtekkel ellentétben, ahol a kaspázok proteolitikus kaszkád rendszert alkotva a sejthalált iniciálják vagy végrehajtják, a növényi sejtekben hasonló kaszkád rendszert nem találtak (Sanmartín és mtsai. 2005; Vartapetian és mtsai. 2011), azonban számos tanulmány szerint, hasonlóságok fedezhetők fel a növényi PCD és a kaspázok által szabályozott állati apoptózis között (De Jong és mtsai. 2000). Ebben a folyamatban lehet szerepük a növényi proteázoknak, kiemelten a cisztein proteázoknak, melyek közül egyesek lehetséges homológjai az állati kaspázoknak (Hoeberichts és mtsai. 2003; Woltering 2004; Roberts és mtsai. 2012).

Trobacher és mtsai. (2006) három alcsaládját különbözteti meg a növényi cisztein proteázoknak: C1A alcsalád a papain-szerű cisztein proteázok, C13 alcsalád a legumainok, C14 alcsalád a kaspázok és metakaspázok. Az első alcsaládot a C1A-t, a papain-szerű cisztein proteázok alcsaládját 32 valós és feltételezett cisztein proteáz alkotja lúdfüben. Az érett enzim monomer, melyet 210-260 aminosavból (AS) áll. „Katalitikus triádja”: Cys25, His159, Asn175; savas pH-n aktív, és az enzim ER lokalizált (Trobacher és mtsai. 2006). A papain-szerű cisztein

proteázok nagyon fontos szerepet töltenek be a növény-patogén kapcsolatban. Ilyen például a paradicsom Rcr3 (Required for Cladosporium resistance-3) és a Pip1 (Phytophthora inhibited protease-1), ami patogéntámadás esetén termelődik és gátolja a patogénektől származó proteázgátlókat és a cisztatin képzést (Shindo és Van der Hoorn 2008).

A második csoportot a C13, a legumainok alcsaládját Asp-specifikus, vakuoláris enzimek alkotják. Ide tartoznak az ún. vakuoláris processzáló enzimek (VPE), melyekből lúdfüben négy (α , β , γ , δ) található. Ezek „kaspáz-szerű” aktivitással rendelkeznek (Trobacher és mtsai. 2006). A VPE-nek kaspáz 1 és 8 aktivitása van, azonban működése nem homológ az állattal; szubsztrátja a cisztein proteáz gátló cisztatin (Woltering 2010). A VPE-k a vakuólumban lokalizáltak, savas pH-n autokatalitikusan aktiválódnak és működésükkel a tonoplaszt szétesését, a vakuólum savas tartalmának kieresztését idézik elő. Szerepük azért is fontos, mert a növényekben nincsenek makrofágok, így a lítikus rendszer szabályozása révén esszenciális szereppel bírnak a fertőzések és az egyedfejlődés során a sejthalál kiváltásában (Hara-Nishimura és mtsai. 2005; Sanmartin és mtsai. 2005). Hara-Nishimura és Hatsugai (2011) a vakuólum-szabályozta sejthalál két útját, a „nem destruktív” és „destruktív” utat különböztetik meg. A „nem destruktív út” során a tonoplaszt egyesül a PM-mel és a hidrolitikus enzimek a sejten kívülre kerülnek. A „destruktív út” során a tonoplaszt membránja felszakad és a hidrolitikus enzimek felemésztik a sejttartalmat. A VPE-k szerepét leírták többek között dohány mozaik vírus és mikotoxin által indukált növényi PCD-ben, valamint a HR-ban és a növényi embriogenezis egyes szakaszában, pl. az integumentum sejtek PCD-jében (Hatsugai és mtsai. 2004; Kuroyanagi és mtsai. 2005).

A harmadik, a C14-es cisztein proteáz csoportot a metakaspázok alcsaládját két metakaspáz csoport, a metakaspáz I és II kilenc tagjával lúdfüben. A metakaspázoknak (MC) más a szubsztrátspecifitása mint a humán kaspázoknak; Arg/Lys specifikusak. Az MC I citoszólikus, az MC II a mitokondriumban és kloroplasztiszban lokalizálódik (Trobacher és mtsai. 2006). Az I-es típusú MC N terminális doménja (80-120 AS) prolinban- (AtMC1 és AtMC2) vagy glutaminban gazdag (AtMC3) ismétlődő motívumokat és cink-ujj motívumokat tartalmaz. A II-es típusú MC-oknál nincs ilyen hosszú prodomén (Tsiatsiani és mtsai. 2011). Coll és mtsai. (2010) bebizonyították, hogy az I-es típusú MC-ok (AtMC1) pozitív regulátorai a sejthalálnak a HR során. Az AtMC8 az UV- és a H₂O₂-indukálta PCD-ben játszik szerepet, a gén kiütésekor ugyanis a sejthalál mértéke csökkent protoplasztokban (He és mtsai. 2008). A II-es típusú MC-ok hasítják az állati effektor kaspáz 3 szubsztrátját (Woltering 2010).

Az NO szerepet játszik a proteázok poszt-transzlációs módosításában. A katalitikus ciszteinek S-nitrozilációja blokkolja az AtMC9 zimogén formájának aktivációját (Belenghi és

mtsai. 2007). A paradicsom *LeMCA1* gén expresszióját a *Botrytis cinerea* fertőzés növelte, a CPT és a fumonisin B1 nem változtatta meg. Ezzel szemben a génexpressziót az ET kismértékben növelte, az SA kismértékben csökkentette paradicsom sejtszuspenzióban (Hoeberichts és mtsai. 2003). Az ET szabályozza a cisztein proteázok génexpresszióját petúnia szíromlevélben is; a szeneszencia alatt kilenc gén expressziója növekedett, az ET érzéketlen receptor mutánsban a cisztein proteáz gének pedig később íródtak át (Jones és mtsai. 2005).

A növényi cisztein proteázok fiziológiai hatásait többnyire exogén proteázgátlókkal tanulmányozzák (pl. *transz*-epoxiszukcinil-L-leucilamido(4-guanidino)bután (E64)) (Woltering 2010), azonban működésüket endogén gátlók is szabályozzák. Ilyen a cisztatin, ami a cisztein proteázokkal együtt kölcsönhatva egyfajta szabályozó szerepet tölthet be a növényi PCD-ben (Yamada és mtsai. 2001; Benchabane és mtsai. 2010; Singh és mtsai. 2011).

Bár egyes cisztein proteázok expressziójának változását vizsgálták egyes konkrét stresszhatások esetén, a cisztein proteáz alcsaládok tagjainak összehasonlító vizsgálata az antiapoptotikus génekkel egyidejűleg abiotikus és biotikus stresszhatásokban szereplő folyamatokkal is összevetve ez idáig nem történt meg.

2.2.8. A sejtmagban történő változások: a DNS feldarabolódása

A PCD utolsó lépéseként figyelték meg a kromatin kondenzálódását és a DNS feldarabolódását a növényekben is (Lam 2004), többek között kamptotecin (CPT) kezelés hatására dohányban (Danon és mtsai. 2000), kadmium kezelést követően répában (Behboodi és Samadi 2004), sóstresszt követően lúdfűben (Huh és mtsai 2002), hipoxiát követően kukoricában (Gunawardena és mtsai. 2001) és UV-B kezelés hatására lúdfűben (Danon és Gallois 1998).

Balk és mtsai. (2003) kimutatták a DNS feldarabolódás és a mitokondriumokból kieresztődő citokróm c közötti pozitív kapcsolatot, ugyanis a citokróm c növelte az endonukleázok aktivitását. A DNS feldarabolódásáért felelős nukleázok működését a poliaminok is befolyásolhatják. Papadakis és Roubelakis-Angelakis (2005) külső putreszcin (Put) alkalmazásával kimutatta, hogy a kezelés csökkentette a PCD mértékét dohányban, azáltal, hogy a Put csökkentette a sejtek DNáz aktivitását és gátolta a DNS fragmentálódását.

2.3. A sóstressz-indukálta sejthalál növényekben

A mezőgazdasági termelés egyik limitáló tényezője a sóstressz, azaz a talajban és/vagy az öntözővízben felhalmozódott magas sótartalom, ami meghaladja a növények számára optimális értéket (Taiz és Zeiger 2006). A magas sókoncentrációtól származó sóstressz a mezőgazdasági termelés alatt álló területek legalább egyharmadát érinti, a Föld felszínének 7%-ára, azaz kb. 930 millió hektárra terjed ki (Munns 2002). A sóstressz hatásának Európában és a világban különösen a tengerparti és a tengerbe ömlő folyók torkolatánál élő/termesztett növények vannak kitéve (Pitman és Lauchli 2002). Beljebb a szárazföldre az üledékrétegeken keresztül szivároghat be a sós víz, ahol az evaporáció és transzspiráció miatt is megnőhet a talaj sókoncentrációja, és lehet ez másodlagos következménye a szárazságnak is. Magyarországon elsősorban a Duna-Tisza közti Homokhátságon és a Tiszántúlon (Hortobágy, Nagykunság, Körösvidék) találhatóak szikes területek (Németh 2005), azaz az Alföld jelentős részén, ahol Magyarország élelmiszertermelésének jelentős része történik.

A talaj sóösszetétele alapján megkülönböztethetjük az ún. szalinitást, ami az összes ásványisó szupraoptimális koncentrációját jelenti, ill. a szodicitást, ami Na^+ többletet fejezi ki (Taiz és Zeiger 2006). A dolgozatban a sóstressz alatt a növényekben az optimális Na^+ koncentráció feletti, azaz a Na^+ többlet okozta hatásokat értjük.

A szupraoptimális Na^+ ion tartalom egyik közvetlen hatásának eredményeként a gyökércsúcsok merisztematikus régiójában a sejtek elhalnak, amely a növények halálához is vezethet. Ezt a jelenséget figyelték meg lúdfű növények gyökércsúcsában (Huh és mtsai. 2002), kallusz sejtekben (Sun és mtsai. 2010) valamint dohány és paradicsom protoplasztokban is (Lin és mtsai. 2006; Gémes és mtsai. 2011).

A növényeket sótoleranciájuk alapján a következő csoportokba sorolhatjuk (Taiz és Zeiger 2006): 1. Halofiták, azaz sókedvelő növények, amik képesek a 250-500 mM NaCl koncentrációt is tolerálni (pl. *Suaeda maritima*), és magas sókoncentráción növekedési optimumot mutatnak (Flowers és Flowers 2005). 2. Sótoleráns növények, amelyek tolerálják a magas sókoncentrációkat, és amelyeknek ez a növekedését már gátolja (pl. *Beta vulgaris*). 3. Olyan halofiták és nem halofiták, amelyeknek nincs sómirigye. Bizonyos mértékű sótoleranciával rendelkeznek, de a magas NaCl koncentráció a növekedésüket gátolja (pl. *Solanum lycopersicum*). 4. Glikofiták, azaz sószenzitív növények, amik számára a 80 mM-nál magasabb NaCl koncentráció letális (pl. gyümölcsfák, citrusfélék).

Az optimálisnál magasabb sókoncentráció káros hatással lehet a növények életfunkcióira, növekedésére, fejlődésére és legvégül a növényi sejtek programozott elhalását okozza. A sóstressz hatása hármas: ionikus-, ozmotikus- és oxidatív stresszt generál (Zhu 2002; Munns és Tester 2008; Shabala 2009; Joseph és Jini 2010).

A sóstressz felborítja a sejtek ionhomeosztázisát (Zhu 2003). A Na^+ ion felhalmozódik a növényi sejtek citoplazmájában, ami toxikus hatású, mivel a fehérjék dehidratálódnak és elvesztik natív konformációjukat (Shabala 2009). Kontroll körülmények között a citoszol kevesebb, mint 100 mM K^+ és 20 mM Na^+ iont tartalmaz, ami megfelelő ionikus környezetet biztosít az enzimek optimális működéséhez (Speer és Kaiser 1991). Az ettől eltérő abnormális Na^+/K^+ arány inaktiválja az enzimeket és gátolja a fehérjeszintézist. Ha a Na^+ ion a nem-szelektív kation csatornán (NSCC) keresztül bejut a citoplazmába, depolarizálja a membránt és a depolarizáció-aktivált kifelé rektifikáló K^+ csatornát (KOR) aktiválja. Emellett a citoplazmában megemelkedik a másodlagos hírvivőként funkcionáló Ca^{2+} koncentráció, fokozódik a NADPH-oxidáz működése, nő a ROS produkció és aktiválódik az NSCC. A K^+ efflux következtében csökken a citoszolikus K^+ tartalom, ami indukálja a proteázokat, és végül a sejt elhal (Shabala 2009). A poliaminok képesek megakadályozni a K^+ effluxot, blokkolva az NSCC-t, így meggátolják a PCD-t (Shabala és mtsai. 2007). Sóstressz hatására nemcsak a K^+ , hanem a levelek Mg^{2+} tartalma is csökkent, amely ion a klorofill molekulák porfirin vázának központi fém atomja és ezért a fotoszintézishez nélkülözhetetlen (Martínez-Ballesta és mtsai. 2004). Emellett degradálódhat a levelek klorofill és karotinoid tartalma is (Juan és mtsai. 2005). A sóstressz következménye ezen túlmenően a fehérjetartalom csökkenése is, melyben különböző proteázok játszanak szerepet (Parida és mtsai. 2004; Parida és Das 2005). A sóstressz elleni védekezés egyik első lépése a citoplazma ionegyensúlyának helyreállítása, az optimális Na^+/K^+ arány megőrzése (Maathuis és Amtmann 1999). A NADPH-oxidáz működése közben keletkezett ROS képes aktiválni a plazmamembrán lokalizált H^+ -ATPáz, ami közreműködhet az optimális Na^+/K^+ arány megőrzésében, azáltal, hogy fokozza a Na^+/H^+ antiporterek aktivitását. Ezzel egyidejűleg az apoplast pH értéke csökken (Zhang és mtsai. 2007; Joseph és Jini 2010).

A megnövekedett külső sókoncentráció másik hatása az ozmotikus stressz (Munns és taster 2008). Az ozmotikus stressz kivédése során a szerves ozmotikumok koncentrációja megnő a növényekben, majd aktiválódnak és akkumulálódnak az ún. kompatibilis ozmotikumok, mint például a cukrok, cukoralkoholok (mannitol, szorbitol), aminosavak (prolin) és szerves savak is (Rhodes és mtsai 2002; Zhao és mtsai. 2009). Ezen ozmotikumok akkumulációja egyes sejtstruktúrákhoz köthető, így például a szorbitolról kimutatták, hogy egyes növények kloroplasztiszainak sztrómájában koncentrálódik, és fejti ki antioxidáns hatását (Nawodnik és Lohaus 2008). A fotoszintézis termékei a szénhidrátok, így a hexózok és a szacharóz akkumulációja sóstressz alatt szintén adaptív válaszreakció, és a termesztett paradicsom növényeknél a sótolerancia egyik mutatója (Juan és mtsai. 2005). A cukrok

akkumulációjának egyik oka lehet a szintézisük fokozódásán kívül a lebontó folyamatok gátlódása is. Ozmotikus stressz hatására sok növényben megemelkedik a szacharóz, a glükóz és a fruktóz koncentrációja, amiben a hexokináz és fruktokináz aktivitásának csökkenése játszik szerepet, így kialakítva az ozmotikus adaptációt (Ghasempour és mtsai. 1998; Weise és mtsai. 1999). Emellett, ha a növények gyökereinek felszívási zónájában magas a talaj (víz) sótartalma, akkor alacsonyabb (sokkal negatívabb) az ozmotikus potenciál, ami csökkenti a vízpotenciált. A növények esszenciális vízháztartási egyensúlyának felborulása a gyökér hidraulikus konduktanciáját és a levél felé történő xilémtranszportot is felborítja. Az alacsony vízpotenciál okozta alacsony turgor miatt a sejtmegnyúlás gátlódik és a növények növekedése redukálódik (Taiz és Zeiger 2006). Ehhez hidraulikusan kapcsolódva a sztómák záródása miatt a fotoszintézis hatékonysága és a széndioxid asszimiláció, így a biomaszaprodukció is csökken, a növény kisebb lesz (Garcia-Sanchez és mtsai. 2002). Amennyiben a NaCl bejut a plasztiszba, közvetlenül is gátolhatja a fotoszintézist a Calvin-ciklus enzimeinek gátlásával (Lovelock és Ball 2002).

A sóstressz harmadik hatása az oxidatív stressz, ami fokozott ROS produkciót okoz (Miller és mtsai. 2010). Ezek a korábban felsorolt sejtkompartmentumokban egymásba is átalakulva a sejtmembránok degradációjához, a metabolikus folyamatok leállításához és végül a sejtek programozott elhalásához vezethetnek. A sóstressz erőteljes ROS produkcióemelkedést indukál (Sun és mtsai. 2010; Wang és mtsai. 2010a), ami a sejtuszupressziós kultúra és a kallusz sejtek növekedését is gátolja (Gangopadhyay és mtsai. 1997; Zhang és mtsai. 2004). Wang és mtsai. (2009) kimutatták, hogy a sóstressz NO akkumulációt és ET emissziót okoz, ami szerepet játszik az ionhomeosztázis kialakításában lúdfű kalluszban. Az NO fontos szerepet játszhat azonban a sejtek védelmében is azáltal, hogy szabályozza a toxikus ROS szinteket és részt vesz a sóstressz tolerancia kialakításában (Siddiqui és mtsai. 2011). A sóstressz hatására megnövekedett ROS produkció nemcsak közvetlen járulhat hozzá a sejtek halálához (Bi és mtsai. 2009), hanem más jelátviteli utakat (MAPK kaskád) és hormonokat aktiválva (ET, SA, ABS) (Xu és mtsai. 2008; Molina és mtsai. 2002). Az ET szerepét bizonyította a NaCl-indukálta szenescenciában az ET bioszintézisben résztvevő 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) szintáz és ACC oxidáz gének antiszensz szupressziója dohányban, aminek következtében nőtt a növények sótoleranciája (Wi és Park 2002). Ghanem és mtsai. (2008) bizonyították azt is, hogy az ET bioszintézis prekursora, az ACC sóstressz alatt fokozza a szenescenciát azáltal, hogy oxidatív stresszt generál, csökkenti a fotoszintetikus hatékonyságot (Fv/Fm) és növeli a Na⁺ bejutását a sejtekbe.

Affenzeller és mtsai. (2009) bebizonyították, hogy a PCD-t indukáló sókoncentráció hatására már akár egy órán belül feldarabolódhat a DNS. Ez azonban a sóstressz ionikus hatásának a következménye és nem az ozmotikusé, ugyanis a szorbitollal indukált sejthalál esetén nem mutatták ki a PCD egyik fő jellegzetességét, a DNS létrát. Wang és mtsai. (2010b) azonban bebizonyították azt, hogy a sejtek halálakor a DNS fragmentálódásának kialakulása függ az alkalmazott sókoncentrációtól is.

A sóstressz okozta stresszhatások egyik lehetséges kivédését gazdasági növényeink SA-val történő előkezelése jelentheti (Szepesi 2009; Gémes 2011).

Noha számos tanulmány írja le a sóstressz okozta ROS- és NO homeosztázisának megváltozását a sejtekben (Sun és mtsai. 2010; Wang és mtsai. 2009; Corpas és mtsai. 2011), mégis a növényekben az idő függvényében történő változásokról a PCD indukciója során nagyon keveset tudunk. A folyamatban jól ismert külön-külön az ET, a ROS és az NO szerepe. Nem ismert azonban ezek aránya, valamint a PCD indukciójában és végrehajtásában szerepet játszó, cisztein proteázok expressziójának változása a sóstresszt követően.

2.4. Az etilén hatásai és szerepe a növényi PCD-ben

Az etilén (ET) gáz halmazállapotú növényi hormon, amely számtalan folyamat szabályozásában részt vesz a növények életciklusa során, a csírázástól, a növekedésen és a termésérésen át a stresszválaszig és a szenescenciáig (Bleecker és Kende 2000; Trobacher 2009).

Az ET bioszintézis (Yang ciklus) prekursora a metionin, ami átalakul S-adenozilmetioninná (SAM) a SAM szintáz katalitikus aktivitásának következtében. A SAM átalakul 1-aminociklopropán-1-karbonsavvá (ACC) és 5-metiltioadenozinná (MTA) az ACC szintáz működésének hatására, ami az ET szintézis limitáló lépése. Az ACC szintáz gátlószere az aminoetoxivinilglicin (AVG) (De Jong és mtsai. 2002). Az ACC oxidáz működésének eredményeképpen alakul át az ACC ET-né, széndioxidá, miközben sztöchiometrikus mennyiségben hidrogén-cianid is keletkezik. Az ACC oxidáz gátlószere a CoCl_2 (Argueso és mtsai. 2007). Az SA képes gátolni az ET szintézist azáltal, hogy gátolja az ACC oxidáz működését, az ACC átalakulását ET-né (Leslie és Romani 1986).

Az ET receptorok (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, ERS2) a lúdfüben az ER-en lokalizáltak. Maga a receptor dimerizálódott protein, Cu (I) iont tartalmaz (RAN1 transzporter), és hasonló a bakteriális kétkomponensű hisztidin kinázokhoz. A paradicsom *NEVER RIPE* (NR) génje a

lúdfű ETR1-gyel homológ, ami jelfogó domén nélküli ET receptort kódol. Az ET kötése után a receptor deaktiválódik, aminek a hatására az ETR1-gyel kapcsolatban lévő CTR1 Ser/Thre kináz, az ET jelátvitel negatív regulátora inaktiválódik és az ET-indukált génexpresszió megindul. A jelátvitel további elemei az EIN2 és a jelátviteli lépésben az őt követő EIN3 fehérjék, amik pozitív regulátorok. Az EIN3 transzkripciós faktor dimer formája kötődik az ET válaszgén *ERF1* gén promóteréhez (Klee 2004; Li és Guo 2007). Az ET percepció gátolható ezüst ionokkal (AgNO_3 vagy ezüst-tioszulfát (STS) formájában), mely képes blokkolni az ET receptort (Kumar és mtsai. 2009).

A PCD és különösen a szenescencia indukálásában a növényi hormonok közül az ET szerepe a legfontosabb (Lam 2004; Love és mtsai. 2008). Az ET egyik legjelentősebb szerepe a lizogén vagy schizogén aerenchyma kialakításában van, amikor is a sejtek elhalnak ársztásos stressz során, hipoxiás környezetben. Ez teszi lehetővé, hogy az oxigén a gyökércsúcs sejtjeihez lizogén járatokon keresztül el tudjon diffundálni. Hipoxia esetén az aerenchyma kialakulása során nő az ACC szintáz és ACC oxidáz aktivitása (He és mtsai. 1996). Exogén ET kezelés képes aerenchyma képződést indukálni normál körülmények között is (Drew és mtsai. 2000). Gunawardena és mtsai. (2001) a DNS internukleoszómális töréseit detektáló TUNEL-pozitív sejteket figyeltek meg az aerenchyma képződése során hipoxiás kukorica gyökerében, ami függött az ET produkció mértékétől.

Az ET fontos szerepet játszik az ózon-indukált PCD kialakulásában is (Overmyer és mtsai. 2003), amely folyamatban az SA is akkumulálódik (Rao és mtsai. 2002). Az ózon-indukálta ACC szintáz aktivitás növekedése ROS produkciót és a léziók kialakulását okozza (Overmyer és mtsai. 2003). A CPT- és a kadmium-indukálta PCD során szintén megemelkedik az ET produkció és ezzel párhuzamosan a H_2O_2 akkumuláció paradicsom sejtszuspenzióban (De Jong és mtsai. 2002; Yakimova és mtsai. 2006). Az ET hatására a megnövekedett ROS produkció mellett a citoplazmatikus szabad Ca^{2+} szint is nő, ami másodlagos hírvivőként indukálhatja a PCD-t (Trobacher 2009). Sóstressznek kitett lúdfű kalluszban azt találták, hogy a H_2O_2 stimulálja az ET emissziót és az ACC növeli a H_2O_2 produkciót (Wang és mtsai. 2010a), ami arra utal, hogy az ET és a H_2O_2 egymást erősítő jelmolekulák (Wi és mtsai. 2010). De Jong és mtsai. (2002) azt is bizonyították, hogy az STS gátolja az ET jelátvitelt és az ET indukálta H_2O_2 produkciót, és megállapították, hogy ez bizonyítja az ET szerepét a sejthalál indukációjában a CPT kezelést követően.

Ózon hatására azonban nemcsak az ET-indukálta ROS produkció emelkedik meg, hanem az NO szint is (Ederli és mtsai. 2006). Wang és mtsai. (2009) korai NO akkumulációt és ET emissziót figyeltek meg sóstressz alatt. Amíg az NO generátor nátrium-nitroprusszid (SNP)

nagyban stimulálta az ET emissziót lúdfű kalluszban, addig az ACC nem fokozta az NO produkciót. Ahlfors és mtsai. (2009) szintén azt találták, hogy az SNP aktiválja az ET bioszintézist már egy óras kezelést követően lúdfűben.

Az ET és a JA olyan autofágikus PCD-t idéznek elő, mint például a levelek öregedése (Love és mtsai. 2008), általában serkentik a szervek szenescenciáját és a nekrotróf patogének által indukált PCD-t szabályozzák (Quirino és mtsai. 2000; Byczkowsky és mtsai. 2012). A példák közé sorolható a kukorica keményítő endospermiumának feltöltődése utáni, az ET hatására bekövetkező másik különleges sejthalál típus is a szem érése alatt. A keményítő endospermiumban ez a sejttartalom lebomlás nélküli mumifikálódásával jár (Gallie és Young 2004). Az ET (és bizonyos esetekben a GA) szabályozta PCD-re antagonist, szövettípustól függő hatással lehet azonban az ABS és a citokininnek, ami az aleuron sejtrétegben jól ismert (Trobeacher 2009). Az ET szerepét a levelek szenescenciájában az bizonyította, hogy lúdfű ET receptor (*etr1-1*) mutánsban, ami inszenzitív az ET-re, késett a levelek szenescenciája (Gribic és Bleecker 1995). Kimutatták azt is, hogy az ET-indukált szenescencia során olyan cisztein proteáz gének expressziója is megnő, mint a *SAG2* és *SAG12* (Gribic 2003). A *SENU2* (*SICYP1*) és *SENU3* cisztein proteázt kódoló gének expressziója késik a szenescencia során ET hiányában paradicsomban (Drake és mtsai. 1996). Lúdfű *ore9* mutánsában is lassul a szenescencia folyamata, mert hibás az ET jelátvitel (Kuriyama és mtsai. 2002). Hasonló szenescenciát késleltető hatást kaptak ET inszenzitív dohány növényekben is, igazolva az ET szerepét a szenescencia indukciójában (Yang és mtsai. 2008).

Az ET szenescenciában betöltött szerepe jól feltárt (Lam 2004; Love és mtsai. 2008), azonban kevésbé ismert az ET illetve az ET-indukált jelátvitel hatása a ROS és az NO akkumulációjára ugyanazon rendszerben, azok arányára az idő függvényében a só- illetve az SA kezelést követően.

2.5. A szalicilsav hatásai és szerepe a növényi PCD-ben

A szalicilsav (SA) a növényi fenolvegyületek közé tartozó benzoésav származék, amelyet a növények rhizoszférájában élő mikroorganizmusok is képesek szintetizálni. A kukorica vagy a bab rhizoszférájában a talaj SA tartalma 100 µg-nál magasabb értéket is elérhet 100 g száraz talajra vonatkoztatva. Az SA általában azonban nem a környezetből kerül a növényekbe, hanem magukban a növényi szövetekben szintetizálódik. Ez azonban a fajok között eltérő mértékű lehet, akár egy családon belül is jelentős lehet a különbség kontroll körülmények között.

Például a *Solanaceae* családba tartozó dohány kontroll körülmények között kevesebb, mint $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ FT SA-vat tartalmaz, addig az ugyanebbe a családba tartozó burgonya több mint $10 \mu\text{g g}^{-1}$ FT SA-t. Árpában, szójában az SA szint körülbelül $1 \mu\text{g g}^{-1}$ FT, a modellnövénynek számító lúdfűben $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ FT (Raskin 1992, Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia 2011). Paradicsom gyökerében $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ FT az SA koncentrációja, ami a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* fertőzést követően akár tízszeresére is emelkedhet (Mandal és mtsai. 2009) (Ez az érték körülbelül megfelel a 10^{-4} M-os SA kezelőoldatnak). Dohányban viszont a dohány mozaik vírus (TMV) hatására akár ötvenszeresére is emelkedhet az endogén SA szint (Enyedi és mtsai. 1992).

Az SA bioszintézise kétféleképpen történhet: a fahéjsav dekarboxilációját követően benzoésav keletkezésével, ami C-2 pozícióban hidroxilálódik vagy a fahéjsav hidroxilálódik kumársavvá, ami később Co-A-hoz kötődve dekarboxilálódik SA-vá (Hayat és mtsai. 2010).

Az SA csak kis mennyiségben található szabad formában a citoplazmában. Legnagyobb része a hidroxilcsoporton, kisebb mennyiségben a karboxilcsoporton keresztül glükózzal konjugátumot képezhet, amit az SA glükoziltranszferázok katalizálnak. Az SA-glükóz konjugátumok a citoszólból a vakuólumba transzportálódnak az ABC transzporterekén keresztül, ahol inaktívan raktározódhatnak, és ahonnan szabad SA-ként felszabadulhatnak (Dean és Mills 2004). Az SA metil-szaliciláttá (MeSA) is alakulhat, ami transzlokálódhat és átalakulhat aktív SA-vá, de légneművé is válhat (volatilizáció) és a fertőzéstől távolabbi szervekben az SAR kialakításában játszhat szerepet. Az SA átalakulását MeSA-vá az SA karboxil-metiltranszferáz 1 (SAMT1) végzi, az SA kötő protein 2 (SABP2) észteráz aktivitása alakítja át a MeSA-t SA-vá (Park és mtsai. 2007).

Az SA élettani hatásai az irodalom alapján sokszor ellentmondásosak és az ismeretek még hiányosak. Ennek egyik oka lehet, hogy alapesetben is az egyes növények SA tartalma jelentősen eltér. Emellett a hormon hatása függ többek között az alkalmazott koncentrációtól, a kezelés időtartamától, a kezelt szerv fejlődési stádiumától. Általában megállapítható, hogy az alkalmazott magas koncentrációjú SA kezelések gátolják a csírázást, növekedést, fotoszintetikus aktivitást, addig az alacsony koncentrációjú SA kezelések serkentik azokat (Kranterev és mtsai. 2008; Vlot és mtsai. 2009; Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia 2011; Janda és mtsai. 2012; Sahu 2013).

Az SA-nak fontos szerepe van a HR és a SAR kialakításában. Az utóbbi időben bebizonyították azt, hogy az SA a kromatin átrendeződésével, hiszton módosításokkal alakítja ki a SAR-t a növényekben, melynek van egy korai (első hat óra) és egy késői (6-24 óra) szakasza az SA akkumulációt követően (Van den Burg és Takken 2009; Jaskiewicz és mtsai.

2011). A nem kompatibilis gazda-kórokozó kapcsolatban, a biotróf kórokozó elleni védekezés részeként az SA a HR során a sejtekben oxidatív robbanást okoz, és a PM-NADPH oxidáz aktiválásával ROS-t generál a fertőzés helyén és a Ca^{2+} jelátviteli kaszkádot is aktiválja (Chen és mtsai. 2001; Kawano és mtsai. 2004; Bastianelli és mtsai. 2010). Az SA továbbá már nagyon kis koncentrációban is gátolja a peroxiszmában található katalázt (KAT), a H_2O_2 -ot bontó enzim KAT1 és KAT2 izoenzimeit. A KAT gátlása miatt megemelkedik a H_2O_2 koncentrációja és oxidatív stressz indukálódik, ami a biotikus stresszfolyamatokban a HR-hoz vezethet (Horváth és mtsai. 2002). Emellett az SA serkenti a H_2O_2 -ot létrehozó szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimet is, ami a H_2O_2 produkciót tovább fokozza. A növekvő H_2O_2 pedig az SA szintézisét fokozza, így alkot az SA és H_2O_2 egy egymást amplifikáló „feedback” hurkot (Rao és mtsai. 1997).

Kimutatták azt is, hogy az SA bizonyos koncentrációban indukálja az NO szintézisét is lúdfüben, amely szintén a programozott sejthalál kialakulásához vezethet (Zottini és mtsai. 2007). Garcia-Heredia és mtsai. (2008) ugyan leírták az SA-indukálta PCD-t és a ROS szerepét a folyamatban sejtszuspenzióban, de nem írnak az NO koncentrációjának változásáról az idő függvényében.

Krinke és mtsai. (2009) kimutatták lúdfü sejtszuspenzióban, hogy az SA jelátvitelében részt vesz a foszfolipáz D (PLD) is, ami már az SA kezelést követően 45 perccel indukálódott. Az SA jelátvitele több helyen redox szabályzás alatt áll. Az NPR1 (Non expressor of PR1) fehérje a fő szabályzó az SA-indukálta védelmi gének aktiválásában. Az NPR1 jelátviteli mediátor fehérje a citoplazmában található, alap állapotban oligomer formában, amit diszulfid hidak stabilizálnak. Az SA hatására a sejt redox állapota megváltozik, az NPR1 aktív monomerré válik a diszulfid hidak redukálása miatt (melyben a 82-es és 216-os cisztein kitüntetett szereppel bír), és sejtmagba transzlokálódva aktiválja a TGA1 és TGA4 transzkripciós faktort, aminek hatására átíródnak a patogenezissel kapcsolt (PR) gének (Fober és Despres 2005). Az NO az NPR1 fehérjét a 156-os ciszteinen és SABP3 fehérjét a 280-as ciszteinen keresztül képes S-nitrozilálni és inaktívvá tenni (Tada és mtsai. 2008), az S-nitrozilációt azonban az SA hatására redukálódó tioredoxin megszünteti (Lindermayr és mtsai. 2010). Gust és Nürnberger (2012) tanulmányukban leírják, hogy a patogén effektorok által indukált immunitás során az SA szinteket koncentrációtól függően érzékeli az NPR3 receptor, ami kis affinitású, nagy SA koncentrációkra érzékeny fehérje, és ami az SA kötődése után az NPR1-et az E3 ubiquitin ligázhoz kapcsolja. Ubiquitinálódás után az NPR1 lebomlik, hiányában nem expresszálódnak a PR gének, ami indukálja a PCD-t. Az NPR4 nagy affinitású, kis SA koncentrációnál működő receptor, ami az NPR1 degradációját gátolja és SAR

kialakulását fokozza. Wu és mtsai. (2012) az utóbbi időben azonban azt fedezték fel, hogy maga az NPR1 fehérje az SA receptora. Az SA ugyanis az NPR1-hez a 521/529-es ciszteinen egy átmeneti fémen, Cu^{2+} ionon keresztül képes kötődni és konformáció változást okozni.

Emellett a MAPK kaszkád is fontos szabályozója az SA jelátvitelének (Bartels és mtsai. 2009): A lúdfű foszfortirozin specifikus fosztafáz 1 enzime (PTP1) képes defoszforilálni és deaktiválni a MAPK-ok közé tartozó MPK6-ot *in vitro*. A MAP kináz foszfatáz1 (MKP1), ami kalmodulin kötőhelyet tartalmaz és a sebzési válasz negatív regulátora, szintén szabályozza az MPK6-ot. Az MPK6, a dohány szalicilsav-indukált protein kináz (SIPK) ortológja és az abiotikus stresszválasz eleme. Emellett az MPK3/MPK6 fontos csomópontja, pozitív regulátora az SA-indukálta védelmi válaszoknak és a PR gének expressziójának, míg a MPK4 gátolja azt. Bartels és mtsai. (2009) bizonyították, hogy a MKP1 és a PTP1 az MPK3/MPK6-függő stressz jelátvitel represszoraként működik és gátolja az SA bioszintézist is.

Az SA jelátvitelében szereplő PR gének számos antifungális hatású proteint, proteáz inhibitort, peroxidázt, kitinázt, defenzint kódolnak és a növények védekezését is meghatározzák (Van Loon és Van Strien 1999). Az SA jelátvitel markergéneként vizsgált PR1 génről az utóbbi időben azt találták, hogy humán kaszpázszerű doménnal rendelkezik és így szabályozhatja a PCD-t a növényekben (Lu és mtsai. 2013).

A szubletális, alacsony SA koncentrációk a kismértékű oxidatív stressz generálásával a növények antioxidáns védelmi rendszerét aktiválhatják és hozzájárulhatnak a növények általános stresszrezisztenciájának fokozásához, amely „edződési” folyamat védelmet nyújthat egy az ezt követő második stresszhatással (pl. a sóstresszel) szemben (Németh és mtsai. 2002; Horváth és mtsai. 2007; Arfan és mtsai. 2007; Krantev és mtsai. 2008; Szepesi 2009; Sahu 2013). A magas, letális SA koncentrációk azonban olyan mértékű erőteljes oxidatív stresszt generálhatnak, ami a PCD indukciójához vezethet a növényekben (Gémes 2011; Sahu 2013).

Az SA-indukálta oxidatív stressz generálásával szorosan összefügg az SA hatása a fotoszintézisre (Janda és mtsai. 2012), ami szintén koncentráció- és fajfüggő. Fariduddin és mtsai. (2003) úgy találták, hogy az alacsonyabb SA koncentrációk ($>10^{-5}$ M) növelték, míg a magasabb koncentrációk csökkentették a pigmenttartalmat búzában. Már 100 μM -os SA kezelés csökkentette a levél növekedését, a klorofill- és fehérjetartalmakat, a fotoszintézis maximális sebességét, a Rubisco enzim mennyiségét és aktivitását árpában (Pancheva és mtsai. 1996). Búzában és pillangósvirágú fajoknál az SA kezelés hatására csökkent a klorofill *a* és *b* tartalom, azonban a karotinoid tartalom nőtt (Moharekar és mtsai. 2003). Az 1 mM SA kezelés megváltoztatta az árpalevelek anatómiáját és tönkretette a kloroplasztiszok struktúráját (Uzunova és Popova 2000). Alacsony maximális kvantumhasznosítást (F_v/F_m), effektív

kvantumhasznosítást (Yield), fotokémiai kioltást (qP) és magas nem fotokémiai kioltást (NPQ), valamint sztómazárást mutatnak a lúdfű *dnd1-1* és a *cpr5-1* törpemutánsok, melyek magas, konstitutív SA szintekkel rendelkeznek (Mateo és mtsai. 2006). Ezekkel ellentétben azonban az SA előkezelés fokozta a fotoszintetikus elektrontranszportot búzában (Sahu és mtsai. 2002), vagy csökkentette a fotoszintézisgátló herbicid, a paraquat által indukált gátlást a CO₂ fixációra (Ananieva és mtsai. 2002). Más esetben pedig az exogén SA kezelés hatására fokozódott a CO₂ fixálás sebessége, a Rubisco és a foszfoenol-piruvát karboxiláz (PEP) enzim aktivitása kukoricában kadmium kezelést követően (Krantev és mtsai. 2006). Az azonban még nem ismert az irodalomban, hogy az SA által indukált fotoszintetikus aktivitáscsökkenés, a keletkezett H₂O₂ és a PCD milyen korrelációban állnak egymással.

Az SA allelopatikus anyag, mivel erőteljesen gátolja más növények csírázását és növekedését, és sztómazárást idéz elő gyökérkezelésként alkalmazva is (Sahu 2013). Ennek egyik oka, hogy a SA hatására a gyökerek sejtjeiben a membránpotenciál depolarizálódik. Ez a káliumfelvétel és általában az aktív transzport gátlásához vezet, amelynek hatására csökken a gyökérben a vízpotenciál, amire a megnyúlásos növekedés rendkívül érzékeny (Harper és Blake 1981). Az SA hiányos *NahG* növények erőteljes növekedésfokozódást mutatnak a vad típushoz képest (Abreu és Munné-Bosch 2009), míg az SA hiperakkumuláló növények törpe növekedésűek és spontán léziók figyelhetők meg a levelein (Bowling és mtsai. 1997). Emellett a 0,5 mM, 24 órás SA kezelés proteázok és a 20S proteoszóma alegységeinek a szintézisét, valamint a csírázás gátló ABS hormon által is indukált LEA (Late-Embriogenesis-Abundant) proteinek és dehidrinek szintézisét indukálta lúdfűben a csírázáskor (Rajjou és mtsai. 2006). Xie és mtsai. (2007) azt is kimutatták árpa csírázásakor, hogy az SA gátolja a gibberellinsav által indukált α -amiláz gént (*Amy32b*) és indukálja az ABS hormonhoz hasonlóan WRKY38 expresszióját az aleuronban, ami gátolja a csírázást.

Az SA sztómazáródást idéz elő babban és kukoricában is (Manthe és mtsai. 1992). Az exogén SA-val kezelt szója növények vízpotenciál értéke alacsonyabb és sztómakonduktanciájuk kisebb a kontrollénál (Barkosky és Einhellig 1993). Az SA allelopatikus hatása során a szomszédos növények vízháztartása és sztómaregulációja is megváltozik. A H₂O₂ és az NO az ABS által indukált sztómazárás jelátviteli molekulái, azonban az még a mai napig nem tisztázott teljesen, hogy milyen mechanizmussal hat az SA a sztómazárásra (Acharya és Assmann 2009). Az SA által indukált ROS-nak, köztük a H₂O₂-nak kulcsszerepe van a sztómazáródásban, így a patogének penetrációjának meggátlásában, valamint a CO₂ asszimiláció szabályozásában is (Wang és Song 2008). Az SA a KAT enzim gátlásával és a plazmamembránhoz kötött NADPH-oxidáz serkentésével megnövelheti a H₂O₂

menyiségét a zárósejtek apoplasztjában, növeli a K^+ ionra nézve a membrán permeabilitását és csökkenti a zárósejtek turgorát (Lee 1998). Az SA sztómazáró hatása azonban erősen pH függő. Minél alacsonyabb az inkubációs puffer pH-ja, annál nagyobb százalékban zártak a sztómák (pH 7,2: 5%; pH 6,2: 40%; pH 5,2: 78%) (Lee 1998). A zárósejtekre gyakorolt SA hatás tehát nagyon hasonló az ABS hatásához. Ennek azonban az is lehet az oka, hogy az SA kezelés hatására az ABS szintje is gyorsan megemelkedik a levelekben (Szepesi és mtsai. 2009). Az ABS által indukált egyik jelátviteli út során az ABS a receptorához kötődik, és a jelátvitel aktiválódása a Ca^{2+} csatornák nyitását és a PM tranziens depolarizálódását okozza. Ennek a szignál útnak a komponense a H_2O_2 (Wang és Song 2008) és az NO is (Garcia-Mata és mtsai. 2003; Neill és mtsai. 2002). A tranziens membrán depolarizáció elősegíti a plazmamembránban található Cl^- efflux csatornák nyitódását, ami tovább depolarizálja a membránt. Emellett az ABS megemeli az IP_3 szintet a sejtben, ami további Ca^{2+} felszabadulást eredményez a belső endomembrán rendszerekben található raktárokból (ER, vakuólom). A megemelkedett $[Ca^{2+}]_{cit}$ szint aktiválja a kifelé irányuló Cl^- csatornák nyitódását és gátolja a befelé irányuló K^+ csatornákat. Gátlódik a H^+ -ATPáz működése és megemelkedik a citoszolikus pH. Ennek hatására tartós depolarizáció alakul ki és aktiválódnak a kifelé irányuló K^+ csatornák, a sejt turgora csökken és a sztóma bezáródik (Taiz és Zeiger 2006). A jelátvivő H_2O_2 forrása lehet a hormonkezelés hatására a membrán-lokalizált NADPH-oxidáz aktiválódása, valamint a zárósejtek nagy fényérzékenységgű kloroplasztisai, ahol a fotoszintetikus elektrontranszport hozzájárulhat a ROS képződéséhez (Wang és Song 2008). Az ABS által indukált sztómazárás jelátviteli útjának másik fontos eleme az NO, aminek szintézise függhet a zárósejtek H_2O_2 produkciójától. Exogén H_2O_2 kezelés hatására ugyanis gyors NO szintézis volt kimutatható lúdfű zárósejtjeiben (Bright és mtsai. 2006). Ez az NO szintézis például NOS gátlóval megakadályozható, de a H_2O_2 -ot gátló antioxidánsokkal is csökkenthető. Az ABS kezelés hatására tehát a NADPH-oxidáz aktiválódása folytán keletkező H_2O_2 a NOS-szerű vagy NR enzimeken keresztül NO-t generál, ami a cADPR-en keresztül a kalciumcsatornák nyitódásán át a sztómák zárásához vezethet (Neill és mtsai. 2008). Xin és mtsai. (2003) bizonyították, hogy lóbab zárósejtjeiben az exogén SA kezelés is NO termelődést indukál, aminek mértéke a sztómazárással korrelál. Az SA sztómazárást indukáló hatása specifikus NOS gátlóval csökkenthető, azaz a H_2O_2 mellett az NO az SA-indukálta sztómazárás másik fontos komponense. E kettő komponens kapcsolata az idő függvényében azonban még nem ismert az SA jelátvitelében (Acharya és Assmann 2009; Khokon és mtsai. 2011).

