

Zárójelentés

„Paradicsom (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) akklimatizációja ozmotikus és sóstressz hatására: kapcsolatok hormonhatások és jelátviteli utak között” (OTKA nysz.: T038392)

című kutatási pályázatról

Témavezető: Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma

Bevezetés

A szalicilsav (SA) elsősorban biotikus stresszorok hatására a magasabbrendű növényekben kialakuló ún. hiperszenzitív reakcióban szereplő jelátviteli komponensként volt ismeretes (Raskin, 1992.). A termesztett növények rhizoszférájában található mikroorganizmusok is képesek az SA szintézisére, és megtalálható a növények gyökérzetének exudátumában is (Chou és Patrick, 1976.).

Mivel a szalicilsav és más benzoésav származékok erőteljesen befolyásolják a növények növekedését, allelopatikus anyagnak tekintendők. A növekedésgátló hatást részben annak tulajdonították, hogy az SA hat a növények vízháztartására. Szalicilsavval kezelt szója növények a kontrollnál alacsonyabb vízpotenciált és kisebb sztómakonduktanciát mutattak (Barkosky és Einhellig, 1993.). Az SA növekedésgátlást és sztómazáródást okozott lóbabban is (Manthe és mtsai, 1992.), gátolta a plazmamembránban lokalizálódó H^+ -ATP-áz aktivitását (Bourbouloux és mtsai, 1998.) és a K^+ , Mg^{2+} , Cl^- valamint a SO_4^{2-} felvételét (Baziramakenga és mtsai, 1994.).

A vízháztartás mellett a SA hat a fotoszintézisre is. Árpában 100 μM -os SA kezelés csökkentette a levél növekedését, a klorofill és fehérje tartalmakat, a fotoszintézis maximális sebességét, és a ribulóz-1,5-*bisz*foszfát karboxiláz-oxigenáz (Rubisco) aktivitását (Pancheva és mtsai, 1996.). Ezzel ellentétben az SA búzában fokozta a fotoszintetikus elektrontranszportot (Sahu és mtsai, 2002.), és előkezelésben alkalmazva feloldotta a fotoszintézisgátló herbicid, a paraquat által indukált gátlást a széndioxid fixációra (Ananieva és mtsai, 2002.).

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

Részben a szubletális oxidatív stressz generálásával és ennek következtében a redox-regulált, antioxidáns enzimek expressziójának fokozásával hozzájárulnak a SA-nak azon hatásait, amelyeket az abiotikus stresszorok hatásainak mérséklése kapcsán tapasztalhatunk. A tárgykörben az elsők között jelent meg az a megfigyelés, hogy az előkezelésként alkalmazott SA jelentősen javította a kukorica hidegtűrését (Janda és mtsai, 1999.; Szalai és mtsai, 2000.) Az SA előkezelés fokozta a növények rezisztenciáját az UV-B sugárzással és az ózonnal (Yalpani és mtsai, 1994.), a paraquattal (Ananieva és mtsai, 2004.),

a hőstresszel (Larkindale és Knight, 2002), a vízhiánnyal (Bezrukhova és mtsai, 2001.) valamint nehézfém stresszel (Mishra és Choudhury, 1999.) szemben is.

A korábbi vizsgálatokban az SA hatásai a sóstressz vonatkozásában ellentmondásosak voltak (Borsani és mtsai 2001a.), mivel a hormont olyan növekedési fázisban alkalmazták, amikor az esetleges ABS szintézist serkentő hatása gátolja a csírázást. A túl kisméretű növény számára alkalmazott túl nagy koncentráció sem vezetett a sóstresszel szembeni rezisztencia tartós fokozódásához (Shakirova és mtsai, 2003.).

A sóstressz által kiváltott **primér hatás** a Na^+ ionok citoplazmába való belépése után az ionegyensúly felborulása (Zhu, 2001.). A magasabbrendű növények citoplazmája 100-200 mM K^+ -ot és 1-10 mM Na^+ -ot tartalmaz, amely 200 mM-os külső Na^+ koncentrációnál 80 mM-ig is emelkedhet. A Na^+ ionok a fiziológiásnál nagyobb koncentrációban mérgezőek a sejt számára, megbontják a fehérjék szorosan kötött hidrátburkát, ezáltal azok elvesztik natív konformációjukat, helyettesítik az enzimek kofaktoraként szolgáló K^+ ionokat, és legtöbbször enzimaktivitás gátlást idéznek elő.