A zárósejtek fotoszintetikus aktivitása a sztómaműködés során nagyon jelentős. A kloroplasztiszoknak kulcsszerepe van ebben, az elektrontranszport során keletkező ATP

produkciónban, a kékfény jelátviteli útban, a keményítő raktározásban, a malát szintézisben, és a CO₂ asszimilációban, ami során ozmotikusan aktív cukrok keletkeznek. Ez a vízpotenciál növekedéséhez vezet, és hozzájárul a sztómák nyitódásához. A zárósejtek különböző fényszabályozta folyamatokban vehetnek részt. Bizonyították, hogy a kék fény indukált sztómanyitódás független a fotoszintézistől (Zeiger és mtsai. 2002). A sztómák erős fényintenzitás hatására is kinyílnak, és ez gátolható a fotoszintetikus elektrontranszport inhibitorával, a DCMU-val, ami a fotoszintézistől való függőségére utal (Zeiger és mtsai. 2002). A zárósejtek szacharóz szintézisére is képesek, ami ozmotikumként szolgálhat a sztómák nyitódásakor. A zárósejtek fotoszintetikus elektrontranszportja függ a CO₂ és O₂ koncentrációjától, ami arra utal, hogy a zárósejtekben is működik a Rubisco által katalizált CO₂ fixáció (Lawson és mtsai. 2002). Emellett a zárósejtekben a fotoszintetikus elektrontranszportlánc melléktermékeként ROS is generálódhat. A lóbab levelekből izolált zárósejt protoplasztokban hipotóniás oldatban a fotoszintézis jelentősen gátlódott, ami tükröződött a fluoreszcencia indukciós paraméterekben. Ez a hatás nem volt megfigyelhető a mezofill protoplasztokban, ami a két szövettípus eltérő válaszreakciójára utal (Goh és mtsai. 2002). Éppen ezért a zárósejtek klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek vizsgálata nagyon informatív lehet bizonyos kezelések hatásának tanulmányozása során a zárósejt működésének pontosabb megismeréséhez (Lawson 2009). Az SA közvetlen hatása a zárósejtek fotoszintézisére azonban még egyáltalán nem ismert az irodalomban.

Az SA részt vesz a szenescencia és a PCD indukciójában is. Morris és mtsai. (2000) azt találták, hogy a SA hiányos *NahG* lúdfű mutánsban később a szenescencia, a levelek sárgulása és csökkent a nekrosis, valamint a SAG12 gén transzkripciója a vad típusú növényekhez képest. Az SA emellett számos szenescenciához kapcsolt gént aktivál (Buchanan-Wollaston és mtsai. 2005), úgy mint a WRKY6 és WRKY53 transzkripciós faktorokat (Robatzek és Somssich 2001; Miao és Zentgraf 2007), valamint a VPE proteázok közül a γ VPE-t (Yamada és mtsai. 2004). Nem ismertek azonban az SA kezelések hatására más, a sejthalálban fontos cisztein proteázok és MAPK-ok génexpressziójában bekövetkezett változások. Garcia-Heredia és mtsai. (2008) leírták az SA indukálta PCD folyamatai közül a ROS és a citokróm *c* kiáramlásának szerepét a lúdfű sejtuszuspenzióban, de nem írnak az NO változásáról. Egyáltalán nem ismert még az irodalomban a ROS/NO arány, az ET szerepe és az ionhomeosztázis megváltozása az SA-indukálta PCD-ben.

Bár az SA közvetlen és stressz akklimatizációt javító hatásairól nagyszámú közlemény jelent meg, a felsorolt irodalmak között is sok olyan található, ahol az SA koncentrációk abba a tartományba esnek, amelyek később PCD kialakulását eredményezik (Uzunova és Popova

2000; Khokon és mtsai. 2011). Nincs azonban összehasonlító vizsgálat arra vonatkozóan, hogy milyen különbség van a vizsgált fiziológiai folyamatok (fotoszintézis, sztómazárás) egyes elemeiben az akklimatizációt eredményező és a sejthalált indukáló SA koncentrációk között.

3. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, milyen különbségek figyelhetők meg a sóstressz akklimatizációt javító szubletális SA koncentrációval történő kezelés hatása, valamint a magasabb koncentrációk programozott sejthalált indukáló folyamatai között paradicsom növényekben. Milyen biokémiai, fiziológiai és génexpressziós különbségek figyelhetők meg a még éppen tolerálható és a PCD-t indukáló hatású SA- és NaCl koncentrációk hatása között. Továbbá miben különbözik a kétféle stresszor, az abiotikus sóstressz és a biotikus stresszben szerepet játszó SA által indukált PCD mechanizmusa.

Kutatásaink során a következő kérdésekre keressük a választ:

1. Milyen koncentrációban indukál a NaCl és SA PCD-t paradicsom növényekben? Hol húzódik az akklimatizáció és a sejthalál határa és ezt milyen fiziológiai folyamatok határozzák meg?
2. Hogyan változnak a fotoszintetikus aktivitás és a klorofill *a* fluoreszcencia indukációs paraméterek a kezeléseket követően? Hozzájárulhat-e a fotoszintézis változása a PCD indukációjához az SA-kezelt és a sóstressznek kitett növényekben?
3. Mivel a fotoszintézis fontos szerepet játszik az ozmotikus adaptációban, gátlódásakor a növények érzékenyebbé válnak a sóstresszre is. A fotoszintetikus aktivitás egyik fontos szabályozója a sztómák záródása, ami a CO₂ diffúziójának gátlásával limitálhatja a CO₂ fixációt. Milyen mechanizmusokon keresztül hat az SA a sztómaműködésre? Mik az SA-indukált sztómazáródásban a jelátviteli komponensek, különös tekintettel a ROS (H₂O₂) és az NO szerepére?
4. Hogyan hat az SA egyedi zárósejtek fotoszintetikus aktivitására (Fv/Fm, effektív kvantumhatékonyság, qP, NPQ, Rel. ETR)?
5. Milyen azonosságok illetve különbségek figyelhetők meg intakt növényekben az SA és NaCl által indukált PCD folyamataiban, a sejtek életképességének változásában, az etilénprodukción, az ionhomeosztázisban, a H₂O₂ és egyéb ROS formák, valamint az NO produkciójában? Aktiválódnak-e „proapoptotikus” cisztein proteázok, metakaspázok, vakuoláris processzálo enzimek, a jelátvitelben szereplő MAPK és „antiapoptotikus” (Bax Inhibitor-1, PR) gének a különböző kezelések hatására?
6. Hogyan változik az SA- és NaCl kezelések hatására a sejthalál terminációjában szerepet játszó összes proteáz aktivitás, valamint zselatin-SDS-PAGE gélen történő elválasztás utáni aktivitása?

7. Hogyan alakulnak a PCD-t indukáló jelátviteli útvonalak paradicsom sejtszuspenzióban a kezelések hatására? Mik a PCD indukciójának közös és eltérő elemei a két stresszor esetén a paradicsom sejtszuspenzióban? Milyen citomorfológiai változások történnek az SA- és a NaCl-indukált PCD terminációjakor?
8. Modellezhetők-e a nem fotoszintetizáló osztódó gyökércsúcs PCD folyamatai sejtszuspenzióval?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Intakt növényeken végzett kísérletek

4.1.1. A növénynevelés és a kísérletek előkészítése

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar. Rio Fuego paradicsom növényeket használtunk fel. A csíráztatás 3 napon keresztül sötétben, 26°C-on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben, majd 4-6 hetes korukig vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek. A tápoldat összetétele a következő volt: 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM KCl és a mikroelemek (10^{-6} M MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-7}$ M ZnSO_4 , 10^{-7} M CuSO_4 , 10^{-7} M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10^{-5} M H_3BO_4), $2 \cdot 10^{-5}$ M Fe-EDTA, pH 5,8. A növényeket 12 órás nappali és 12 órás éjszakai periódus, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás (F36W/GRO fénycsővek, Sylvania, Németország), 24/22°C nappali/éjszakai hőmérséklet és 55-60%-os relatív páratartalom mellett neveltük. A tápoldatot kétnaponta cseréltük. A növények a 10^{-7} - 10^{-2} M SA és 100-250 mM NaCl kezelést a tápoldattal kapták, 6 ill. 24 órán keresztül. A vizsgálatokhoz minden esetben a felülről számított harmadik levélemeletről származó, kifejlett leveleket használtuk fel. A kísérleteket 9 és 18 óra között végeztük és 3-5 alkalommal ismételtük.

4.1.2. A hidrogén-peroxid kvantitatív és kvalitatív meghatározása

A H_2O_2 tartalom meghatározásánál Velikova és mtsai. (2000) módszerét használtuk fel. 200 mg friss növényi mintát 1 ml hideg 0,1 %-os TCA-val eldörzsöltünk, majd lecentrifugáltuk (12000 rpm, 10 perc, 4°C). 0,5 ml felülúszóhoz hozzáadtunk 0,5 ml 50 mM K-foszfátpuffert (pH 7) és 1 ml 1 M-os KI oldatot, majd összeráztuk és 10 perc után, 390 nm-en fotometráltuk (KONTRON kétsugaras spektrofotométer, Milano, Olaszország). A H_2O_2 mennyiségeket nmol g^{-1} friss tömegre (FT) vonatkoztatva adtuk meg. A kalibrációt H_2O_2 hígítási sorozatával készítettük.

A H_2O_2 detektálására a levelekben diamino-benzidin (DAB) festéket használtuk, ami sötétbarnás színt adva jelzi a H_2O_2 jelenlétét a szövetekben (Thordal-Christensen és mtsai. 1997). A mintákat 25 ml 2 mg/ml koncentrációjú festékolatban áztattuk 2 órán keresztül.

Ezután leszívtuk a DAB-festékoldatot, majd a mintákat 15 percen keresztül 90°C-on főztük 96%-os etanolban. A főzést követően az etanolt eltávolítottuk és a leveleket 50%-os glicerines oldatba helyeztük, amiket ezután lefényképeztünk (Sony Cyber-shot DSC-H9 digitális fényképezőgép segítségével (Sony Co., Tokyo, Japán)).

4.1.3. A szuperoxid gyökanion kvalitatív meghatározása

A szuperoxid gyökanion detektálására a nitrotetrazólium-kék (NBT) festéket használtuk, ami kék színt adva jelzi a $O_2^{\cdot -}$ jelenlétét a szövetekben (Overmyer és mtsai. 2000). A mintákat 3 mg/ml koncentrációjú festékoldatban áztattuk 1 órán keresztül. Ezután leszívtuk az NBT-festékoldatot és 25 ml 96%-os etanolt pipettáztunk a helyére, majd a mintákat 15 percen keresztül 90°C-on főztük. A főzést követően az etanolt eltávolítottuk és 50%-os glicerines oldatba helyeztük a leveleket, amiket ezután lefényképeztünk (Sony Cyber-shot DSC-H9 digitális fényképezőgép segítségével (Sony Co., Tokyo, Japán)).

4.1.4. Fotoszintetikus paraméterek meghatározása

4.1.4.1. A sztómakonduktancia mérése

A sztómakonduktanciát a levelek abaxiális felszínének közepén, steady-state porométer segítségével (PMR-2, PP Systems, Amesbury MA, USA) határoztuk meg a növénynevelés körülményei között a kezeléseket követően.

4.1.4.2. A CO₂ asszimiláció meghatározása a külső CO₂ koncentráció függvényében

A CO₂ asszimilációt a külső (ambient) CO₂ koncentráció (C_a) függvényében, hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln, Nebraska, USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével határoztuk meg. A kamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk: 25°C, 65±10% nedvességtartalmú levegő, amelynek áramlási sebessége 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt, 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitáson. A méréseket az emelkedő külső CO₂ koncentráció függvényében (0-1600 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (C_a)) végeztük, miután a leveleket 10-10 percig fényadaptáltuk.

A növények A/C_a görbéinek paramétereit az A/C_a görbék kezdeti lineáris szakaszára (0-400 $\mu\text{mol m}^{-1} (\text{C}_a)$) illesztett egyenes alapján ($y=ax+b$) határoztuk meg (Pfanzen and Mitsch, 2007), ahol a = a karboxilációs hatékonysággal egyenlő (CE: Carboxylation efficiency ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})(\mu\text{mol m}^{-1})^{-1}$). Az x tengelymetszetből meghatároztuk a CO_2 kompenzációs pontot (C_{cp} : CO_2 compensation point [$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-1}$]). A teljes A/C_a görbékre illesztett függvényrel ($y=Y_0+\alpha(1-e^{-bx})$) pedig meghatároztuk a telítési görbe maximumát ($A_{\max}$ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) a SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) program segítségével.

4.1.4.3. A CO_2 asszimiláció meghatározása a külső fényintenzitás függvényében

A CO_2 asszimilációt a fényintenzitás (PPFD) függvényében, hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln, Nebraska, USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével határoztuk meg. A kamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk: 25°C hőmérsékletű, $65\pm 10\%$ nedvességtartalmú, $360 \mu\text{mol m}^{-1} \text{CO}_2$ tartalmú levegő, melynek áramlási sebessége $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt. A méréseket a fényintenzitás függvényében (0-1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PPFD)) végeztük, miután a leveleket minden egyes fényintenzitás értéknél 10 percig sötétadaptáltuk.

A növények fénygörbéinek paramétereit a fénygörbék kezdeti lineáris szakaszára (50-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PPFD)) illesztett egyenes alapján ($y=ax+b$) határoztuk meg (Lambers and Mitsch, 1998), ahol az a a kvantum hasznosítással (Q : Quantum yield ($\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ foton)), az egyenes x tengelymetszete a fény kompenzációs ponttal (L_{cp} : Light compensation point ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)), és b a sötétlégzéssel (R_d : Dark respiration ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) egyenlő. A teljes fénygörbékre illesztett függvényrel ($y=\alpha(1-e^{-bx})$, ahol $x=\text{PPFD}-L_{cp}$) meghatároztuk a telítési görbe maximumát ($A_{\max}$ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) a SigmaPlot 11.0 program (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) segítségével (Toledo-Aceves és Swaine 2008).

4.1.4.4. A klorofill a fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása

Intakt levelekben a klorofill a fluoreszcencia indukció paramétereit hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln, Nebraska, USA) határoztuk meg. A mérőkamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk: 25°C , $65\pm 10\%$ nedvességtartalmú, $360 \mu\text{mol m}^{-1} \text{CO}_2$ tartalmú levegő, amelynek áramlási sebessége 500

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt. A mérések során a leveleket 10 percig sötétadaptáltuk, majd a beállított paraméterekkel elindítottuk a mérést (Guóth és mtsai 2009).

A mért klorofill fluoreszcencia értékekből (F_m , F_o , F_v , F_s , F_m' , F_o') a következő paramétereket határoztuk meg (Roháček 2002):

1. F_v/F_m , ami megadja a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítását, azaz a reakciócentrumok által begyűjtött összes energia fotokémiai folyamatokra fordítható részét.
2. A második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítását ($\text{Yield} = (F_m' - F)/F_m'$), ami a teljes energia az éppen nyitott reakciócentrumokban, a fotokémiai munkavégzésre felhasznált része (Genty és mtsai. 1989).
3. A fotokémiai kioltási paramétert (qP), azaz $qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_o')$ (Bilger és Schreiber 1986).
4. A nem fotokémiai kioltást (NPQ), azaz $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger and Björkman 1990).
5. A relatív fotoszintetikus elektrontranszport (Rel. ETR) értékét: $\text{Rel. ETR} = 0,84 \cdot 0,5 \cdot \text{PPFD} \cdot (F_m' - F)/F_m'$. A Rel. ETR/PPFD görbékre az alábbi illesztést alkalmaztuk: $\text{Rel. ETR} = \text{Rel. ETR}_{\max}(1 - e^{-b(\text{PPFD})})$ a SigmaPlot 11.0 szoftver (Systat Software Inc. Erkrath, Germany) segítségével, ahol a $\text{Rel. ETR}_{\max}$ a maximum értéke a relatív elektron transzportnak, α a görbe meredeksége, I_k ($I_k = \text{Rel. ETR}_{\max}/\alpha$) a minimális telítő fényintenzitás (Roleda és mtsai. 2006).

4.1.4.5. A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása

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

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

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

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

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

A pigmenttartalmakat $\mu\text{g g}^{-1}$ friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.1.4.6. Az összcukortartalom meghatározása

Az összcukor mennyiségének meghatározására a Dubois és mtsai. (1956) fenol-kénsavas módszerét használtuk fel. 1 g friss növényi mintát desztillált vízben eldörzsölve, majd 10 ml-re kiegészítve 90°C-on 45 percig forraltuk. Miután lehűlt, lecentrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc, 4°C) és a felülúszóból 40 µl extraktumot, 360 µl desztillált vizet, 400 µl 1,8 %-os fenol oldatot és 2000 µl cc. H₂SO₄-et mértünk össze. Összerázva, 15 perc után 490 nm-en fotometráltuk (KONTRON kétsugaras spektrofotométer, Milano, Olaszország). Az összcukor mennyiséget szacharózzal készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg 20-250 µg/ml koncentráció intervallumban. Az összcukor mennyiségeket g g⁻¹friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.1.5. Az etilénprodukciónak meghatározása

1 g növényi mintát helyeztünk gázgyűjtő üvegekbe, melyeket szilikongumival ellátott kupakkal zártunk le. A mérés megkezdése előtt az etilént 1 órán keresztül gyűjtöttük sötétben. Az etilénprodukciónak gázkromatográf segítségével (Hewlett-Packard 5890 Series II, Avondale PA, USA), lángionizációs detektorral, alumínium-oxiddal töltött oszlopon határoztuk meg. A hélium vivőgáz áramlási sebessége 35 cm³ perc⁻¹, a hidrogéné 30 cm³ perc⁻¹, a levegőé 350 cm³ perc⁻¹ volt. Az injektor hőmérséklete 120°C, a kolonnáé 100°C, a lángionizációs detektoré 160°C volt. Az etilénprodukciónak mennyiségét standard állapotú, ismert koncentrációjú etilénnel készített kalibráció alapján nmol g⁻¹friss tömeg órá⁻¹ értékben adtuk meg (Tari és mtsai. 2006).

4.1.6. Az életképesség meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban

Az életképességet 3,5 ml 0,002%-os fluoreszcein diacetát (FDA) oldat segítségével határoztuk meg 5 percig tartó festéssel sötétben, szobahőmérsékleten (Gémes és mtsai. 2011). A mintákat a festés után 5 percig 3,5 ml 10 mM-os MES/TRIS (pH 6,10) oldattal mostuk, majd Zeiss Axiovert 200M típusú mikroszkóp alatt (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország), a 10-es filterszett segítségével vizsgáltuk (excitáció 450-495 nm, emisszió 515-565 nm). Az expozíciós idő 153 ms volt. A felvételek elkészítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról nagy

felbontású digitális kamera segítségével fotókat készítettünk (Axicam HR), majd a képeket az Axiovision 4.8 szoftver (Carl Zeiss Inc., München, Németország) segítségével dolgoztuk fel.

4.1.7. A ROS produkció meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban

A különböző koncentrációjú kezelések hatására bekövetkező ROS (köztük a H_2O_2) produkciót a 2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát (H_2DCFDA) fluoreszcens festéssel detektáltuk (Suhita és mtsai. 2004). A festék zöld fluoreszcenciát mutató formája a ROS jelenlétét jelzi a mintákban. A festés 3,5 ml 10 μM koncentrációjú festékkel, 20 percig történt 37°C-on. Ezután a mintákat 3,5 ml 10 mM-os MES/TRIS (pH 6,15) oldattal mostuk, majd Zeiss Axiovert 200M típusú mikroszkóp alatt (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország), a 10-es filterszett segítségével vizsgáltuk (excitáció 450-495 nm, emisszió 515-565 nm). Az expozíciós idő 250 ms volt. A felvételek elkészítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról nagy felbontású digitális kamera segítségével fotókat készítettünk (Axicam HR), majd a képeket az Axiovision 4.8 szoftver (Carl Zeiss Inc., München, Németország) segítségével dolgoztuk fel. A ROS-t jelző festék zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a minták pixelintenzitását, ami a ROS mennyiségével arányos. A festék ellenőrzéseként a ROS kioltást a negatív kontroll elkészítésekor 1 mM aszkorbáttal (ASA) és 100 Unit ml^{-1} katalázzal (KAT) végeztük. A pozitív kontrollhoz 10 μM -os H_2O_2 -ot használtunk, ami fokozta a H_2DCFDA fluoreszcenciáját a mintákban (Allan és Fluhr 1997).

4.1.8. Az NO produkció meghatározása fluoreszcens festéssel gyökércsúcsban

A különböző koncentrációjú kezelések hatására bekövetkező NO produkciót a 4,5-diaminofluoreszcein-diacetát (DAF-2DA) fluoreszcens festéssel detektáltuk (Bright és mtsai. 2006). A festék zöld fluoreszcenciát mutató formája az NO jelenlétét jelzi a mintákban. A festés 3,5 ml 10 μM koncentrációjú festékkel, 20 percig történt szobahőmérsékleten. Ezután a mintákat 3,5 ml 10 mM-os MES/TRIS (pH 6,10) oldattal mostuk, majd Zeiss Axiovert 200M típusú mikroszkóp alatt (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország), a 10-es filterszett segítségével vizsgáltuk (excitáció 450-495 nm, emisszió 515-565 nm). Az expozíciós idő 2,42 s volt. A felvételek elkészítésénél ötszörös objektívet alkalmaztunk. A mintákról nagy felbontású digitális kamera segítségével fotókat készítettünk (Axicam HR), majd a képeket az Axiovision

4.8 szoftver (Carl Zeiss Inc., München, Németország) segítségével dolgoztuk fel. Az NO-t jelző festék zöld fluoreszcenciájának alapján megmértük a minták pixelintenzitását, ami az NO mennyiségével arányos. A festék ellenőrzéseként az NO kioltását a negatív kontroll készítésekor 100 μ M cPTIO-val (2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxyl-3-oxid) végeztük. A pozitív kontrollhoz 100 μ M-os nátrium-nitroprusszidot (SNP) használtunk, ami fokozta a DAF-2DA fluoreszcenciáját a mintákban.

4.1.9. *In silico* módszerek (gének kiválasztása, homológiafa készítése, promóteranalízis)

A szakirodalom alapján kiválasztott génekre internetes adatbázisokból (DFCI, NCBI, Sol Genomics Network, TGRC) kigyűjtöttük a hasonló fehérjéket kódoló szekvenciákat, majd homológiaillesztést hajtottunk végre, és elkészítettük a szekvenciák homológia fáját a ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) és a Dendroscope 3.2.2. programok (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/>) (Huson és Scornavacca 2012) segítségével (1.-2. mellékletek).

A gének analízisét a Sol Genomics adatbázis segítségével végeztük el (<http://solgenomics.net/>) (4. melléklet).

A génekre az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen és Skaletsky 2000) segítségével terveztünk primereket (3. melléklet). Referencia génként a paradicsom elongációs faktor 1 alfa (*SIEF1*) génjét (X53043.1) választottuk (3. melléklet), mivel az *SIEF1* egy konstitutívan expresszáldó gén a különböző stresszhatások alatt (Lovdal és Lillo 2009). A tervezett primer szekvenciák génspecifitását az NCBI BLAST segítségével ellenőriztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A kiválasztott gén promóterelemzését a PlantCARE adatbázis segítségével végeztük el (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot és mtsai. 2002), a teljes gén szekvenciáját megelőző, a transzkripció iniciációs helye (ATG) előtti 1,5 kb hosszú upstream régiót felhasználva. Célunk az, hogy meghatározzuk, milyen promótermotívumok szabályozzák az általunk kiválasztott gén működését, különös tekintettel a stresszválásra (5. melléklet).

4.1.10. RNS izolálás, DNáz kezelés, cDNS írás, qRT-PCR

A növényekből származó összes RNS preparálásához kb. 100 mg mintát folyékony nitrogénben elhomogenizáltunk dörzscsészében, majd 1 ml TRI reagenst adtunk hozzá (1,822 M guanidinium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát pH 4,0, 0,7341 mM N-lauril-szarkozin, 44 mM β -merkaptotanol, 45,45% fenol). A mintákat 65°C-on 3 percig inkubáltuk, majd 200 μ l kloroform hozzáadása után 3 percig szobahőmérsékleten tartottuk. Ezután a mintákat centrifugáltuk (10000 rpm, 15 perc, 4°C) és a felülúszót 375 μ l kloroform:izoamilalkoholba (24:1) átpipettáztuk. Újabb centrifugálás után (10000 rpm, 15 perc, 4°C) a mintákat 500 μ l izopropanolba pipettáztuk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután lecentrifugáltuk őket (12000 rpm, 10 perc, 4°C), majd a pelletet 500 μ l 70%-os hideg etanollal tisztítottuk. Ezt követően 30 μ l dietil-pirokarbonáttal (DEP) kezelt steril desztillált vízben feloldottuk az RNS-t. Az esetleges degradációt 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (Chomczynski és Sacchi 1987).

A mintákat DNáz enzimmel kezeltük, 4 μ l DNáz puffer, 17 μ l DEP-es víz és 0,2 μ l RNáz inhibitorhoz hozzáadunk 12-18 μ g RNS mintát és ezután 4 μ l DNáz enzimet (Fermentas UAB, Vilnius, Litvánia). Az elegyet 37°C-on 30 percig, majd 65°C-on 10 percig inkubáltuk. A fehérjéket 150 μ l kloroformmal és 150 μ l fenollal elimináltuk, majd a mintákat centrifugáltuk (10000 rpm, 15 perc, 4°C). A felülúszót tovább tisztítottuk 200 μ l kloroformmal, centrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc, 4°C), majd 550 μ l hideg 96%-os etanol és 20 μ l 3 M-os Na-acetát elegyében 2-3 órát inkubáltuk. Centrifugálás után (12000 rpm, 15 perc, 4°C) 500 μ l 70%-os hideg etanollal mostuk, majd 30 μ l DEP-es vízben feloldottuk a pelletet. Az esetleges degradációt 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (Gallé 2010).

A tisztított RNS-t 200 Unit reverz transzkriptáz (RT) enzim (Fermentas UAB, Vilnius, Litvánia) segítségével cDNS-sé írtuk át, 4 μ l reverz transzkriptáz reakció puffer, 0,5 μ l random hexamer, 1 μ l 25 mM-os dNTP mix, 0,5 μ l RNáz inhibitor, 13 μ l DEP-es vizet tartalmazó reakcióelegyben. A reakció 37°C-on 1 órán át tartott (Gallé 2010).

A vizsgálni kívánt gének expresszióját qRT-PCR segítségével detektáltuk. 15 μ l szintetizált cDNS-t 285 μ l nukleázmentes vízzel kihígítottunk, majd ebből 9 μ l hígított cDNS-t összekevertünk 0,5 μ l primerpárral és 10 μ l SYBRGreen mixxel (Fermentas UAB, Vilnius, Litvánia). A kvantitatív PCR-t (qRT-PCR) Real-Time PCR készülékkel (Biorad, Hercules CA, USA) végeztük. A reakció során 10 perces 90°C-on történő hevítést, 41 ciklusból álló sorozat (15 másodpercig 95°C, 1 percig 60°C) követett. A SYBRGreen festék

fluoreszcenciáját minden lépés után az Opticon Monitor szoftver (BioRad, Hercules CA, USA) segítségével detektáltuk. A PCR lefutása után a termékek specifikusságát az olvadási görbék nyomonkövetésével ellenőriztük. Az adatok analízisekor a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk. Az *SLEF1* értékeit használtuk referenciaként, ami mindvégig konstans expressziós szinteket mutatott a levelekben és gyökerekben, és a kapott eredményeket kezdeti kontroll eredményeire normalizáltuk (Gallé 2010).

4.1.11. Az elemtartalom meghatározása

2 g friss növényi mintát desztillált vízben történő erőteljes kétszeri mosást követően szárítószekrényben 80°C-on 24 órán át szárítottuk. A lemért száraz tömegű (SZT) mintákat 6 ml koncentrált salétromsavval roncsoltuk 20 órán keresztül, majd 2 ml H₂O₂-t mértünk rá elszívó fülke alatt. A mintákat roncsoló csövekbe öntöttük és 200°C-on 25 percig roncsoltuk mikrohullámú roncsolóban (MarsXpress CEM, Matthews NC, USA). A kihülés után a mintákat 20 ml-re hígítottuk ioncserélt desztillált vízzel. Az elemek meghatározása a megfelelő kalibrációk és hígítások elkészítése után atomabszorpciós spektrométerrel (AAS, Hitachi Z-8200, Tokyo, Japan), levegő-acetilén láng alkalmazásával történt (Trivedi és Erdei 1992). A mért elemtartalmak mennyiségét $\mu\text{mol g}^{-1}$ SZT értékben adtuk meg.

4.1.12. A fehérjetartalom meghatározása

500 mg növényi mintát eldörzsöltünk hideg 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferben, majd lecentrifugáltuk (10200 rpm, 10 perc, 4°C). A fehérjetartalom meghatározását Bradford (1976) módszere alapján végeztük. Kezelésenként 5 μl , ill. 2 μl levél ill. gyökér felülúszót adtunk 900 μl desztillált vízhez és 100 μl Bradford festékhez (Biorad, Hercules CA, USA), majd alapos keverést követően 595 nm-en fotometráltuk őket.

4.1.13. A proteázaktivitás meghatározása azokazeinnel és zselatin-SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE)

500 mg növényi mintát eldörzsöltünk 50 mM-os hideg Tris-HCl pufferben (pH 7,4), majd lecentrifugáltuk (10200 rpm, 10 perc, 4°C). 50 µl felülúszóhoz 550 µl 100 mM-os K-foszfátpuffert (pH 5,5) és 300 µl 1%-os azokazeint adtunk, majd 37°C-on inkubáltuk 2 óráig. A folyamatot 30 percig tartó 300 µl 10%-os hideg triklórecetsavas kezeléssel (TCA) állítottuk le jégen. A mintákat lecentrifugáltuk (12000 RPM, 10 perc, 4°C), majd fotometráltuk 440 nm-en (KONTRON kétsugaras spektrofotométer, Milano, Olaszország) (Pereira és mtsai. 2010).

A proteázok aktivitásának meghatározására 20 µl fehérjemintát választottunk el 0,1%-os zselatint tartalmazó SDS-PAGE-vel (5%-os felső gél, 12,5%-os alsó gél) 90 V-on 20 percig, majd 70 V-on 120 percig (Grudkowska és Zagdanska 2010; Rossano és mtsai. 2011). A molekulásúly jelöléséhez 10 µl ProSieve QuadColor fehérje markert (Lonza, USA, Rockland) használtunk. A mintákhoz és a gélhez adott 20%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) az elválasztás után 2,5%-os Triton-X 100 oldattal mostuk, a gélek rázatása kétszer 40 percig (40 rpm, 25°C) történt. A géleket ezután inkubációs pufferbe tettük (50 mM Tris-HCl, 5m M CaCl₂, 2m M MgCl₂, pH 5,5) 37°C-on 16 órára. Az inkubáció után a géleket 250 ml 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel (40%-os metanol és 10%-os ecetsavat tartalmazó oldatban) festettük meg 30 percig, majd mostuk kétszer 30 percig. A géleket ezután desztillált vízbe helyeztük, majd digitalizáltuk. A proteolízist a fehér, átlátszó csíkok mutatják a kék háttérben, amelyet a Digimizer 4.2.2.0. (<http://digimizer.com/>) képelemző program segítségével analizáltunk. Az adott kDa tömegű proteázok foltjainak pixelintenzitását a területre és a háttérre normalizáltuk.

4.1.14. Az életképesség meghatározása elektrolit kieresztés (EL) alapján

Az elektrolit kieresztést Sun és mtsai. (2010) alapján határoztuk meg. 1 cm átmérőjű levélkorongokat vagy 100 mg gyökeret tettünk kezelésenként 10 ml ioncserélt desztillált vízbe 2 órára, 25°C-on. Az inkubáció után meghatároztuk az oldat vezetőképességét (C1) konduktivitásmérővel (OK-102/1 Radelkis, Budapest, Magyarország). A mintákat ezután 40 percig forraltuk, majd lehűtés után ismét meghatároztuk az oldat konduktivitását (C2). A relatív elektrolit kieresztést a következő képlettel számoltuk: Rel. elektrolit kieresztés= (C1/C2)X100.

4.1.15. DNS fragmentálódás vizsgálata agaróz-gélelektroforézissel

A mintákat folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban eldörzsöltük, majd Eppendorf-csőbe tettük, és 400 µl homogenizáló puffert (0,1 M NaCl, 2% SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 9, 10 mM EDTA) adtunk hozzá, amelyben szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk. Ezután 300 µl fenol-kloroform 1:1 (V:V) arányú elegyét mértük hozzá, és alaposan összeráztuk, majd lecentrifugáltuk (5600 rpm, 10 perc, 4°C). A felülúszóval a fenol-kloroformos tisztítási eljárást még kétszer megismételtük. A felülúszóhoz 0,5 ml kloroform-izoamilalkoholt (24:1) adtunk és lecentrifugáltuk. (5600 rpm, 10 perc, 4°C). Az újabb felülúszóhoz 550 µl jéghideg izopropanol és 20 µl Na-acetát elegyét adtuk, majd elegyítés után az Eppendorf-csöveket 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákat lecentrifugáltuk (12000 rpm, 10 perc, 4°C). A kapott csapadékot 70%-os etanollal mostuk és újból lecentrifugáltuk (12000 rpm, 10 perc, 4°C), majd az alkohol alapos eltávolítása után 30 percig jégen steril körülmények között inkubáltuk. A DNS-t 50 µl TE pufferben (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8) vettük fel (Kubis és mtsai. 2003). A kinyert DNS 10 µl-ét 3 µl festékkel (6x MassRuler Loading Dye), és 2 µl RNáz A-val 3%-os (w/v) agaróz-gélben, TBE (Tris-bórsav-EDTA) pufferben 2 órát futattuk 80 mV-on.

4.2. Zárósejteken végzett kísérletek

4.2.1. Az epidermisznyúzatok előkészítése és kezelése

A felülről számított harmadik levélemeletről származó kifejllett, kezeletlen növények leveleinek abaxiális oldaláról, csipesz segítségével két levélér között lenyúztuk az epidermisz szövetet. Az epidermisznyúzatokat 35 mm átmérőjű, üveg aljú, műanyag Petri-csészébe (MatTek Co., Ashland MA, USA), 0,3 ml „nyító pufferbe” (NP) (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 6,15, 35 mOsm) helyeztük (Garcia-Mata és Lamattina (2007) alapján, módosítva). Ezután egy 1 cm² nagyságú fémráccsal az edény aljához szorítottuk a nyúzatokat, majd további 3,2 ml NP-t adtunk hozzájuk. Az epidermisznyúzatokat 3 óráig a növénynevelési körülmények között (30-60 µmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson) inkubáltuk. Az inkubáció után az NP-t leszívtuk pipetta és szűrőpapír segítségével, majd hozzáadtuk a 10⁻⁷-10⁻² M SA-at tartalmazó kezelőoldatot, amit további 3 órás inkubáció követett.

4.2.2. A zárósejtek életképességének meghatározása

A zárósejtek életképességének meghatározása a kezeléseket követően FDA fluoreszcens festékkel történt, a 4.1.6. fejezetben leírtak szerint 35 mm-es üvegaljú Petri-csészékben (MatTek Co., Ashland MA, USA), a nyúzatokat 1 cm² nagyságú fémráccsal az edény aljához szorítva. A felvételek elkészítésénél negyvenszeres objektívet alkalmaztunk.

4.2.3. A sztómanyitottság meghatározása

A sztómaműködés tanulmányozására a legalkalmasabb módszer, az apertúra nagyságának lemérése, mivel az a különféle kezelések és környezeti viszonyok között változik. A mérések lehetnek közvetlenek, azaz mikroszkóp alatti megfigyelések, valamint közvetettek, párologtatás mérésen alapuló kísérletek, sztómakonduktancia mérések. A különböző koncentrációjú kezelőoldatokban történő inkubációk után az epidermisznyúzatokat negyvenszeres nagyításon Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország) segítségével vizsgáltuk a látható fény tartományában. A mintákról nagy felbontású digitális kamera segítségével fotókat készítettünk (Axicam HR), majd a két zárósejt közötti rés méretét az Axiovision 4.8 szoftver (Carl Zeiss Inc., München, Németország) segítségével határoztuk meg.

4.2.4. A zárósejtek ROS produkciójának meghatározása festéssel

A zárósejtek ROS produkciójának a meghatározása a kezeléseket követően H₂DCFDA fluoreszcens festékkel történt, a 4.1.7. fejezetben leírtak szerint, 35 mm-es üvegaljú Petri-csészékbe (MatTek Co., Ashland MA, USA), a nyúzatokat 1 cm² nagyságú fémráccsal az edény aljához szorítva. A felvételek elkészítésénél negyvenszeres objektívet alkalmaztunk.

4.2.5. A zárósejtek NO produkciójának meghatározása festéssel

A zárósejtek NO produkciójának a meghatározása a kezeléseket követően DAF-2DA fluoreszcens festékkel történt, a 4.1.8. fejezetben leírtak szerint, 35 mm-es üvegaljú Petri-

csészékben (MatTek Co., Ashland MA, USA), a nyúzatokat 1 cm² nagyságú fémráccsal az edény aljához szorítva. A felvételek elkészítésénél negyvenszeres objektívet alkalmaztunk.

4.2.6. A zárósejtek klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek meghatározása

A Microscopy-PAM mérőrendszer alkalmas egyetlen sejt indukált fluoreszcenciájának rögzítésére (Goh és mtsai. 1999). Az elrendezésben a Microscopy-PAM rendszer egy inverz fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakozik (Axiovert 40 CFL, Zeiss GmbH, Németország). Esszenciális elemei a kékfényt emittáló dióda (LED, NSBG 500, Nichia, Japán), mint az impulzus-modulált mérőfény forrása, a miniatűr fotoelektron-sokszorozó (PC/PM-MC, Walz GmbH, Németország), és az adatfeldolgozó PAM-Control egység (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország).

A Microscopy-PAM mérések alkalmával az epidermisznyúzatokon egy életképes zárósejtpárra fókuszáltunk, majd 10 percig sötétadaptáltuk 25°C-on. Ezután a beállított paraméterekkel elindítottuk a méréseket (Goh és mtsai 2002). A kapott eredményekből a 4.1.4.4. fejezetben leírt paramétereket számoltuk.

4.2.7. A sztómazáródás jelátviteli komponenseinek vizsgálata

A jelátvitel vizsgálatához a nyúzatokat az első három órás inkubációt követően gátlószereket tartalmazó NP-ben inkubáltuk a kezelések mellett három óráig, majd megmértük a sztómák nyitottságát. Az alkalmazott gátlószerek a következők voltak: 1 mM kalciumkelátor etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 300 U szuperoxid-dizmutáz (SOD), ami a szuperoxid gyökanionokat dizmutálja, 1 mM H₂O₂ kioltó aszkorbát (ASA), 100 U H₂O₂ lebontó kataláz (KAT), 0,2 mM NO kioltó 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid cPTIO és 10 µM difenilén-jodónium klorid (DPI), ami a NADPH-oxidáz működését gátolja. Minden vegyszert a Sigma-Aldrich cég (St. Louis MO, USA) forgalmaz.

4.3. Sejtszuspenzióval, mint modellrendszerrel végzett kísérletek

4.3.1. Kalluszindítás paradicsom növényből

A kalluszindításhoz 4 hetes paradicsomnövények (nóduszt tartalmazó) szárát használtuk fel. A 0,5-1 cm-es explantátumokat csapvízzel lemostuk, majd a 70%-os etanolban 1 percig ráztuk. Ezt követően hypós desztillált vízben 20 percig ráztattuk. A hypós oldatból steril körülmények között áthelyeztük az explantátumokat 50 ml steril desztillált vízbe, amiben 5 percig rázva mostuk. Ezt négyszer ismételtük, majd a mintákról a vizet steril szűrőpapíron leitattuk. Ezt követően helyeztük ki őket Petri-csészébe táptalajra.

A paradicsom szövettenyészet táptalajának összetétele a következő volt: Murashige és Skoog féle alap só keverék (MS) (Murashige és Skoog 1962) (4,3 g/l); 3 % szacharóz (30 g/l); Gamborg B5 vitaminok (GB5) (Gamborg és mtsai. 1968): 29,65 μ M B₁-vitamin (tiamin) (10 mg/l), 8,12 μ M B₃-vitamin (nikotinsav) (1 mg/l), 4,86 μ M B₆-vitamin (piridoxin) (1 mg/l), 0,56 mM B₈-vitamin (myo-inozit) (100 mg/l); 5 μ M 1-naftilecetsav (NAA); 8,82 μ M N⁶-benziladenin (BA) (Nagendra-Prasad és mtsai. 2008); 8 g/l agar; pH 5,8-ra állítva KOH-val. A táptalaj oldatát 119°C-on, 20 percig autoklávoztuk, majd steril körülmények között 10 cm átmérőjű Petri-csészébe öntöttük, amelyben hagytuk a felhasználás előtt megdermedni. A kalluszokat steril körülmények között, háromhetenként ültettük át új táptalajra.

4.3.2. Sejtszuspenzió készítése kalluszból és a kísérletek beállítása

A megfelelő minőségű és mennyiségű kalluszt steril körülmények között 100 ml-es Erlenmeyer lombikba tettük és kis mennyiségű tápoldatban egy steril kanál segítségével szétnyomtuk. Ezután 50 ml tápoldatot öntöttünk a lombikba, melyet steril vattadugóval zártunk le.

A paradicsomos sejtszuspenzió tápoldatának az összetétele a következő: 4,3 g/l MS, GB5, 30 g/l szacharóz, 5 μ M NAA, 1 μ M BA (Yakimova és mtsai. 2006); pH 5,8-ra állítva KOH-val. A tápoldatot 119°C-on, 20 percig autoklávoztuk, majd steril körülmények között lombikban tároltuk a felhasználásig.

A sejtszuspenziót hetente frissítettük 1:4 arányban új tápoldattal. A sejtszuspenzióval teli lombikokat sötétben (Knight és mtsai. 2001), 25°C-on, rázatógép segítségével ráztattuk folyamatosan 100 rpm-en (Gallenkamp ORBI-SAFE, UK).

A sejtszuszpenciók a 100-250 mM NaCl és a 10^{-7} - 10^{-2} M SA kezelést steril körülmények között, steril szűrőn (Millipore, 0,22 μ m pórusméret) átszűrve a tápoldatban kapták.