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

Az akklimatizáció során tehát elsődleges a citoplazma ionegyensúlyának a helyreállítása. Ez a Na^+ transzport szabályozásán keresztül valósul meg. A Na^+ kizáródik a citoplazmából, ha a transzporterek K^+/Na^+ szelektivitása nagy, és a káliumiont részesítik előnyben a nátriummal szemben. A citoplazma nátriumion tartalmát csökkentik azok a transzporter molekulák is, amelyek a sejt-kompartmentumok, így a vakuólum illetve az apoplast felé, aktív transzporttal pumpálják ki a Na^+ iont. Ezek az ún. Na^+/H^+ antiporter fehérjék, amelyek közül a plazmamembránban lokalizálódó fehérjét SOS1-nek nevezik, a vakuólum membránhoz kötött pedig NHX (NHE) transzporter családnak.

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

A sóstressz hatására az egyik elsőként kialakuló változás a turgornyomás csökkenése miatt bekövetkező sejtmelegnyúlás gátlás, amelyhez kapcsolódik a sztómák záródását követően a fotoszintézis hatékonyságának csökkenése és a csökkent széndioxid asszimiláció. A Calvin-ciklus enzimek és a fotofoszfóriláció folyamatai is sóérzékenyek.

A **másodlagos hatások** közül legfontosabb a megnövekedett külső sókoncentráció következtében kialakuló **ozmotikus stressz**. Az ozmotikus stressz káros hatásainak kivédését az ozmotikus homeosztázis helyreállítása jelenti. Ennek egyik eleme lehet a szervesen ozmotikumok koncentrációja, de rendkívül fontos az ún. kompatibilis ozmotikumok, mint például az alacsony molekulahatárú szénhidrátok (szacharóz, glükóz, fruktóz, trehalóz), cukoralkoholok (mannitol, szorbitol, ononitol, pinitol), szerves savak, aminosavak (prolin), quaterner ammónium származékok (glicinbetain, β -alaninbetain, prolinbetain stb.) szintézisének aktiválódása és akkumulációja (Szegetes és mtsai, 2000.). A kompatibilis

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

A másodlagos folyamatok között másik fontos elem az abiotikus stresszorok nem-specifikus hatásaként jelentkező **oxidatív stressz**. A reaktív oxigén formák (ROS) egyik legfontosabb forrása a fotoszintetikus és a mitokondriális elektrontranszport lánc. A fotoszintetikus elektrontranszport során a 2. fotokémiai rendszerben keletkező szinglet oxigén mellett az 1-es fotokémiai rendszer (PSI) is hozzájárul a ROS kialakulásához. A PSI közvetlenül adhat át elektronokat a molekuláris oxigénnek, generálva ezáltal a szuperoxid gyökion, majd az ebből keletkező H_2O_2 képződését a kloroplasztisban. A ROS inaktiválásában enzimatikus (SOD, CAT, APX, monodehidroaszorbát reduktáz, dehidroaszorbát reduktáz, glutation reduktáz (GR)) és nem enzimatikus mechanizmusok (karotinoidok, cukrok, cukoralkoholok, poliaminok) is szerepelnek.

A ROS eltávolítása már önmagában is tekinthető **detoxifikációs mechanizmusnak**. Tágabb értelemben azonban ide soroljuk a stresszor hatása alatt felhalmozódó káros anyagcseretermékek eltávolítását és a sérült molekulák lebontását vagy javítását is.