4.3.3. A sejtszuszpenció frisstömeg gyarapodásának mérése

A sejtszuszpenció élelciklusa során a sejtek igen nagy százaléka aggregálódik, ezért a sejtszámlálás nehézkes és pontatlan. A nagymértékű aggregációt a ráztatás erősségének növelésével nem lehet megszüntetni, mivel olyan nyíróerő lép fel a lombikban, amely a sejtek halálát okozza. Éppen ezért a szaporodás vizsgálatára a legideálisabbnak a sejtszuszpenció frisstömeg változásának mérése kínálkozik (Hayashi és Yoshida 1988). A hetenkénti átpasszálás napján a lombikokban lévő sejtszuszpenciót megfelelő méretű és minőségű szűrőpapírral (FT55, Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, Németország) előre sterilizált üvegtölcséren átszűrtük. Steril fülkében mérlegre helyeztünk lombikot, amibe pontosan 2 g átszűrt sejtet mértünk be steril kanállal, majd steril mérőhenger segítségével 40 ml friss szuszpenziós tápoldatot öntöttünk hozzá, lezártuk, becsomagoltuk, majd visszatettük a rázó gépbe. A mérés alkalmával minden nap, ugyanabban az időpontban, amikor elindítottuk a tenyészetet, új szuszpenziós lombikokat nyitottunk fel, és ugyanolyan méretű és minőségű szűrőpapíron (így a szűrőpapír egyforma nedvességet szív magába) átszűrtük, ezután mérleggel lemértük az átszűrt sejtek friss tömegét. A kapott eredményeket időfüggvényben g^{-1} FT vonatkoztatva adtuk meg.

4.3.4. Sejtszuszpenció pH-jának és elemtartalmának meghatározása

A sejtszuszpenció oldatának pH-ját pH mérővel határoztuk meg (OP-211/2 Radelkis, Budapest, Magyarország).

A sejtszuszpenció elemtartalmának meghatározása során steril kanállal mintát vettünk a különböző kezelést kapott sejtszuszpenciókból és szűrőpapírral sterilizált üvegtölcséren átszűrtük, majd háromszor 50 ml ioncserélt desztillált vízzel átmostuk. Az átszűrt sejtekből 2 g mintát a 4.1.11. fejezetben leírt módon dolgoztunk fel.

4.3.5. Sejtszuspenzió életképességének meghatározása festéssel

A sejtszuspenzió életképességének vizsgálatakor 600 µl mintát tettünk a különböző kezelést kapott sejtszuspenziókból 35 mm-es üvegaljű Petri-csészékbe (MatTek Co., Ashland MA, USA), melyeket ezután FDA fluoreszcens festék segítségével a 4.1.6. fejezetben leírtak szerint festettünk meg. A felvételek elkészítésénél tízszeres objektívet alkalmaztunk. A sejtek életképességét a halott (zöld fluoreszcenciát nem mutató) és az élő sejtek (zöld fluoreszcenciát mutató) százalékos arányának meghatározásával, az idő függvényében adtuk meg. A random módon kiválasztott mikroszkópos mezőben legalább 100 sejtet mértünk le, hat független ismételtes során.

4.3.6. Sejtszuspenzió életképességének meghatározása ionkieresztés alapján

A sejtszuspenziót megfelelő méretű és minőségű szűrőpapírral sterilizált üvegtölcséren átszűrtük, és kétszer 50 ml ioncserélt desztillált vízzel átmostuk. 0,5 g mintát tettünk 10 ml ioncserélt desztillált vízbe 2 órára 25°C-on. A további lépéseket a 4.1.14. fejezetben leírtak szerint végeztük el.

4.3.7. Nukleáris változások detektálása TUNEL módszerrel

A DNS fragmentáció detektálásához a TUNEL (Rosche, Germany) módszert alkalmaztuk, mely során enzimatis reakciókon keresztül jelölhetők az endonukleázok hasítási folyamatai során keletkező szabad 3'-OH csoportok. 96%-os etanollal tisztított, 35 mm-es üvegaljű Petri-csészékbe (MatTek Co., Ashland MA, USA) 600 µl sejtszuspenziót mértünk ki. A sejteket 30 percig fixáltuk 4% paraformaldehid tartalmú hideg foszfát pufferben (PBS, pH 7,4). A sejteket ezután mostuk PBS pufferrel (pH 7,4), majd permeabilizáltuk 0,1%-os TritonX-100 és 0,1%-os Na-citrát elegyével két percig. PBS pufferrel (pH 7,4) kétszer mostuk a mintákat, majd a gyártó utasításainak megfelelően összeállított TUNEL reakcióeleggyel (50 µl), a jelölőfestékkel egy órán keresztül, 37°C-on sötétben kezeltük a sejteket. Az inkubációt követően PBS pufferrel (pH 7,4) háromszor mostuk a mintákat (Bi és mtsai. 2009). A PCD-t kísérő DNS fragmentációt a festék zöld fluoreszcenciája jelzi a sejtekben, melyet Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltunk tízszeres objektívet használva. A sejtmagokat 10 mM-os

Hoechst 33258 festékkel festettük. A mintákról nagy felbontású digitális kamera segítségével (Axicam HR) fotót készítettünk. Az expozíciós idő 2,61 ms volt. Az értékelés az Axiovision 4.8 program segítségével történt. A festés próbájaként a negatív kontrollhoz nem adtunk hozzá enzimet. A pozitív kontrollhoz DNáz I enzimet (Fermentas UAB, Vilnius, Litvánia) használtunk.

4.3.8. Sejtsuszpenzió DNS fragmentálódásának vizsgálata gélelektroforézissel

A sejtsuszpenzió DNS tartalmának kivonása során steril kanállal mintát vettünk a különböző kezelést kapott sejtsuszpenziót tartalmazó lombikokból, és a megfelelő méretű és minőségű szűrőpapírral sterilizált üvegtölcséren átszűrtük. 2X50 ml desztillált vízzel történő mosást követően 200 mg átszűrt sejtet Eppendorf-csőbe mértünk és folyékony N₂-ben lefagyasztottunk, majd a 4.1.15. fejezetben leírtak szerint végeztük el a további lépéseket.

4.3.9. Sejtsuszpenzió etilénprodukciónak meghatározása

A sejtsuszpenzió etilén produkciójának mérése során steril kanállal mintát vettünk a lombikokból és a megfelelő méretű és minőségű szűrőpapírral sterilizált üvegtölcséren átszűrtük. 1 g átszűrt sejtet gázgyűjtő üvegcsőbe tettünk, és hozzáadtunk 0,5 ml szuszpenziós oldatot, mely tartalmazta a megfelelő mennyiségű NaCl vagy SA kezelőoldatot. A lezárt üvegcsőveket 24 órán keresztül sötétben rázattuk (100 rpm, 25°C), majd a 4.1.5. fejezetben leírtak alapján végeztük el a további lépéseket.

4.3.10. Sejtsuszpenzió ROS produkciójának meghatározása festéssel

A sejtsuszpenzió ROS festésekor 600 µl mintát tettünk a különböző kezelést kapott sejtsuszpenziókból 35 mm-es üvegaljú Petri-csészékbe (MatTek Co., Ashland MA, USA), melyeket ezután H₂DCFDA fluoreszcens festék segítségével a 4.1.7. fejezetben leírtak szerint festettünk meg és értékeltünk. A felvételek elkészítésénél tízszeres objektívet alkalmaztunk.

4.3.11. Sejtszuspenzió NO produkciójának meghatározása festéssel

A sejtszuspenzió NO festése során 600 µl mintát tettünk a különböző kezelést kapott sejtszuspenziókból 35 mm-es üvegaljú Petri-csészékbe (MatTek Co., Ashland MA, USA), melyeket ezután DAF-2DA fluoreszcens festék segítségével a 4.1.8. fejezetben leírtak szerint festettünk meg és értékeltünk. A felvételek elkészítésénél tízszeres objektívet alkalmaztunk.

4.3.12. A sejthalál indukció jelátviteli komponenseinek vizsgálata

A PCD szignalizációs komponenseinek vizsgálatához az alkalmazott NaCl- és SA kezelések mellett specifikus gátlószereket használtunk fel és néztük azok együttes hatását az életképesség változására a 4.3.5. fejezetben leírtak szerint. A gátlószerek és azok koncentrációi a következők voltak: 100 µM LaCl₃, 10 µM EGTA, 10 µM N-(6-aminohexil)-5-klór-1-naftilszulfonamid hidroklorid (W-7), 200 U SOD, 100 U KAT, 1 mM ASA, 10 mM DPI, 200 µM cPTIO, 10 µM aminoetoxivinilglicin (AVG), 20 µM STS, 0,1 µM 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-one (PD98059), 1 µM *transz*-epoxiszukcinil-L-leucilamido(4-guanidino)bután (E-64). A gátlószereket, enzimeket és szabadgyök kioltókat minden esetben a kezeletlen kontroll szuspenzióhoz is hozzáadtuk, ahol nem voltak hatással a sejtek életképességére. A kísérletek során felhasznált LaCl₃-t, EGTA-t, SOD-ot, ASA-t, KAT-ot, AVG-t, E-64-et vízben oldottuk fel, a W-7, cPTIO, PD98059 oldás dimetil-szulfoxidban (DMSO) történt. Az STS 1:4 arányú 0,1 M ezüstnitrát és 0,1 M nátriumtioszulfát oldat felhasználásával készült. Minden vegyszert a Sigma-Aldrich cég (St. Louis MO, USA) forgalmaz.

4.4. Az adatok feldolgozása és értékelése

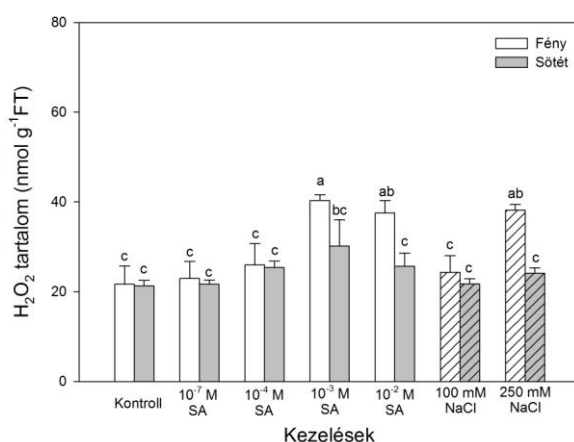
A mikroszkópos felvételek értékelése minden esetben az Axiovision 4.8 program segítségével történt. A mért adatokat Microsoft Office Excel 2007 program és SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) programok segítségével dolgoztuk fel és értékeltük ki. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket a varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelölt átlagok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten különböznek egymástól szignifikánsan. Más esetben Student-féle *t*-tesztet használtunk fel, ahol a kapott eredmények $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken különböznek egymástól szignifikánsan.

5. Eredmények

5.1. A reaktív oxigénformák indukciója és a fotoszintetikus hatékonyság megváltozása 6 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben

Korábbi munkáinkból ismert, hogy a 10^{-4} M alatti SA, valamint a 100 mM alatti NaCl koncentrációk az általunk használt paradicsom növények számára még tolerálható, az ennél magasabb koncentráció értékek azonban rövidebb (10^{-2} M SA, 250 mM NaCl) vagy hosszabb idő után (10^{-3} M SA) a növények pusztulását idézik elő (Szepesi 2011; Gémes 2009). Először azt vizsgáltuk meg, hogy milyen különbség van az említett koncentrációk használata esetén a PCD indukcióját előidéző ROS és az ezt generáló fotoszintetikus aktivitás vonatkozásában.

A reaktív oxigénformák közül a H_2O_2 szignifikánsan megemelkedik a letális 10^{-3} - 10^{-2} M SA és a 250 mM NaCl-dal kezelt növények levelében a kontrollhoz képest hat órával a kezelés után (1. ábra). A 10^{-3} - 10^{-2} M SA és a 250 mM NaCl-kezelt növények azonban, ahol a minták sötétben kapták a kezelést, szignifikánsan kisebb H_2O_2 produkciót mutatnak a fényben kezelt növények leveleihez képest, ugyanezen kezelésekre hatása (1. ábra).



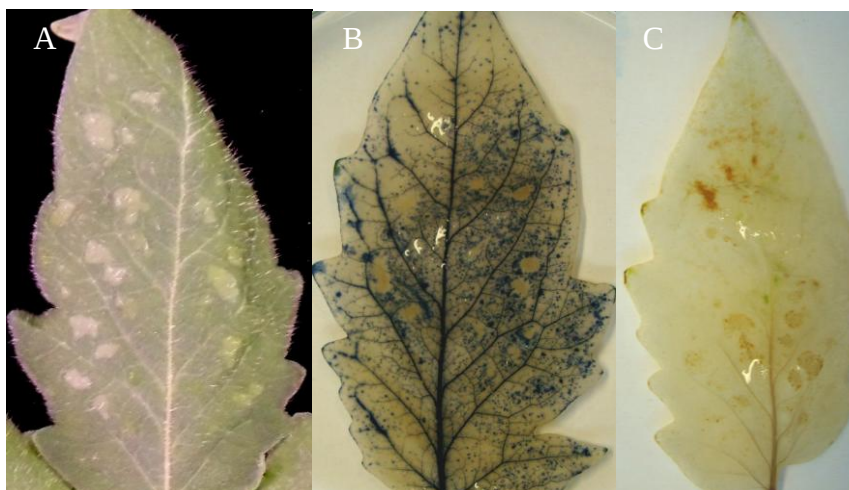
1. ábra: H_2O_2 tartalom változása paradicsom növények levelében 6 órás, fény vagy sötétben történő 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A H_2O_2 termelődést a DAB festék barnás színe is jelzi az SA- és NaCl-kezelt levelekben, amely a mért eredményeknek megfelelően fokozódik az SA kezelés koncentrációjának növekedésével (6. melléklet, A).

A szuperoxid gyökanyon termelődését az NBT kékes elszíneződése jelzi az SA- és NaCl-kezelt levelekben (6. melléklet, B). A hat órát fényen, 10^{-3} M SA-val kezelt növények

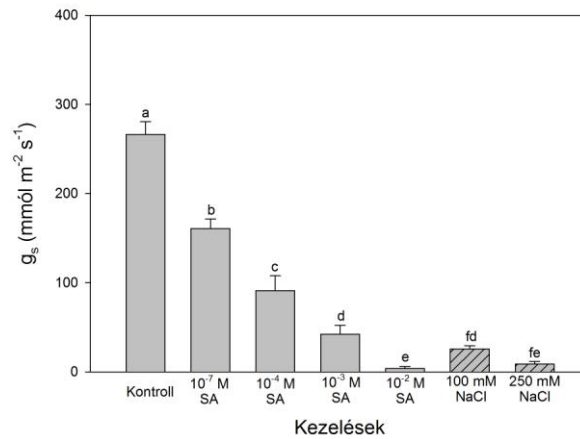
levéllemezen, az érközőkben, kék festődési gócok figyelhetők meg, míg a 10^{-2} M SA-val kezelt növények levelén, az erek környéke mutat erőteljes festődést az NBT-vel (6. melléklet, B).

Míg a 10^{-2} M SA- és a 250 mM NaCl-kezelt növények turgorvesztett állapotba kerülnek a hatodik órára, a fényben tartott, 10^{-3} M SA-kezelt növények levelén az érközőkben „áttetsző foltok” jelennek meg (2. ábra, A). Az NBT festést követően megállapítható, hogy a megjelenő érközi foltok szélén, a mezofill sejtekben erőteljes szuperoxid gyökanion termelődés történik (2. ábra, B), míg a foltok helyén DAB festéssel nagymértékű H_2O_2 akkumuláció mutatható ki (2. ábra, C).



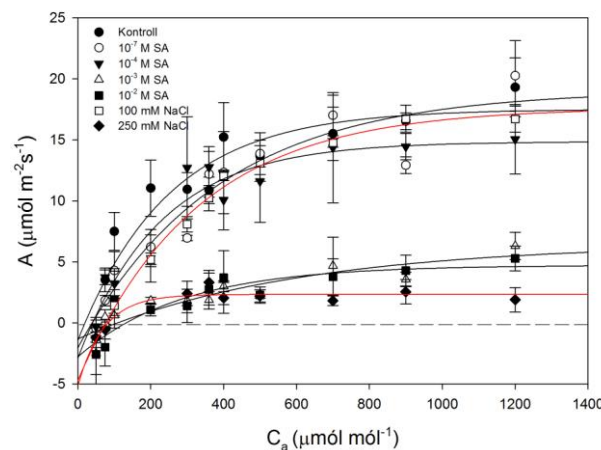
2.ábra: 6 órás 10^{-3} M szalicilsav (SA) hatására bekövetkező változások a megvilágított paradicsom növények levelében (A: festetlen; B: NBT festett (a kék szín a szuperoxid gyökanion jelenlétét jelzi); C: DAB festett (a barnás szín a H_2O_2 jelenlétét jelzi)).

Mivel a megvilágított növényekben nagyobb H_2O_2 és szuperoxid gyökanion tartalmakat detektáltunk, feltételezhető, hogy ezek keletkezése kapcsolódik a fotoszintetikus folyamatokhoz, ugyanakkor vissza is hathatnak arra. Emellett a levelekben az alkalmazott SA- és NaCl kezelések hatására keletkező H_2O_2 szerepet játszhat a sztómazárásban. Az alkalmazott SA- és NaCl koncentrációk már 6 óra alatt is szignifikánsan csökkentették a sztómakonduktanciát a levelek abaxiális oldalán (3. ábra). Ez különösen jelentős volt a letális 10^{-3} és 10^{-2} M SA valamint a 250 mM NaCl-kezelt növények esetén (3. ábra), amely kezelések később a növények pusztulását is előidézték.



3.ábra: A sztómakonduktancia (g_s) változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, $n=6$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A 10^{-3} - 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések erőteljesen hatnak a növények vízháztartására, továbbá a sztómák zárása miatt, a CO_2 diffúziójának gátlása következtében a fotoszintézis hatékonyságát is csökkenthetik. A mért sztómakonduktancia csökkenésének megfelelően alakul a hatodik órára a CO_2 asszimiláció (A) a külső CO_2 koncentráció (C_a) függvényében, azaz a 10^{-3} - 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl koncentrációknál drámaian csökken (4. ábra). A kapott eredmények kapcsán meg kell jegyezni, hogy a két legmagasabb SA koncentrációval és a 250 mM NaCl-dal kezelt növények később elpusztulnak.



4.ábra: A CO_2 asszimilációs görbék (A/C_a) változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, $n=3$).

A CO_2 asszimilációs görbék paramétereinek változása alapján a hat órás 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és 250 mM NaCl-kezelt növények görbéinek telítési értékei ($A_{\max}$) alacsonyabbak a kontrollénál (1. táblázat). A karboxilációs hatékonyság (CE) szintén csökkent értéket mutat a 10^{-3} - 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelést követően a kontrollhoz képest, és ezeknél a kezelt növényeknél a CO_2 kompenzációs pont (C_{cp}) értékei is magasabb értékek felé tolódnak a kontrollhoz képest (1.

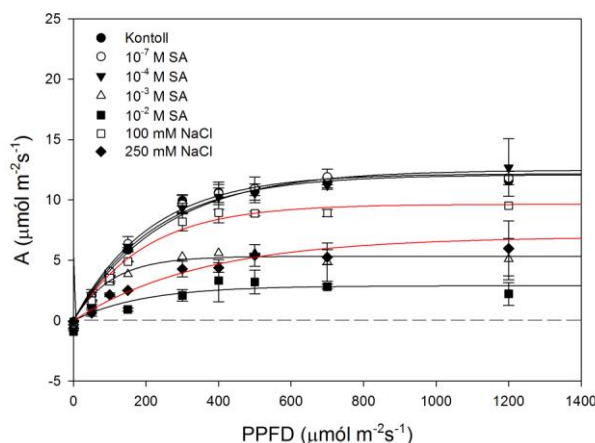
táblázat). Bár a 100 mM NaCl kezelés hatására az $A_{\max}$ nem csökken szignifikánsan, a CE értéke igen és a C_{cp} is magasabb értéket mutat a kontrollhoz képest a 10^{-3} - 10^{-2} M SA kezelésekhez hasonlóan (1. táblázat).

1.táblázat

A CO ₂ asszimilációs görbék (A/C _a) változása			
Kezelések	$A_{\max}$ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	CE ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)($\mu\text{mol m}^{-1}$) ⁻¹	C_{cp} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-1}$)
Kontroll	20,99 ± 2,15 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	53,09 ± 1,39 ^d
10 ⁻⁷ M SA	22,06 ± 2,86 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	55,90 ± 0,94 ^{cd}
10 ⁻⁴ M SA	19,13 ± 2,32 ^a	0,08 ± 0,00 ^b	57,34 ± 5,85 ^{cd}
10 ⁻³ M SA	10,85 ± 3,54 ^b	0,02 ± 0,00 ^d	65,50 ± 0,90 ^{bc}
10 ⁻² M SA	7,99 ± 1,10 ^b	0,02 ± 0,00 ^d	94,46 ± 6,18 ^a
100 mM NaCl	19,76 ± 0,91 ^a	0,05 ± 0,00 ^c	73,32 ± 1,84 ^b
250 mM NaCl	2,79 ± 0,19 ^c	0,06 ± 0,00 ^c	73,89 ± 1,89 ^b

A CO₂ asszimilációs görbék (A/C_a) paramétereinek változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően. $A_{\max}$: a telítési görbe maximuma ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); CE: a karboxilációs hatékonyság ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)($\mu\text{mol m}^{-1}$)⁻¹; C_{cp} : a CO₂ kompenzációs pont ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-1}$). Átlag±SE, n=3. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A CO₂ koncentráció függvényében mért CO₂ asszimilációhoz hasonlóan alakul a CO₂ asszimiláció (A) a fényintenzitás függvényében (PPFD) is a hatórási SA- és NaCl kezelések hatására (5. ábra). A 10^{-3} - 10^{-2} M SA koncentrációk és a 100-250 mM NaCl hatására drámaian csökken a CO₂ asszimiláció minden fényintenzitáción a kontrollhoz képest (5. ábra).



5.ábra: A fénygörbék (A/PPFD) változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3).

A fénygörbék paramétereinek változása alapján megállapítható, hogy a 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a 100-250 mM NaCl-kezelt növények görbéinek telítési pontjai ($A_{\max}$) szignifikánsan alacsonyabbak a kontrolléhoz képest (2. táblázat). A 10^{-2} M SA kezelés hatására csökken leginkább az $A_{\max}$ értéke (2. táblázat). A kvantumhasznosítás (Q) szintén csökkent értékeket

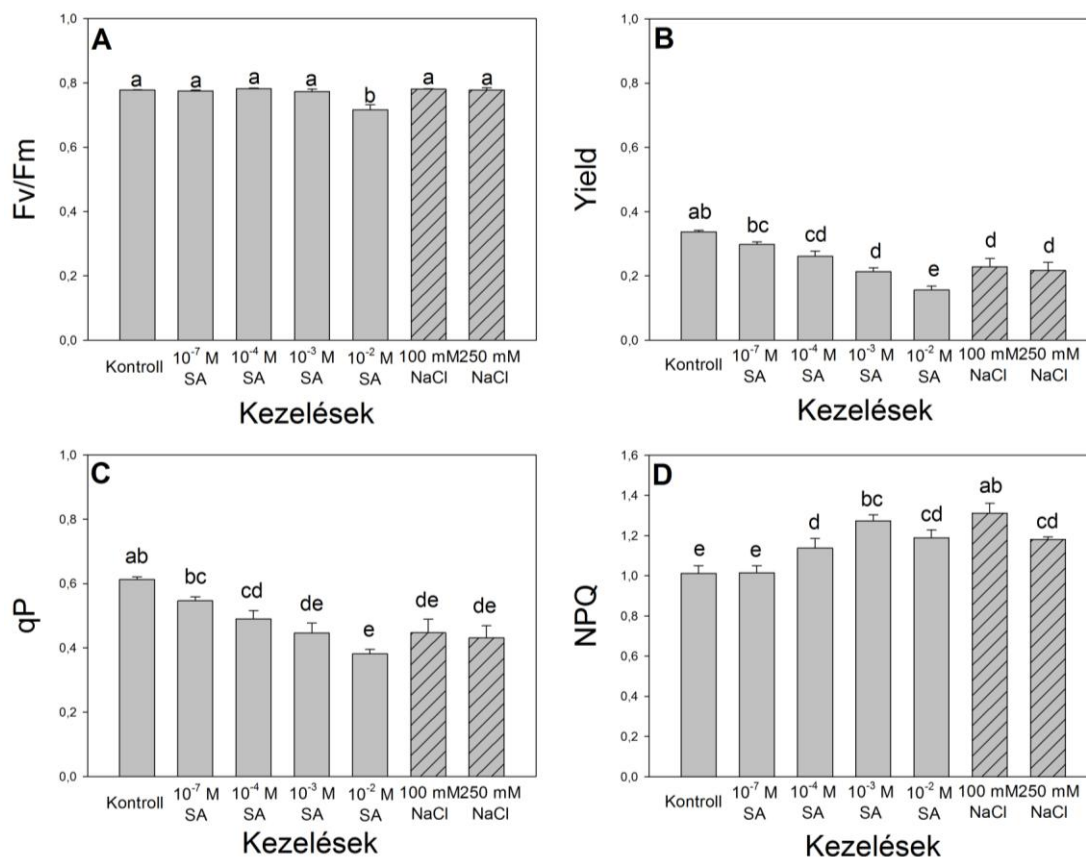
mutat a 10^{-2} M SA és a 100-250 mM NaCl kezeléseket követően a kontrollhoz képest (2. táblázat). Míg a sötétlégzés (Rd) a 10^{-3} M SA és a 100-250 mM NaCl kezelések hatására szignifikánsan csökken, a 10^{-2} M SA hatására megnő (2. táblázat). A fény kompenzációs pont (Lcp) értéke az Rd értékeihez hasonlóan változik (2. táblázat).

2.táblázat

Fénygörbék paramétereinek változása				
Kezelések	A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Q ($\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ foton}$)	Rd ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Lcp ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Kontroll	12,54 $\pm$ 0,89 ^a	0,041 $\pm$ 0,001 ^{ab}	0,67 $\pm$ 0,08 ^b	16,22 $\pm$ 1,7 ^b
10⁻⁷ M SA	12,18 $\pm$ 0,52 ^a	0,045 $\pm$ 0,002 ^a	0,66 $\pm$ 0,12 ^b	13,54 $\pm$ 3,8 ^b
10⁻⁴ M SA	11,88 $\pm$ 0,56 ^a	0,040 $\pm$ 0,002 ^{ab}	0,59 $\pm$ 0,07 ^b	13,93 $\pm$ 1,3 ^b
10⁻³ M SA	4,95 $\pm$ 0,30 ^c	0,037 $\pm$ 0,000 ^{ab}	0,33 $\pm$ 0,01 ^c	8,75 $\pm$ 1,2 ^{bc}
10⁻² M SA	2,22 $\pm$ 0,53 ^d	0,012 $\pm$ 0,000 ^d	0,90 $\pm$ 0,01 ^a	75,34 $\pm$ 3,6 ^a
100 mM NaCl	9,68 $\pm$ 0,13 ^b	0,035 $\pm$ 0,001 ^b	0,15 $\pm$ 0,01 ^c	4,16 $\pm$ 1,5 ^c
250 mM NaCl	5,72 $\pm$ 0,77 ^c	0,026 $\pm$ 0,005 ^c	0,28 $\pm$ 0,12 ^c	9,92 $\pm$ 4,2 ^{bc}

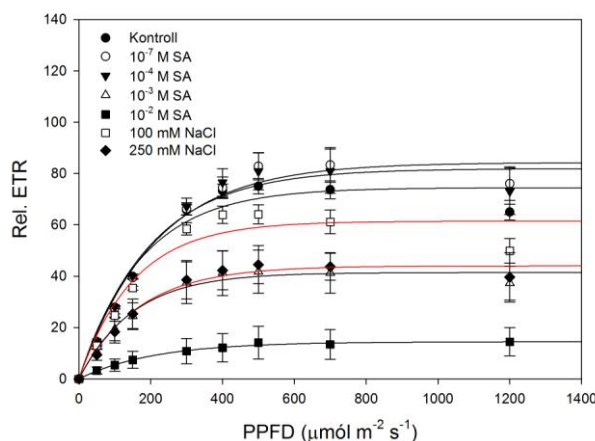
A fénygörbék (A/PPFD) paramétereinek változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően. A_{max}: a telítési görbe maximuma ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Q: a kvantumhasznosítás ($\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ foton}$); Rd: a sötétlégzés ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Lcp: a fény kompenzációs pont ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Átlag $\pm$ SE, n=3. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek megváltozása a fotoszintetikus apparátusban történő változásokra utalnak. A második fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrumok maximális kvantumhasznosítása (Fv/Fm) egyedül a 10^{-2} M SA kezelés hatására csökken szignifikánsan a kontrollhoz képest a levelekben (6. ábra). Az effektív kvantumhasznosítás (Yield) és a fotokémiai kioltás (qP) azonban már a 10^{-4} - 10^{-2} M SA- és a 100-250 mM NaCl-kezelteknél is szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest (6. ábra). A hődisszipáció mértéke (NPQ) ugyanezen kezelése hatására szignifikánsan megemelkedik a kontrollhoz viszonyítva (6. ábra). A 10^{-2} M SA-kezelt növények alacsony klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméter értékei a kezelt növény órákon belül bekövetkező pusztulására is utalhat.



6.ábra: A klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek változása (A: Fv/Fm; B: Yield; C: qP; D: NPQ) megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). (Fv/Fm: maximális kvantumhasznosítás; Yield: effektív kvantumhasznosítás; qP: fotokémiai kioltás; NPQ: nem fotokémiai kioltás) A különböző jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A relatív fotoszintetikus elektron transzport (Rel. ETR) a fényintenzitás függvényében (PPFD) felvett görbéi a 10⁻³-10⁻² M SA és a 100-250 mM NaCl kezelések hatására jelentősen csökkennek a kontrollhoz képest (7. ábra).



7.ábra: A Rel. ETR görbék (ETR/PPFD) változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3).

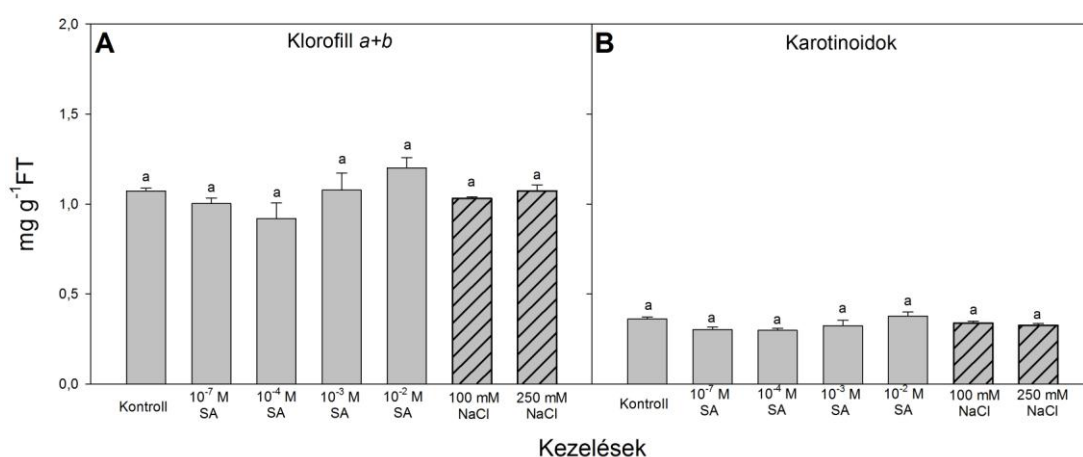
A Rel. ETR görbék paramétereinek változása alapján megállapítható, hogy a 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a 250 mM NaCl-kezelt növények görbéinek telítési pontjai (Rel. ETR_{max}) és a görbék kezdeti lineáris szakaszára illesztett egyenes meredeksége (α) szignifikánsan alacsonyabbak a kontrollénál (3. táblázat). 10^{-2} M SA kezelés hatására csökkennek leginkább az említett paraméterek (3. táblázat). A minimális telítő fényintenzitás (I_k) értéke egyedül a 10^{-2} M SA kezelés hatására nő meg a kontrollhoz képest (3. táblázat).

3.táblázat

Rel. ETR görbe paramétereinek változása			
Kezelések	Rel. ETR _{max}	α	I_k ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Kontroll	$74,99 \pm 3,55^a$	$0,28 \pm 0,005^a$	$267,79 \pm 11,69^a$
10^{-7} M SA	$78,82 \pm 6,84^a$	$0,27 \pm 0,005^a$	$289,45 \pm 29,81^a$
10^{-4} M SA	$82,25 \pm 9,18^a$	$0,27 \pm 0,005^a$	$294,14 \pm 28,61^a$
10^{-3} M SA	$41,59 \pm 8,02^b$	$0,19 \pm 0,044^b$	$224,02 \pm 23,89^a$
10^{-2} M SA	$15,93 \pm 4,52^c$	$0,05 \pm 0,023^c$	$357,49 \pm 33,26^b$
100 mM NaCl	$61,55 \pm 4,29^{ab}$	$0,24 \pm 0,006^{ab}$	$250,73 \pm 23,73^a$
250 mM NaCl	$44,03 \pm 7,79^b$	$0,18 \pm 0,042^b$	$250,95 \pm 23,29^a$

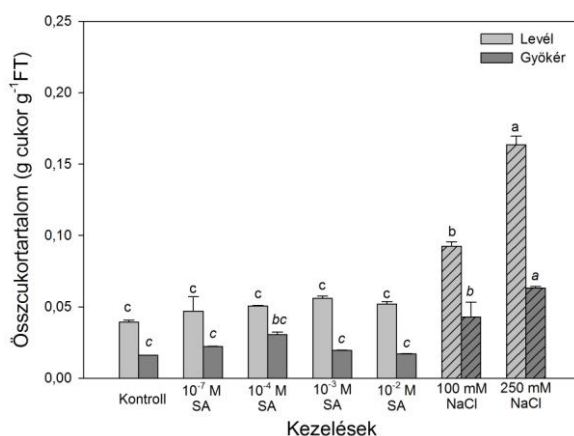
A Rel. ETR görbék paramétereinek változása megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően. Rel. ETR_{max}: a relatív elektron transzport maximuma; α : a görbe kezdeti lineáris szakaszának a meredeksége; I_k : a minimális telítő fényintenzitás ($I_k = \text{Rel. ETR}_{\text{max}}/\alpha$). Átlag $\pm$ SE, n=3. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Az SA és NaCl kezelések az első hat óra alatt nem változtatják meg szignifikánsan a fotoszintézisben résztvevő klorofill *a+b* (10. ábra, A) és a karotinoidok mennyiségét a kontrollhoz képest (8. ábra, B).



8.ábra: A pigmenttartalmak változása (A: klorofill *a+b*; B: karotinoidok) megvilágított paradicsom növények levelében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A cukrok a fotoszintézis termékei, amelyek szintje egyedül a 100-250 mM NaCl kezelés hatására nő meg szignifikánsan a kontrollhoz képest a levelekben és a gyökerekben (9. ábra), amihez a légzés csökkenése (R_d) is hozzájárulhat (2. táblázat).

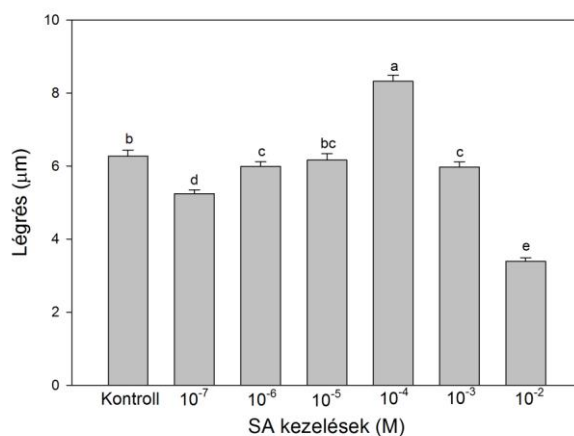


9.ábra: Az összcukortartalom változása megvilágított paradicsom növények levelében és gyökerében 6 óráig 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

A paradicsomnövények pusztulását előidéző SA és NaCl koncentrációk jelentősen gátolják a sztómakonduktanciát, a CO₂ fixációt, a fotoszintetikus elektrontranszportot, és növelik a ROS termelést a növényekben.

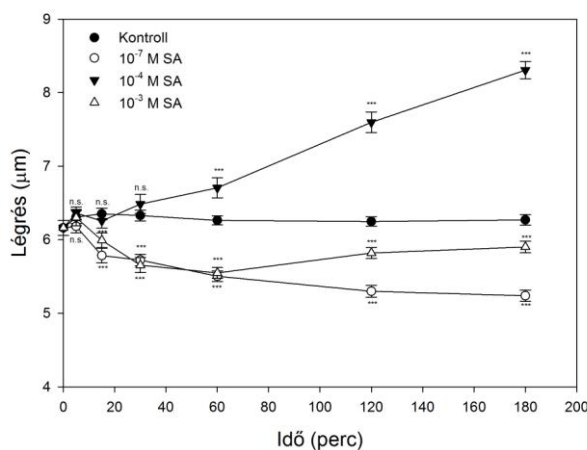
5.2. A szalicilsav közvetlen hatása a sztómaműködésre paradicsomlevél epidermisznyúzatán

A különböző koncentrációjú SA kezelések az intakt levelekhez képest eltérő módon hatnak a paradicsomlevél alsó epidermisznyúzat sztóma légréseinek nyitottságára (10. ábra). A három órás szubletális 10⁻⁷-10⁻⁶ M SA és a letális 10⁻³-10⁻² M SA kezelés hatására a sztómák eltérő mértékű, de szignifikáns záródása figyelhető meg, míg 10⁻⁴ M SA hatására a sztómák nyitódása következik be a kontrollhoz képest (10. ábra).



10.ábra: A légrés méretének változása paradicsom levél alsó epidermisznyúzáton 3 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) kezelést követően, nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 6,15) (Átlag $\pm$ SE, n=90). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

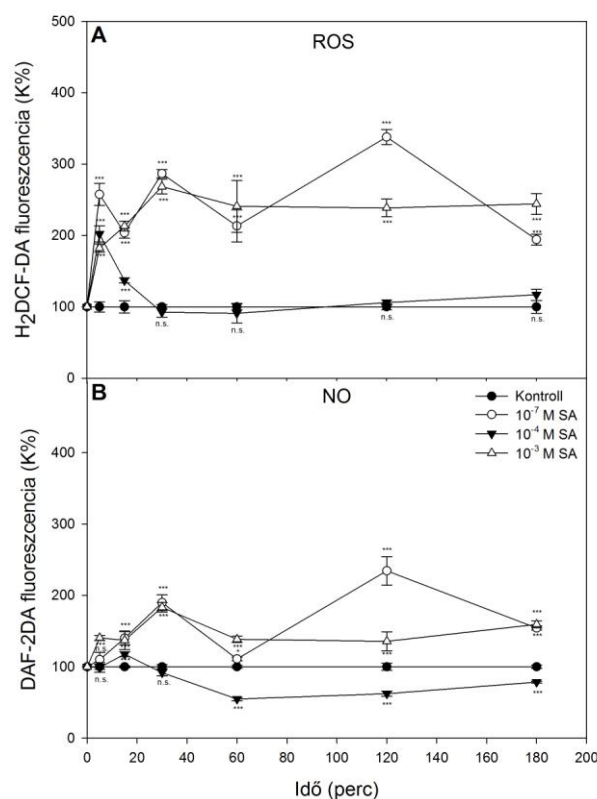
A kezelések közül kiválasztott és továbbvizsgált, alacsony koncentrációjú (10^{-7} M) SA és a PCD-t kiváltó magas koncentrációjú (10^{-3} M) SA hatására a szómák záródása már a kezelést követő 15. percre megfigyelhető a kontrollhoz képest (11. ábra). Ezzel szemben a sztómák nyitódnak a 10^{-4} M SA kezelés hatására a 60. perctől (11. ábra). A három órás kezelés során a sztómák végig megőrizték az életképességüket (FDA festéssel ellenőrizve), a PCD csak később következik be a magas koncentrációjú SA kezelés hatására.



11.ábra: A sztóma apertúra méretének változása az idő függvényében paradicsom levél alsó epidermisznyúzáton 3 órás 10^{-7} - 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően, nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 6,15) (Átlag $\pm$ SE, n=90). A *-gal jelölt kezelt minták az SA mentes kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A zárósejtek ROS (H_2O_2) és NO produkcióját az idő függvényében határoztuk meg, hogy megvizsgáljuk szerepüket az SA-indukálta sztómazárásban. A sztómazáródással párhuzamosan növekszik a zárósejtek ROS és NO produkciója a kontrollhoz képest. A ROS produkció már 5 percen belül szignifikánsan megnő mindkét SA kezelés hatására (12.ábra, A). A 10^{-7} M és a 10^{-3} M

kezelés hatására 30 perc után figyelhető meg a ROS produkció maximuma (12. ábra, A). A 10^{-4} M SA kezelés hatására egy átmeneti ROS fokozódást követően csökkenés tapasztalható (12. ábra, A). A 10^{-7} M és a 10^{-3} M kezelést követően 30 perc után szignifikánsan megnő az NO produkció, míg a 10^{-4} M SA hatására lecsökken a kontrollhoz képest (12. ábra, B).



12.ábra: A zárósejtek ROS- (A) és NO- (B) produkciójának változása a kontrollhoz képest az idő függvényében paradicsom levél alsó epidermisznyúzatán 3 órás 10^{-7} - 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően, nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 6,15) (Átlag±SE). A *-gal jelölt kezelt minták az SA mentes kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

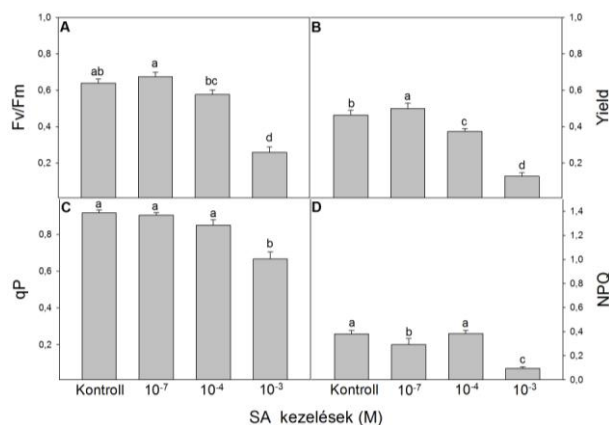
A ROS és NO modulátorok szignifikánsan hatnak az SA-indukálta sztómamozgásra (4.táblázat). A ROS kioltó 300 U SOD, 1 mM ASA, 100 U KAT és a 0,01 mM DPI a NADPH-oxidáz gátlószere, valamint a 0,2 mM cPTIO, az NO kioltója szignifikánsan csökkenti a 10^{-7} és 10^{-3} M SA-indukálta sztómazárást (4. táblázat). Az 1 mM ASA és az 1 mM EGTA kivételével egyik blokkoló sem hat a kontrollra. Hasonlóképpen, a 10^{-4} M SA kivételével az EGTA Ca²⁺-kelátor gátolja a 10^{-7} és 10^{-3} M SA-indukálta sztómazárást (4. táblázat), ami megerősíti a sztómazárásban a citoplazmatikus [Ca²⁺] megemelkedésének szerepét.

4.táblázat

ROS és NO modulátorok hatása az SA-indukálta sztómamozgásra				
Modulátorok	A légrés mérete (μm)			
	SA kezelések (M)			
	Kontroll	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻³
-	6,27 ± 0,17 ^d	5,24 ± 0,11 ^t	8,32 ± 0,17 ^a	5,97 ± 0,14 ^e
1 mM EGTA	7,96 ± 0,22 ^{ab}	7,92 ± 0,21 ^{ab}	8,30 ± 0,19 ^{ab}	7,31 ± 0,20 ^c
300 U SOD	6,34 ± 0,18 ^d	5,73 ± 0,11 ^e	8,20 ± 0,16 ^{ab}	6,03 ± 0,10 ^{de}
1 mM ASA	7,44 ± 0,13 ^c	6,22 ± 0,12 ^d	8,23 ± 0,12 ^{ab}	7,32 ± 0,16 ^c
100 U KAT	6,20 ± 0,19 ^{de}	5,85 ± 0,11 ^e	7,81 ± 0,25 ^{bc}	6,24 ± 0,10 ^d
0,2 mM cPTIO	6,62 ± 0,21 ^d	5,87 ± 0,13 ^e	7,12 ± 0,15 ^c	7,33 ± 0,12 ^c
0,01 mM DPI	6,42 ± 0,12 ^d	6,54 ± 0,13 ^d	7,46 ± 0,16 ^c	6,52 ± 0,11 ^d

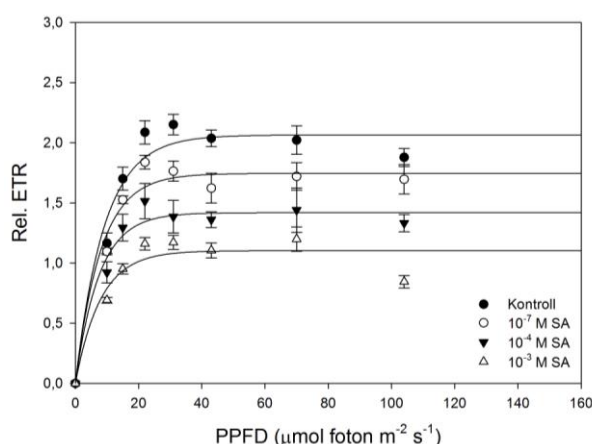
A Ca²⁺-kelátor 1 mM EGTA, a ROS kioltó 300 U SOD, 1mM ASA, 100 U KAT, az NO kioltó 0,2 mM cPTIO, és a NADPH-oxidáz gátló 0,01 mM DPI hatása a légrés nyitottságára (μm) paradicsom levél alsó epidermisznyúzatán 3 órás 10⁻⁷-10⁻³ M szalicilsav (SA) kezelést követően, nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 6,15). Átlag±SE, n=90. A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Meghatároztuk a zárósejtek klorofill *a* fluoreszcencia paramétereinek változását. A zárósejtek sokkal érzékenyebben reagáltak az SA kezelésekre és a fényre, ami a nyúzat egy sejtréteg vastagságával magyarázható, valamint azzal, hogy a fonák epidermisz eredetileg a növényen nincs kitéve erős fényhatásnak. Mind a négy paraméter (Fv/Fm, Yield, qP, NPQ) értéke szignifikánsan csökken a 10⁻³ M SA kezelés hatására a zárósejtekben a kontrollhoz képest (13. ábra). A 10⁻⁴ M SA hatására csökken az effektív kvantumhasznosítás (Yield); a qP és az NPQ azonban nem változik szignifikánsan a kontrollhoz képest (13. ábra).



13.ábra: A zárósejtek klorofill *a* fluoreszcencia paramétereinek (A: Fv/Fm; B: Yield; C: qP; D: NPQ) változása paradicsom levél alsó epidermisznyúzatán 3 órás 10⁻⁷-10⁻³ M szalicilsav (SA) kezelést követően, nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 6,15) (Átlag±SE, n=9). Fv/Fm: maximális kvantumhasznosítás; Yield: effektív kvantumhasznosítás; qP: fotokémiai kioltás; NPQ: nem fotokémiai kioltás. A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A zárósejtek relatív elektrontranszportja (Rel. ETR) az alkalmazott SA koncentráció függvényében szintén csökken a kontrollhoz képest (14. ábra).



14.ábra: A zárósejtek relatív elektrontranszportjának (Rel. ETR) változása paradicsom levél alsó epidermisznyúzáton 3 órás 10^{-7} - 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 6,15). $\text{Rel. ETR} = 0.84 \cdot 0.5 \cdot \text{PPFD} \cdot (\text{Fm}' - \text{F}) / \text{Fm}'$. (Átlag $\pm$ SE, n=9).

A zárósejtek Rel. ETR görbék paramétereinek változása alapján megállapítható, hogy a 10^{-7} - 10^{-3} M SA kezelések hatására az alkalmazott koncentráció függvényében csökken a relatív elektron transzport maximuma ($\text{Rel. ETR}_{\text{max}}$), a görbék kezdeti lineáris szakaszára illesztett egyenes meredeksége (α) és a minimális telítő fényintenzitás (I_k) értéke a kontrollhoz képest a 10^{-3} M SA kezelés kivételével, ahol az I_k értéke megnő (5. táblázat).

5.táblázat

A zárósejtek relatív elektrontranszportjának (Rel. ETR) paramétereinek változása			
Kezelések	Rel. ETR_{max}	α	I_k ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Kontroll	$2,30 \pm 0,07^a$	$0,12 \pm 0,007^a$	$18,39 \pm 1,18^{\text{ns}}$
10^{-7} M SA	$1,81 \pm 0,09^b$	$0,10 \pm 0,001^a$	$16,95 \pm 0,66^{\text{ns}}$
10^{-4} M SA	$1,48 \pm 0,14^c$	$0,10 \pm 0,007^a$	$14,90 \pm 2,50^{\text{ns}}$
10^{-3} M SA	$1,20 \pm 0,04^d$	$0,06 \pm 0,005^b$	$19,72 \pm 1,35^{\text{ns}}$

A zárósejtek relatív elektrontranszport (Rel. ETR) paramétereinek változása paradicsom levél alsó epidermisznyúzáton 3 órás 10^{-7} - 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően nyitó pufferben (10 mM MES/TRIS, 10 mM KCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 6,15). $\text{Rel. ETR}_{\text{max}}$: a relatív elektron transzport maximuma; α : a görbe kezdeti lineáris szakaszának a meredeksége; I_k : a minimális telítő fényintenzitás ($I_k = \text{Rel. ETR}_{\text{max}} / \alpha$). Átlag $\pm$ SE, n=9. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján (ns: nem szignifikáns).

Megállapítható tehát, hogy az SA sztómákra gyakorolt hatása eltér az intakt növény és az epidermisznyúzat esetén. A paradicsomnövények halálát okozó koncentrációk azonban a zárósejtek esetében is jelentősen gátolják a fotoszintézist.

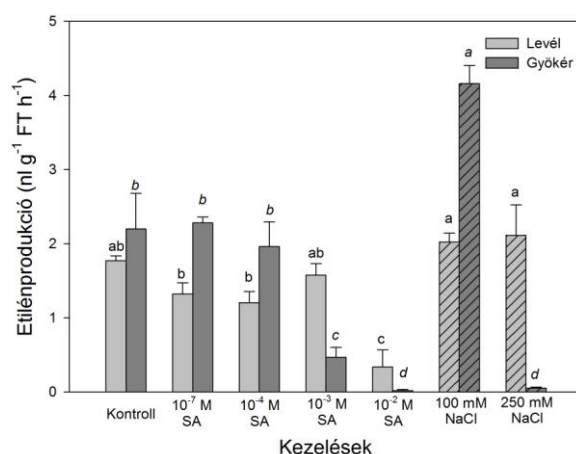
5.3. A sejthalál indukció főbb komponenseinek vizsgálata 6 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben

5.3.1. Az etilénprodukciónak, ROS, NO és az életképesség változása

A növényi szövetek etilénprodukciónak fokozódása hozzájárulhat a szenescencia, illetve a sejszintű PCD indukciójához, ezért megmértük a levelek és a gyökerek ET produkcióját a kezelt paradicsom növényekben.

Az alkalmazott letális (10^{-3} - 10^{-2} M) SA koncentrációk csökkentik a gyökerek ET emisszióját a hatodik órában a kontrollhoz képest (15. ábra). A letális, 250 mM NaCl koncentráció szintén csökkenti az ET produkciót a gyökerekben, míg a szubletális, 100 mM NaCl ugyanitt serkenti azt (15. ábra).

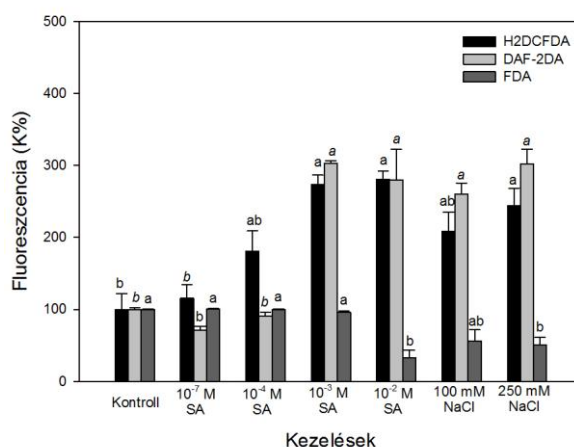
Megállapítható tehát, hogy az intakt növényekben a szubletális SA koncentrációk az ET produkciót nem csökkentik szignifikánsan, míg a 100 mM NaCl kezelés szignifikáns növekedést vált ki, a letális SA és NaCl koncentrációk mindkét esetben csökkentik a gyökerek ET szintézisét. Az ET produkció fokozódása tehát nem játszik szerepet a PCD indukciójában a letális SA és NaCl kezelések hatására, intakt paradicsom növények gyökerében. Mindez a 100 mM-os NaCl koncentrációnál mérsékelten, míg a 10^{-4} M SA-nál kisebb SA koncentrációknál nem figyelhető meg.



15.ábra: Az etilénprodukciónak változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

Az ET produkció jelentős csökkenése a gyökérben figyelhető meg, ezért fluoreszcens festékek segítségével megvizsgáltuk, hogyan hat ez a gyökércsúcsokban bekövetkező ROS és NO produkcióra, valamint az életképesség megváltozására (16. ábra). A növekvő koncentrációjú SA kezelések hatására a gyökércsúcs ROS produkciója szignifikánsan megemelkedik a kontrollhoz képest (16. ábra). A NaCl kezelések szintén növelik a gyökércsúcsok ROS produkcióját a kontrollhoz képest (16. ábra). Az NO produkció a 10^{-3} - 10^{-2} M SA és a 100 mM és 250 mM NaCl kezelések hatására emelkedik meg szignifikánsan a kontrollhoz képest a gyökércsúcsokban (16. ábra). A hatodik órára a 10^{-2} M SA- és 250 mM NaCl-kezelt növények gyökércsúcsában csökken szignifikánsan az életképesség (16. ábra).

A letális koncentrációjú kezelések hatására tehát a gyökércsúcsban megemelkedik a ROS és NO produkció, ami rövid időn belül az életképesség csökkenéséhez vezet.

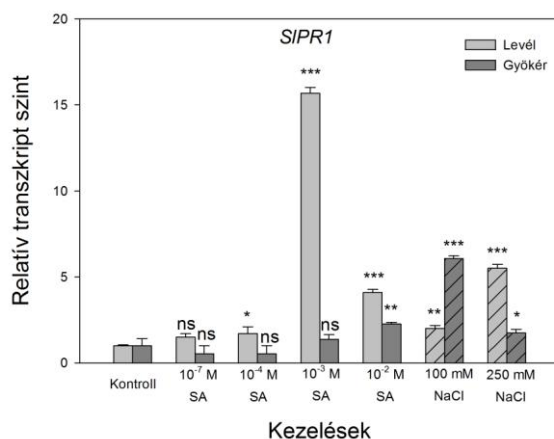


16.ábra: A reaktív oxigénformák- (H_2DCFDA) és a nitrogén-monoxid ($DAF-2DA$) produkciójának és az életképességnek (FDA) a változása paradicsom növények gyökércsúcsában (0,5 mm) 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő festékek esetén (dőlt betűvel jelölve a $DAF-2DA$ -val mért adatok).

5.3.2. Génexpressziós változások: az SA jelátvitelében szereplő, a patogenezissel kapcsolatos *SIPR1*

Az alkalmazott SA és NaCl kezelések hatására több, a PCD indukciójában szerepet játszó, az irodalom alapján internetes adatbázisokból (NCBI, Sol Genomics Network) kiválasztott markergén expressziójában jelentős különbségek mutatkoznak a kezeléseket követő hatodik órában a kontrollhoz képest. A patogenezissel kapcsolt gén, az SA jelátvitelében kulcsszerepet játszó *SIPR1* expressziója az alkalmazott letális, 10^{-3} - 10^{-2} M SA koncentrációk esetében szignifikánsan nő a kontrollhoz képest, ami azt mutatja, hogy ezen esetekben az SA által

indukált jelátviteli folyamat bekapcsolt állapotban van (17. ábra). Nő az *SlPR1* gén expressziója a 250 mM NaCl-kezelt növények levelében, valamint a 100 mM NaCl-kezelt növények gyökerében is, ami azt bizonyítja, hogy a *PR1* gént abiotikus stresszor is indukálhatja (17. ábra). Az *SlPR1* gén expresszió növekedése önmagában tehát nem a sejthalál indukciójának bekövetkezését jelzi.

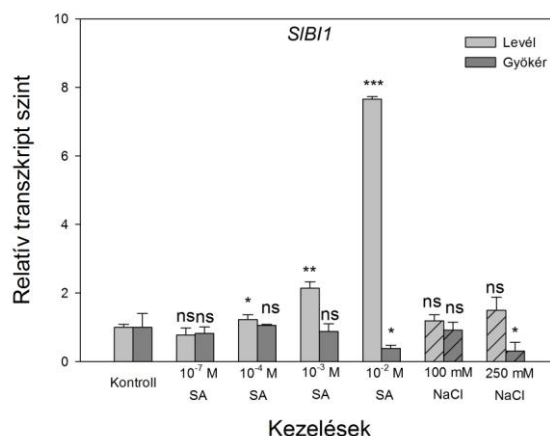


17.ábra: Az *SlPR1* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

5.3.3. Génexpressziós változások: az antiapoptotikus *Bax Inhibitor-1* és a jelátvitelben szereplő *MAP3K α*

A Bax Inhibitor-1 (*SlBI1*) egy evolúciósan erősen konzervált fehérje (2. melléklet). Az *SlBI1* paradicsomban az 1-es kromoszómán helyezkedik el, a 396 bp által kódolt fehérje molsúlya 14,97 kDa (4. melléklet). A gén promóter régiójában többek között találhatóak TC-gazdag ismétlődések, ami a védekezési- és stresszválaszban résztvevő *cisz*-ható elem, szárazság indukálta válaszban résztvevő MYB kötő szekvencia (MBS), gomba elicitor válasz elem (Box-W1), továbbá az SA válaszban résztvevő *cisz*-ható elem (TCA) is (5. melléklet).

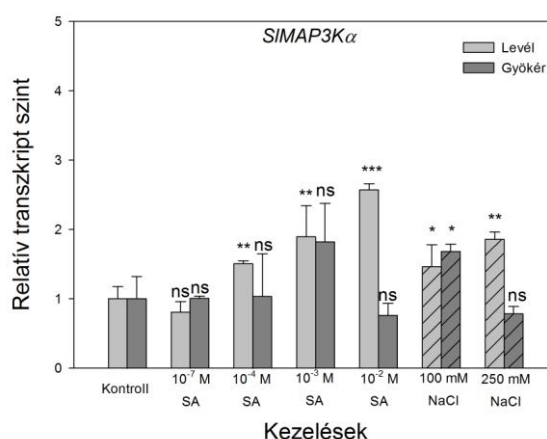
Az *SlBI1* expressziója a letális koncentrációjú és gyors PCD-t okozó 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelés hatására lecsökken a gyökérben, ami a kezelések elsődleges támadáspontja, míg a 10^{-4} - 10^{-2} M SA-kezelt növények levelében nő a kontrollhoz képest (18. ábra).



18.ábra: Az *SIB1* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A MAPK kaszkárendszer alkotó *SIMAP3K α* , az abiotikus és biotikus stresszorok által indukált jelátvitel egyik gyakori eleme, a 11-es kromoszómán helyezkedik el a paradicsomban, az 1845 bp hosszúságú gén által kódolt fehérje súlya 67,02 kDa (4. melléklet). A gén promóter régiójában többek között találhatóak TC-gazdag ismétlődések, amik a védekezési- és stresszválaszban résztvevő *cis*-ható elemek, a szárazság indukálta válaszban résztvevő MYB kötő szekvenciák (MBS), ABS (ABRE), és ET válasz elemek (ERE) is (5. melléklet).

Az *SIMAP3K α* expressziója a 10^{-4} - 10^{-2} M SA- és a NaCl-kezelt növények levelében, valamint kis mértékben, nem szignifikánsan a 10^{-3} M SA-kezelt növények gyökerében nő a kontrollhoz képest (19. ábra). Ugyancsak mérsékelten emeli a gén expresszióját a 100 mM-os NaCl kezelés a gyökérben.



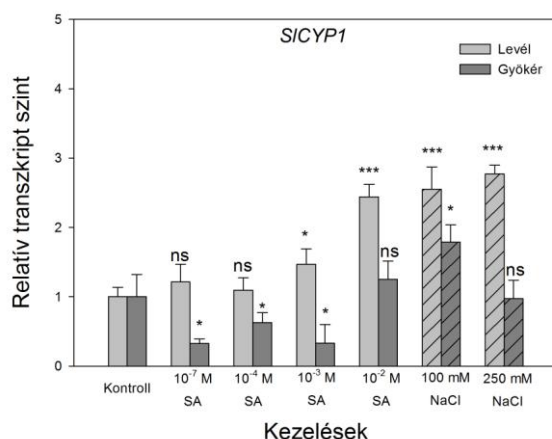
19.ábra: Az *SIMAP3K α* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

Az eredmények azt mutatják, hogy a növényekben a letális koncentrációjú kezelések esetén is megnőhet az antiapoptotikus gének expressziója. A fenti változások a PCD inhibitor *SIB1* expressziójának csökkenését és a jelátviteli komponens, az *SIMA3K α* expresszió növekedésének a hiányát mutatják a letális SA- és NaCl-kezelt paradicsom növények gyökerében.

5.3.4. Génexpressziós változások: a proapoptotikus *cisztein proteázok*

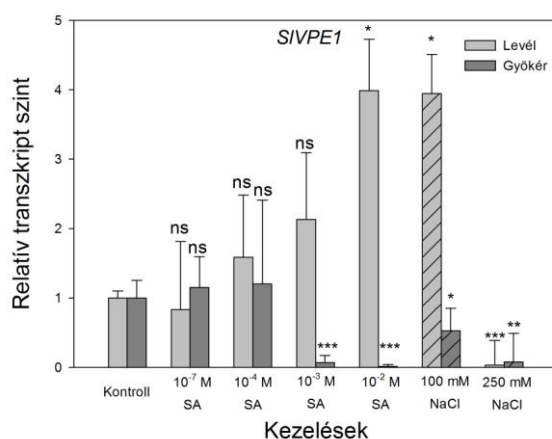
Internetes adatbázisokból (NCBI, Sol Genomics Network) kigyűjtöttük a cisztein proteázokat kódoló, fehérjére átfordított szekvenciákat, majd homológia illesztést végeztünk (ClustalW) és megszerkesztettük a homológiafát (Dendroscope 3.2.2.). A cisztein proteáz alcsaládok jól elkülönülnek az átfordított fehérjeszekvenciákból készült szekvencia rokonsági fán (1. melléklet), amely alapján egy-egy fehérjét kódoló gént választottunk ki a papain szerű cisztein proteázok- (Solyc12g088670.1: *SICYP1*), vakuoláris processzáló enzimek- (Solyc08g065610.2: *SIVPE1*), metakaspázok- (Solyc09g098150.2: *SIMCA1*) alcsaládjából a további vizsgálatokhoz. A kiválasztott gének különböző kromoszómán helyezkednek el, 1400-2000 bp hosszúak, és az általuk kódolt fehérjék súlya 45-54 kDa (4. melléklet). Mindhárom gén vizsgált promóter régiójában található szárazság indukálta válaszban résztvevő MYB kötő rész (MBS) (5. melléklet). Az *SICYP1* és *SIVPE1* promóter régiójában többek között találhatóak TC-gazdag ismétlődések, amelyek a védekezési- és stresszválaszban résztvevő *cisz*-ható elemek, továbbá az SA válaszban résztvevő *cisz*-ható elemek (TCA) (5. melléklet). Az *SIMCA1* promóter régiójában találhatóak gomba elicitor- (Box-W1) és etilén válasz elemek (ERE) is (5. melléklet).

A papain-szerű cisztein proteázok közül az *SICYP1* gén expressziója a szubletális és a lassú PCD-t okozó 10^{-3} M-os SA kezelések hatására csökken, míg a letális SA és NaCl kezelések hatására nem változik a gyökérben a kontrollhoz képest (20. ábra). A 10^{-2} M SA- és a NaCl-kezelt növények levelében szignifikánsan nő a *SICYP1* gén expressziója a kontrollhoz képest (20. ábra).



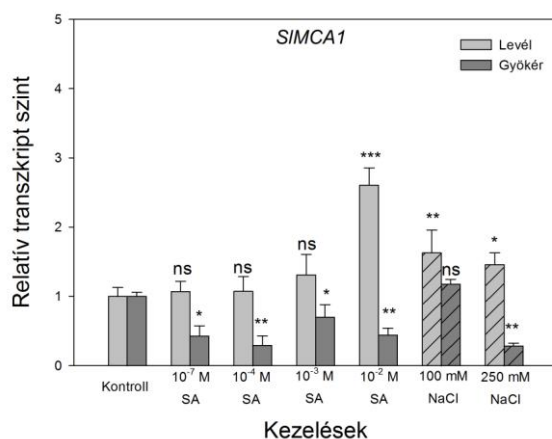
20.ábra: Az *SICYP1* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 óráig 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A vakuoláris processzáló enzimek közül az *SIVPE1* expressziója a letális 10^{-2} M SA- és a 100 mM NaCl-kezelt növények levelében szignifikánsan nő, míg a letális SA és NaCl kezelések hatására a gyökérben szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest (21. ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy az *SIVPE1* expressziójában a kezelést követő 6. órában detektálható változás nem mutat korrelációt a PCD-vel, aminek oka az adott VPE izoenzim expressziós kinetikájában való eltérés lehet (ezzel kapcsolatban történtek előkísérletek).



21.ábra: Az *SIVPE1* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 óráig 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A metakaspázok közül az *SIMCA1* gén expressziója valamennyi SA kezelés és a 250 mM NaCl kezelés hatására szignifikánsan csökken a gyökérben, míg a 10^{-2} M SA és a NaCl kezelések hatására nő a kontrollhoz képest a levelekben (22. ábra).



22.ábra: Az *SIMCA1* génexpressziós szintjének változása paradicsom növények levelében és gyökerében 6 óras 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SD, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

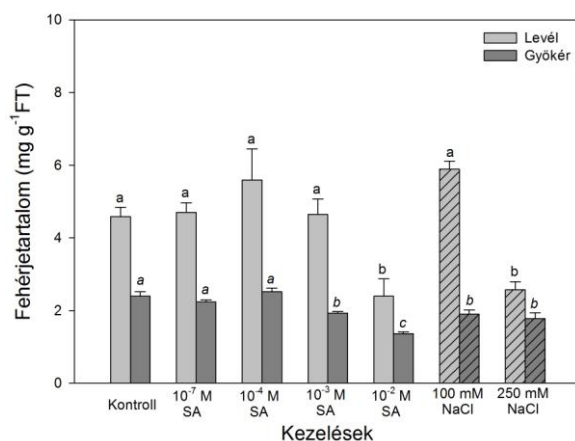
Megállapítható tehát, hogy a letális SA és NaCl kezelések az *SICYP1* és *SIMCA1* gének expresszióját növelik a levelekben, míg az *SIVPE1* és *SIMCA1* génekét csökkentik paradicsom növények gyökerében. A proapoptotikus *SICYP1*, *SIVPE1* és *SIMCA1* minden esetben jelentős expresszió fokozódást mutatott a gyors PCD-t indukáló 10^{-2} M SA kezelés hatására a növények hajtásában.

5.4. A sejthalál terminációja 24 órás kezeléseket követően paradicsom növényekben

5.4.1. A proteázok aktiválódása

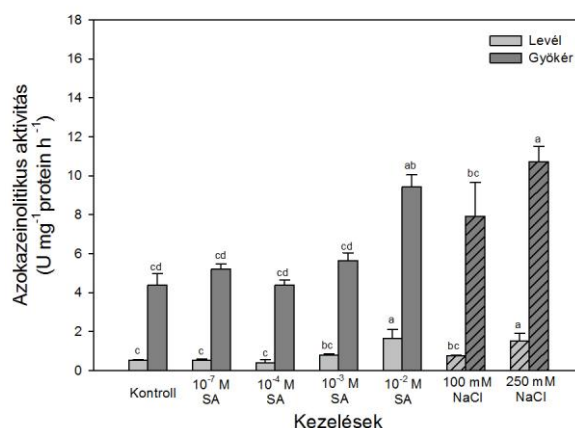
A proteázok a fehérjék általános degradációját okozva hozzájárulhatnak a PCD terminációjához a növényekben is.

A 24 órás letális koncentrációjú 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések hatására a levelek és gyökerek fehérjetartalma szignifikánsan lecsökken a kontrollhoz képest (23. ábra). Az ugyancsak PCD-t kiváltó 10^{-3} M SA és tolerálható 100 mM NaCl kezelés szintén csökkenti a gyökerek fehérjetartalmát ebben az időpontban (23. ábra). A Na^+ jelenlétében a fehérjetartalom csökkenésének azonban valószínűleg eltérő oka van, mint az SA kezelt növények gyökerében.



23.ábra: A fehérjetartalom változása paradicsom növények levelében és gyökerében 24 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

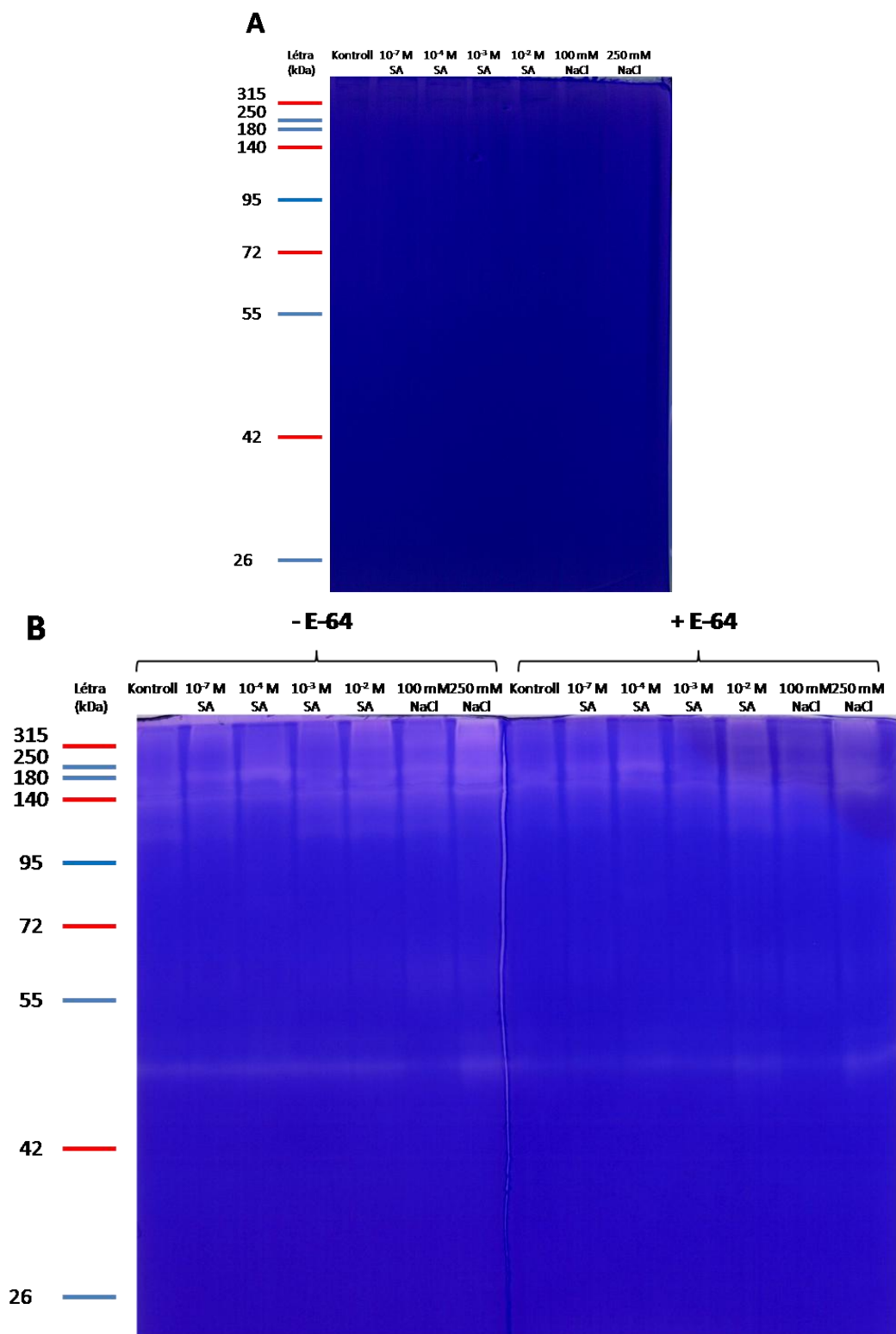
A fehérjetartalom csökkenésével párhuzamosan nő a 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések hatására a növények levelében és gyökerében a proteázaktivitás a kontrollhoz képest (24. ábra). A változás különösen a gyökerekben jelentős.

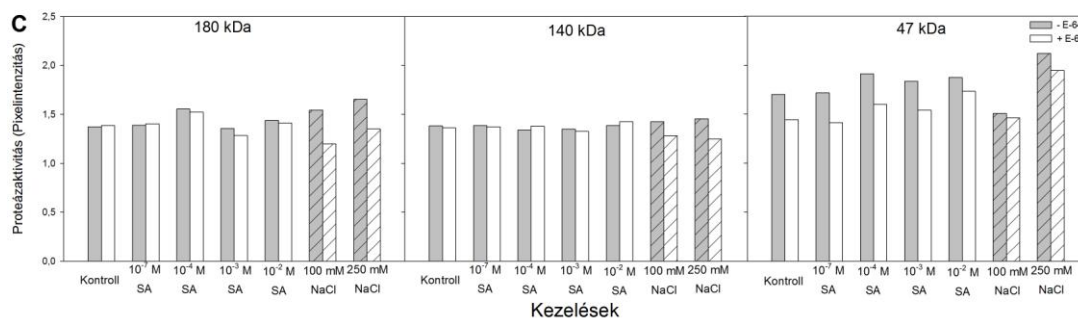


24.ábra: A proteázaktivitás változása paradicsom növények levelében és gyökerében 24 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

A proteázaktivitás kimutatható zselatin-SDS-PAGE segítségével. A kezeléseket követő 24. órában azonban a levélmintákban semmilyen proteázaktivitás nem detektálható a zselatin-SDS-PAGE segítségével (25. ábra, A). Az alkalmazott SA és NaCl koncentrációk függvényében nő a proteázaktivitás a 24. órára a gyökerekben (25. ábra, B). Specifikus cisztein proteáz blokkoló (E-64) segítségével kimutatható, hogy az alkalmazott kezelések hatására a gyökerekben valóban a cisztein proteázok aktivitása is megnő a 24. órában a kontrollhoz képest (25. ábra, B). A képelemzés segítségével megállapítható, hogy a fehérje létra alapján ~180 kDa súlyú

proteáz aktivitása a NaCl kezelések hatására megemelkedik, aminek egy része az E-64 blokkolóval gátolható, míg a 140 kDa súlyú fehérje aktivitásában a kezelések hatására nincs különbség (25. ábra, C). A 47 kDa tömegű proteáz aktivitásmérése megerősíti, hogy az SA kezelések, de különösen a 250 mM NaCl erőteljesen fokozza a cisztein proteáz aktivitását a gyökérben (25. ábra, C).



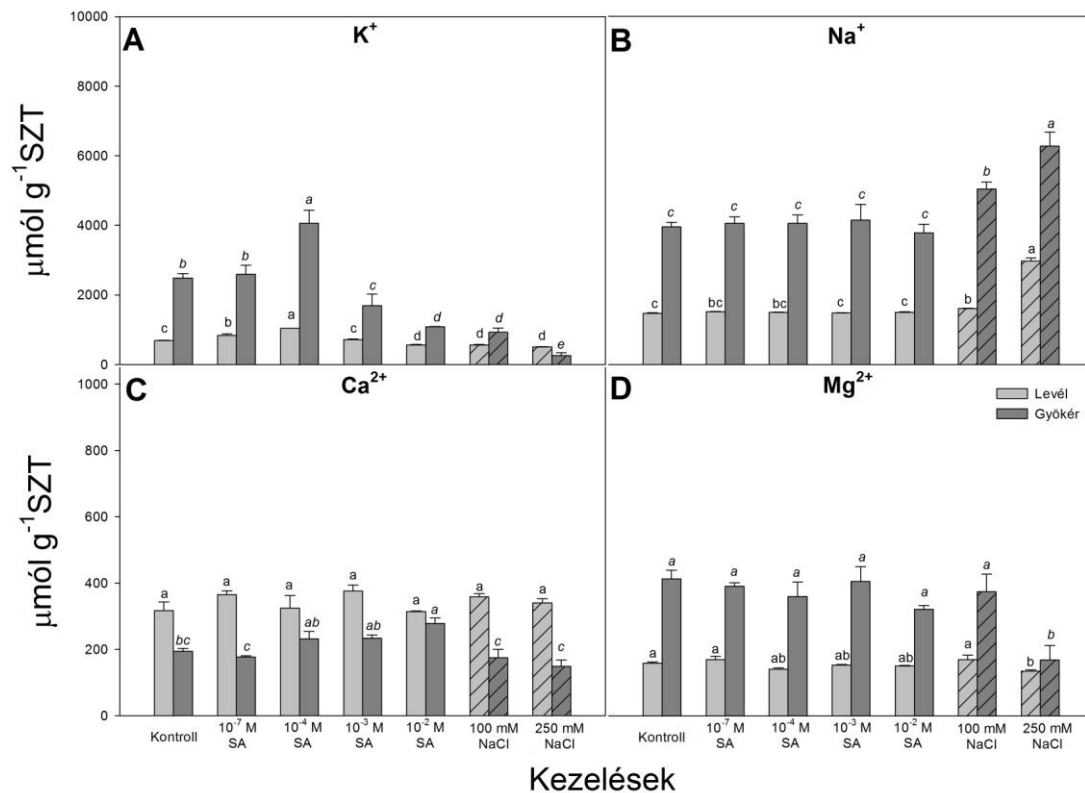


25.ábra: A proteázaktivitás változásának kimutatása zselatin-SDS-PAGE (12,5% poliakrilamid; 0,1% zselatin) segítségével paradicsom növények levelében (A) ill. gyökerében (B) 24 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően, specifikus cisztein proteáz blokkoló (E-64) nélkül ill. jelenlétében. A proteázaktivitás világos csíkként látszik a sötét háttérben. A proteázok azonosítása előfestett standard fehérje létrával (Lonza Rockland Inc., USA, Rockland) történt (a gél jobb oldalán). A proteázaktivitás meghatározását a gélen a Digimizer 4.2.2.0. képelemző program segítségével kvantifikáltuk (C).

Megállapítható tehát, hogy a letális dózisban alkalmazott SA és NaCl kezelések hatására aktiválódó proteázok egy része cisztein proteáz lehet.

5.4.2. Az ionhomeosztázis megváltozása

A 24 órás SA és NaCl kezelések hatására jelentősen megváltozik a levelek és gyökerek elemtartalma. A letális koncentrációjú 10^{-3} - 10^{-2} M SA és a 100 ill. 250 mM NaCl kezelés hatására szignifikánsan lecsökken a gyökerek és levelek kálium tartalma a kontrollhoz képest (26. ábra, A). Ezzel szemben a 10^{-4} M SA-kezelt növények levelében és gyökerében szignifikánsan nő a kálium tartalom 24 órával a kezelés után (26. ábra, A). A nátrium tartalom a levelekben és a gyökerekben egyedül a NaCl kezelések hatására, az alkalmazott koncentrációk függvényében nő (26. ábra, B). A kalcium tartalom nem változik szignifikánsan egyik kezelés hatására sem a levelekben, a gyökerekben azonban az alkalmazott SA kezelések hatására a koncentráció függvényében nő, a 10^{-2} M SA-kezelt növények gyökerében ez szignifikánsan különbözik a kontrolltól (26. ábra, C). A magnéziumtartalom egyedül a 250 mM NaCl kezelés hatására csökken szignifikánsan a levelekben és a gyökerekben szignifikánsan a kontrollhoz képest (26. ábra, D).

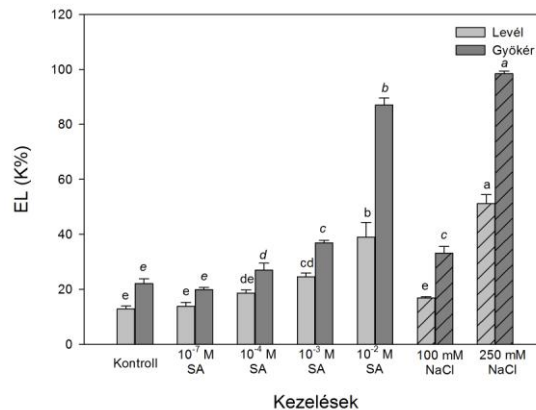


26.ábra: Az elemtartalom (A: K⁺; B: Na⁺; C: Ca²⁺; D: Mg²⁺) változása paradicsom növények levelében és gyökerében 24 órás 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok P<0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

Mivel a K⁺ hiány aktiválhatja a proteázokat, az iontartalmakban kapott változások jó összhangban vannak a proteázaktivitás megváltozásával.

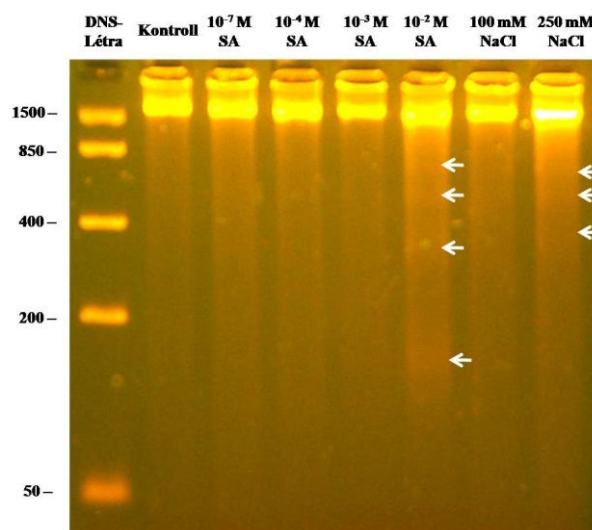
5.4.3. Az életképesség megváltozása az ionkieresztés alapján, a DNS fragmentációja

A levelek és a gyökerek életképessége az elektrolit kieresztés (EL) alapján az alkalmazott NaCl és SA koncentrációk függvényében szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest a 24. órára (27. ábra). A 10⁻² M SA és a 250 mM NaCl kezelés hatására a gyökerek elektrolit kieresztése csaknem eléri a 100%-ot (27. ábra).



27.ábra: Az ionkieresztés (EL) változása paradicsom növények levelében és gyökerében 24 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján, mely külön jelzi a különbségeket az eltérő szervekben (dőlt betűvel jelölve a gyökérben mért adatok).

A letális koncentrációjú, gyors PCD-t kiváltó 10^{-2} M SA és a 250 mM NaCl kezelés hatására a DNS internukleoszómális fragmentációja mutatható ki a paradicsom gyökerekben agaróz-gélelektroforézis segítségével a kezeléseket követő 24. órában (28. ábra).



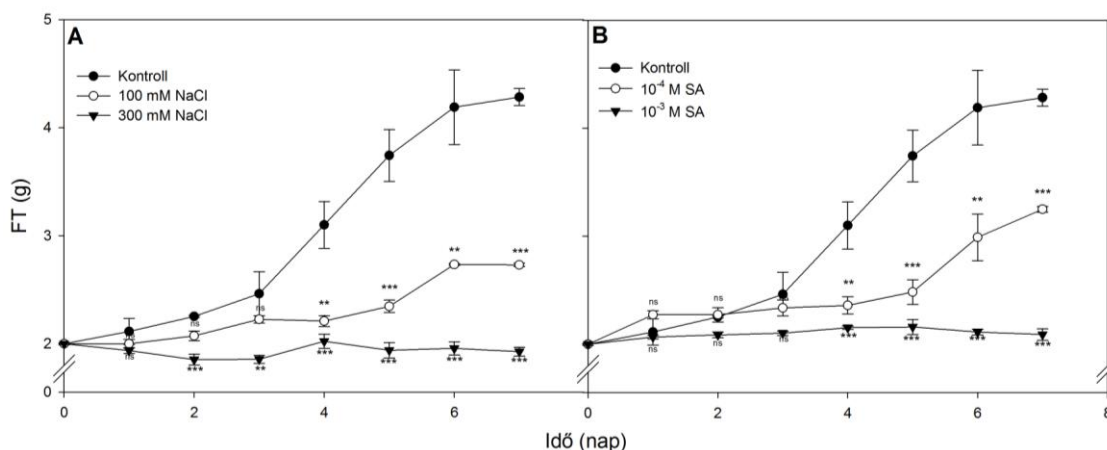
28.ábra: A DNS degradálódásának kimutatása agaróz-gélelektroforézissel paradicsom gyökerében 24 órás 10^{-7} - 10^{-2} M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően.

Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a letális SA és NaCl koncentrációk hatására már a kezelést követő 24. óra után megjelennek a PCD-re jellemző főbb változások, ami az SA esetén inkább a gyors PCD-t okozó 10^{-2} M-os kezelésnél mutat a letális sóstressz esetén is megfigyelhető jellegzetességeket.

5.5. A sejthalál indukciójának és jelátviteli komponenseinek vizsgálata paradicsom sejtszuspenzióban

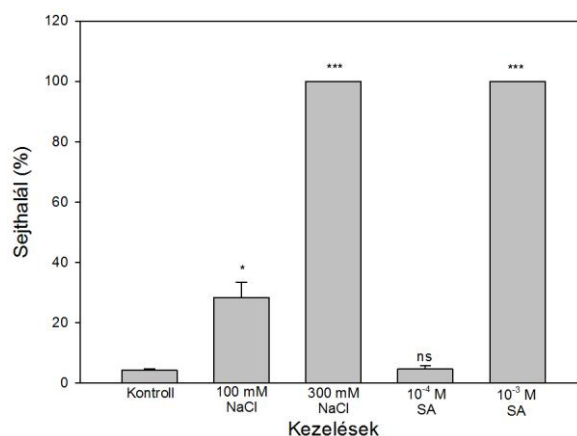
5.5.1. Növekedési kinetikák és elektrolit kieresztés

Az SA és a sóstressz által indukált PCD morfológiai, biokémiai és molekuláris biológiai markerei időrendben először a gyökerkezelés miatt a gyökérben jelentkeznek. A gyökér osztódó szöveteinek modellezésére egy klorofill-mentes szövetkultúrát, paradicsom sejtszuspenziót készítettünk, és a továbbiakban a sejthalál komponenseinek vizsgálatát ezzel végeztük (Papp 2010; Szopkó 2011). A sejtszintű vizsgálatokhoz először kalluszt, majd sejt kultúrát indítottunk, mely segítségével elsőként a NaCl és SA kezelések hatását a friss tömeg (FT) változására vizsgáltuk meg (29. ábra). A paradicsom sejtszuspenzió FT gyarapodása az idő függvényében szigmoid görbe szerint alakul (29. ábra). A görbe alapján megállapítható, hogy a paradicsom sejtszuspenzió FT növekedése kezdetben lassú (0-3. nap), azután felgyorsul (3. naptól). Egy ideig megközelítőleg exponenciálisnövekedés figyelhető meg (3-4. nap), ezután következik egy egyenes szakasz, mely során a növekedés lineáris (4-5. nap), végül leáll (7. nap). A 100 mM NaCl és a 10^{-4} M SA kezelések már a 3. naptól csökkentik a paradicsom sejtszuspenzió FT gyarapodását a kontrollhoz képest, melynek hatására a szigmoid görbe alakja megváltozik (29. ábra).



29.ábra: A paradicsom sejtszuspenzió tömeggyarapodásának változása 7 napos 100 és 300 mM NaCl (A), valamint 10^{-4} és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően (Átlag $\pm$ SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A 300 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására a sejtek elpusztulnak (30. ábra), amit az irreverzibilis elektrolit kiáramlás mutat (100%), és már az első nap kisebb a FT a kontrollhoz képest (29. ábra). Az elektrolit kiáramlás 30%-os növekedése után a sejtek kontroll oldatba helyezve regenerálódni tudtak (100 mM NaCl és 10^{-4} M SA).



30.ábra: Az elhalt sejtek százalékos arányának változása 100 és 300 mM NaCl, valamint 10^{-4} és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően paradicsom sejtuszuspenzióban (Átlag $\pm$ SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

A kezelések végére a kezdeti pH érték ($5,26 \pm 0,03$) a 100 és 300 mM NaCl kezelések hatására lecsökken (pH $4,97 \pm 0,05$ ill. $5,16 \pm 0,03$), míg a 10^{-3} M SA kezelés hatására a pH lúgosodik (pH $5,38 \pm 0,06$).

5.5.2. A sejtek elemtartalmának megváltozása

A sejtek elemtartalmában is jelentős változásokat okoznak a letális NaCl- és SA koncentrációk. A káliumion tartalom szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest az egy hetes 100 és 300 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására, míg a 10^{-4} M SA kezelés hatására nem változik szignifikánsan (6. táblázat). A sejtek nátriumion tartalma szignifikánsan megnő a NaCl kezelések hatására, míg a SA kezeléseknél nincs szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (6. táblázat). A K^+/Na^+ arány azonban szignifikánsan lecsökken nemcsak a NaCl-kezelt sejtekben, hanem a 10^{-3} M SA kezelések hatására is (6. táblázat). A kalciumion tartalom szignifikánsan megnő a 300 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására a sejtekben, míg a 100 mM NaCl és 10^{-4} M SA kezeléseknél nincs szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (6. táblázat). A magnéziumion tartalom a sóstressz hatására csökken, míg az SA kezeléseknél nincs szignifikáns változás a kontrollhoz képest a paradicsom sejtuszuspenzióban (6. táblázat). A kezelések hatására bekövetkező K^+ és Na^+ tartalom, valamint a K^+/Na^+ arány változása jó összhangban van a gyökérben kapott tendenciákkal.

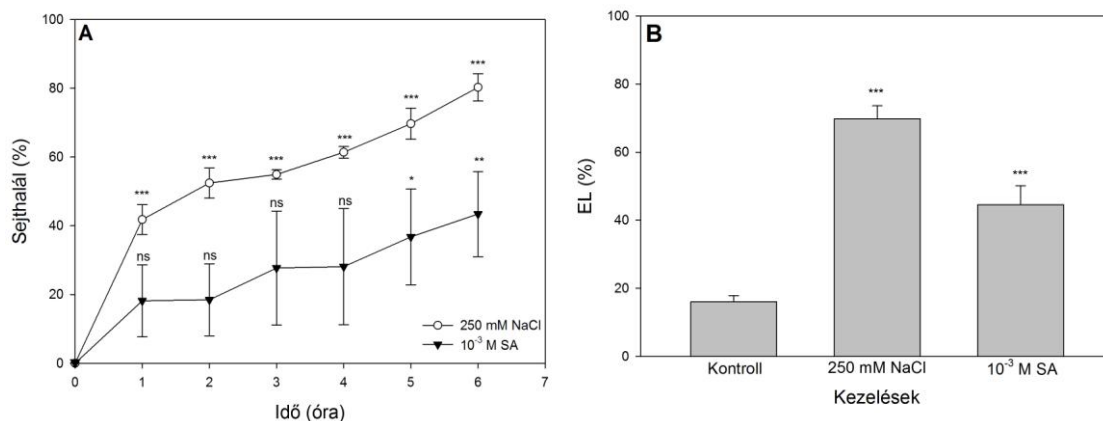
6.táblázat

Az elemtartalom és a K^+/Na^+ arány változása paradicsom sejtszuspenzióban					
Elemek ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{SZT}$)	Kezelések				
	Kontroll	100 mM NaCl	300 mM NaCl	10^{-4} M SA	10^{-3} M SA
K^+	$1887,14 \pm 29,0$	$947,62 \pm 102,7^{***}$	$716,08 \pm 26,6^{***}$	$1987,9 \pm 53,3^{ns}$	$892,56 \pm 19,2^{***}$
Na^+	$55,13 \pm 3,0$	$305,29 \pm 39,2^{***}$	$1244,64 \pm 78,4^{***}$	$55,01 \pm 1,9^{ns}$	$67,09 \pm 5,8^{ns}$
K^+/Na^+	$34,72 \pm 1,9$	$3,24 \pm 0,4^{***}$	$0,58 \pm 0,05^{***}$	$36,31 \pm 1,4^{ns}$	$13,87 \pm 1,3^{***}$
Ca^{2+}	$85,46 \pm 5,7$	$106,96 \pm 5,6^{ns}$	$165,40 \pm 4,2^{***}$	$99,47 \pm 9,5^{ns}$	$222,12 \pm 24,7^{***}$
Mg^{2+}	$135,43 \pm 7,5$	$86,14 \pm 7,2^*$	$82,73 \pm 12,1^*$	$141,01 \pm 7,0^{ns}$	$146,44 \pm 13,1^{ns}$

Az elemtartalom és a K^+/Na^+ arány változása egy hetes 100 és 250 mM NaCl vagy 10^{-4} és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően paradicsom sejtszuspenzióban. (Átlag $\pm$ SE, n=6). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

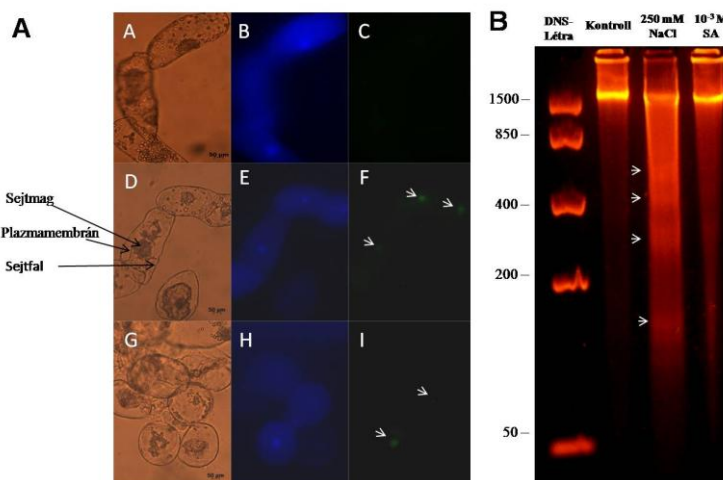
5.5.3. A PCD detektálása és kvantifikálása

A NaCl és SA kezelések által az FT-re kifejtett hatás alapján kiválasztottuk a letális 250 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezeléseket, hogy segítségükkel összehasonlítva vizsgáljuk meg a sejthalál indukcióját és jelátviteli komponenseit a paradicsom sejtszuspenzióban. Az elhalt sejtek százalékos arányának változását FDA festés segítségével határoztuk meg az első 6 órában. A 6 órás 250 mM NaCl és 10^{-3} M SA kezelést követően a sejthalál mértéke szignifikáns növekedést mutat az idő függvényében a kontrollhoz képest (31. ábra, A). A 250 mM NaCl kezelés hatására már a 2. órát követően szignifikánsan megnő a sejtek elhalása, míg a 10^{-3} M SA kezelés hatására csak az 5. órát követően figyelhető meg szignifikáns sejtpusztulás (31. ábra, A). Az ionkieresztés mértéke a 250 mM NaCl kezelés hatására csaknem 80%-os, a 10^{-3} M SA kezelés hatására több, mint 40%-os a kezelés 6. órájára (31. ábra, B). A 6 órás kezelést követő helyreállítódási kísérlet megerősítette, hogy a 250 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések által visszafordíthatatlanul indukálódik a sejthalál. A 6 órás kezelést követően a sejteket szűrőpapíron összegyűjtöttük majd kétszer 30 ml sejtszuspenziós közeggel átmostuk és új 100 ml-es Erlenmeyer lombikba raktuk, 30 ml friss szuszpenziós oldatba 24 órára, steril körülmények között. A helyreállítódás után a sejthalál mértékét FDA festéssel határoztuk meg. Az eredmények megerősítették, hogy mindkét hat órás kezelés indukálta a PCD-t, mivel a sejtek a friss médium ellenére már nem voltak élők.



31.ábra: Az elhalt sejtek százalékos arányának változása az idő függvényében (A) és az ionkieresztés (EL) változása 6 órás 250 mM NaCl és 10⁻³ M szalicilsav (SA) kezelést követően paradicsom sejtszuspenzióban (Átlag±SE, n=6). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

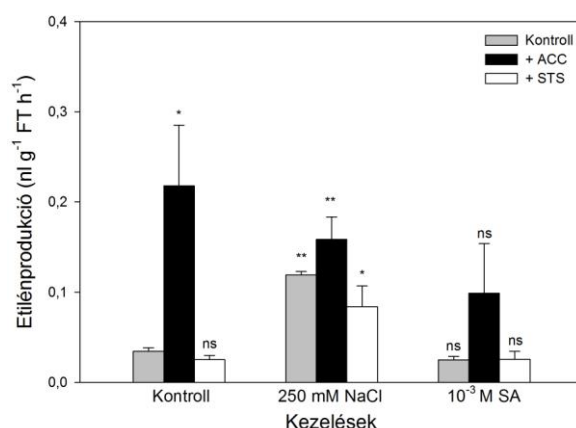
A kísérletek során megvizsgáltuk, hogy a két letális kezelés kiváltja-e a PCD-re jellemző főbb morfológiai változásokat. Mindkét kezelés hatására kimutatható a sejtmag zsugorodása és a kromatin kondenzációja (32. ábra, A). A PCD fő jellegzetességét, a DNS internukleoszómális fragmentálódást TUNEL-próbával vizsgáltuk meg. TUNEL-pozitív sejtmagok figyelhetők meg mind a 250 mM NaCl mind pedig a 10⁻³ M SA kezelések hatására a 6. órán (32. ábra, A). A TUNEL-pozitív sejtmagok száma 60% körül alakult a 250 mM NaCl kezelést követően és 22% körül a 10⁻³ M SA kezelés hatására. A DNS kivonása és elválasztása agaróz-gélelektroforézissel történt. A DNS fragmentálódása figyelhető meg a 250 mM NaCl-kezelt sejtekben a kezelést követő 6. órára, melyekben nagyarányú és előrehaladott a PCD (32. ábra, B). Habár a 10⁻³ M SA kezelés hatására TUNEL pozitív sejtek megfigyelhetők, a DNS létra a kezelés 6. órájára még nem alakult ki (32. ábra).



32.ábra: A DNS fragmentálódásának kimutatása TUNEL festéssel (A) és a DNS degradációjának kimutatása agaróz-gélelektroforézissel (B) 6 órás 250 mM NaCl és 10⁻³ M szalicilsav (SA) kezelést követően paradicsom sejtszuspenzióban. (Kontroll (A, B, C), 250 mM NaCl (D, E, F), 10⁻³ M SA (G, H, I), fénymikroszkópos képek (A, D, G); Hoechst 33258 festés (B, E, H); TUNEL-pozitív sejtmagok (C, F, I)).

5.5.4. Az etilénprodukciónak, ROS, NO és az életképesség változása

Az ET produkció a 250 mM NaCl kezelés hatására szignifikánsan megnő, míg a 10^{-3} M SA-val kezelt sejtek ET produkciója nem változik szignifikánsan a kontrollhoz képest a paradicsom sejtuszuspenzióban (33. ábra). Az ET produkcióját serkenti az ET prekursor, 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) a kezelésekkel együtt alkalmazva, ez azonban az SA jelenlétében nem bizonyult szignifikánsnak. Az ET receptor blokkoló ezüst-tiosulfát (STS) nem csökkenti az ET produkciót a kontroll és SA kezelt sejtekben, viszont csökkentette a NaCl-indukálta ET produkciót (33. ábra).

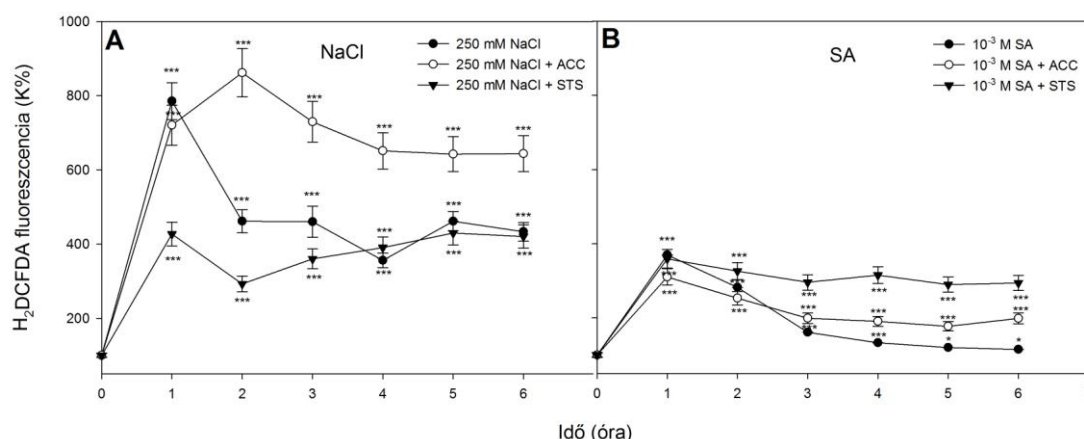


33.ábra: Az etilénprodukciónak változása 6 órás 250 mM NaCl és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően önmagában vagy az etilénprekursor 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC, 10 μ M) vagy az etilén receptor blokkoló ezüst-tiosulfát (STS, 20 μ M) párhuzamos alkalmazásával paradicsom sejtuszuspenzióban (Átlag $\pm$ SE, n=6). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

A letális NaCl és SA hatására erőteljes ROS produkció figyelhető meg a sejtekben, amely az első órát követően rendkívüli mértékben megnő a 250 mM NaCl kezelés hatására, kisebb mértékben a 10^{-3} M-os SA jelenlétében a kontrollhoz képest (34. ábra). A ROS produkció maximumát a második órától csökkenés követi, kisebb mértékben a 250 mM NaCl, nagyobb mértékben a 10^{-3} M-os SA kezelés esetében (34. ábra).

Hogy megvizsgáljuk az ET szerepét az oxidatív stressz indukciójában a NaCl- és SA-kezelt sejtekben, az ET szintézist fokoztuk az ET prekursor ACC hozzáadásával. Az első órában az ACC nem változtatja meg a ROS termelést a 250 mM NaCl-kezelt sejtekben, de a második órától megemeli a ROS felhalmozódást a kontrollhoz képest (34. ábra, A). A 10^{-3} M SA jelenlétében az ACC a 3. órától emeli meg a ROS termelést (34. ábra, B). Az STS ET receptor blokkoló alkalmazása csökkenti a ROS produkciót a sóstressz alatt az első órában, de a 4. órától a ROS termelés nem különbözik az STS nélküli, NaCl-kezelt sejtektől (34. ábra, A).

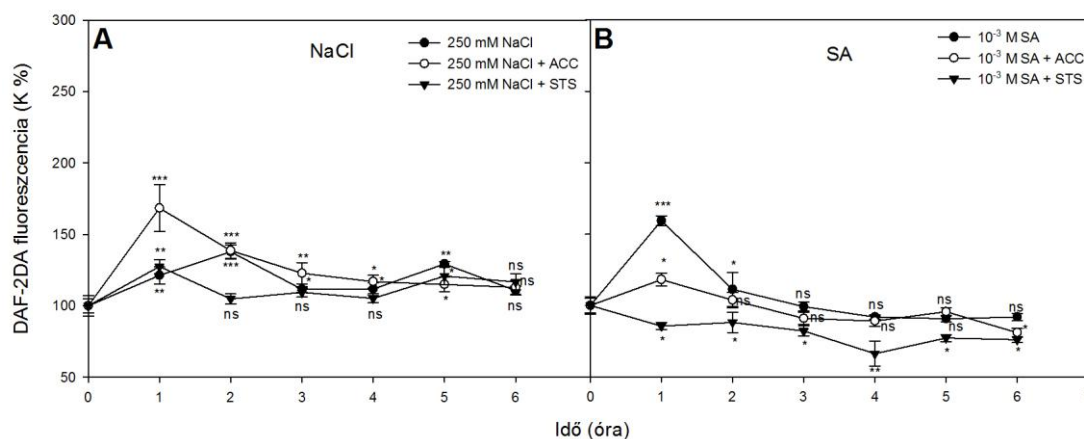
Azonban az STS együttes alkalmazása az SA mellett szignifikánsan megemeli a sejtek ROS produkcióját (34. ábra, B).



34.ábra: A sejtuszpenzió ROS produkciójának változása (H_2DCFDA festéssel) a kontrollhoz képest az idő függvényében 6 órás 250 mM NaCl és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően önmagában vagy az etilénprekursor, 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC, 10 μM) vagy az etilén receptor blokkoló ezüst-tioszulfát (STS, 20 μM) párhuzamos alkalmazásával paradicsom sejtuszpenzióban (Átlag $\pm$ SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

Az NO produkció is megváltozik az alkalmazott NaCl- és SA kezelések hatására a kontrollhoz képest az idő függvényében (35. ábra). A 250 mM NaCl hatására a fluoreszcencia intenzitás maximuma a második órában, a 10^{-3} M SA kezelés hatására az első órában volt megfigyelhető (35. ábra, A és B).

Az ET prekursor ACC növeli az NO produkciót az első órában a NaCl kezelés esetén, de nem különbözik szignifikánsan a 6 órás kezelés végéig a kontrolltól (35. ábra, A). Az ACC együttes alkalmazása a 10^{-3} M SA kezeléssel az első órában csökkenti, majd később nem okoz szignifikáns változást az NO produkcióban (35. ábra, B). Az STS kezelés 40%-os emelkedést eredményez az NO produkcióban a sókezelt sejtek esetében és szignifikánsan csökkenti az NO produkciót az SA-kezelt sejtekben (35. ábra, A és B).



35.ábra: A sejtuszpenzió NO produkciójának változása (DAF-2DA festéssel) a kontrollhoz képest az idő függvényében 6 órás 250 mM NaCl és 10^{-3} M szalicilsav (SA) kezelést követően önmagában, az etilénprekurzor, 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC, 10 μ M) vagy az etilén receptor blokkoló ezüst-tiosulfát (STS, 20 μ M) párhuzamos alkalmazásával paradicsom sejtuszpenzióban (Átlag $\pm$ SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

Specifikus gátlószerek alkalmazásával vizsgáltuk meg az egyes jelátviteli komponensek szerepét a sejthalál indukciójában, amit a sejthalál százalékában határoztunk meg. A 250 mM NaCl és 10^{-3} M SA által kiváltott sejthalál mértékét szignifikánsan csökkentette a Ca^{2+} kelátor, EGTA és a kalmodulin inhibitor, W-7 (7. táblázat). A O_2^- kioltó, SOD enzim, a H_2O_2 kioltó, KAT enzim és a NADPH-oxidáz gátlása DPI-vel jelentősen csökkenti a NaCl- és SA-indukálta sejthalált arra utalva, hogy a ROS mindkét jelátviteli út fontos eleme (7. táblázat). Az NO kioltó, cPTIO nincs szignifikáns hatással a NaCl- és SA-indukálta sejthalál mértékére (7. táblázat). Az ET prekursor ACC együttes alkalmazása a NaCl kezeléssel növeli a sejthalál mértékét a paradicsom sejtekben, de az SA-indukálta sejthalálra nincs hatással (7. táblázat). Az ET szintézis gátló AVG kis mértékben csökkenti a sejthalált a sóstressznek kitett sejtekben. Az ET receptor blokkoló STS szintén csökkenti a sóstressz indukálta PCD-t, viszont növeli az SA-indukálta (7. táblázat), ami jól korrelál a STS-indukálta ROS produkcióval az SA kezelés esetén (34. ábra). A MAPK blokkoló PD98059 és a cisztein proteáz inhibitor E-64 is csökkenti a NaCl- és SA-indukálta sejthalál mértékét (7. táblázat).

7.táblázat

Specifikus gátlószerek hatása a sejthalál mértékére 6 órás 250 mM NaCl és 10 ⁻³ M SA kezelést követően													
Specifikus gátlószerek													
Kezelések		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		10μM EGTA	10μM W-7	200 U SOD	100 U KAT	10mM DPI	200μM cPTIO	10μM ACC	10μM AVG	20μM STS	0.1μM PD98059	1μM E-64	
Sejthalál (%)	250 mM NaCl	80,2 ± 3,9	71,0 ± 1,0 *	67,7 ± 4,2 *	58,6 ± 3,0 **	52,1 ± 1,0 **	63,0 ± 1,7 **	77,4 ± 2,0 ns	89,3 ± 2,5 *	64,7 ± 4,8 *	67,5 ± 3,0 *	72,8 ± 1,0 *	68,1 ± 1,0 *
	10 ⁻³ M SA	43,3 ± 2,3	33,8 ± 1,0 **	37,0 ± 2,1 *	21,5 ± 1,4 ***	30,1 ± 1,0 **	15,0 ± 1,0 ***	43,7 ± 1,0 ns	45,6 ± 3,6 ns	45,1 ± 1,0 ns	55,6 ± 1,0 ***	30,3 ± 2,7 **	29,7 ± 1,3 **

Specifikus gátlók hatása a sejthalál mértékére (%) 6 órás a 250 mM NaCl és 10⁻³ M szalicilsav (SA) kezelést követően paradicsom sejtszuszpenzióban. A felhasznált gátlók: 10 μM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 10 μM N-(6-aminohexil)-5-klór-1-naftilszulfonamid hidroklorid (W-7), 200 U szuperoxid-dizmutáz, 100 U kataláz (KAT), 10 mM difenilén-jodónium klorid (DPI), 200 μM 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid (cPTIO), 10 μM 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC), 10 μM aminoetoxivinilglicin (AVG), 20 μM ezüsttiosulfát (STS), 0,1 μM 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-one (PD98059), 1 μM *transz*-epoxiszukcinil-L-leucilamido(4-guanidino)bután (E-64). (Átlag±SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól P≤0,05 (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

6. Eredmények értékelése

6.1. A sejthalál indukciója és a fotoszintetikus hatékonyság megváltozása a paradicsom növényekben

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, milyen különbségek figyelhetők meg a tolerálható sóstressz, a sóstressz akklimatizációt javító, szubletális SA koncentrációval történő kezelés hatása, valamint a magasabb, letális SA koncentrációk és a letális NaCl koncentrációk programozott sejthalált indukáló folyamatai között.

Munkacsoporthunk korábbi munkáiból ismert volt, hogy az abiotikus sóstressz akklimatizációt javító SA kezelések hatékonyabbá teszik a fotoszintézist (Szepesi 2009; Gémes 2011). Ezért elsőként megvizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációkban alkalmazott kezelések hogyan hatnak a növények fotoszintetikus aktivitására és a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterekre, továbbá a kezelések hozzájárulhatnak-e a fotoszintézis gátlásán keresztül a PCD indukciójához?

Az irodalomból ismert, hogy a NaCl és a SA hatására keletkező reaktív oxigénformák egymásba alakulva súlyosan károsítják a sejtmembránokat, fehérjéket, lipideket (Miller és mtsai. 2010; De Pinto és mtsai. 2012). Kísérleteink során megmértük, hogy az általunk alkalmazott NaCl és SA koncentrációk hogyan befolyásolják a levelekben a reaktív oxigénformák közül a H_2O_2 mennyiségét fényben és sötétben. A H_2O_2 tartalom szignifikánsan megnő a hat órás 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a 250 mM NaCl-kezelt növények levelében a fényen, míg sötétben ebben az időpontban nem különbözik szignifikánsan egyik koncentrációnál sem a kontrollhoz képest, bár az SA a kataláz gátlásán keresztül közvetlenül is hathat a H_2O_2 termelődésére (Horváth és mtsai. 2002). Az SA a gyökércsúcsokban is emeli a ROS produkciót. A H_2O_2 tartalom megnövekedése a fényen kezelt növények esetében a 250 mM NaCl és 10^{-2} - 10^{-3} M SA hatására önmagában is okozhatják a szövetek pusztulását, különösen a O_2^- feldúsulása (Asada 2006), aminek a koncentrációja a 10^{-3} M SA hatására jelentősen emelkedett az érközi foltok kialakulásakor. A fényen történő NaCl és SA kezelés hatására megemelkedő szöveti H_2O_2 a sötétben mértékhez képest bizonyíthatja, hogy a kezelt növényekben a fotoszintézis bekapcsolódása fokozza a sejtek és szövetek pusztulását okozó H_2O_2 mennyiségét, és ezáltal a PCD indukcióját is (Doyle és mtsai. 2010; Sierla és mtsai. 2013). A kapott eredmények azt is megerősítik, hogy nemcsak az SA bioszintézis, hanem az

SA hatása is a fény által szabályozott, ami döntően befolyásolja a növények védekezését és a HR-t (Genoud és mtsai. 2002; Zeier és mtsai. 2004; Kangasjarvi és mtsai. 2012).

A kezelések hatására keletkező H_2O_2 a levelekben indukálja a sztómazárást (Acharya és Assmann 2009). Az alkalmazott SA és NaCl koncentrációk már 6 óra alatt is szignifikánsan csökkentették a sztómakonduktanciát a levelek abaxiális oldalán, ami különösen jelentős volt a 10^{-3} és 10^{-2} M SA-, valamint a 100 és 250 mM NaCl-kezelt növények esetén. A vízkultúrában nevelt növények tápoldatához adott SA a gyökérsejtekben membrádepolarizációt okozott, ami az aktív transzport, így a K^+ felvétel gátlódásához, és ezáltal a vízpotenciál csökkenéséhez vezet egy órás inkubáció után (Szepesi és mtsai. 2009). Az SA-kezelt növények a vízháztartás homeosztázisának védelme érdekében a sztómákat bezárják. Hasonlóképpen történik az SA allelopatikus hatásának érvényesülése is a kompetíciós növényi kapcsolatokban (Hayat és mtsai. 2010). Ismert a NaCl kezelés hatására is a vízháztartás egyensúlyának megőrzése érdekében kialakuló sztómazárás és a fotoszintézis aktivitásának csökkenése (Garcia-Sanchez és mtsai. 2002).

A sztómakonduktancia értékének csökkenése korrelációban van a sztómazáródás mértékével. A kezelések hatására az intakt növényekben záródnak a sztómák, ami a CO_2 diffúzióját gátolja, ennek következtében a fotoszintézis hatékonysága is csökken. A hat órás NaCl- és SA kezelést követően a mért sztómakonduktancia csökkenésének megfelelően alakult a CO_2 asszimiláció (A), mind a CO_2 koncentráció (C_a), mind pedig a fényintenzitás (PPFD) függvényében, azaz a letális 10^{-2} - 10^{-3} M SA és 250 mM NaCl koncentrációknál drámaian csökken mindkettő $A_{\max}$ -, a karboxilációs hatékonyság- (CE) és kvantumhasznosítás (Q) értéke, ugyanakkor a CO_2 kompenzációs pont (C_{cp}) értékei eltolódnak a kontrollhoz képest. A fotoszintézis egyik fő limitáló tényezőjének, a CO_2 felvételnek, a sztómazáródás miatti gátlása következtében a későbbiekben ezeknek a növényeknek a növekedése és biomassza produkciója csökken és növények elpusztultak. A fotoszintézis gátlása és a kezelések letalitása közötti kapcsolatot az SA esetében a témában megjelent tanulmányaink fogalmazták meg először.

A fotoszintézis hatékonyságát azonban nemcsak a sztómák nyitottsága vagy zártsága szabályozza. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a hat órás exogén SA- és NaCl kezelések milyen hatással vannak magára a fotoszintetikus apparátusra, amit jól demonstrál a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek mérésén alapuló módszer (Guóth és mtsai. 2009). A PSII reakciócentrumok maximális kvantumhasznosítása, azaz a reakciócentrumok által begyűjtött összes fényenergia fotoszintézisre fordítható részét leíró Fv/Fm érték a letális 10^{-2} M koncentrációjú SA kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest, ami a PSII reakciócentrumának gyors destrukciójáról árulkodik, és előre jelzi a 10^{-2} M SA-kezelt

növények fotoszintézisének károsodását. Az effektív kvantumhasznosítás (Yield), a fotokémiai kioltás (qP), valamint a relatív fotoszintetikus elektron transzport maximuma (Rel. ETR_{max}) azonban a letális 10⁻² M SA kezelésén kívül a 10⁻³ M SA és a letális 250 mM NaCl kezelés hatására is szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. A hődiszzipáció mértéke (NPQ) ugyanezen kezelések hatására szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz viszonyítva. A kapott eredmények megerősítik, hogy a letális koncentrációjú SA és NaCl kezelések erőteljesen gátolják többek között a fotoszintetikus elektron transzportot, ami hozzájárulhat a ROS produkciójához (Janda és mtsai. 2012), így a PCD indukciójához a levélben.

A fotoszintézis hatékonysága szorosan kapcsolódik a fotoszintézisben résztvevő pigmentek mennyiségével is, melyek lebomlása átmeneti adaptív válasz lehet az oxidatív stresszel szemben (De Pinto és mtsai. 2012). Megvizsgáltuk a levelek klorofill *a+b* és karotinoid tartalmát, melyekre azonban a kezelések a 6. órában még nem voltak szignifikáns hatással, és amelyek csak a 24. órás kezeléseket követően változnak meg (Gémes 2011). Wu és mtsai. (2010) is csak 2 napos sóstressz hatására kaptak szignifikáns klorofill tartalom csökkenést paradicsomban. Ennek részben az oka az, hogy a keletkező szabadgyökök rövidtávon elsősorban a PSII reakciócentrumát degradálják, és ez csak később terjed ki a fénybegyűjtő komplexekben lévő pigmentekre.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a fotoszintézis termékeinek, az összecukor tartalomnak a változását is. Egyedül a NaCl kezelések hatására nőtt meg szignifikánsan az összecukor tartalom a kontrollhoz képest a levelekben és a gyökerekben, ami a sótoleráns paradicsom genotípusok egyik jellegzetes válasza is. A fénygörbénél kapott Rd értékek is azt mutatják, hogy a levelekben a sóstressz csökkenti a sötétlégzést, ami szénhidrát megőrző hatással járhat. Ezeknél a koncentrációknál a cukrok akkumulációja, mint kompatibilis ozmotikumok felhalmozódása, fontos szereppel bírhat a növények sóstressz akklimatizációjában a 100 mM NaCl koncentrációnál (Ghasempour és mtsai. 1998), ugyanakkor a magas cukorakkumuláció szenescenciát idéz elő a levelekben (Love és mtsai. 2008).

6.2. A szalicilsav hatása a sztómaműködésre paradicsomlevél epidermisznyúzáton

Mivel a fotoszintetikus aktivitás fontos szerepet játszik az ozmotikus adaptációban, hiányában a növények érzékenyebbé válnak az ozmotikus stresszre, így a sóstresszre is. A fotoszintetikus aktivitás egyik fontos szabályozója a sztómák záródása, ami a CO₂ diffúziójának gátlásával

limitálhatja a CO₂ fixációt. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy hogyan hat az SA a sztómaműködésre valamint az egyedi zárósejtek fotoszintetikus aktivitására közvetlenül, epidermisz nyúzatokon. Megvizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli komponensek vesznek részt az SA-indukált sztómazáródásban, különös tekintettel a ROS (H₂O₂) és az NO szerepére. Az irodalomban ugyanis még nem tisztázott teljesen, hogy az SA milyen mechanizmussal hat a sztómák működésére (Acharya és Assmann 2009). Bizonyítást nyert, hogy a H₂O₂ (Zhang és mtsai. 2001) és az NO (Apparao Kolla és Raghavendra 2007; Khokon és mtsai. 2011) az SA jelátvitelének komponense (Acharya és Assmann 2009), de arról nincs adat, hogy e kettő komponens akkumulációjának aránya az idő függvényében hogyan alakul a különböző SA koncentrációk hatására a zárósejtekben, és ez hogyan módosítja a légrés nagyságát. Nincs irodalmi adat az SA zárósejtek fotoszintézisére gyakorolt hatásáról sem, valamint nem ismert, hogy a zárósejtek fotoszintézisében bekövetkező változások kapcsolatban vannak-e a sztómák záródásával.

Az abaxiális paradicsomlevél epidermisznyúzaton már az SA kezelést követő 5 percen belül szignifikánsan megnőtt a ROS produkció a zárósejtekben. Ezzel szemben az NO szint csak az SA kezelést követő 15. perc után emelkedett meg szignifikánsan. A ROS és NO szintek fokozatosan emelkedtek a zárósejtekben a 30. percre a 10⁻⁷ és 10⁻³ M SA kezelés hatására, mellyel párhuzamosan a sztómák zárása volt megfigyelhető az idő függvényében. Epidermisz nyúzaton, az intakt növényekkel ellentétben a 10⁻⁴ M SA hatására a kezelést követő 30. perctől csökkent a zárósejtek ROS és NO produkciója, amivel párhuzamosan a sztómák nyitódása volt megfigyelhető. Ezekben a sejtekben, különösen az NO produkció sokkal kisebb volt a kontrollhoz képest, ami megerősíti azt, hogy az NO kulcsszereppel bír a sztómazárásban, hiánya pedig sztómanyitódást eredményez. Ez különösen fontos lehet a patogénfertőzések alatt, ahol is a zárósejtek NO szintézise és akkumulációja lokálisan gátlódhat a patogénektől származó molekulák hatására (Melotto és mtsai. 2006).

Az SA által indukált ROS és NO szerepét a sztómamozgásra különböző specifikus gátlószerekkel tanulmányoztuk. A kalcium kelátor EGTA megakadályozta az SA indukálta sztómazárást és növelte a sztómaapertúrák méretét, megerősítve, hogy a [Ca²⁺_{cyt}] esszenciális komponense az SA indukálta sztómazárásnak a paradicsom epidermisznyúzaton. Azonban a 10⁻⁴ M SA indukálta sztómanyitódásban a [Ca²⁺_{cyt}]-nak nincs szerepe. Kawano (2003) bizonyította, hogy az SA indukálta O₂⁻ produkció mellett Ca²⁺ influx figyelhető meg a PM-en keresztül a citoszolba és ennek a hatására a [Ca²⁺_{cyt}] szint emelkedik a dohány sejtszuspenzióban. Mori és mtsai. (2001) szintén O₂⁻ produkciót figyeltek meg lóbab epidermisznyúzat zárósejtjeiben az SA kezelést követően. A H₂O₂ és NO kioltása ill. gátlása a

SOD, KAT, DPI valamint cPTIO SA melletti egyidejű alkalmazásával csökkentette az SA indukálta sztómazárást, megerősítve ezzel, hogy a H_2O_2 és NO fontos komponense az SA indukálta sztómazárásnak és e kettő komponens egyensúlya megszabja a légrés méretének szabályozását az SA hatására. Az a megfigyelés, hogy epidermisz nyúzatokon van olyan SA koncentráció (10^{-4} M), ami sztómanyitódást okoz, új eredmény. Bizonyítottuk továbbá azt, hogy ez a 10^{-4} M-os SA koncentráció nem emeli meg a zárósejtek ROS (H_2O_2) és NO produkcióját a kontrollhoz képest.

Az SA hatása nagy jelentőséggel bír az intakt növények levelének fotoszintézisére is (Hayat és mtsai. 2010), azonban az SA közvetlen hatása a zárósejtek fotoszintézisére egyáltalán nem ismert még, mely fontos eleme lehet a sztómaműködés szabályozásának különböző, a fotoszintézisre is ható stresszor esetén. A sztómákon történő gázcsere kritikus szerepet játszik a fotoszintetikus aktivitás és a transzspiráció szabályozásában a növények növekedése és fejlődése során. Az irodalomban leírtaknak megfelelően azt kaptuk, hogy az alkalmazott SA koncentrációk már rövid időn belül a sztómák zárását és a sztómakonduktancia csökkenését okozták az intakt paradicsom növényekben (Manthe és mtsai. 1992; Lee 1998), azonban a paradicsom epidermisz nyúzatokon az alacsony (10^{-7} M) és a magas (10^{-3} M) SA koncentrációk okoztak sztómazárást. Ez egyúttal azt is jelzi, hogy a levél mezofillumból származó kémiai jel (pl. ABS (Szepesi és mtsai. 2009)) vagy hidraulikus jel felülírhatja az SA közvetlenül a zárósejtekre kifejtett hatását. Bár az epidermisz nyúzatok zárósejtjeiben a sztómazáráskor szerepelt a jelátvitelben a ROS és NO szint emelkedése, mindez ideig nem volt ismert az egyes zárósejtek fotoszintézisének változása az SA kezelések hatására.

Erős korreláció van a különböző környezeti hatás során bekövetkező fotoszintézis- és a sztómakonduktancia változás között (Hetherington és Woodward 2003; Shen és mtsai. 2010), ami kapcsolatot feltételez a zárósejtek és a mezofillsejtek fotoszintetikus kapacitása között (Wong és mtsai. 1979). A sztómanyitódás három olyan mechanizmustól függ, melyek meghatározzák a zárósejtek ozmoregulációját. A K^+ és a malát és/vagy a Cl^- akkumuláció elsősorban a reggeli gyors sztómanyitódásért felelősek, míg a zárósejtek kloroplasztiszában a keményítő lebontásából származó szacharóz délután szabályozza a sztómamozgást (Lawson 2009). Egy másik lehetőség a zárósejteket körülvevő mezofill sejtek fotoszintetikus aktivitásából származó szénhidrátok felhasználása a turgor fenntartására délután (Talbot és Zeiger 1993). Mivel a szacharóz származhat mind a zárósejtekből, mind pedig a mezofill sejtekből, a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának meghatározása fontos információt adhat a sejtekre gyakorolt SA kezelések hatásáról.

A fotoszintézis hatékonyságát a reakciócentrumokban végbemenő elsődleges fotokémiai folyamatok szabályozzák. Az ezeket a folyamatokat leíró fluoreszcencia paraméterek megbízható adatokat szolgáltatnak a fotoszintetikus aktivitás változásáról (Genty és mtsai. 1989). Az intakt levelekben mértékhez hasonlóan, az alkalmazott SA koncentrációk függvényében változtak a fluoreszcencia paraméter értékek a paradicsom levél epidermisznyúzatok zárósejtjeiben is. Az Fv/Fm, Yield és qP szignifikánsan csökkent a 10^{-3} M SA kezelés hatására a zárósejtben, ami a PSII reakciócentrumok erőteljes gátlására és a zárósejt magas ROS produkciójára utal (Asada 2006). A Rel. ETR maximuma minden SA koncentráció hatására az alkalmazott koncentráció növekedésének függvényében csökkent, az illesztett görbe meredeksége (α) szintén csökkent a 10^{-4} - 10^{-3} M SA kezelések hatására a kontrollhoz képest. Ezek a mért adatok megerősítik, hogy a 10^{-3} M SA koncentráció igen erőteljes hatással van a zárósejt fotoszintézisére, másrészt a csökkenő Fv/Fm és Rel. ETR paraméterek jelzik azt is, hogy az antioxidáns rendszerek nem képesek gátolni a kezelés hatására bekövetkező ROS produkciót a kloroplasztiszokban (Asada 2006). Az így keletkező ROS pedig részt vehet a gyorsabb és erőteljesebb sztómazárásban és a PSII reakciócentrumok károsodásában, ami a PCD indukcióját idézheti elő később a zárósejtben is. A 10^{-4} M-os SA közvetlen hatása a zárósejt klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereire jóval kisebb, mint a 10^{-3} M-osé, továbbá nem változtatja meg az Fv/Fm, Yield, qP és NPQ értékeket.

Az alkalmazott alacsonyabb SA koncentrációknál a PSII reakciócentrumok károsodása, az Fv/Fm csökkenése nem volt szignifikáns, viszont a Rel. ETR_{max} szignifikánsan csökkent. Kissé növekvő NPQ érték volt megfigyelhető a 10^{-4} M SA kezelés hatására a zárósejt párokban. A magasabb NPQ érték magasabb zeaxantin tartalomra utalhat, ami hatásos antioxidáns és fluoreszcencia kioltó, valamint a kék fény indukálta sztómanyitódás receptora is (Lawson 2009). Zhu és mtsai. (1998b) erős korrelációt mutattak ki a zárósejt zeaxantin koncentrációja és a sztómanyitódás között. Azon körülmények között, mikor a H⁺ elektrokémiai gradiens a tilakoid membránon keresztül nő, a zeaxantin akkumulálódik és hozzájárul a nem fotokémiai kioltáshoz (Niyogi és mtsai. 2005). A kísérleteink során alkalmazott 10^{-4} M SA által okozott kismértékű (szignifikánsnak nem bizonyuló) NPQ növekedés tehát utalhat a sztómanyitódáshoz szükséges zeaxantin mennyiség növekedésére.

Ezek az eredmények alapján tehát a 10^{-3} M SA hatással van a zárósejt fotoszintetikus folyamataira, amely fokozza a ROS produkciót, csökkenti a zárósejt szénhidrát produkcióját és sztómazárást idéz elő. Munkánkkal rávilágítottunk arra, hogy a magas SA koncentrációknál a sztómazáródáshoz a zárósejt fotoszintézisének SA általi gátlása is hozzájárul.

6.3. A sejthalál indukció főbb komponenseinek vizsgálata a paradicsom növényekben

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy milyen azonosságok illetve különbségek figyelhetők meg az SA és NaCl által indukált PCD folyamataiban, különös tekintettel a sejtek életképességének változásában szerepet játszó ET, a H₂O₂ és egyéb ROS formák valamint az NO szerepére. Megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben expresszálódnak a különböző kezelések hatására a „proapoptotikus” hatású (cisztein proteázok, metakaspázok, vakuoláris processzáló enzimek) és az „antiapoptotikus” hatású (Bax Inhibitor-1, PR) gének.

Az ET pozitív regulátora a PCD-nek (De Jong és mtsai. 2002; Overmyer és mtsai. 2003; Trobacher 2009). Munkánk során megvizsgáltuk az SA- és NaCl kezelések hatását az intakt növények ET produkciójára. A kapott eredmények alapján a letális (10⁻³-10⁻² M) SA és 250 mM NaCl kezelések csökkentették a gyökerek ET emisszióját, míg a szubletális 100 mM NaCl serkentette azt a hatodik órában. Cao és mtsai. (2007) bizonyították 100 mM NaCl kezeléssel dohány növényekben, hogy az ET receptor homológ *NTHK1* mutáció sóérzékenységet okoz, valamint megfigyelték azt is, hogy az ACC exogén alkalmazása csökkentette a mutánsok sóérzékenységét dohányban. Lei és mtsai. (2011) megfigyelték azt is, hogy az EIN2 mutáció szintén sószenszítív növényeket eredményezett. Ezek az adatok bizonyítják, hogy az ET szerepet játszhat a sótolerancia kialakításában, hiánya pedig az intakt növények pusztulását okozhatja a sóstressz alatt. Az SA kezelések hatására kapott eredmények megfelelnek az irodalomban ismert SA hatásnak, miszerint az SA gátolja az ET bioszintézisét az ACC oxidáz gátlásán keresztül (Leslie és Romani 1986), ugyanakkor az ET produkció csökkenése a kontroll szint alá, a stresszel szembeni adaptáció lehetőségét csökkentheti. Az alacsonyabb ET szintek ugyanis aktiválják a stressz akklimatizációban fontos antioxidáns rendszereket, míg nagyon magas koncentrációban az ET indukálja a PCD-t (Bajkán 2004).

Az ET produkció jelentős csökkenése a letális hatású kezelések esetén a gyökérben figyelhető meg, ezért fluoreszcens festékek segítségével megvizsgáltuk a gyökércsúcsokban bekövetkező ROS és NO produkció és az életképesség változását. A gyökércsúcsban történő változások azért is bírnak kitüntetett szereppel a növények életében, mert többek között a fejlődésüket és növekedésüket meghatározó auxin és citokininek bioszintézisének egyik helye a gyökércsúcs (Petersson és mtsai. 2009, Ghanem és mtsai. 2011). A levelekben mért H₂O₂ szintekhez hasonlóan, a növekvő koncentrációjú SA kezelések hatására a gyökércsúcs ROS produkciója is szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest. A NaCl kezelések szintén növelték a gyökércsúcsok ROS produkcióját. A kezelések hatására megemelkedő ROS

produkció a koncentrációtól és az időtől függően befolyásolja a sejtekben végbemenő változásokat. Kis koncentrációban beindíthatja a sejtek antioxidáns védelmi mechanizmusát és ezzel segíti azok túlélését, míg nagy koncentrációban a sejtalkotók károsításán keresztül a sejtek, végül a növényi egyedek pusztulását okozza (De Pinto és mtsai. 2012). A SA kis koncentrációban a ROS akkumulációjának szabályozásával serkenti a növények antioxidáns védelmi kapacitását, ami a sikeres tolerancia kialakításának feltétele lehet abiotikus (pl. NaCl) stresszel szemben is (Horváth és mtsai. 2007). Nagy koncentrációban azonban az SA-generálta ROS a sejtek halálát okozza (Hayat és mtsai. 2010). A NaCl hatására keletkező ROS-ról hasonló állapítható meg, kis koncentrációban az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódásának köszönhetően a sejtek túlélnek, míg a nagy koncentráció hatására elpusztulnak (Sun és mtsai. 2010; Wang és mtsai. 2010a). A ROS mellett kitüntetett szereppel bír az életképesség befolyásolására a kezelések hatására keletkező NO. Az NO produkció csak a 10^{-3} - 10^{-2} M SA és a 100 mM és 250 mM NaCl kezelések hatására emelkedett meg szignifikánsan a kontrollhoz képest a paradicsomnövények gyökércsúcsaiban. Az irodalomból ismert, hogy az SA (Delledonne és mtsai. 1998; Zottini és mtsai. 2007) és a NaCl is (Wang és mtsai. 2009) NO szintézist generál a koncentrációtól függően. A kezelések során keletkező ROS és NO produkció azonban együttesen, és egymásra hatva is befolyásolhatja a növényi sejtek sorsát (Gémes és mtsai. 2011). Az NO a szuperoxid gyökánnal reagálva peroxinitrit keletkezését eredményezi, ami egészen másféle reakcióban vesz részt, másféle jelátviteli folyamatokat indukál és módosít, mint a kiindulási vegyület (Delledonne és mtsai. 2001). A ROS és NO szintjének egyidejű fokozódása a sejtek vitalitásának csökkenését okozhatják (Gémes 2011). A kapott eredményeink ezzel összhangban jól mutatják, hogy ahol a kezelések hatására bekövetkező ROS és NO produkció a kontrollhoz képest szignifikánsabban magasabb volt, a hatodik órára a növények gyökércsúcsában szignifikánsan lecsökkent az életképesség, ami különösen igaz a 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl-dal kezelt növényekre. A 10^{-3} M SA kezelés hatására ugyan fokozódik a ROS és NO produkció, de ebben az időpontban a gyökércsúcsok még nem mutatnak életképesség csökkenést, ami hosszabb idő után már detektálható (Gémes és mtsai. 2011).

Munkánk során megvizsgáltuk a különböző koncentrációjú SA- és NaCl kezelések hatására, a PCD indukciójában szerepet játszó, az irodalom alapján internetes adatbázisokból (NCBI, Sol Genomics Network) kiválasztott markergének expresszióját a kezeléseket követő hatodik órában. A patogenezissel kapcsolatos gén, az SA jelátvitel bekapcsoltságát igazoló *SIPR1* expressziója nőtt a 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a 250 mM NaCl-kezelt növények levelében, valamint a 100 mM NaCl-kezelt növények gyökerében. A *SIPR1* gén nemcsak az SA-kezelt

növények esetében indukálódik, hanem a NaCl-kezelt növényekben is, ugyanis a NaCl kezelés hatására az intracelluláris SA koncentráció megnőhet (Molina és mtsai. 2002). A PR gének és fehérjék kulcsszerepet játszanak a patogénekkal szembeni védekezésben és a szisztematikusan szerzett rezisztencia, a SAR kialakításában (Van Loon és Van Strien 1999). Lu és mtsai. (2013) bizonyították, hogy a PR1 gén humán kaspázyszerű doménnal rendelkezik és így szabályozhatja a PCD-t is a növényekben. Az *SlPR1* expressziója különösen a letális koncentrációjú SA és NaCl kezelésnek kitett paradicsom növények levelében nő meg, valamint a szubletális koncentrációjú NaCl-kezelt növények gyökerében, ami arra utalhat, hogy ezekben a szervekben védekezési mechanizmusok kapcsolnak be.

Az *SlPR1* génexpressziós változásokhoz hasonlóan, az *SlBI1* expressziója a letális koncentrációknak kitett növények levelében nőtt meg, míg a 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelés hatására lecsökkent a gyökérben. A BI-1 egy evolúciósan konzervált sejthalál szupresszor fehérje, amit több abiotikus stressz is indukál, és kulcsszereppel bír az ER-stressz indukálta PCD kivédésében (Watanebe és Lam 2009; Ishikawa és mtsai. 2011). Kawai-Yamada és mtsai. (2004) bizonyították, hogy az AtBI-1 felülexpresszállása csökkentette a H_2O_2 és SA okozta sejthalál mértékét. A kapott eredményeink alapján feltételezhető, hogy az *SlBI1* expresszió fokozódásának elmaradása a letális koncentrációjú SA-val és NaCl-dal kezelt növények gyökerében szerepet játszhat ezeknél a kezeléseknél a PCD indukációjában, ami azért is fontos, mert kísérleti rendszerünkben a stresszhatás elsődleges támadáspontja a gyökér.

Az *SlBI1*-hez hasonlóan a *SlMAP3K α* expressziója a 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a NaCl-kezelt növények levelében, valamint a 10^{-3} M SA- és 100 mM NaCl-dal kezelt növények gyökerében emelkedett meg a kontrollhoz képest. A MAPK-ok fontos szerepet töltenek be a különböző stresszorok által kiváltott védekezés és sejthalál szabályozásában is (Zhang és Klessing 2001). Del Pozo és mtsai. (2004) bizonyították, hogy a MAP3K α a *Pseudomonas syringae* által előidézett HR fontos eleme, a sejthalál pozitív regulátora, de megfelelően alacsony H_2O_2 koncentrációknál ugyanaz a kináz a H_2O_2 által szabályozott génexpresszió közvetítője, ami a védekezési géneket is indukálhatja (Colcombet és Hirt 2008).

Eredményeink alapján a cisztein proteázok közül a papain-szerű cisztein proteázok alcsaládjába tartozó *SlCYP1* expressziója a szubletális SA kezelések hatására csökkent, míg a letális SA és NaCl kezelések hatására nem változott a gyökérben a kontrollhoz képest. A levélben azonban a letális 10^{-2} M SA és a NaCl kezelés hatására nőtt az expresszió mértéke a kontrollhoz képest. A papain az első cisztein proteáz volt, amit felfedeztek a növényekben, és ami hosszú időn keresztül modellként szolgált a cisztein proteázok működésének megértéséhez (Schaller 2004). A C1A alcsaládba tartozó, papain-szerű cisztein proteázok fontos szerepet

játszanak a fehérje degradációban, a nitrogén mobilizációban és a szenescenciában (Trobacher és mtsai. 2006; Roberts és mtsai. 2012). Az *SICYP1* szerepét eddig csak a szárazság stressz hatására írták le (Harrak és mtsai. 2001), működése ismeretlen a sóstressz- és a SA-indukálta élettani folyamatokban. Shindo és mtsai. (2012) azonban az *SICYP1* ortológjaként a lúdfű RD21 cisztein proteázát azonosítják, aminek fontos szerepe van a növények immunitásában a nekrotróf patogénekkal szemben. A cisztein proteázok mellett a cisztein proteáz inhibitorok expressziója és aktivitása is szabályozza a proteázaktivitást (Singh és mtsai. 2011). Az ET egyik hatása éppen a papain-szerű cisztein proteáz inhibitorok repressziója, ami lehetővé teszi az öregedéssel kapcsolatos cisztein proteázok aktivitásának fokozódását (Sugawara és mtsai. 2002). Ily módon a gyökerek alacsony etilénprodukcója védelmet jelenthet a proteolízis aktiválódásával szemben.

A papain-szerű cisztein proteázok mellett kitüntetett szerepük van a legumainok közé tartozó VPE-knek a PCD folyamatában. A vakuólum membránjának dezintegrációját és ezáltal a celluláris komponensek degradációját szabályozó VPE-k jelenleg az egyik legkutatottabb cisztein proteáz alcsalád (Hatsugai és mtsai. 2004; Hara-Nishimura és mtsai. 2005; Woltering 2010). A VPE-k számos stressz hatására indukálódnak és szabályozzák a PCD-t (Roberts és mtsai. 2012). Az *SIVPE1* expressziója a letális 10^{-2} M SA- és a 100 mM NaCl-kezelt növények levelében szignifikánsan nő, míg a letális SA és NaCl kezelések hatására a gyökérben szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest a paradicsom növényekben, így ennek az enzimsoporthoz a levél proteolízisében lehet szerepe. A hat órás inkubáció után ezt a változást fehérje szinten még nem tudtuk detektálni.

A harmadik cisztein proteáz alcsalád a metakaspázok (C14) alcsaládjá, ami strukturális hasonlóságot mutat az állati kaszpázokkal, de szubsztrátspecifitásuk eltér (Woltering 2010). Lúdfűben kilenc gént különböztethetünk meg, amit két csoportba sorolnak (AtMC1 és AtMC2). Ezek antagonisztikusan szabályozzák a sejthalált (Coll és mtsai. 2011; Tsiatsiani és mtsai. 2011). Kato és mtsai. (2012) az *SIMCA1*-et az S-nitrozilálható fehérjék közé sorolják, azaz az intracelluláris NO szintváltozás módosíthatja a fehérje funkcióját. A kapott eredményeink alapján a metakaspázok közül az *SIMCA1* expressziója a 10^{-7} - 10^{-2} SA- és a 250 mM NaCl kezelések hatására csökkent a gyökérben, míg a 10^{-2} M SA hatására nőtt a kezelt levelekben a kontrollhoz képest. Ez az irodalomban az első olyan adat, amely szerint az SA megemeli az *SIMCA1* expresszióját és bizonyítja kifejeződésének szervfüggőségét a kezelés hatására; Hoeberichts és mtsai. (2003) ugyanis lúdfű sejtszuspenzióban ennek az ellenkezőjét tapasztalták 10^{-5} M SA kezelés hatására.

6.4. A sejthalál terminációja a paradicsom növényekben

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, milyen változások történnek a sejthalál terminációs fázisában, különös tekintettel az ionhomeosztázisra és a proteázok, köztük a cisztein proteázok aktivitására. Emellett megvizsgáljuk, hogy az alkalmazott kezelések hatására indukálódott PCD terminációs szakaszában megtörténik-e a DNS fragmentálódása.

Kísérleteink során a 24 órás letális koncentrációjú 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések hatására mind a levelek, mind a gyökerek fehérjetartalma szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest. A 10^{-3} M SA és 100 mM NaCl kezelések szintén csökkentették a gyökerek fehérjetartalmát a kontrollhoz képest. Ez a csökkenés a kétféle kezelésnél nem feltétlen azonos okokra vezethető vissza. A citoplazmába belépő Na^+ átmenetileg módosíthatja a primer anyagcsere legtöbb folyamatának enzimátikus lépéseit (Parida és Das 2005). A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a gyökérkezelések következtében a növények fehérjetartalmában szignifikáns csökkenés elsőként a gyökerekben következik be. A gyökerek károsodása többek között a tápanyagfelvétel, az auxinok és citokininek bioszintézise miatt az egész növény további sorsát determinálja (Marschner 2012). A fehérjetartalom csökkenése a szeneszcencia egyik fontos lépése, amit mind a sóstressz, mind pedig a SA indukálhat (Krupinska és Humbeck 2008; Love és mtsai. 2008; Noodén 2004). A fehérjetartalom csökkenésével párhuzamosan megnőtt a letális, 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések hatására a paradicsomnövények levelében és gyökerében a 24 órás mintákban a proteázaktivitás is a kontrollhoz képest. Az azokazein szubsztráttal mért proteázaktivitás egyik módszere az összproteázaktivitás meghatározásának, pl. szárazságstressz (Grudkowska és Zagdanska 2010) vagy szeneszcencia esetében (Rossano és mtsai. 2011). Az egyedi enzimek proteázaktivitásának meghatározását azonban a zselatin-SDS-PAGE teszi lehetővé (Rossano és mtsai. 2011). Az eredményeink alapján megállapítható, hogy az általunk alkalmazott SA és NaCl hatására a koncentráció függvényében nőtt a proteázaktivitás a 24 órás inkubáció után a gyökerekben. Ezzel szemben a levelekben nem mutatható ki változás zselatin-SDS-PAGE segítségével, amiben szerepet játszhatnak az itt jelenlevő proteáz inhibitorok, pl. a cisztatin, másrészt az, hogy a levelekben ebben az időpontban mérhető proteáz aktivitás jóval kisebb (Yamada és mtsai. 2001; Benchabane és mtsai. 2010). A gyökerekben specifikus cisztein proteáz blokkoló (E-64) (Rossano és mtsai. 2011) segítségével kimutatható, hogy az alkalmazott kezelések hatására valóban megnő a 180 kDa és 47 kDa tömegű cisztein proteázok

aktivitása a 24. órában. Megállapítható tehát, hogy PCD indukciója során a folyamat kulcsgénjeinek expresszióját követően a terminációs szakaszban fehérje szinten is döntő változások történnek, és emelkedni kezd a fehérjék lebontásában szerepet játszó cisztein proteáz aktivitás. Jelentős cisztein proteáz aktiválódás azonban csak 24 óra múlva következik be. A gyökerekben aktivitást mutató ciszteinproteáz izoenzimek specifikus gátlóval részlegesen blokkolhatóak, így bizonyítható szerepük az össz-proteáz aktivitás kialakulásában is.

A kapott eredményeink alapján a proteázaktivitással párhuzamosan az ionhomeosztázisban is jelentős változások történnek az alkalmazott SA- és NaCl kezelések hatására indukálódott PCD terminációs szakaszában. A letális koncentrációjú 10^{-2} M SA és a 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelések hatására szignifikánsan lecsökkent a gyökerek, valamint ugyanezen és az ugyancsak letális 10^{-3} M SA kezelések hatására a levelek káliumtartalma a kontrollhoz képest. Ezzel szemben a 10^{-4} M SA-kezelt növények levelében és gyökerében szignifikánsan nőtt a káliumtartalom. A nátriumtartalom egyedül a NaCl kezelések hatására nőtt a levelekben és a gyökerekben az alkalmazott koncentrációk függvényében. Shabala (2009) alapján feltételezhető, hogy az intracelluláris káliumkoncentráció csökkenése indukálhatja a cisztein proteázokat és ezáltal a PCD-t. A 10^{-4} M SA hatására bekövetkező káliumfelvétel igazolhatja az SA koncentrációtól függő hatásbeli különbségét is (Szepesi 2009; Gémes 2011). A kalciumtartalom az SA kezelések hatására a koncentráció függvényében nőtt; szignifikánsan a 10^{-2} M SA-kezelt növények gyökerében magasabb a kontrollhoz képest. A kalcium fontos másodlagos jelátvivő szereppel bír a sejtekben (Harper és mtsai. 2004). De Jong és mtsai. (2002), valamint Yakimova és mtsai. (2008) bizonyították, hogy a kalcium influx blokkolása révén a sejthalál mértéke csökkenthető paradicsom sejtszuspenzióban. Hasonló eredményeket kaptunk a sejtszuspenzióban az SA és sóstressz hatására indukálódó PCD vizsgálatokor is. A magnéziumtartalom egyedül a 250 mM NaCl kezelés hatására csökken szignifikánsan a kontrollhoz képest. A magnézium többek között a klorofill molekula központi atomját alkotja, melynek csökkenése a szenescencia másik fontos eleme a fehérjetartalom csökkenése mellett (Buchanan és mtsai. 2000; Quirino és mtsai. 2000; Noodén 2004). A többnapos sóstressz hatására a klorofilltartalom csökkenésének következtében a levelek sárgulása, valamint a fotoszintetikus hatékonyságának csökkenése figyelhető meg (Juan és mtsai. 2005; Martínez-Ballesta 2004), ami az általunk vizsgált időintervallumban még nem alakult ki.

A kapott eredmények alapján a levelek és a gyökerek életképessége az alkalmazott 250 mM NaCl és 10^{-3} - 10^{-2} M SA koncentrációk hatására szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest a 24. órára. A 10^{-2} M SA és a 250 mM NaCl kezelés hatására a gyökerek elektrolit

kieresztése csaknem elérte a 100%-ot, ahol ezen kezelések hatására a DNS fragmentációja is kimutatható volt a gyökerekben, bebizonyítva, hogy a 10^{-2} M SA és a 250 mM NaCl gyors PCD-t okoz a növények gyökereiben 24 órán belül. A DNS feldarabolódása ugyanis a PCD utolsó lépése, amikor az örökítőanyag végérvényesen elveszti funkcióját és a sejtek a visszafordíthatatlan károsodás miatt elpusztulnak (Lam 2004). A 10^{-3} M SA kezelés hatására indukálódott PCD lassúbb folyamat a 10^{-2} M SA kezeléssel szemben, mely több, mint 48 óra után okozza a növények halálát (Gémes 2011). A szubletális 10^{-4} M SA kezelés viszont növeli a növények stresszrezisztenciáját, a másodlagos sóstresszel szemben (Szepesi 2009).

6.5. A sejthalál indukciójának és jelátviteli komponenseinek vizsgálata paradicsom sejtsuszpenzióban

A PCD-t indukáló jelátviteli útvonalak vizsgálatához paradicsomnövényekből előbb kallusz tenyészetet, majd sejtsuszpenziót készítettünk. Ezután meghatároztuk a NaCl- és SA-indukálta PCD közös (ROS, NO, K^+ efflux) és eltérő (etilén) elemeit.

A sejtek frisstömeg (FT) gyarapodása az idő függvényében szigmoid görbe szerint alakult. Összehasonlítva a két különböző koncentrációjú NaCl (100 és 300 mM) és SA (10^{-4} és 10^{-3} M) hatását a sejtek FT gyarapodására a sejtsuszpenzióban, hasonló változást okoztak a sejt kultúra növekedésére: az alkalmazott NaCl- és SA kezelések a koncentráció függvényében csökkentették azt. A letális 300 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására azonban már a 2. ill a 4. nap elteltével jelentősen csökkent az FT a kontrollhoz képest (Papp 2010). A szupraoptimális NaCl koncentrációk ozmotikus-, ionikus- és oxidatív stresszt okoznak (Shabala 2009), ami a turgor vesztéséhez és az FT csökkenéséhez vezet. A turgor csökkenését többek között a káliumnak a sejtekből történő kiáramlása okozza, ami a sejtek citoplazmájában az ionhomeosztázis zavarát okozhatja (Speer és Kaiser 1991). A letális koncentrációkkal ellentétben az 5-6. napon a sejtsuszpenzió FT gyarapodása fokozódik a 100 mM NaCl kezelést követően, ami a szubletális stressz mellett nem éri el a kontroll szintjét. Növekedésredukciót figyeltek meg sóstressznek kitett dohány (Gangopadhyay és mtsai. 1997) és nyárfa kalluszokban (Zhang és mtsai. 2004), valamint paradicsom sejtsuszpenzióban is (Molina és mtsai. 2002). Hasonló késést mutattak ki a sejtosztódásban és növekedésben ozmotikus stressz alatt dohány kalluszban (Gangopadhyay és mtsai. 1997). A 10^{-3} M SA kezelés szintén gátolta és késleltette a sejtnövekedést, de nem okozott a NaCl-hoz hasonló mértékű ozmotikus sokkot,

ami összhangban van Chen és mtsai. (2001) eredményével, akik a sejtsztódás csökkenését figyelték meg 0,2 M SA-kezelt dohány sejtszuspenzióban.

A sejtszuspenzió inkubációs közegének pH értéke szignifikánsan csökkent a 100 és 300 mM NaCl kezelések hatására, ezzel szemben nőtt a 10^{-3} M SA-kezelt sejt kultúrákban. A külső oldat pH értékének csökkenése függ a PM H^{+} -ATPáz aktivitásától, ami biztosítja az optimális elektrokémiai H^{+} gradienst a PM-on keresztül. Mivel a supraoptimális Na^{+} toxikus a növényi sejtekre, különböző mechanizmusok segítik a Na^{+} kompartmentizálódását az apoplastba vagy a vakuólumba, amit számos transzportrendszer szabályoz (Zhu és mtsai. 1998a). A PM-on keresztüli Na^{+} transzport függ a PM lokalizált H^{+} -ATPáz működése során kialakított elektrokémiai gradienstől, ami aktiválja a PM-on lokalizált Na^{+}/H^{+} antiportereket (Serrano és mtsai. 1999). Ez az erőteljes H^{+} kipumpálás a sejtekből szükséges a sóstressz adaptációhoz (Kerkeb és mtsai. 2001). Az SA kezelés hatására kapott eredményeinkhez hasonlóan H^{+} felvételt és a K^{+} effluxot figyelték meg a HR során dohány sejtekben (Glazener és mtsai. 1996), valamint a szuspenziós közeg lúgosodását biotikus stressz esetén (Hano és mtsai. 2008). A SA-indukált ROS megemelheti az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, ami meggátolhatja a H^{+} -ATPáz működését (Scaller és Oecking 1999).

A sejtek Na^{+} tartalma szignifikánsan megnőtt a 100 és 300 mM NaCl kezelés hatására, de nem változott szignifikánsan az SA kezelést követően. Megváltozott azonban a sejtekben a K^{+}/Na^{+} arány, ami csökkent mindkét NaCl és a 10^{-3} M SA kezeléseket követően a kontrollhoz képest. A K^{+} felvétel vagy szignifikánsan gátlódott ezen kezelések hatására vagy a K^{+} kiáramlása következett be (Papp 2010). Demidchik és mtsai. (2010) bizonyították lúdfű gyökerében, hogy a NaCl-indukálta HR során K^{+} efflux történik, aminek következtében a K^{+} veszteség stimulálja a proteázok- és endonukleázok aktiválódását. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az intracelluláris K^{+} koncentráció csökkenése a letális SA kezelést követően is kulcsfontosságú lehet a PCD kiváltásában a paradicsom sejtszuspenzióban is.

A K^{+}/Na^{+} arány meghatározza, hogy a növényi sejtek túlélnek a stresszhatást vagy elpusztulnak a sóstressz alatt (Zhu 2001), amit az extra- és intracelluláris kalcium koncentráció is szabályoz pl. nyárfákban (Sun és mtsai. 2009). A 300 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására megnőtt a sejtek Ca^{2+} tartalma. A sóstressz és az SA okozta ROS produkció korrelációban van a PM-on lokalizált Ca^{2+} csatornák aktivációjával, melyek az intracelluláris Ca^{2+} szintet emelik meg (Bi és mtsai. 2009; Shabala 2009; Joseph és Jini 2010).

A Mg^{2+} tartalom szignifikánsan csökkent a NaCl-kezelt sejtekben, de nem változott a SA kezelések hatására. Martinez-Ballesta és mtsai. (2004) szintén a Mg^{2+} tartalom csökkenését figyelték meg a sóstressznek kitett sejtekben.

Az ionhomeosztázis szabályozása szükséges a sejtek optimális növekedéséhez és életképességének megőrzéséhez. Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az ionhomeosztázis zavara, különösen a sejtek K^+/Na^+ arányának csökkenése jól mutatja a PCD kialakulását. Sikerült kimutatnunk azt is elsőként, hogy az SA-indukált PCD-ben fontos szerepet tölthet be az intracelluláris K^+ hiány paradicsom sejtszuspenzióban.

Az FT-növekedésgörbék alapján kiválasztottuk a letális 250 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezeléseket, hogy segítségükkel vizsgáljuk meg a sejthalál indukcióját és jelátviteli komponenseit a paradicsom sejtszuspenzióban (Szopkó 2011). A 250 mM NaCl és a 10^{-3} M SA kezelések hatására a sejtek 80%-a ill. 40%-a pusztul el a kezeléseket követő 6 órán belül. Az elhalt sejtek százalékos aránya szignifikánsan nőtt az első órát követően a 250 mM NaCl és az ötödik órát követően a 10^{-3} M SA kezelés hatására a kontrollhoz képest. A kapott eredmények jó összhangban vannak Huh és mtsai. (2002) valamint Garcia-Heredia és mtsai. (2008) által kapottakkal, akik megfigyelték, hogy az SA-indukálta sejthalál egy relatíve lassabb folyamat, míg az életképesség gyorsabban csökken a 250 mM NaCl kezelés hatására, mivel a Na^+ ionok nem csupán erőteljes oxidatív stresszt, hanem ionikus- és oxidatív stresszt is generálnak (Shabala 2009).

A membránintegritás és stabilitás elvesztése a stressz alatt fontos eleme a sejthalál indukciójának. A NaCl és SA kezelések fokozták az ionkieresztést (EL) a citoplazmából és növelték a membránok permeabilitását nyárfa sejtszuspenzióban ill. uborka csíranövényben (Shi és mtsai 2006; Sun és mtsai. 2010). A NaCl és SA kezelések hatására a paradicsom sejtszuspenzióban megnövekedett EL jól korrelál az FDA festések eredményeivel, ahol a csökkenő fluoreszcencia mutatja az életképesség csökkenését a sejtekben.

A letális NaCl és SA kezelések a kromatin kondenzációját, a citoplazma zsugorodását okozták, ami a növényi PCD fő morfológiai vonásai. Van Doorn (2011) legújabb növényi PCD definíciója alapján, a citoplazma térfogatának csökkenése, a citoplazmatikus szabad Ca^{2+} koncentráció emelkedése, a MAPK kaskád jelátvitelének indukciója, a DNS degradációja, a nukleusz kondenzációja és kisebb átmérője, ill. a cisztein proteázok aktiválódása az „autolitikus PCD” fő karakterisztikus jellemzői. Wang és mtsai. (2010b) *Thellungiella halophila* sejtek transzmissziós elektronmikroszkóppal készített felvételeinek segítségével ultrastrukturális változásokat mutattak ki 6 órás, 300 mM-os NaCl kezelést követően, amelyek ún. autofagoszómák megjelenését bizonyította. Az „autolitikus PCD-hez” bizonyos sejtekben a H_2O_2 produkció is szükséges (Duan és mtsai. 2010). Ezek alapján a 250 mM NaCl által a paradicsom sejtszuspenzióban kiváltott PCD-t morfológiai vonásai alapján az „autolitikus PCD” csoportjába sorolhatjuk.

Az SA-indukálta PCD-t nem kíséri ilyen gyors citoplazmatikus változás, de a citoplazmába történő Ca^{2+} influx, a MAPK aktivációja, a ROS akkumulációja, a mitokondriális transzmembrán potenciál összeomlása kimutatható volt a folyamatban (Garcia-Heredia és mtsai. 2008).

A DNS fragmentációja volt megfigyelhető a 6 órás, 250 mM NaCl kezelést követően a paradicsom sejtszuspenzióban, ami jó összhangban van Affenzeller és mtsai. (2009) által kapott eredményekkel, akik szintén DNS létrázódását mutatták ki a sóstressz hatására. Az SA kezelés hatására ebben az időpontban még nem figyelhető meg a DNS létrázódása, azonban számos TUNEL-pozitív sejtmag található az SA-kezelt mintákban is. Wang és mtsai. (2010b) a növekvő NaCl koncentrációk hatását tanulmányozva a *Thellungiella halophila* sejtszuspenziós kultúra életképességére megállapították, hogy az elhalt sejtek száma szignifikánsan más, mint a TUNEL-pozitív sejtek száma. Ezzel az eredménnyel bebizonyították, hogy a TUNEL-jelölés csupán a DNS fragmentációt jelöli és nem alkalmas a sejthalál pontos mértékének megállapítására. Hasonló következtetéseket vonhatunk le a paradicsom sejtszuspenzióban is a letális NaCl és SA hatásának összehasonlításakor.

Garcia-Heredia és mtsai. (2008) a mitokondriumokból a Cyt c kieresztését és a mitokondriumok membránpotenciál csökkenését figyelték meg a 12 órás 10^{-3} M SA kezelést követően. A PCD ezen fő jellegzetességeinek megjelenése bizonyítja, hogy a 10^{-3} M SA indukálja a sejthalált, azonban lassabban, mint a 250 mM NaCl hatása a folyamatra a paradicsom sejtszuspenzióban. A 6 órás 250 mM NaCl és 10^{-3} M SA kezelést követő 24 órás helyreállítódási kísérlet sikertelensége igazolta, hogy az alkalmazott kezelések visszavonhatatlanul indukálták a PCD-t a paradicsom sejtekben 6 órán belül.

A ROS és NO részt vesz a különböző stresszorokkal szembeni gyors válaszfolyamatokban, és mindkettő indukálhatja a PCD folyamatait. A ROS produkció szignifikánsan megnőtt a 250 mM NaCl kezelést követő első órában, a második órától csökkent, de tartósan magasabban maradt, mint a kontroll. A 10^{-3} M SA kezelést követően a ROS produkció fokozódása kisebb mértékű volt, mint a 250 mM NaCl esetében. Ez az erőteljes ROS produkció az egyik legfontosabb komponense lehet a sejthalál indukciójának (De Pinto és mtsai. 2012). A ROS gátlása a szuperoxid gyökianiont kioltó SOD enzimmal, a hidrogén-peroxidot kioltó KAT enzimmal és a NADPH-oxidázt blokkoló DPI-dal szignifikánsan csökkentette a 250 mM NaCl- és a 10^{-3} M SA-indukálta sejthalál mértékét a paradicsom sejtszuspenzióban. Ezek az eredmények megerősítették az oxidatív robbanás és a ROS-indukálta károsodás szerepét a sóstressz- és a SA-indukálta PCD-ben (Garcia-Heredia és mtsai. 2008; Shabala 2009; Sun és mtsai. 2010). Ezzel szemben az NO produkció csak az első órától

nőtt meg, mindkét kezelés esetében és szignifikánsan magasabb volt az SA-kezelt sejtek esetében, később azonban csökkent az idő függvényében. Az NO és a ROS megfelelően alacsony koncentrációkban külön-külön is aktiválhatja a stresszhatásokkal szembeni védelmet jelentő gének expresszióját. Egymással többféle módon reakcióba is léphetnek (pl. a szuperoxid gyökánion és az NO reakciója peroxinitritet eredményez), így kiolthatják egymás hatását. Ha koncentrációjuk túllépi a kioltó mechanizmusok kapacitását, akkor együttes koncentrációnövekedésük aktiválja és gyorsítja a sejthalált (Delledone és mtsai. 1998; Clarke és mtsai. 2000). Az NO-ot kioltó cPTIO hatástalannak bizonyult a sejthalál mértékének csökkentésében mindkét kezelés esetében. Az NO tehát nem játszik szerepet a PCD indukció e korai szakaszában egyik kezelés esetében sem a paradicsom sejtuszuspenzióban. A ROS akkumuláció azonban kulcsszereppel bír a sejthalál gyors indukciójában, különösen a NaCl kezelés esetén.

Mivel az ET önmaga is képes a PCD indukálására a növényekben (Love és mtsai. 2008), megvizsgáltuk, hogy az ET generátor ACC és az ET receptor gátló STS hogyan hat a paradicsom szuszpenziós sejtek ROS és NO produkciójára, és ezáltal a sejthalál szabályozására a sóstressz és a SA kezelések alatt. A kapott eredmények megerősítették, hogy az ET fokozza a PCD mértékét az alkalmazott sóstressz alatt a paradicsom sejtuszuspenzióban is, ugyanis az ET növelte a ROS produkciót, ami fokozhatja a sejthalált és a DNS fragmentációját. A kapott eredmények jó összhangban vannak De Jong és mtsai. (2002) által más stresszor esetén kapott eredményekkel. Az ET hiánya az SA-kezelt sejtekben az egyik legkarakterisztikusabb különbség az általunk alkalmazott NaCl- és a SA koncentrációk által indukált PCD-ben. Azért, hogy megvizsgáljuk az ET szerepét a stresszindukálta sejthalálban, különböző ET modulátorokat használtunk az alkalmazott NaCl- és SA kezelések mellett, és megvizsgáltuk ezek együttes hatását a sejtek életképességének változására. Az ET bioszintézis inhibitor AVG kismértékben növelte a sejtek életképességét a sóstressz alatt, de hatástalannak bizonyult az SA-kezelt sejtekre. Az ET receptor blokkoló STS szignifikánsan lecsökkentette a NaCl-indukálta sejthalál mértékét, megerősítve az ET jelátvitel szerepét a sóstressz-indukálta PCD-ben és bizonyítva, hogy az ET képes a ROS produkció szabályozásával részt venni a PCD indukciójában. Az ET tehát fokozza a sejthalál mértékét a paradicsom sejtuszuspenzióban a NaCl kezelés során, amit megerősített az, hogy az ET prekursor ACC alkalmazása növelte az elhalt sejtek százalékos arányát, valamint erőteljes és tartósan magas ROS produkciót okozott a sejtekben a kontrollhoz képest. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a sóstressz-indukálta ET a ROS akkumuláció közvetlen szabályozásával fontos komponense a sóstressz-indukálta

PCD-nek, hasonlóképpen, mint a kamptotecin- (De Jong és mtsai. 2002) vagy a kadmium-indukálta PCD esetében (Yakimova és mtsai. 2006; Yakimova és mtsai. 2008).

Ezzel szemben az ACC és az AVG hatástalansága az alkalmazott SA kezelés mellett azt bizonyítják, hogy az ET nem játszik szerepet az SA-indukálta PCD-ben. Az ET prekursor ACC egy óra után növelte az NO produkciót az alkalmazott NaCl kezelés mellett a paradicsom sejtszuspenzióban, azonban nem változtatta azt meg az SA kezelés mellett a kontrollhoz képest. Váratlan eredményre vezetett azonban az STS együttes alkalmazása az SA-val, ami megnövelte a sejtek ROS- és csökkentette az NO produkcióját, amik együttesen a gyorsabb sejthalálhoz vezettek. Ezek az eredmények is megerősítik azt, hogy a mintákban a növekvő ROS produkció és a csökkenő NO produkció a sejtek életképességének csökkenését okozza. Az STS kiválóan alkalmas az ET receptor blokkolására a sejtekben és számos esetben alkalmazzák sejtszuspenzióban vízőldékonysága miatt (Kumar és mtsai. 2009), azonban arról nincs információnk az irodalom alapján, hogy hogyan hat ez a blokkoló szer a sejtek redox homeosztázisára, hogyan befolyásolhatja a sejtek életképességét, különösen az SA kezelések mellett feltételezhető ez a lehetőség.

A kalcium, mint másodlagos hírvivő szintén fontos szerepet tölt be a sejthalál jelátvitelében a sóstressz alatt (Shabala 2009) és az SA-indukálta jelátvitelben (Zottini és mtsai. 2007), ezért megvizsgáltuk a Ca^{2+} kelátor EGTA és a kalmodulin inhibitor W-7 hatását a paradicsom sejtszuspenzióban a sóstressz- és SA-indukálta PCD során. Mindkettő gátlószer csökkentette az elhalt sejtek százalékos arányát a letális koncentrációjú NaCl- és SA kezeléseknel, igazolva azt, hogy a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció változásától függő folyamatok esszenciális szereppel bírnak a sejthalál kiváltásában a paradicsom sejtszuspenzióban. Hasonló hatását bizonyították az EGTA és W-7 alkalmazásának a kadmium-indukálta sejthalálban (Yakimova és mtsai. 2008).

Megvizsgáltuk a MAPK szerepét is a NaCl- és SA-indukálta PCD-ben, a PD98059, a MAPK specifikus gátlószerének hozzáadásával a paradicsom sejtszuspenzióhoz. Clarke és mtsai. (2000) kimutatták, hogy a PD98059 nem gátolja az NO hatását, de blokkolja a H_2O_2 -indukálta sejthalált is, ezzel megerősítve azt, hogy a MAPK-ok szabályozzák a H_2O_2 -indukálta PCD-t. A kapott eredményeink alapján a MAPK inhibitor PD98059 csökkentette a 250 mM NaCl és a 10^{-3} M SA által indukált sejthalál mértékét, megerősítve, hogy a PD98059 szenzitív MAPK kaskád részt vesz a mindkét kezelés által indukált PCD-ben, melyet aktiválhat a citoszolikus Ca^{2+} szintváltozás és a ROS generálódás.

Az ET és a cisztein proteázok kapcsolata összetett. Jones és mtsai. (2005) bizonyították, hogy egyes proteázok hamarabb indukálódnak vad típusú petúnia szíromleveleiben a

szenescencia alatt, mint az ET inszenzitív transzgenikus növényben. Az ET az idő függvényében képes szabályozni egyes cisztein proteázok aktivitását. Az általunk alkalmazott cisztein proteáz inhibitor E-64 csökkentette a sejthalál mértékét a NaCl- és SA által indukált PCD során, megerősítve azt, hogy a cisztein proteázok is fontos szereppel bírnak mindkét stresszor által kiváltott PCD-ben.

A kapott eredmények alapján tehát megállapítható, hogy a NaCl-indukálta sejthalált az ET által serkentett ROS produkció szabályozza, míg az SA-indukálta PCD-ben az ET-nek nincs szabályozó szerepe a paradicsom sejtszuspenzióban. Mindkét stresszor okozta sejthalálban szerepet játszik a $[Ca^{2+}_{cyt}]$ szint változása, a MAPK kaszkád, a cisztein proteázok és a citoplazmatikus K^+ szint csökkenése.

Fontos megállapítás továbbá, hogy az intakt gyökerek ET produkciója eltér a sejtszuspenzióban mért ET produkció tendenciáitól. A letális SA koncentrációk (10^{-3} és 10^{-2} M) a hat órás inkubáció után a gyökerek ET produkcióját szignifikánsan csökkentették, sejtszuspenzióban azonban a 10^{-3} M-os SA kezelés hatására nem tapasztaltunk csökkenést. Intakt növények gyökerében a letális, 250 mM NaCl koncentráció szintén erőteljes ET szint csökkenést okozott, míg sejtszuspenzióban ugyanez a sókoncentráció erőteljesen aktiválta az ET szintézist. Megállapíthatjuk tehát, hogy a sejtszuspenzió klorofill nélküli, osztódó sejtjei a paradicsom esetében nem modellezik a gyökérmerisztémát.

7. Összefoglalás

Munkánk során megvizsgáltuk, milyen különbségek figyelhetők meg a sóstressz akklimatizációt javító szubletális 10^{-7} és 10^{-4} M SA koncentrációval történő kezelés hatása, valamint a magasabb, 10^{-3} és 10^{-2} M-os SA koncentrációk programozott sejthalált indukáló folyamatai között paradicsom növényekben. Megvizsgáltuk a biokémiai, fiziológiai és génexpressziós különbségeket a paradicsom által tolerálható 100 mM-os és a PCD-t kiváltó 250 mM-os NaCl és az említett SA hatásai között.

Munkánk során az alábbi főbb eredmények születtek:

1. A supraoptimális NaCl és SA koncentrációk megemelik a paradicsom növényekben a levelek és gyökerek H_2O_2 tartalmát a kezeléseket követő 6, ill. 24 órában. Ezzel párhuzamosan a 250 mM NaCl- és 10^{-3} - 10^{-2} M SA-kezelt növények szöveteinek életképessége szignifikánsan csökken. 24 órás 10^{-2} M SA kezelés hatására a gyökér sejtek DNS-e fragmentálódik. Ezzel szemben a 100 mM NaCl és 10^{-4} M SA kezelések bár oxidatív stresszt generálnak, a növények életképességét nem befolyásolják, és akklimatizációs folyamatokat indukálnak.
2. A supraoptimális NaCl és SA koncentrációk hatására, a fotoszintetikus elektrontranszport gátlása révén szignifikánsan megemelkedik a levelek H_2O_2 tartalma a fényben, ami fokozza a sejtek halálát. A sztómákon keresztüli CO_2 diffúzió limitálása is meghatározza a fotoszintetikus hatékonyságot. A 100 és 250 mM NaCl és a 10^{-3} - 10^{-2} M SA kezelések hatására szignifikánsan csökken a sztómakonduktancia 6 órán belül. Ezzel párhuzamosan csökken a levelekben a fényintenzitás és a külső CO_2 koncentráció függvényében felvett maximális CO_2 fixáció ($A_{\max}$), az A/C_i és fénygörbék (A/PPFD) lineáris szakaszának meredeksége, a karboxilációs hatékonyság (CE) illetve a fotoszintetikus kvantumhasznosítás (Q), a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek közül a maximális- (F_v/F_m) és effektív kvantumhasznosítás (Yield) és a relatív elektron transzport sebessége (Rel. ETR). Azok a növények, melyekben tartósan és szignifikánsan csökken az SA kezelések hatására a fotoszintetikus hatékonyság, később elpusztulnak. Ezt az összefüggést elsőként közöltük a szalicilsav fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatásának vonatkozásában.

3. A sztómák nyitottsága vagy zártsága nagymértékben hat a fotoszintetikus hatékonyságra, éppen ezért regulációjuk sokoldalú tanulmányozása elengedhetetlen az SA fotoszintézisre gyakorolt hatásának megértésében. Munkánk során megvizsgáltuk az SA direkt hatását a sztómamozgásra epidermisz nyúzatokon is, amit másodlagos hírvivőként a zárósejtek ROS és NO szintjeinek megváltozása közvetít. Az abaxiális epidermisz nyúzatokon a 10^{-7} és 10^{-3} M SA hatására sztómazáródás volt megfigyelhető, azonban a levelekben mértékekkel ellentétben a 10^{-4} M SA hatására a sztómák kinyíltak. Azoknál a koncentrációknál, ahol a sztómák záródtak magas ROS és NO produkciót mértük, ami gátolható volt aszkorbinsavval, katalázzal és difenilén-jodónium kloriddal a ROS, és a cPTIO-val, az NO produkció gátlószereivel, illetve specifikus kioltóival. Ezzel szemben átmeneti, kismértékű ROS növekedés és a kontrollnál alacsonyabb NO szint figyelhető meg a 10^{-4} M SA kezelés hatására a zárósejtekben. Ez az első olyan adat az irodalomban, ami azt bizonyítja, hogy az SA kezelés közvetlenül sztómanyitódást is okozhat, és az együtt jár a sztómazáródásban közismert szerepet játszó ROS és NO akkumulációjának csökkenésével.
4. Az SA a koncentrációtól függően gátolja a zárósejtek fotoszintézisét. A magas SA koncentrációk hatására a zárósejtek maximális és effektív kvantumhasznosítása, valamint a fotokémiai kioltás paramétere csökkent. 10^{-7} M SA jelenlétében a zárósejtek kloroplasztiszi magasabb Rel. ETR értéket mutattak, mint 10^{-3} M SA esetén, ami a 10^{-3} M-os koncentrációnál az Fv/Fm csökkenésével együtt a fotoszintézis irreverzibilis gátlódásának szerepét erősíti meg a sztómák zárásában. Megállapítottuk, hogy az alacsony és magas (letális) SA koncentrációk által kiváltott sztómazáródás mechanizmusa eltér. Az utóbbiban a zárósejt fotoszintézisének gátlása is jelentős szerepet játszik.
5. A letális 10^{-3} - 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések csökkentették a gyökerek ET emisszióját. Míg a szubletális 100 mM NaCl serkentette, a szubletális SA koncentrációk nem változtatták meg az ET produkciót a gyökerekben. A supraoptimális NaCl és SA koncentrációk nemcsak a levelek H_2O_2 tartalmát emelik meg, hanem erőteljes ROS és NO produkciót generálnak a gyökércsúcsokban is a kezeléseket követő 6. órában, ami hozzájárul a gyökércsúcs szövetei életképességének csökkenéséhez.
6. Megváltozik a különböző koncentrációjú NaCl és SA kezelések hatására a pro- és antiapoptikus gének expressziója. Az „antiapoptotikus” Bax Inhibitor-1-et kódoló *SIB1* gén expressziós szintje a 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelés hatására lecsökkent a gyökérben, míg a levélben megnőtt. Mivel a kezelések elsődleges támadáspontja a gyökér, a BI-1 expressziójának hiánya fontos szerepet játszhat a PCD indukciójában.

7. Ezzel párhuzamosan a PCD indukció jelátvitelében szerepet játszó MAPK-ok közül az *SLMAP3K α* expressziója a letális 10^{-3} - 10^{-2} M SA- és a NaCl-kezelt növények levelében nőtt meg, de a letális koncentrációjú 10^{-2} M SA- és NaCl-kezelt növények gyökerében nem változott szignifikánsan. Az *SLMAP3K α* azonban részt vehet megfelelően alacsony H_2O_2 koncentrációknál az oxidatív stressz elleni védekezési géneket aktiváló jelátviteli folyamatok szabályozásában is, amely feltételezhető a 100 mM-os NaCl esetén. A PCD indukciójában fontos szerepet játszanak a cisztein proteázok. A letális koncentrációjú NaCl és SA kezelések hatására megemelkedett a papain-szerű cisztein proteázok közül a *SICYP1* és a metakaspázok közül a *SIMCA1* expressziója a levélben. A letális 10^{-2} M SA kezelés megemeli az *SIVPE1* expresszióját is a paradicsom növények leveleiben.
8. A proteázok expresszióját követően a 24 órás inkubáció után emelkedik meg a proteolitikus enzimaktivitás. A letális koncentrációjú 10^{-2} M SA és 250 mM NaCl kezelések hatására mind a levelek, mind a gyökerek fehérjetartalma szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest. A proteáz aktivitás és annak változása is a levelekben azonban jóval kisebb. Ezzel párhuzamosan megnő a cisztein proteázok aktivitása a gyökerekben míg a levelekben nem mutatható ki változás ebben az időpontban a zselatin-SDS-PAGE segítségével a kezelések hatására. Megállapítható, hogy a PCD indukciója során a folyamat kulcs génjeinek expresszióját követően a terminációs szakaszban fehérje szinten is döntő változások történnek és aktiválódik többek között egy 180 kDa és egy 47 kDa molsúlyú cisztein proteáz a gyökérben. A génexpresszióban megfigyelt változások és a proteolitikus változás idő- és térbeli eltérése arra utal, hogy a proteázok aktiválódását fehérje szinten is több tényező befolyásolja.
9. A proteázaktivitással párhuzamosan az ionhomeosztázisban is jelentős változások történnek az alkalmazott SA- és NaCl kezelések hatására indukálódott PCD terminációs szakaszában. A letális koncentrációjú SA- és NaCl kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent a gyökerek és levelek kálium tartalma a kontrollhoz képest. Ezzel szemben a 10^{-4} M SA-kezelt növények levelében és gyökerében szignifikánsan nőtt a kálium tartalom, ami elősegítheti a növények akklimatizációját.
10. A letális, 250 mM NaCl és 10^{-3} M SA hatásának összehasonlítását és a PCD indukciójának mechanizmusát paradicsom sejtszuspenzióban is megvizsgáltuk. Mindkét kezelés ROS és NO produkciót indukált az idő függvényében, már a kezelést követő 30. percben. A két PCD jelátvitel között a legmarkánsabb különbség, hogy a 250 mM NaCl kezelés hatására megnő az ET produkció. Az ET bioszintézis prekurzorának, az 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) exogén alkalmazásakor megnövekedett ET fokozta a ROS produkciót és

a sóstressz-indukálta PCD-t, ezzel ellentétben az ACC nem volt hatással az elpusztult sejtek százalékos értékére az SA jelenlétében. A sóstressz-indukálta ET produkció blokkolható volt az ezüst-tiosulfáttal (STS), az etilénreceptor gátlószerével, ami csökkentette a ROS produkciót a sóstressz alatt és növelte a sejtek életképességét. Ezzel szemben az STS az SA jelenlétében fokozta a ROS produkciót és növelte a sejthalált. Mindkét stresszor hatására bekövetkező PCD mértékét csökkentette a kalcium kelátor EGTA, a kalmodulin inhibitor W-7, a MAPK kaszkád blokkoló PD98059, a cisztein proteáz blokkoló E-64 és a ROS kioltók alkalmazása, ami citoplazmatikus szabad kalcium és a MAP kináz kaszkád jelátviteli szerepére is utal. Eredményeink alapján az is megállapítható, hogy az intracelluláris K^+ koncentráció és a K^+/Na^+ arány csökkenése mind a NaCl- és mind az SA-indukálta PCD része.

11. Az intakt gyökerek ET produkciója eltér a sejtszuspenzióban mért ET produkció tendenciáitól. A letális SA koncentrációk (10^{-3} és 10^{-2} M) a hatórási inkubáció után a gyökerek ET produkcióját szignifikánsan csökkentették, a sejtszuspenzióban azonban a 10^{-3} M-os SA kezelés hatására nem tapasztalhatunk csökkenést. Intakt növények gyökerében a letális, 250 mM NaCl koncentráció szintén erőteljes ET szint csökkenést okozott, míg sejtszuspenzióban ugyanez a sókoncentráció erőteljesen aktiválta az ET szintézist. Mivel az ET a sóstressz által indukált PCD egyik legfontosabb mediátora, megállapíthatjuk, hogy a sejtszuspenzió klorofill nélküli, osztódó sejtjei a paradicsom esetében nem modellezik a gyökérmerisztémát.

8. Summary

Programmed cell death (PCD) is an integral part of the plant development and in the response to changing environments. PCD is induced by various abiotic stressors such as high salinity. A special type of PCD in plants is the hypersensitive response during biotic stress which is mediated by salicylic acid (SA). Salt stress results in the disturbance in ion homeostasis, water status and redox equilibrium of plant cells. SA can also cause changes in the water status of plants and can result in oxidative stress but it is not known how SA affects the ion homeostasis of cells. The aims of our work were to study the effects of different concentrations of NaCl and SA on the cell death initiation in tomato in order to highlight the common features or differences in the NaCl- and SA-induced PCD.

Our results can be summarized as follows:

1. Supraoptimal concentrations of NaCl and SA increased the amount of reactive oxygen species (ROS) and H_2O_2 content of leaf tissues and root apices. In parallel, the viability of plants treated with 250 mM NaCl and 10^{-3} - 10^{-2} M SA decreased significantly. The DNA in the root tissues were fragmented after treatment with 10^{-2} M SA and 250 mM NaCl after 24h. In contrast, the treatment with 100 mM NaCl and 10^{-4} M SA generated oxidative stress and induced acclimation process in plants.
2. Supraoptimal concentrations of NaCl and SA increased the amount of ROS and H_2O_2 content of leaf tissues in the light. The inhibition of photosynthetic electron transport can significantly contribute to the generation of ROS in chloroplasts. The photosynthetic performance can be controlled by the limitation of CO_2 diffusion through stomatal pores. The addition of NaCl at 100-250 mM and SA at 10^{-7} - 10^{-2} M to the hydroponic culture of tomato plants for 6 hours resulted in stomatal closure on intact leaves. In parallel with stomatal closure 100-250 mM NaCl and 10^{-3} - 10^{-2} M SA decreased the maximal CO_2 fixation rate (A_{max}), and the initial slopes of the CO_2 (A/C_i) and light response (A/PPFD) curves, the carboxylation efficiency (CE) and the photosynthetic quantum efficiency (Q), respectively and relative electron transport rate (Rel. ETR) in intact leaves. Those concentrations of SA which decreased the photosynthetic performance in intact leaves led later to PCD.
3. Salicylic acid (SA) has direct control over stomatal movement by increasing the levels of ROS and nitric oxide (NO) and by changing the photosynthetic activity of guard cells (GC).

10^{-7} and 10^{-3} M SA induced stomatal closure on the abaxial epidermal peels of tomato leaf but stomata remained open at 10^{-4} M. At those concentrations which reduced stomatal aperture ROS and NO were raised. The accumulation of active oxygen and nitrogen forms could be prevented by specific scavengers which were effective inhibitors of stomatal closure by SA. In contrast to other plant species, GCs did not show a long-lasting accumulation of ROS in the presence of 10^{-4} M SA and their NO content declined below the control level which led to stomatal opening.

4. Increasing SA concentrations resulted in a significant decrease in maximum and effective quantum yield of PSII photochemistry as well as in the photochemical quenching parameter of GCs. In the presence of 10^{-7} and 10^{-4} M SA, chloroplasts of GCs sustained a higher maximum relative electron transport rate than in the presence of 10^{-3} M, suggesting that SA induced inhibition of the GC photosynthesis can affect stomatal closure at high SA concentrations.
5. The lethal concentration of SA (10^{-3} - 10^{-2} M) and NaCl (250 mM) decreased the ethylene (ET) production in the roots while ET emission was induced by sublethal concentration of NaCl (100 mM). The sublethal concentration of SA did not cause any change in ET level. Treatments with supraoptimal concentration of NaCl and SA increased the ROS and NO production in the root apices of tomato plants, which led to significant loss of tissue vitality.
6. The specific genes involved in cell death program were induced by NaCl and SA and their expression levels were analyzed by RT-PCR. The expression of *SIBI1* coding for the antiapoptotic Bax Inhibitor increased significantly in the leaves treated with 10^{-2} M SA, but decreased in the root treated with lethal concentrations of SA and NaCl. In parallel, the expression of *SIMAP3K α* , the member of the MAPK cascade increased after the treatment with 10^{-3} - 10^{-2} M SA and 100-250 mM NaCl in the leaves, but decreased in the root treated with lethal concentration of SA and NaCl. This kinase may participate in the signal transduction leading to PCD but it can mediate the activation of defence mechanism against oxidative stress at low H_2O_2 levels. One of the most important hallmarks of PCD is the increase in the activity of specific cysteine proteases. The expression of *SICYP1*, the papain-like cysteine protease gene and the *SIMCA1*, the metacaspase gene increased after the treatment with the lethal concentrations of SA and NaCl in the leaves. *SIVPE1* expression was enhanced by the treatment with 10^{-2} M SA only in the leaves of tomato plants. This suggests that the lack of the antiapoptotic *SLBI1* expression is a characteristic feature of the roots where PCD has been initiated. Since the increased expression of various protease genes can be detected in the leaves, but not in the roots after 24 hours, it can be supposed

that changes in protease gene expression occurred earlier in the roots, or the activity of cysteine proteases is controlled at protein level.

7. The protein content in the leaves and roots decreased significantly after the 24h-long treatment with the lethal concentration of SA and NaCl. In parallel, the proteolysis, especially the cysteine protease activity increased in the roots of tomato plants. However, the gelatin-SDS-PAGE did not show protease activity in the leaves, but there were at least 3 putative cysteine protease bands in the roots. It can be concluded that there were significant changes in the protein homeostasis after the changes in the gene expression levels of cysteine proteases. In parallel, there were significant changes in the ion homeostasis of the plants after the treatment with SA and NaCl. The treatment with lethal concentration of SA and NaCl decreased the potassium content in the leaves and roots, but the treatment with 10^{-4} M SA increased the potassium level in the leaf and root tissues, which can enhance the stress acclimation of the plants.
8. Signal transduction pathways induced by salt stress and SA have been compared at cell level in tomato cell suspension culture. In tomato suspension cultures a treatment with 250 mM NaCl increased the production of ROS, NO and ET. 10^{-3} M SA-induced cell death was also accompanied by ROS and NO production, but ET emanation, the most characteristic difference between the two cell death programs, did not change. ET synthesis was enhanced by addition of ET precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which after two hours increased the ROS production in the case of both stressors and accelerated cell death under salt stress. However, it did not change the viability and NO levels in SA-treated samples. The effect of ET induced by high NaCl concentration could be blocked with silver thiosulphate (STS), an inhibitor of ET action. STS reduced the death of cells which is in accordance with the decrease in ROS production of cells exposed to high salinity. Unexpectedly, application of STS together with SA resulted in increasing ROS and reduced NO accumulation which led to a faster cell death. NaCl- and SA-induced cell death was blocked by Ca^{2+} chelator EGTA and calmodulin inhibitor W-7, or with the inhibitors of ROS. The inhibitor of MAPKs, PD98059, and the cysteine protease inhibitor E-64 reduced cell death in both cases. These results show that NaCl induces cell death mainly by ET-induced ROS production, but ROS generated by SA was not controlled by ET in tomato cell suspension. Our results suggest that the decrease of the intracellular K^{+} concentration and $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ ratio is a common phenomenon in triggering programmed cell death by lethal concentrations of SA and NaCl.

9. The ET production in the roots is different from ET production in the suspension culture. ET production decreased in the roots of tomato after the treatment with 10^{-3} és 10^{-2} M SA or 250 mM NaCl. In contrast to the results measured in the root, ET increased in the 250 mM NaCl treated cells in the suspension culture. Our results suggest that the cell suspension culture is not a good model of the root meristem cells.

9. Irodalomjegyzék

- Abreu M.E., Munne-Bosch S. (2009) Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60: 1261-1271.
- Acharya B.R., Assmann S.M. (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant. Mol. Biol.* 69: 451-462.
- Affenzeller M.J., Dareshouri A., Andosch A., Lutz C., Lutz- Meindl U. (2009) Salt stress induced cell death in the unicellular green alga *Microcystis denticulata*. *J. Exp. Bot.* 60: 939-954.
- Ahlfors R., Brosché M., Kangasjärvi J. (2009) Ozone and nitric oxide interaction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 4: 878-879.
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive Oxygen Species, antioxidants and signaling in Plants. *J. Plant Biol.* 51: 167-173.
- Allan A.C., Fluhr R. (1997) Two sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559-1572.
- Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.-J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Alvarez M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442.
- Ananieva A.A., Alexieva V.S., Popova L.P. (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 159: 685-693.
- Apparao Kolla V., Raghavendra A.S. (2007) Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 130: 91-98.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Arfan M., Athar H.R., Ashraf M. (2007) 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: 685-94.
- Argueso C.T., Hansen M., Kieber J.J. (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26: 92-105.
- Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391-396.
- Asai T., Stone J.M., Heard J.E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J., Ausubel F.M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20: 1390-1406.
- Bajkán Sz. (2004) Etilénkezelés hatása paradicsom növények ozmotikus adaptációjára és az oxidatív stresszel szembeni akklimatizációs folyamataira. *Diplomamunka*, Szegedi Tudományegyetem, Növényélettani Tanszék, Szeged. 43-45.
- Balk J., Chew SK., Leaver CJ., McCabe PF. (2003) The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.* 34: 573-583.
- Barkosky R.R., Einhellig A.F. (1993) Effects of salicylic acid on plant-water relationships. *J. Chem. Ecol.* 19: 237-247.
- Bartels S., Anderson J.C., Gonzalez Besteiro M.A., Carreri A., Hirt H., Buchala A., Metraux J.P., Pech S.C., Ulm R. (2009) MAP KINASE PHOSPHATASE1 and PROTEIN TYROSINE

- PHOSPHATASE1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2884-2897.
- Bassham DC. (2007) Plant autophagy- more than a starvation response. *Plant Biol.* 10: 587-593.
- Bastianelli F., Costa A., Vescovi M., D'Apuzzo E., Zottini M., Chiurazzi M., Schiavo F.L. (2010) Salicylic acid differentially affects suspension cell cultures of *Lotus japonicus* and one of its non-symbiotic mutants. *Plant Mol. Biol.* 72: 469-483.
- Belenghi B., Romero-Puertas M., Vercammen D., Brackener A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical residue. *J. Biol. Chem.* 282: 1352-1358.
- Beligni M.V., Fath A., Bethke P. C., Lamattina L., Jones R.L. (2002) Nitric Oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 129: 1642-1650.
- Behboodi B.S., Samadi K. (2004) Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. *Plant Sci.* 167: 411-416.
- Benchabane M., Schlüter U., Vorster J., Goulet M.C., Michaud D. (2010) Plant cystatins. *Biochimie* 92: 1657-66.
- Bi YH., Chen WL., Zhang WN., Zhou Q, Yun LJ., Xing D. (2009) Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium- induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Cell.* 101: 629-643.
- Bilger W., Schreiber U. (1986) Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth. Res.* 10: 303-308.
- Bilger W., Björkman O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-185.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee A.K., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M., Bolwell G.P. (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 47: 851-863.
- Bleecker A.B., Kende H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 1-18.
- Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F., Dong X. (1997) The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9: 1573-1584.
- Bradford M.M. (1976) 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.
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir J.S., Neill S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45: 113-122.
- Brodersen P., Gro Malinovsky F., Hematy K., Newman M.A., Mundy J. (2005) The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* acd11. *Plant Physiol.* 138: 1037-1045.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (szerk.) (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567-585.
- Byczkowska A., Kunikowska A., Kaźmierczak A. (2012) Determination of ACC-induced cell-programmed death in roots of *Vicia faba* ssp. *minor* seedlings by acridine orange and ethidium bromide staining. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-0120383-9.
- Cacas J.L., Diamond M. (2009) Is the autophagy machinery an executioner of programmed cell death in plants? *Trends Plant Sci.* 14: 299-300.
- Cao W.H., Liu J., He X.J., Mu R.L., Zhou H.L., Chen S.Y., Zhang J.S. (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt stress responses. *Plant Physiol.* 143: 707-719.

- Carimi F., Terzi M., De Michele R., Zottini M., Schiavo F.L (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Sci.* 166: 963–969.
- Chandlee J.M. (2001) Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol. Plant.* 113: 1-8.
- Chen HJ., Hou WC., Kuc J., Lin YH. (2001) Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. *J. Exp. Bot.* 52: 1219-1226.
- Chen X., Wang Y., Li J., Jiang A., Cheng Y., Zhang W. (2009) Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 407-415.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Clarke A., Desikan R., Hurst R.D., Hancock J.T., Neill S.J. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* 24: 667-677.
- Colcombet J., Hirt H. (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* 413: 217-226.
- Coll NS., Epple P., Dangl J.L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18: 1247-1256.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quirós M., León A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gómez M., del Río A.L. (2004) Cellular and subcellular localisation of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136: 2722-2733.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci.* 181: 604-611.
- Dangl J.L., Dietrich R.A., Thomas H. (2000) Senescence and programmed cell death. *Biochem. Mol. Biol. Plants* 2000: 1044-1100.
- Danon A., Gallois P (1998) UV-C radiation induces apoptotic like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 437: 131-136.
- Danon A., Delorme V., Mailhac N., Gallois P. (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 647-655.
- Danon A., Miersch O., Felix G., Camp RGL., Apel K. (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 41: 68-80.
- Dat JF., Pellinen R., Beeckman T., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjarvi J., Inze D., Van Breusegem F. (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* 33: 621-632.
- Dean J.V., Mills J.D. (2004) Uptake of salicylic acid 2-*O*- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiol. Plant.* 120: 603-612.
- De Jong A., Hoeberichts F.A., Yakimova E.T., Maximova E., Woltering E.J. (2000) Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211: 656-662.
- De Jong A., Yakimova E.T., Kapchina V.M., Woltering E.J. (2002) A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 21: 537-545.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13454-13459.
- Demidchik V., Cuin TA., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. (2010) *Arabidopsis* root K^{+} -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J. Cell Sci.* 123: 1468-1479.

- Del Pozo O., Pedley K.F., Martin G.B. (2004) MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J.* 23: 3072-3082.
- De Pinto M.C., Paradiso A., Leonetti P., De Gara L. (2006) Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J.* 48: 784-795.
- De Pinto M.C., Locato V., De Gara L. (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ.* 35: 234-244.
- Del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141: 330-335.
- Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T., Neill S.J. (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55: 205-212.
- Doyle S.M., Diamond M., McCabe P.F. (2010) Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 61: 473-482.
- Drake R., John I., Farrell A., Cooper W., Schuch W., Grierson D. (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 30: 755-767.
- Drew M.C., He C.J., Morgan P.W. (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* 5: 123-127.
- Duan Y., Zhang W., Li B., Wang Y., Li K., Sodmergen, Han C., Zhang Y., Li X. (2010) An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in Arabidopsis. *New Phytol.* 186: 681-695.
- Dubois M., Gibbs K. A., Hamilton J. K., Roberts D. A., Smith F. (1956) Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-352.
- Ederli L., Morettini R., Borgogni A., Wasternack C., Miersch O., Reale L., Ferranti F., Tosti N., Pasqualini S. (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol.* 142: 595-608.
- Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P., Raskin I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2480-2484.
- Erdei L. (szerk.) (2004) Növényélettan, Növekedés- és fejlődésélettan. JATEPress, Szeged.
- Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., Rona J.P., Bouteau F. (2008) Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J. Exp. Bot.* 59: 3121-3129.
- Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41: 281-284.
- Flowers T.J., Flowers S.A. (2005) Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agr Water Manage* 78: 15-24.
- Fobert P.R., Despres C. (2005) Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 378-382.
- Foyer H.C., Shigeoka S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155: 93-100.
- Gallé Á. (2010) Búzafajták ozmotikus- és szárazságstressz alatti akklimatizációja, a glutation transzferázok szerepe a stresszválaszban. *Doktori (PhD) értekezés*, Szegedi Tudományegyetem
- Gallie D.R., Young T.E. (2004) The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol. Gen. Genet.* 271: 267-281.
- Gamborg O., Miller R., Ojima K. (1968) Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gangopadhyay G., Basu S., Mukherjee B.B., Gupta S. (1997) Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. *Plant Cell Tiss Org* 49: 45-52.

- García-Heredia J.M., Hervás M., De la Rosa M.A., Navarro J.A. (2008) Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. *Planta* 228: 89-97.
- García-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M.R. (2003) Nitric oxide regulates K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11116-11121.
- García-Mata C., Lamattina L. (2007) Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* 17: 143-151.
- García-Sánchez F., Jofon J., Carvajal M., Syvertsen J.P. (2002) Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na^+ and Cl^- accumulation in 'Sunburst' mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Sci.* 162: 705-712.
- Gechev T.S., Hille J. (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* 168: 17-20.
- Gémes K. (2011) Paradicsom sóstressz akklimatizációjának javítása szalicilsav előkezeléssel: a reaktív oxigénformák és a nitrogén-monoxid szerepe. *Doktori (PhD) értekezés*, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék, Szeged.
- Gémes K., Poór P., Horváth E., Kolbert Zs., Szopkó D., Szepesi Á., Tari I. (2011) Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiol. Plant.* 142: 179-192.
- Genoud T., Buchala A.J., Chua N.H., Metraux J.P. (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31: 87-95.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Ghanem M.E., Albacete A., Martínez-Andujar C., Acosta M., Romero-Aranda R., Dodd I.C., Lutts S., Pérez-Alfocea F. (2008) Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Exp. Bot.* 59: 3039-3050.
- Ghanem M.E., Albacete A., Smigocki A.C., Frebort I., Pospíšilová H., Martínez-Andujar C., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F. (2011) Root-synthesised cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinised tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Exp. Bot.* 62: 125-140.
- Ghasempour H.R., Gaff D.F., Williams R.P.W., Gianello R.D. (1998) Contents of sugars in the leaves of drying desiccation tolerant flowering plants, particularly grasses. *Plant Growth Regul.* 24: 185-191.
- Glazener J.A., Orlandi E.W., Baker C.J. (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* 110: 759-763.
- Goh C.-H., Schreiber U., Hedrich R. (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll a fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli. *Plant Cell Environ.* 22: 1057-1070.
- Goh C.-H., Hedrich R., Nam H. G. (2002) Evidence for the functional organization of chloroplasts in adaxial guard cells of *Vicia faba* leaves by single cell analysis. *Plant Sci.* 162: 965-972.
- Greenberg J.T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12094-12097.
- Gribic V., Bleeker A.B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 8: 595-602.
- Gribic V. (2003) SAG2 and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants. *Physiol. Plant.* 119: 263-269.
- Grudkowska M., Zagdańska B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* 5: 609-624.
- Gunawardena A., Pearce D.M., Jackson M.B., Hawes C.R., Evans D.E. (2001) Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214.

- Gunawardena A.H.L.A.N. (2008) Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *J. Exp. Bot.* 59: 445-451.
- Guóth A., Tari I., Gallé Á., Csiszár J., Pécsváradi A., Cseuz L., Erdei L. (2009) Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity. ABA levels and grain yield. *J. Plant Growth Regul.* 28: 167-176.
- Gupta K.J., Igamberdiev A.U, Manjunatha G., Segu S., Moran J.F., Neelawarne B., Bauwe H., Kaiser W.M. (2011) The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Sci.* 181: 520-526.
- Gust A.A., Nürnberger T. (2012) Plant immunology: A life or death switch. *Nature* 486: 198-199.
- Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. (2001) Does the redox status of cytochrome c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radical Bio. Med.* 31: 697-703.
- Hano C., Addi M., Fliniaux O., Bensaddek L., Duverger E., Mesnard F., Lamblin F., Lainé E. (2008) Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 590-600.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N., Nakaune S., Kuroyanagi M., Nishimura M. (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 404-408.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N. (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ.* 18: 1298-1304.
- Harper J.R., Balke N.E. (1981) Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiol.* 68: 1349-1353.
- Harper J.F., Breton G., Harmon A. (2004) Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 263-288.
- Harrak H., Azelmat S., Baker EN., Tabaeizadeh Z. (2001) Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* 44: 368-74.
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858.
- Hayashi T., Yoshida K. (1988) Cell expansion and single-cell separation induced by colchicine in suspension-cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2618-2622.
- Hayat S., Fariduddin Q., Ali B., Ahmad A. (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron. Hung.* 53: 433-437.
- Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot.* 68: 14-25.
- He C-J., Morgan, P.W., Drew M.C. (1996) Transduction of an ethylene signals required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* 112: 463-472.
- He R., Drury G.E., Rotari V.I., Gordon A., Willer M., Farzaneh T., Woltering E.J., Gallois P. (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 283: 774-783.
- Hetherington A.M., Woodward F.I. (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424: 901-908.
- Hoeberichts F.A., Have T.A, Woltering E.J., (2003) A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217: 517-522.
- Hofius D., Munch D., Bressendorf S., Mundy J., Petersen M. (2011) Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death Differ.* 18: 1257-1262.
- Horvath E., Janda T., Szalai G., Páldi E. (2002) 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.
- Horvath E., Szalai G., Pál M., Páldi E., Janda T. (2003) A szalicilsav szerepe az abiotikus stressztolerancia kialakulásában. *Bot. Közlem.* 90: 129-138.

- Horvath. E., Szalai G., Janda T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.* 26: 290-300.
- Hughes F.M., Cidlowski J.A. (1999) Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Enzyme Regul.* 39: 157-171.
- Huh G.H., Damaz B., Matsumoto T.K., Reddy M.P., Rus A.M., Ibeas J.I. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29: 649-659.
- Hung K.T., Kao C.H. (2004) Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid –induced senescence of rice leaves. *J. Plant Physiol.* 161: 1347-1357.
- Huson D.H., Scornavacca C. (2012) Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* doi: 10.1093/sysbio/sys062.
- Ishikawa T., Watanabe N., Nagano M., Kawai-Yamada M., Lam E. (2011) Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. *Cell Death Differ.* 18: 1271-1278.
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B.E., Murata Y., Kwak J.M. (2009) MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 20520-20525.
- Janda K., Hideg É., Szalai G., Kovács L., Janda T. (2012) Salicylic acid may indirectly influence the photosynthetic electron transport. *J. Plant Physiol.* 169: 971-978.
- Jaskiewicz M., Conrath U., Peterhansel C. (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* 12: 50-55.
- Jin Z., El-Deiry WS. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 4: 139-163.
- Jonak C., Ökresz L., Bögre L., Hirt H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 415-424.
- Jones A. (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* 5: 225-230.
- Jones M.L., Chaffin G.S., Eason J.R., Clark D.G. (2005) Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas. *J. Exp. Bot.* 56: 2733-2744.
- Joseph B., Jini D. (2010) Salinity induced programmed cell death in plants: challenges and opportunities for salt-tolerant plants. *J. Plant Sci.* 5: 376-390.
- Juan M., Rivero R. M., Romero L., Ruiz J. M. (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 54: 193-201.
- Kangasjarvi S., Neukermans J., Li S., Aro EM., Noctor G. (2012) Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J. Exp. Bot.* 63: 1619-1636.
- Kato H., Takemoto D., Kawakita K. (2012) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiol. Plant.* doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01684.x.
- Kawai-Yamada M., Ohori Y., Uchimiya H. (2004) Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16: 21-32.
- Kawai-Yamada M., Yoshinaga K., Ogawa T., Ihara-Ohori Y., Uchimiya H. (2005) Oxidative stress and plant cell death suppressors. *Plant Biotechnol.* 22: 419-422.
- Kawano T. (2003) Roles of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defence and growth induction. *Plant Cell Rep.* 31: 829-837.
- Kawano T., Furuichi T., Muto S. (2004) Controlled free salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnol.* 21: 319-355.
- Kerkeb L., Donaire J.P., Rodriguez-Rosales M.P. (2001) Plasma membrane H⁺-ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl. *Physiol. Plant.* 111: 483-490.
- Khokon MDAR., Okuma E., Hossain MA., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori IC., Murata Y. (2011) Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 34: 434-443.

- Klee H.J. (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 660-667.
- Knight V.I., Wang H., Lincoln J.E., Lulai E.C., Gilchrist D.G., Bostock R.M. (2001) Hydroperoxides of fatty acids induced programmed cell death in tomato protoplasts; *Physiol. Mol. Plant P.* 59: 277-286.
- Koshland D.E. (1992) The molecule of the year. *Science* 258: 1861.
- Kopper L., Fésűs L. (2002) Apoptózis. Medicina, Bp.
- Krantev A., Yordanova R., Popova L. (2006) Salicylic acid decreases Cd toxicity in maize plants. *Gen. Appl. Plant Physiol.* Special issue, 45-52.
- Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J. Plant Physiol.* 165: 920-931.
- Krinke O., Flemr M., Vergnolle C., Collin S., Renou J.P., Taconnat L., Yu A., Burketova L., Valentova O., Zachowski A., Ruelland E. (2009) Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* 150: 424-436.
- Krupinska K., Humbeck K. (2008) Senescence processes and their regulation. *Plant Biol.* 10: 1-3.
- Kubis S.E., Castilho AMMF., Vershinin A.V., Heslop-Harrison J.S. (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol. Biol.* 52: 69-79.
- Kumar V., Parvatam G., Ravishankar G.A. (2009) AgNO₃ – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electric J. Biotechnol.* 12: 1-15.
- Kuriyama H., Fukuda H. (2002) Developmental programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 568-573.
- Kuroyanagi M., Hatsugai N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 280: 32914-32920.
- Lam E., Kato N., Lawton M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Lam E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 5: 305-315.
- Lambers H., Chapin F. S., Pons T. L. (1998) Plant physiological ecology. *Springer-Verlag*. New York.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M, Pagnussat G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54: 109-136.
- Lamotte O., Courtois C., Barnavon L. (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and signaling properties of a fascinating molecule. *Planta* 221: 1-4.
- Lane B.G. (2002) Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* 53: 67-75.
- Lawson T., Oxborough K., Morison J.I.L., Baker N.R. (2002) Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells and mesophyll cells in intact leaves to light, CO₂ and humidity. *Plant Physiol.* 128: 52-62.
- Lawson T. (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytol.* 181: 13-34.
- Lee J.S. (1998) The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. *J. Plant Biol.* 41: 97-102.
- Lee K.P., Kim C., Landgraf K., Apel K. (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 104: 10270-10275.
- Lei G., Shen M., Li Z.G., Zhang B., Duan K.X., Wang N., Cao Y.R., Zhang W.K., Ma B., Ling H.Q., Chen S.Y., Zhang J.S. (2011) EIN2 regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 34: 1678-1692.
- Lescot M., Déhais P., Moreau Y., De Moor B., Rouzé P., Rombauts S. (2002) PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30: 325-327.

- Leshem Y.Y., Harmaty E. (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide Free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. *J. Plant Physiol.* 148: 258-263.
- Leslie C.A., Romani R.J. (1986) Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 5: 144-146.
- Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R., Lamb C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 4: 427-437.
- Li H., Guo H. (2007) Molecular basis of the ethylene signaling and response pathway in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.* 26: 106-117.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Lin J., Wang Y., Wang G. (2006) Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.* 163: 731-739.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137: 921-930.
- Lindermayr C., Sell S., Müller B., Leister D., Durner J. (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 22: 2894-2907.
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Talloczy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P. (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121: 567-577.
- Lovdal T., Lillo C. (2009) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal. Biochem.* 387: 238-242.
- Love A.J., Milner J.J., Sadanandom A. (2008) Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci.* 13: 589-595.
- Love A.J., Milner J.J., Sadanandom A. (2009) Response to Cacas and Diamond: Is the autophagy machinery an executioner of programmed cell death in plants? *Trends Plant Sci.* 14: 300-301.
- Lovelock C.E., Ball M.C. (2002) Influence of salinity on photosynthesis of halophytes. In: Lauchli A., Lüttge U. (2002) Salinity: Environment – Plants – Molecules. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, 315-339.
- Lu S., Justin D. Faris J.D., Sherwood R., Edwards M.C. (2013) Dimerization and protease resistance: New insight into the function of PR-1. *J. Plant Physiol.* 170: 105-110.
- Mandal S., Mallick N., Mitra A. (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 642-649.
- Marschner P. (2012) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK. 178-190.
- Maathuis F.J., Amtmann A. (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Manthe B., Schultz M., Schnabl H. (1992) Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: Evidence for salicylic acid metabolization. *J. Chem. Ecol.* 18: 1525-1539.
- Marschner P. (2012) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK.
- Martínez-Ballesta M.C., Martínez V., Carvajal M. (2004) Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environ. Exp. Bot.* 52: 161-174.
- Mateo A., Funck D., Mühlenbock P., Kular B., Mullineaux P.M., Karpinski S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.* 57: 1795-1807.
- Meijer W.H., van der Klei I.J., Veenhuis M., Kiel J.A. (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* 3: 106-116.
- Melotto M., Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Miao Y., Laun T.M., Smykowski A., Zentgraf U. (2007) *Arabidopsis MEKK1* can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol. Biol.* 65: 63-76.

- Miao Y., Zentgraf U. (2007) The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the salicylic acid beyond defence jasmonic acid and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell* 19: 819-830.
- Miller G.A.D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* 33: 453-467.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Breusegem F.V. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16: 300-309.
- Moharekar S.T., Lokhande S.D., Hara T., Tanaka R., Tanaka A., Chavan P.D. (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* 41: 315-317.
- Molina A., Bueno P., Marin M.C., Rodriguez-Rosales M.P., Belver A., Venema K., Donair J.P. (2002) Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension culture to NaCl. *New Phytol.* 156: 409-415.
- Moller I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Moller I.M., Sweetlove L.J. (2010) ROS signalling – specificity is required. *Trends Plant Sci.* 15: 370-374.
- Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D.F. (2010) NO synthesis and signaling in plants-where do we stand? *Physiol. Plant.* 138: 372-383.
- Morel J.B., Dangl J. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4: 671-683.
- Mori CM., Pinontoan R., Kawano T., Muto S. (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* 42: 1383-1388.
- Morris K., Mackerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan-Wollaston V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23: 677-685.
- Mullineaux P., Karpinski S. (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 43-48.
- Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagendra-Prasad D., Sudhakar N., Murugesan K., Mohan N. (2008) Pre-exposure of calli to ozone promotes tolerance of regenerated *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 plantlets against acute ozone stress. *J. Plant Physiol.* 165: 1288-1299.
- Nakagami H., Soukupova H., Schikora A., Zarsky V., Hirt H. (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281: 38697-38704.
- Nadwodnik J., Lohaus G. (2008) Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritime*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227: 1079-1089.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247.
- Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol.* 159: 11-35.

- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59: 165-176.
- Nemeth M., Janda T., Eszter J., Horvath E., Paldi E., Szalai G. (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci.* 162: 569-574.
- Németh T. (2005) Talajvédelem: Országos Talajvédelmi Stratégia tudományos háttere. Bp. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium.
- Niyogi K.K., Li X-P., Rosenberg V., Jung H-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56: 375-382.
- Noodén L.D. (2004) Plant cell death processes. *Elsevier Academic Press*
- Orzáez D., Granell A. (1997) DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J.* 11: 137-144.
- Overmyer K., Tuominen H., Kettunen R., Betz C., Langebartels C., Sandermann H., Kangasjärvi J. (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849-1862.
- Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8: 335-342.
- Overmyer K., Brosche M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M., Saarma M., Scheel D., Kangasjarvi J. (2005) Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiol.* 137: 1092-1104.
- Ördög A., Wodala B., Rózsavölgyi T., Tari I., Horváth F. (2013) Regulation of guard cell photosynthetic electron transport by nitric oxide. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/ers397.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., del Río L.A. (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 521-530.
- Pancheva T.V., Popova L.P., Uzunova A.N. (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *J. Plant Physiol.* 149: 57-63.
- Papp A. (2010) NaCl és szalicilsav okozta programozott sejthalál vizsgálata paradicsom sejtszuszpenzióban. *Szakdolgozat*, Szegedi Tudományegyetem Növénybiológiai Tanszék, Szeged.
- Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 220: 826-837.
- Parida A.K., Das A.B., Mitra B., Mohanty P. (2004) Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the Mangrove *Bruguiera parviflora*. *National Institute for Plant Biodiversity Conservation and Research* 59: 408-14.
- Parida A.K., Das A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Park S.W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessing D.F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116.
- Pereira D.A., Ramos M.V., Souza D.P., Portela T.C.L., Guimares J.A., Madeira S.V.F., Freitas D.T. (2010) Digestibility of defense proteins in latex of milkweeds by digestive proteases of *Monarch butterflies*, *Danaus plexippus* L.: A potential determinant of plant–herbivore interactions. *Plant Sci.* 179: 348-355.
- Petersson SV., Johansson A.I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang JY., Moritz T., Grebe M., Benfey P.N., Sandberg G., Ljung K. (2009) An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* 21: 1659-1668.
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Aschan G., Batic F., Turk B., Macek I. (2007) Photosynthetic performance (CO₂-compensation point, carboxylation efficiency, and net photosynthesis) of timothy grass (*Phleum pratense* L.) is affected by elevated carbon dioxide in post-volcanic mofette areas. *Environ. Exp. Bot.* 61: 41-48.

- Pitman M.G., Lauchli A. (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Lauchli A., Lüttge U. (2002) Salinity: Environment – Plants – Molecules. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, 3-20.
- Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* 5: 278-282.
- Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141: 910-923.
- Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P., Murr D.P., and Watkins C.B. (1997) 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.
- Rao M.V., Lee H., Davis K.R. (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32: 447-456.
- Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Reape T.J., McCabe P.F. (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180: 13-26.
- Ren D., Yang H., Zhang S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 559-565.
- Rentel M.C., Knight M.R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 1471-1479.
- Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S.C., Grierson C.S., Hirt H., Knight M.R. (2004) OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427: 858–861.
- Rivas-San Vicente M., Plasencia J. (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62: 3321-3338.
- Robatzek S., Somssich E. (2001) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* 28: 123-133.
- Roberts I.N., Caputoa C., Criadoa M.V., Funkb C. (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiol. Plant.* 145: 130–139.
- Rhodes D., Nadolska-Orczyk A., Rich P.J. (2002) Salinity. osmolytes and compatible solutes. In: Lauchli A., Lüttge U. (2002) Salinity: Environment – Plants – Molecules. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, 181-204.
- Rogers H.J. (2005) Cell death and organ development in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* 71: 225-261.
- Roháček K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29.
- Roleda M.Y., Hanelt D., Wiencke C. (2006) Exposure to ultraviolet radiation delays photosynthetic recovery in Arctic kelp zoospores. *Photosynth. Res.* 88: 311-322.
- Rossano R., Larocca M., Riccio P. (2011) 2-Dzymographic analysis of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) florets proteases: Follow up of cysteine protease isotypes in the course of post-harvest senescence. *J. Plant Physiol.* 168:151-1525.
- Rozen S., Skaletsky H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (szerk.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sahu G.K., Kar M., Sabat S.C. (2002) Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. *Plant Biol.* 4: 321-328.
- Sahu G.K. (2013) Salicylic Acid: Role in Plant Physiology and Stress Tolerance. In: G.R. Rout and A.B. Das (szerk.): *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer. DOI 10.1007/978-81-322-0807-5_9. 217-239.
- Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E. (2005) Capases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiol.* 137: 841-847.

- Savill J., Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788.
- Schaller A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.
- Schaller A., Oecking C. (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11: 263-272.
- Scheel D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 305-310.
- Scott I., Logan D.C. (2008) Mitochondria and cell death pathways in plants. *Plant Signal Behav.* 3: 475-477.
- Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., de Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R., Montesinos C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50: 1023-1036.
- Shabala S., Cuin T.A., Pottosin I. (2007) Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Lett.* 581: 1993-1999.
- Shabala S. (2009) Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *J. Exp. Bot.* 60: 709-712.
- Shen H., Prider J.N., Facelli J.M., Watling J.R. (2010) The influence of the hemiparasitic angiosperm *Cassytha pubescens* on photosynthesis of its host *Cytisus scoparius*. *Funct. Plant Biol.* 37: 14-21.
- Shi Q., Bao Z., Zhu Z., Ying Q., Qian Q. (2006) Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regul.* 48: 127-135.
- Shindo T., Van der Hoorn R.A.L. (2008) Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* 9: 119-125.
- Shindo T., Misas-Villamil J.C., Hörger A.C., Song J., Van der Hoorn R.A.L. (2012) A role in immunity for Arabidopsis cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS ONE* 7: e29317. doi:10.1371/journal.pone.0029317.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O. (2011) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248: 447-455.
- Sierla M., Rahikainen M., Salojärvi J., Kangasjärvi J., Kangasjärvi S. (2013) Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antiox. Redox Sign.* DOI: 10.1089/ars.2012.5016.
- Singh M., Bhogal D, Goel A, Kumar A (2011) Cloning, in silico characterization and interaction of cysteine protease and cystatin for establishing their role in early blight disease in tomato. *J Plant Biochem. Biotechnol.* 20: 110-117.
- Smaili S.S., Hsu Y-T., Carvalho A.C.P., Rosenstock T.R., Sharpe J.C., Youle R.J. (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 183-190.
- Smertenko A., Franklin-Tong V.E. (2011) Organisation and regulation of cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death Differ.* 18: 1263-1270.
- Spadaro D., Yun B-W., Spoel S.H., Chu C., Wang Y-Q., Loake G.J. (2010) The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiol. Plant.* 138: 360-371.
- Speer M., Kaiser W.M. (1991) Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. *Plant Physiol.* 97: 990-997.
- Stein J.C., Hansen G. (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.* 121: 71-79.
- Sugawara H., Shibuya K., Yoshioka T., Hashiba T., Satoh S. (2002) Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *J. Exp. Bot.* 53: 407-413.

- Suhita D., Raghavendra A.S., Kwak J.M., Vavasseur A. (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* 134: 1536–1545.
- Sun J., Dai S., Wang R., Chen S., Li N., Zhou X., Lu C., Shen X., Zheng X., Hu Z., Zhang Z., Song J., Xu Y. (2009) Calcium mediates root K^+/Na^+ homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiol.* 29: 1175-86.
- Sun J., Li L., Liu M., Wang M., Ding M., Deng S., Lu C., Zhou X., Shen X., Zheng X., Chen S. (2010) Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K^+/Na^+ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 103: 205-215.
- Swidzinski J.A., Leaver C.J., Sweetlove L.J. (2004) A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochem.* 65: 1829-2839.
- Szepesi Á., Csiszár J., Bajkán Sz., Gémes K., Horváth F., Erdei L., Deér A., Simon L.M., Tari I. (2005) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. *Acta Biol. Szeged.* 49: 123-125.
- Szepesi Á., Csiszár J., Gémes K., Horváth E., Horváth F., Simon M.L., Tari I. (2009) Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na^+ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J. Plant Physiol.* 166: 914-925.
- Szepesi Á. (2009) Hosszútávú szalicilsav előkezelés hatása paradicsom növények sóstressz akklimatizációjára. *Doktori (PhD) értekezés*, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék, Szeged.
- Szopkó D. (2011) Sóstressz és szalicilsav indukálta programozott sejthalál vizsgálata paradicsom sejtszuszpenzióban. *Szakdolgozat*, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék, Szeged.
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z.L., Song J.Q., Wang C., Zuo J.R., Dong X.N. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956.
- Taiz L., Zeiger E. (2006) *Plant Physiology*. Fourth edition, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi S., Yamasaki H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *Febs Lett.* 512: 145-148.
- Talbott L.D., Zeiger E. (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol.* 102: 1163-1169.
- Tari I., Csiszár J., Szalai G., Horváth F., Pécsváradi A., Kiss G., Szepesi Á., Szabó M., Erdei L. (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biol. Szeged.* 46: 556-56.
- Tari I., Csiszár J., Gémes K., Szepesi Á. (2006) Modulation of Cu^{2+} accumulation by (aminoethoxyvinyl)glycine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone), the inhibitors of stress ethylene and polyamine synthesis in wheat genotypes. *Cer. Res. Commun.* 34: 989-996.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 15: 141-152.
- Thomas H., Ougham H.J., Wagstaff C., Stead A.D. (2003) Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* 54: 1127-1132.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997) Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187-1194.
- Toledo-Aceves T., Swaine M.D. (2008) Biomass allocation and photosynthetic responses of lianas and pioneer tree seedlings to light. *Acta Oecologica* 34: 38-49.
- Trivedi S., Erdei L. (1992) Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^+ and on the influx and translocation of K^+ in wheat of low and high K^+ status. *Physiol. Plant.* 84: 94-100.

- Trobacher C.P., Senatore A., Greenwood J.S. (2006) Masterminds or minions? Cysteine proteinases in plant programmed cell death. *Can. J. Bot.* 84: 651-667.
- Trobacher C.P. (2009) Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87: 757-769.
- Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zaviyalov A., Lam E., Bozhkov P.V. (2011) Metacaspases. *Cell Death Differ.* 18: 1279-1288.
- Uzunova A.N., Popova L.P. (2000) Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38: 243-250.
- Van Breusegem F., Dat J.F. (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 141: 384-390.
- Van den Burg H.A., Takken F.L.W. (2009) Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* 14: 286-294.
- Van Doorn W.G. (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends Plants Sci.* 10: 478-483.
- Van Doorn G.W., Woltering E.J. (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plants Sci.* 10: 117-123.
- Van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P.V. (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Diff.* 18: 1241-1246.
- Van Doorn W.G. (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J. Exp. Bot.* 62: 4749-4761.
- Van Loon L.C., Van Strien E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant P.* 55: 85-97.
- Vartapetian A.B., Tuzhikov A.I., Chichkova N.V., Taliansky M., Wolpert T.J. (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death Differ.* 18: 1289-1297.
- Velikova V., Yordanov I., Edreva A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Vianello A., Zancani M., Peresson C., Petrusa E., Casolo V., Krajnakova J., Patui S., Braidot E., Macri F. (2007) Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiol. Plant.* 129: 242-252.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 177-206.
- Vranová E., Inzé D., Breusegem F.V. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
- Wada S., Ishida H., Izumi M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Mae T., Makino A. (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* 149: 885-893.
- Wang P., Song C.P. (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol.* 178: 703-718.
- Wang H., Liang X., Wan Q., Wang X., Bi Y. (2009) Ethylene and nitric oxide are involved in maintain ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* 230: 293-307.
- Wang H., Liang X., Huang J., Zhang D., Lu H., Liu Z., Bi .Y (2010a) Involvement of ethylene and hydrogen peroxide in induction of alternative respiratory pathway in salt-treated *Arabidopsis* calluses. *Plant Cell Physiol.* 51: 1754-1765.
- Wang J., Li X., Liu Y., Zhao X. (2010b) Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol.* 167: 1145-51.
- Wang Y., Chen C., Loake G.J., Chu C. (2010c) Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell* 1: 133-142.
- Watanabe N., Lam E. (2006) *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45: 884-894.
- Watanabe N., Lam E. (2009) Bax Inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3149-3167.

- Weise A., Gröner F., Sonnewald U., Deppner H., Lerch J., Hebbeker U., Flügge U-I., Weber A. (1999) Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett.* 461: 13-18.
- Wi S.J., Park K.Y. (2002) Antisense expression of carnation cDNA encoding ACC synthase or ACC oxidase enhances polyamine content and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Mol. Cells* 13: 209-220.
- Wi S.J., Jang S.J., Park K.Y. (2010) Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Cells* 30: 37-49.
- Wodala B., Deák Zs., Vass I., Erdei L., Altorjay I., Horváth F. (2008) In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiol.* 146: 1920-1927.
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 322: 681-692.
- Woltering E.J. (2004) Death proteases come alive. *Trends Plant Sci.* 9: 496-472.
- Woltering (2010) Death proteases: alive and kicking. *Trends Plant Sci.* 15: 185-188.
- Wong S.C., Cowan I.R., Farquhar G.D. (1979) Stomatal conductance correlates with photosynthetic activity. *Nature* 282: 424-426.
- Wrzaczek M., Brosché M., Kollist H., Kangasjärvi J. (2009) Arabidopsis GRI is involved in the regulation of cell death induced by extracellular ROS. *PNAS* 106: 5412-5417.
- Wu X.X., Ding H.D., Chen J.L., Zhang H.J., Zhu W.M. (2010) Attenuation of salt-induced changes in photosynthesis by exogenous nitric oxide in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill. L.) seedlings. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 7837-7846.
- Wu Y., Zhang D., Chu Y. J., Boyle P., Wang Y., Brindle I. D., De Luca V., Despres C. (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* 1: 639-647.
- Xie Z., Zhang ZL., Hanzlik S., Cook E., Shen Q.J. (2007) Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid inducible WRKY gene. *Plant Mol. Biol.* 64: 293-303.
- Xin L., Shuqiu Z., Chenghou L. (2003) Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. *Chinese Sci. Bull.* 48: 449-452.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. (2008) Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283: 26996-27006.
- Yakimova E.T., Kapchina-Toteva V.M., Laarhoven L.J., Harren F.M., Woltering E.J. (2006) Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 581-589.
- Yakimova E.T., Woltering E.J., Kapchina-Toteva V.M., Harren F.J.M., Cristescu S.M. (2008) Cadmium toxicity in cultured tomato cells-role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. *Cell Biol. Int.* 32: 1521-9.
- Yamada T., Kondo A., Ohta H., Masuda T., Shimada H., Takamiya K. (2001) Isolation of the protease component of maize cysteine protease-cystatin complex: Release of cystatin is not crucial for the activation of the cysteine protease. *Plant Cell Physiol.* 42: 710-716.
- Yamada K., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2004) The slow wound-response of gVPE is regulated by endogenous salicylic acid in *Arabidopsis*. *Planta* 218: 599-605.
- Yang T.F., Gonzalez-Carranza Z.H., Maunders M.J., Roberts J.A. (2008) Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana glauca* plants. *Ann. Bot.* 101: 301-310.
- Yao N., Tada Y., Park P., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S. (2001) Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats. *Plant J.* 28: 13-26.
- Yoda H., Hiroi Y., Sano H. (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* 142: 193-206.

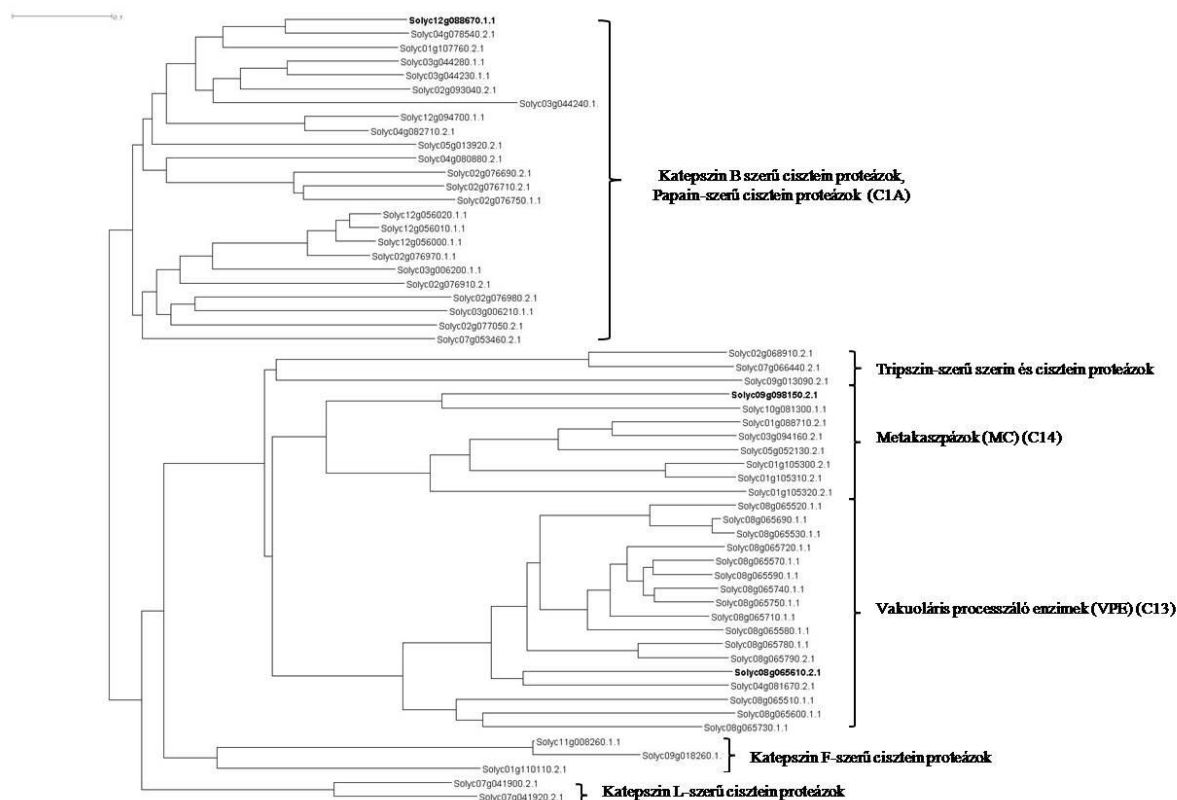
- Yoshimoto K., Jikumaru Y., Kamiya Y., Kusano M., Consonni C., Panstruga R., Ohsumi Y., Shirasua K. (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2914–2927.
- Zeier J., Pink B., Mueller M.J., Berger S. (2004) Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta* 219: 673–683.
- Zeiger E., Talbott L. D., Jin X. (2002) The guard cell chloroplasts: a perspective for the twenty first century. *New Phytol.* 153: 415–424.
- Zhang S., Klessing D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6: 520–527.
- Zhang W., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D.W., Song C.P. (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 126: 1438–1448.
- Zhang F., Yang Y.L., He W.L., Zhao X., Zhang L.X. (2004) Effects of salinity on growth, compatible solutes of calluses induced from *Populus euphratica*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40: 491–494.
- Zhang F., Wang Y., Yang Y., Wu H., Wang D., Liu J. (2007) Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. *Plant Cell Environ.* 30: 775–785.
- Zhao X., Tan H.J., Liu Y.B., LI X. R., Chen G. X. (2009) Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98: 97–103.
- Zhu J.K., Liu J., Xiong L. (1998a) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181–91.
- Zhu J., Talbott L.D., Jin X., Zeiger E. (1998b) The stomatal response to CO₂ is linked to changes in guard cell zeaxanthin. *Plant Cell Environ.* 21: 813–820.
- Zhu J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.
- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev Plant Biol.* 53: 247–273.
- Zhu J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441–445.
- Zottini M., Costa A., Michele R.D., Ruzzene M., Carimi F., Schiavo F.L. (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 58: 1397–1405.

Internetes források:

<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/>
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
<http://digimizer.com/>
<http://frodo.wi.mit.edu/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>
<http://solgenomics.net/>
<http://tgrc.ucdavis.edu/>

10. Mellékletek

1. melléklet: Cisztein proteáz fehérjék paradicsomban (*Solanum lycopersicum*)



A paradicsom gének a Sol Genomics (<http://solgenomics.net/>) internetes adatbázisból lettek kigyűjtve, majd a homológia illesztést követően a szekvenciák homológia fája a ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) és a Dendroscope 3.2.2. (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/>) programok segítségével készült el.

A vastagon jelölt génekkel történtek a génexpressziós vizsgálatok.

2. melléklet: Különböző növényfajok Bax inhibitor 1 fehérjéinek összehasonlítása

```

Solanium      MEGFTSFFDSQSAS--RNWSYDSLKNFRQISPLVQTHLKQVYLTLCALVASAAGAYLHI 59
Capsicum      MEGFTSFFESQSAS--RSRWNYDALKNFRQISPRVQTHLKQVYLTLCALVASAAGAYLHI 59
Nicotiana     MESCTSFNFSQSASSRNWSYDSLKNFRQISPFVQTHLKQVYLTLCALVASAAGAYLHI 60
Brassica      MDSFSSFFDSQPGS--RSWSYDSLKNLRQISPSVQNHLKRVYLTLCALVASAFGAYLHV 58
Arabidopsis   MDAFSSFFDSQPGS--RSWSYDSLKNFRQISPAVQNHLKRVYLTLCALVASAFGAYLHV 58
               *: . :***:*. . *      * _*:***: :*** * _*:***:***** :***:

Solanium      LWNIGGLLTMACMGSMVWLLSAPPYQEQRVALLMAAALFEGASIGPLIELGINFDPFI 119
Capsicum      LWNIGGFLLTLACIGSMVWLLATPPYQEQRVALLMAAALFEGASIGPLIELGINFDPFI 119
Nicotiana     LWNIGGLLTTLGCVGSIVWLMATPLYEEQKRIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPFI 120
Brassica      LWNIGGILTITIGCFGSMIWLSCPPYEQQKRLSLLFSLAVLEGASVGPLIKVAVDFDPFI 118
Arabidopsis   LWNIGGILTITIGCIGTMIWLLSCPPYEHQKRLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAVDFDPFI 118
               *****:***:*. .*:***: : * *:***:***: :*:***:*****: :*:***

Solanium      VFGAFVGC VVFGCFSAAMLARRREYLYLGGLSSGVSLLFWLHFASSIFGGSMVAFKF 179
Capsicum      VLGA FVGC VVFGCFSAAMLARRREYLYLGGLSSGVSLLMWLHFASSIFGGAMALFKF 179
Nicotiana     VIGA FVGC VVFGCFSAAMVARRREYLYLGGLSSGVSLLFWLHFASSIFGGSMALFKF 180
Brassica      LITAFVGTAFVFCFSAAMLARRREYLYLGGLSSGVSLLMWLQFASSIFGGSAIFKF 178
Arabidopsis   LITAFVGTAFVFCFSAAMLARRREYLYLGGLSSGVSLLMWLQFASSIFGGSAIFKF 178
               : : **** . : * ** _*:***:*****:***:***:*****: :***

Solanium      ELYFGLLVFVGYIVFDTQEIIIEKAHLGMDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLNASEK 239
Capsicum      EVYFGLFVFGYIVFDTQEIIIEKAHLGMDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLNAFEK 239
Nicotiana     EVYFGLLVFVGYIIFDTQDIIEKAHLGDLDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIMLNASDK 240
Brassica      ELYFGLLIFVGYMVVDTQDIIEKAHLGMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLNASDK 238
Arabidopsis   ELYFGLLIFVGYMVVDTQEIIIEKAHLGMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIMLNASDK 238
               *:***:***:***: : . ***:*****:*****:*****:*****: :*

Solanium      EEKKKKRRN 248
Capsicum      EEKKKKRRN 248
Nicotiana     EEKKKKRRN 249
Brassica      EDKKKKRRN 247
Arabidopsis   EEKKKKRRN 247
               * _*:***:***

```

Az összehasonlítás a ClustalW program segítségével készült

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

A csillaggal jelölt aminosavak konzervatívak a különböző növényfajokban.

3. melléklet: A qRT-PCR-hez felhasznált oligonukleotid primer párok

Név	Írány	Szekvencia (5'-3')
<i>SIEF1</i>	Forward:	GGAACCTTGAGAAGGAGCCTAAG
	Reverz:	CAACACCAACAGCAACAGTCT
<i>SIPR1</i>	Forward:	CATCCCGAGCACAAAACCTATG
	Reverz:	CCCCAGCACCAGAATGAAT
<i>SIBI1</i>	Forward:	CTCAAAAACCTTCCGCCAGAT
	Reverz:	GCCACTAAAGCACAGCATAGC
<i>SlMAP3Kα</i>	Forward:	TTCTCCACCCAGTCCTTCTG
	Reverz:	GCCTGCCTTTCTTCCATTTT
<i>SlCYP1</i>	Forward:	ACTGGGGAGAGAACGGCTAC
	Reverz:	CGGGTTTAGGAGGATTTGGT
<i>SlVPE1</i>	Forward:	TTTTCATCCTCGTCGGAATC
	Reverz:	GAGTCATCTGCGTCATCGAA
<i>SlMCA1</i>	Forward:	CCGTGAGGAAGAAGAGGAGA
	Reverz:	GAGTGGAAGAGGCAAGGACT

A vizsgált paradicsom génekre az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen és Skaletsky 2000) segítségével terveztük a primereket, amelyek génspecifikusságát az NCBI BLAST segítségével ellenőriztük vissza (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. melléklet: A vizsgált gének analízise paradicsomban (*Solanum lycopersicum*)

Gén	Név	Hely (SolGenomics)	Génbank azonosító	Kromoszóma ^a	Helyzet ^b	Hossz (bp) ^c	Hossz (as) ^d	Molekulásúly (kDa) ^e
<i>SIPR1</i>	Patogenezissel kapcsolatos fehérje 1	Solyc01g10662 0.2.1	CAA09671.1	1	SL2.40ch 01:86187 760..861 88655	896	179	20,12
<i>SIBI1</i>	Bax Inhibitor 1	Solyc01g09002 0.1	AY380778.1	1	SL2.40ch 01:75484 997..754 84011	396	132	14,97
<i>SIMAP3Kα</i>	MAP3Kináza	Solyc11g00600 0.1	AY500156.1	11	SL2.40ch 11:80968 7..81571 7	1845	614	67,02
<i>SICYP1</i>	Papain szerű cisztein proteáz (C1A)	Solyc12g08867 0.1	AJ003137.1	12	SL2.40ch 12:62394 311..623 90540	1401	467	51,13
<i>SIVPE1</i>	Vakuoláris processzáló enzim1b (C13)	Solyc08g06561 0.2	AJ841791.1	8	SL2.40ch 08:50962 513..509 56613	1950	483	53,21
<i>SIMCA1</i>	Metakaspáz 7 (C14)	Solyc09g09815 0.2	AY114141.1	9	SL2.40ch 09:67312 625..673 09562	1694	417	45,57

A vizsgált gének analízisét az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és a Sol Genomics adatbázis segítségével végeztük el (<http://solgenomics.net/>).

^a A gén helye a kromoszómán.

^b A gén helyzete a kromoszómán.

^c A gén nukleotid (bp) hossza.

^d Az átírt aminosav (as) szekvencia hossza.

^e Az átírt fehérje tömege (kDa).

5. melléklet: A vizsgált gének promóterelemzés paradicsomban (*Solanum lycopersicum*)

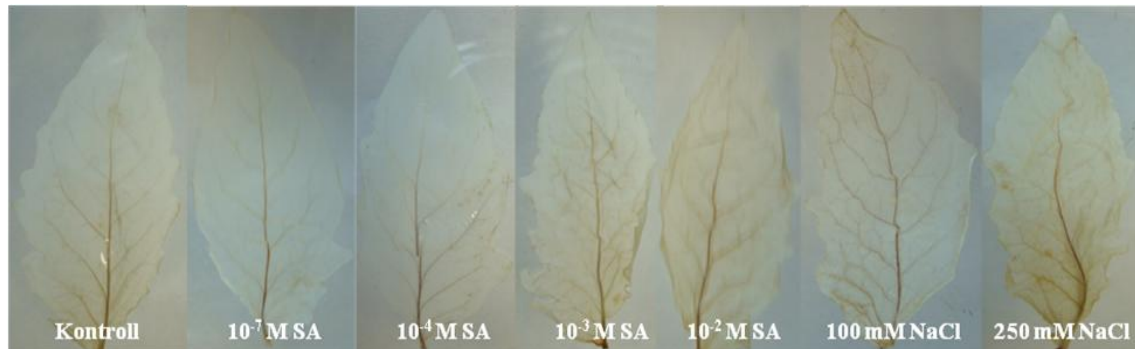
Gén	Növekedést és fejlődést szabályozó elemek	Stresszválasz elemek
<i>SIPR1</i>	5'UTR Py-gazdag motívum ² ; ACE; AE-box ² ; ATC-motívum; Box 4 ⁷ ; Box I; Box III; CAAT-box ³² ; CAT-box; G-box ⁷ ; GT1- motívum ² ; MRE; O2-hely; Skn1- motívum ² ; Sp1; TA-gazdag régió ⁶ ;	ABRE ³ ; ARE ² ; CGTCA-box; TGACG-motívum;
<i>SIBI1</i>	5'UTR Py-gazdag motívum; AAGAA-motívum ³ ; AC-II; ATCT-motívum; ATGCAAAT-motívum ² ; Box 4 ³ ; Box I ² ; CAAT-box ⁴⁸ ; GA-motívum; GARE-motívum ³ ; MRE; Skn1-motívum; Sp1 ² ; cirkadián	Box-W1; HSE; MBS; MBSII; TC-gazdag ismétlődések; TCA-elemek
<i>SIMAP3Kα</i>	AT-gazdag elemek; AT-gazdag szekvencia; AT1-motívum; ATC-motívum; Box 4 ³ ; Box I ² ; CAAT-box ³⁵ ; CCGTCC-box; CGTCA-box; G-box ⁴ ; GA- motívum ³ ; GCN4-motívum; I-box ² ; LAMP- motívum ² ; O2-hely ² ; Skn1-motívum ² ; TCT- motívum; TGA- motívum; as2-box; chs-CMA2a	ABRE; ARE ² ; ERE ² ; MBS ² ; TC-gazdag ismétlődések ² ; TGACG-motívum
<i>SICYP1</i>	5'UTR Py- gazdag motívum; Box 4 ³ ; Box I; Box II; CAAT-box ²⁶ ; G-box ⁴ ; GATA- motívum; GCN4- motívum; P-box; Skn-1 motívum; cirkadián	ABRE; ARE ² ; MBS; TC- gazdag ismétlődések ⁴ ; TCA-elemek
<i>SIVPE1</i>	3-AF1 kötő hely; AE-box; Box 4 ⁵ ; CAAT-box ⁴¹ ; G-box; GA- motívum; GAG- motívum; GARE- motívum; GT1-motívum; Skn1- motívum ³ ; TCT- motívum ³ ; as-2-box ² ; cirkadián ²	ARE; CGTCA-box ⁴ ; HSE ² ; MBS; TC- gazdag ismétlődések; TCA-elemek; TGACG- motívum ⁴ ; WUN- motívum
<i>SIMCA1</i>	ACE ² ; AE-box ² ; AT1- motívum ² ; ATCT- motívum; Box 4 ³ ; Box I; CAAT-box ³⁷ ; CCAAT-box; G-box, O2-hely; Skn1-motívum; TA-gazdag régió ¹⁹ ; TCT- motívum; cirkadián	Box-W1 ² ; CGTCA-box; ERE; HSE; MBS ² ; TGACG- motívum

3-AF1 kötő hely: fényválasz elemek; 5'UTR Py gazdag motívum: magas transzkripció szintet okozó *cis*-ható elem; ABRE:ABA válaszban résztvevő *cis*-ható elem; ACE: fényválaszban résztvevő *cis*-ható elem; AE-box: fényválaszt szabályzó rész; ARE: anaerobikus hatásra indukálódó elemet szabályozó *cis*-ható elem; as-2-box: részt vesz a hajtásspecifikus expresszióban és a fényválaszban; AT-gazdag elemek: kötődik az AT-gazdag DNS kötő fehérjéhez (ATBP-1); AT-gazdag szekvencia: elem a nagyobb elicitor szabályozta aktivitásért; AT1-motif: fényválaszt szabályzó rész; ATCT-motif: a fényválaszban résztvevő konzervatív DNS szabályzó rész; ATGCAAAT motif: TGAGTCA motívumhoz kapcsolódó *cis*-ható szabályzó elem; Box4: a fényválaszban résztvevő konzervatív DNS szabályzó rész; Box I: fényválasz elem; Box II: fényválaszban résztvevő elem része; Box III: protein kötő rész; Box-W1: gomba elicitor válasz elem; CAAT-box: *cis*-ható elem a promóterben és az enhancer régiókban; CAT-box: *cis*-ható szabályzó elem a merisztémához kapcsoltan; CCAAT-box: MYBHv1 kötő rész; CCGTCC-box: *cis*-ható szabályzó elem a merisztéma specifikus aktiválásához kapcsoltan; CGTCA-box: MeJA válaszban *cis*-ható szabályzó elem; chs-CMA2a: fényválasz elem része; cirkadián: cirkadián kontrol *cis*-ható szabályzó elem; ERE: etilén válasz elem; G-box: fényválaszban résztvevő *cis*-ható elem; GA-motif: része a fényválasz elemnek; GAG-motif: része a fényválasz elemnek; GARE-motif: gibberellin válasz elem; GATA-motif: része a fényválasz elemnek; GCN4-motif: endospermium kifejezésében résztvevő *cis*-ható elem; GT1-motif: fényválasz elem; HSE: hőstresszben résztvevő *cis*-ható elem; I-box: része a fényválasz elemnek; LAMP: része a fényválasz elemnek; MBS: szárazság indukálta válaszban résztvevő MYB kötő rész; MRE: fényválaszban résztvevő MYB kötő rész; O2-site: zein metabolizmus szabályozásában résztvevő *cis*-ható szabályzó elem; P-box: gibberellin válasz elem; P-box: kifejezésében résztvevő *cis*-ható elem; Skn-1-motif: kifejezésében résztvevő *cis*-ható elem; TA-rich region: enhancer; TC-rich repeats: védekezésben és stresszválaszban résztvevő *cis*-ható elem; TCT-motif: része a fényválasz elemnek; TCA-element: SA válaszban résztvevő *cis*-ható elem; TGA-motívum: auxin válasz elem; TGACG-motif: MeJA válaszban résztvevő *cis*-ható szabályzó elem; WUN-motif: sebzés válasz elem;

A vizsgált paradicsom gének promóterelemzését a PlantCARE adatbázis segítségével végeztük el (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot és mtsai. 2002), a teljes gén szekvenciáját megelőző, a transzkripció iniciációs helye (ATG) előtti 1,5 kb hosszú upstream régiót felhasználva. A jobb felső indexben jelzett számok az egynél több kópiában található *cis*-ható elemek számát jelzik a gének 1,5 kb hosszúságú promóter régiójában.

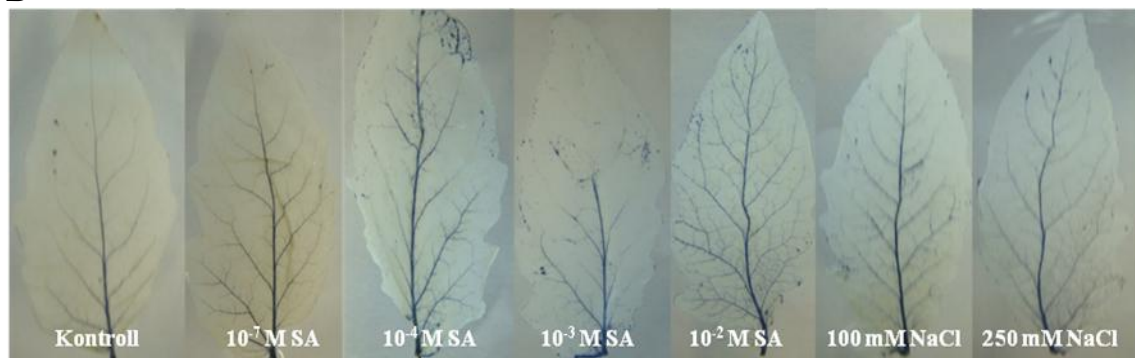
6. **melléklet:** Hidrogén-peroxid (A) és szuperoxid gyökanion (B) detektálása levelekben

A



H₂O₂ tartalom változása DAB festést követően (barnás szín) paradicsomnövények levelében 6 órás 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően fényen.

B



Szuperoxid gyökanion tartalom változása NBT festést követően (kékes szín) paradicsomnövények levelében 6 órás 10⁻⁷-10⁻² M szalicilsav (SA) vagy 100 mM ill. 250 mM NaCl kezelést követően.

11. Publikációs lista

11.1. Tudományos közlemények referált folyóiratokban

(A *-gal jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a PhD értekezéshez)

Irma Tari, Gábor Laskay, Zoltán Takács, **Péter Poór** (2013) Respose of sorghum to abiotic stresses, A review. *Journal of Agronomy and Crop Science* DOI: 10.1111/jac.12017 (IF: 2,433)

***Péter Poór**, Judit Kovács, Dóra Szopkó, Irma Tari (2013): Ethylene signaling in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma* 250: 273-284. (IF: 1,922)

***Péter Poór**, Irma Tari (2012) Regulation of stomatal movement and photosynthetic activity in guard cells of tomato abaxial epidermal peels by salicylic acid. *Functional Plant Biology* 39: 1028-1037. (IF: 2,929)

***Péter Poór**, Dóra Szopkó, Irma Tari (2012): Ionic homeostasis disturbance is involved in tomato cell death induced by NaCl and salicylic acid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48: 377-382. (IF: 1,497)

***Péter Poór** and Irma Tari (2011) Ethylene-regulated reactive oxygen species and nitric oxide under salt stress in tomato cell suspension culture. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 143-146.

Péter Poór, Katalin Gémes, Ferenc Horváth, Ágnes Szepesi, Mária L. Simon, Irma Tari (2011) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with the stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato and decreases the harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology* 13: 105-114. (IF: 2,395)

Árpád Székely, **Péter Poór**, István Bagi, Jolán Csiszár, Katalin Gémes, Ferenc Horváth, Irma Tari (2011) Effect of EDTA on the growth and copper accumulation of sweet sorghum and sudangrass seedlings. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 159-164.

Irma Tari, **Péter Poór**, Katalin Gémes (2011) Sublethal concentrations of salicylic acid decrease the formation of reactive oxygen species but maintain an increased nitric oxide production in the root apex of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutants. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1263-1266.

Gémes Katalin, **Poór Péter**, Horváth Edit, Kolbert Zsuzsanna, Szopkó Dóra, Szepesi Ágnes, Tari Irma (2011) Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum* 142: 179-192. (IF: 3,112)

Irma Tari, Adrienn Guóth, Dániel Benyó, Judit Kovács, **Péter Poór**, Barnabás Wodala (2010) The roles of ABA, reactive oxygen species and nitric oxide in root growth during osmotic stress in wheat: comparison of a tolerant and a sensitive variety. *Acta Biologica Hungarica* 61: 189-196. (IF: 0,793)

I. Tari, Gy. Kiss, A.K. Deér, J. Csiszár, L. Erdei, Á., Gallé, K. Gémes, F. Horváth, **P. Poór**, Á. Szepesi, L.M. Simon (2010) Salicylic acid-induced increases in aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum* 54: 677-683. (IF: 1,582)

- Tari I., Camen D., Coradini G., Csiszár J., Fediuc E., Gémes K., Lazar A., Madosa E., Mihacea S., **Poór P.**, Postelnicu S., Staicu M., Szepesi Á., Nedelea G., Erdei L. (2008) Changes in chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress responses of bush bean genotypes for selecting contrasting acclimation strategies under water stress. *Acta Biologica Hungarica* 59: 335-345. (IF: 0,619)
- Ágnes Szepesi, Jolán Csiszár, Ágnes Gallé, Katalin Gémes, **Péter Poór**, Irma Tari (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: 129-138.
- Katalin Gémes, **Péter Poór**, Zita Sulyok, Ágnes Szepesi, Margit Szabó, Irma Tari (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 Biologica Szegediensis* 52: 161-162.
- Ágnes Szepesi, **Péter Poór**, Katalin Gémes, Edit Horváth, Irma Tari (2008) Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants. *Acta Biologica Szegediensis* 52: 199-200.

11.2. Poszterek és konferencia előadások

- Péter Poór**, Judit Kovács, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2013) Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. Plant Diseases and Resistance Mechanisms. 2013. február 20-22. Vienna, Ausztria (poszter)
- Ágnes Szepesi, **Péter Poór**, Judit Kovács, Zoltán Takács, Ágnes Gallé, Irma Tari (2013) Effects of salicylic acid on polyamine metabolism in tomato plants. Plant Diseases and Resistance Mechanisms. 2013. február 20-22. Vienna, Ausztria (poszter)
- Poór Péter**: Sóstressz és szalicilsav indukálta programozott sejthalál összehasonlító vizsgálata paradicsom növényekben és sejtszuszpenzióban. MTA Szegedi Akadémiai Bizottság, A Magyar Tudomány Ünnepe Szeged, 2012. november 3-30. (előadás)
- Judit Kovács, **Péter Poór**, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2012) Salt stress induced ethylene production and cysteine protease activity during programmed cell death in tomato. 7th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference. 2012. szeptember 12-15. Tallinn, Észtország (poszter)
- Judit Kovács, **Péter Poór**, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2012) Salt induced changes in the accumulation of reactive oxygen species and in ethylene production. 10th International Ph.D. Student Conference on Experimental Plant Biology. 2012. szeptember 03-05. Brno, Csehország (poszter)
- Péter Poór**, Ágnes Szepesi, Zoltán Takács, Judit Kovács, Irma Tari (2012) Polyamine metabolism under salt-induced cell death in tomato plants. Plant Biology Congress Freiburg 2012: jointly organized by FESPB and EPSO. 2012. július 29.-2012. augusztus 03. Freiburg, Németország (poszter)
- Judit Kovács, **Péter Poór**, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2012) Salt stress induced cysteine protease activities during programmed cell death in tomato. Plant Biology Congress Freiburg 2012: jointly organized by FESPB and EPSO. 2012. július 29.-2012. augusztus 03. Freiburg, Németország (poszter)

- Ágnes Szepesi, **Péter Poór**, Judit Kovács, Zoltán Takács, Ágnes Gallé, Irma Tari (2012) Short term effect of salicylic acid on polyamine metabolism in tomato plants. Plant Biology Congress Freiburg 2012: jointly organized by FESPB and EPSO. 2012. július 29.-2012.augusztus 03. Freiburg, Németország (poszter)
- Péter Poór**, Judit Kovács, Dóra Szopkó, Irma Tari (2012) Ethylene signaling in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. Plant Abiotic Stress Tolerance II. 2012. február 22-25. Wien, Ausztria (poszter)
- Péter Poór**, Edit Horváth, Ágnes Gallé, Jolán Csiszár, Irma Tari (2011) Salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato leaves. 2011.szeptember 07-09. Wroclaw, Lengyelország (poszter)
- Poór Péter**, Szopkó Dóra, Tari Irma (2011) Etilén szabályozta reaktív oxigén formák és nitrogén-monoxid só- és szalicilsav-indukált stressz alatt paradicsom sejtszuszpenzióban. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31.-2011.szeptember 02. Szeged (poszter)
- Székely Árpád, **Poór Péter**, Bagi István, Csiszár Jolán, Gémes Katalin, Horváth Ferenc, Tari Irma (2011) EDTA kezelés hatása a cukorcirok és a szudánifű réz akkumulációjára és növekedésére. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31.-2011.szeptember 02. Szeged (poszter)
- Tari Irma, Gémes Katalin, Horváth Edit, **Poór Péter**, Szepesi Ágnes, Csiszár Jolán (2011) A szalicilsav szerepe a paradicsom sóstressz rezisztenciájának fokozásában: interakció az abszcizinsav és az etilén jelátviteli folyamataiban. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31.-2011.szeptember 02. Szeged (előadás)
- Péter Poór**, Dóra Szopkó, Irma Tari (2011) The role of reactive oxygen species, nitric oxide and ethylene in salt stress- and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 2011. július 5-8. Budapest, Magyarország (poszter)
- Irma Tari, Katalin Gémes, Edit Horváth, **Péter Poór**, Ágnes Szepesi, Jolán Csiszár (2011) Regulation of antioxidant defence systems and abscisic acid biosynthesis by salicylic acid in tomato roots. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 2011. július 5-8. Budapest, Magyarország (előadás)
- Ágnes Szepesi, Katalin Gémes, Zoltán Takács, Gábor Orosz, Mária Vorák, **Péter Poór**, Irma Tari (2011) The role of polyamines and their metabolism in the regulation of H₂O₂ level in salicylic acid treated tomato plants. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 2011. július 5-8. Budapest, Magyarország (poszter)
- Csiszár Jolán, Váry Zsolt, Horváth Edit, Gallé Ágnes, Szepesi Ágnes, Gémes Katalin, **Poór Péter**, Tari Irma: Enhanced expression and activities of some GST isoenzymes during salt stress and their putative role in the elimination of reactive oxygen species in salicylic acid-primed tomato. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 2011. július 5-8. Budapest, Magyarország (poszter)
- Poór Péter**, Gémes Katalin, Székely Árpád, Bagi István, Tari Irma (2011) EDTA kezelés hatása a cukor- és takarmánycirok réz akkumulációjára, biomassza produkciójára és fotoszintetikus aktivitására. A Magyar Szabadgyök-kutató Társaság VI. Kongresszusa és az MTA Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. 2011.május 27-28. SZIE Gödöllő (poszter)
- Szepesi Ágnes, Gémes Katalin, **Poór Péter**, Orosz Gábor, Takács Zoltán, Tari Irma (2011) Szalicilsav előkezelt paradicsom növények antioxidáns válaszai só-stressz alatt. A Magyar

Szabadgyök-kutató Társaság VI. Kongresszusa és az MTA Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése. 2011.május 27-28. SZIE Gödöllő (előadás)

Poór Péter (2011) Szalicilsav kezelés hatása paradicsomnövények sztómaműködésére. - Magyar Növénybiológiai Társaság Fiatal Növénybiológusok előadássorozata, 2011. január 17. Szeged SZBK. (előadás)

Irma Tari, **Péter Poór**, Katalin Gémes, Ágnes Szepesi, Dóra Szopkó, Mária L. Simon, Jolán Csiszár (2010) Improvement of salt stress acclimation of tomato by salicylic acid: the role of osmotic adaptation. International Symposium „Interdisciplinary Regional Research” 2010. október 13-15., Szeged (előadás)

Ágnes Szepesi, Jolán Csiszár, Katalin Gémes, Gábor Orosz, **Péter Poór**, Zoltán Takács, Irma Tari (2010) Oxidative stress response of salicylic acid pre-treated tomato plants during salt stress. International Symposium „Interdisciplinary Regional Research” 2010. október 13-15., Szeged (előadás)

Katalin Gémes, **Péter Poór**, Zsuzsanna Kolbert, Irma Tari (2010) Salicylic acid generated NO and reactive oxygen species during salt stress in tomato roots: acclimatization or programmed cell death. 3rd Plant NO Club International Meeting, 2010. július 15-16. Olomouc, Csehország (poszter)

Péter Poór, Katalin Gémes, Ágnes Szepesi, Irma Tari (2010) Involvement of NO and reactive oxygen species in salicylic acid-induced stomatal closure in abaxial epidermal peels of tomato. XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), 2010. július 4-9. Valencia, Spanyolország (poszter)

Jolán Csiszár, **Péter Poór**, Ágnes Gallé, Dániel Benyó, Edit Horváth, Zsuzsanna Kolbert, László Erdei, Irma Tari (2010) Role of H₂O₂, NO and peroxidases in the elongation growth of roots. Molecular Aspects of Plant Development, 2010. február 23-26. Vienna, Ausztria (poszter)

Tari Irma, Csiszár Jolán, Gallé Ágnes, Guóth Adrienn, Horváth Edit, **Poór Péter** (2009) Az abszcizinsav szerepe vízpotenciált megtartó és vízpotenciál csökkenést toleráló búza genotípusok szárazságtűrési stratégiájában. Miniszimpozium a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszéke megalakulásának 80. évfordulójára, 2009. november 13-14. Debrecen (előadás)

Poór Péter, Gémes Katalin, Rózsavölgyi Tamás, Tari Irma (2009) Szalicilsav kezelés hatása paradicsom növények sztómaregulációjára. 8. Magyar Ökológus Kongresszus, 2009. augusztus 26-28. Szeged (poszter)

Irma Tari, Katalin Gémes, **Péter Poór**, Jolán Csiszár (2009) Acclimation of the photosynthetic performance of tomato to high salinity after salicylic acid pre-treatment. International Conference on Plant Abiotic Stress Tolerance, 2009 február 8-11., Vienna, Ausztria (poszter)

Tari Irma, Csiszár Jolán, Gémes Katalin, Horváth Edit, Szepesi Ágnes, **Poór Péter**, Sulyok Zita (2008) A szalicilsav, mint allelopatikus anyag. IX. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, 2008. július 7-9. Szeged (előadás)

12. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőm, Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanszékvezető Tanárnőnek minden segítségét, aki szakdolgozó koromtól fogva fáradhatatlanul tanított és támogatott, és aki iránymutatásával, óriási szakmai tudásával a kutatói és tanári pályán elindított. Fáradhatatlan segítségnyújtása felbecsülhetetlen mind a kutatás, mind az eredmények publikálása, mind pedig a doktori disszertáció elkészítése során.

Köszönöm Prof. Dr. Erdei Lászlónak minden támogatását valamint, hogy lehetővé tette, hogy a Növénybiológiai Tanszéken kezdhettem el PhD munkámat.

Köszönöm munkacsoportunk tagjainak, Dr. Gémes Katalin, Dr. Szepesi Ágnes, Kovács Judit minden segítségét.

Köszönöm szakdolgozóinknak, Papp Anitának és Szopkó Dórának a kísérletek kivitelezése során nyújtott minden segítségét.

Köszönöm Kispálné Szabó Ibolyának, Meszlényi Máriának és Tandari Máriának minden segítségét és a vidám légkört a laboratóriumokban.

Köszönöm a dolgozatban felhasznált módszerekkel és eszközökkel kapcsolatos hasznos tanácsait és minden segítségét Dr. Bottka Sándornak, Dr. Csiszár Jolánnak, Dr. Gallé Ágnesnek, Forgóné Dr. Guóth Adriennek, Horváth Editnek, Dr. Horváth Ferencnek, Ördög Attilának, Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának, Dr. Laskay Gábornak, Dr. Pécsváradi Attilának, Rózsavölgyi Tamásnak, Dr. Szabó Margitnak, Dr. Vashegyi Ágnesnek, Dr. Wodala Barnabásnak, valamint a Növénybiológiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának, aki segítette a munkámat.

Végezetül szeretném megköszönni az OTKA K101243 és az OTKA K76854 pályázatok, valamint a Magyarország-Románia Határon Átnyúló Együttműködési Program keretében a számos pályázat folyamán az Európai Unió Európai Regionális Fejlesztési Alap anyagi támogatásával megvalósult infrastruktúrájának fejlesztését a kísérletek megvalósításához.

13. Nyilatkozat

Alulírottak kijelentjük, hogy a Szegedi Tudományegyetem Növénybiológiai Tanszékén folytatott szakdolgozati munkánk során kapott eredményeket illetve Poór Péter doktorjelölttel társszerzőként közösen publikált eredményeket (*Protoplasma* 250: 273-284, 2013; *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48: 377-382, 2012) a doktorjelölt szabadon felhasználhatja a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott doktori (PhD) értekezésében. Kijelentjük, hogy ezek az eredmények más PhD értekezés tudományos eredményei között nem szerepelnek. Tudomásul vesszük továbbá, hogy ezek a fent említett eredmények a jövőben nem szerepelhetnek más PhD értekezés eredményei között.



Kovács Judit



Szopkó Dóra

Szeged, 2013. március 1.