Jónéhány detoxifikáló enzim glutation (GSH)-függő, ezek közül legnagyobb jelentősége talán a glutation S-transzferázoknak (GST) van. A GST-k elektrofil szubsztrátokhoz GSH-t kötnek, majd a glutationált metabolitot az ún. „ATP-kötő kazettával rendelkező”, ABC transzporterek a vakuólumba szállítják. A GST-k ily módon központi szerepet töltenek be a xenobiotikumok detoxifikálásában (Edwards és mtsai, 2000.). A stressz hatására indukálódó izoenzimeknek szerepük lehet a citotoxikus alkenálok konjugálásában. Ezek a vegyületek, mint például a 4-hidroxinonenál, a membránok oxidatív destrukciója következtében keletkeznek, rendkívül toxikusak, és a GST-k egy csoportja (phi GST-k) képes a detoxifikálásukra (Gronwald és Plaisance, 1998.). Detoxifikációs funkciót betölthetnek az aldo-keto reduktázok is, amelyek egyik nem túl régen bizonyított funkciója, hogy redukálják a lipidperoxidáció mérgező termékeként keletkező aldehideket, így a 4-hidroxinonenált (Oberschall és mtsai, 2000.).

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

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

A hosszútávú előkezelésként alkalmazott SA sóstresszel szembeni védő hatását tudomásunk szerint saját eredménynek tekinthetjük (Tari és mtsai, 2002). A talajban lévő SA koncentrációk nagyságrendekkel alacsonyabbak az irodalmi áttekintésben felsorolt hivatkozások nagy részében használt koncentrációkhoz képest ($5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} M). A növényekben azonban környezeti stresszhatásra kialakulhat olyan SA koncentráció, ami a 10^{-4} M-os exogén SA oldatból felvételre kerül (Freeman és mtsai, 2005.). Ezért kísérleteinkben az SA-t jóval alacsonyabb koncentrációintervallumban használtuk (10^{-8} - 10^{-4} M), és hosszú időtartamú előkezeléseket végeztünk.

A magas sótartalmú talajok, az elsivatagosodó területek mezőgazdasági hasznosításának lehetősége olyan növényi genotípusok kiválasztását igényli, amelyek jól bírják ezeket a szélsőséges feltételeket. Ismernünk kell azokat a fiziológiai és molekuláris folyamatokat, amelyek az egyed szintjén lehetővé teszik a kedvezőtlen feltételek közti túlélést, és fontos ezeknek a mechanizmusoknak az összehasonlítása a sikeresen

aklimatizálódó vad fajok fiziológiai folyamataival is. Próbálkoztunk tehát olyan eu-stresszt kiváltó kezelésekkel, ami javítja a növények rezisztenciáját abiotikus stresszorokkal szemben. Az allelopatikus hatást kiváltó szalicilsav hozzájárulhat a növények általános stresszrezisztenciájának fokozódásához. Mivel a paradicsomot gyakran hidropónikus, talaj nélküli kultúrában termesztik, és gyakran csak magas sótartalmú öntözővíz áll rendelkezésre, kísérleteinkben a paradicsom sóstressz rezisztenciájának javítását tűztük ki célul.

Kérdésként vetettük fel, hogy az SA előkezelés befolyásolja-e, s ha igen, milyen mechanizmussal a paradicsom növények sóstresszel szembeni rezisztenciáját?

Ezek az eredmények részben elméleti alapot nyújtanak a szalicilsav által kiváltott priming megértéséhez, részben tovább fejleszthetők a gyakorlatban is használható technológiává.

Célkitűzések

Céljaink a következőkben foglalhatók össze:

- Összehasonlítottuk három, talaj nélküli kultúrában is termesztett paradicsom genotípus (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cv. Rio Fuego, Raissa és Profilo) só- és nem ionos ozmotikus stresszel szembeni érzékenységét. A 50, 100 és 200 mOsm NaCl és PEG 6000-es kezelések után meghatároztuk a relatív növekedési sebesség csökkenését, a vízpotenciál és ozmotikus potenciál változást, a Na^+ , K^+ tartalmakat és azok arányát, a klorofilla fluoreszcencia indukciós és kioltási paramétereit, valamint az oxidatív stressz hatására indukálódó jellegzetes enzimek aktivitását (glutathion S-transzferáz, fenilalanin ammónia-liáz). Ennek alapján a kétféle stresszor hatására átmeneti, tehát sem erőteljes rezisztenciára, sem erőteljes szenzitivitásra nem utaló választ mutató Rio Fuego fajtát választottuk kísérleti objektumul.
- A továbbiakban a hosszú időtartamú szalicilsav előkezelés hatásait elemeztük. Okoz-e változást az SA előkezelés a növények vízháztartási paramétereiben, vízpotenciáljában, ozmotikus potenciáljában, és a fotoszintézis hatékonyságát is meghatározó sztómakonduktanciában? Hogyan hat az SA a K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) felvételére előkezelésben és direkt hatásként?
- Vizsgáltuk az előkezelések hatását a klorofilla fluoreszcencia indukciós és kioltási paraméterekre, és próbáltunk összefüggést találni a paraméterek és az előkezelt növények sóstressz rezisztenciája között.
- Történik-e az SA előkezelés hatására ozmotikus adaptáció? Fokozza-e az SA szeretlen ozmotikumok akkumulációját? Hogyan befolyásolja az SA előkezelés a sóstressznek kitett növények gyökerében és hajtásában a K^+/Na^+ arányt, illetve az Na^+ hajtásba irányuló transzportját?
- Van-e hatása az előkezelésnek a szerves ozmotikumok szintézisére és akkumulációjára? Ha igen, melyek ezek a szerves ozmotikumok illetve ozmoprotektív anyagok: szacharóz, glükóz, fruktóz, szorbitol, poliaminok.
- Vizsgáltuk a glükóz metabolizmus egyik kulcsenzimének, a hexokináz aktivitásának változását az előkezelések hatására.
- Hogyan hat az SA előkezelés a szorbitol szintézisét katalizáló aldózreduktáz aktivitására a paradicsom gyökerben és hajtásban? Feladatul tűztük ki az enzim tisztítását ammónium szulfátos kicsapással és ioncserés kromatográfiával, az enzimkinetikai paraméterek meghatározását hajtásból és gyökérből tisztított enzimpreparátummal különböző szubsztrátok jelenlétében. Vizsgáltuk továbbá a NaCl és a SA *in vitro* hatását az enzimaktivitásra.
- Hogyan hat az SA a nem enzimatis és enzimatis antioxidáns védőmechanizmusokra [karotinoid, szorbitol, poliamin és prolintartalom, SOD, CAT,

APX, peroxidáz (POX) és glutation reduktáz (GR) aktivitás] és a detoxifikációban szerepet játszó enzimek aktivitása (GST)? Miképpen befolyásolja az előkezelés ugyanezeket a paramétereket a sóstressznek kitett növényekben?

- Kérdésként vetődött fel, hogy a sóstressz akklimatizáció szempontjából az SA előkezelés hatására bekövetkező ozmotikus (és/vagy térfogati) adaptáció vagy az antioxidáns mechanizmusok aktiválódása a meghatározó?
- Mi a szerepe az SA-nak az akklimatizáció sikerességét meghatározó abszcizinsav (ABS) bioszintézisének indukciójában és az ABS tartalmak változásában?
- Hogyan hat az SA az ABS bioszintézis egyik regulációs pontját jelentő aldehid oxidáz izoenzim (AO1) aktivitására?
- Kérdésként merült fel, hogy csökken-e az irodalmi adatoknak megfelelően az etiléntermelés az SA előkezelt növények gyökerében ill. hajtásában? Van-e szerepe az etilénnek az SA-indukálta akklimatizációban? Hogyan hat a kis koncentrációjú etilén az akklimatizációs folyamatokra?
- Az SA, az ABS és az etilén által indukált jelátviteli utak kölcsönhatását vizsgáltuk szövettenyészetben és a levélből készült protoplaszt tenyészetben. Milyen kezelésekkel fordítható meg a sejthalált okozó SA koncentrációk hatása?
- Végül célül tűztük ki az SA által indukált akklimatizációs folyamatok összehasonlítását a sótoleráns, vad paradicsom faj, a *L. pennellii* sóstresszre adott, az irodalomban leírt válaszreakcióival.

Anyagok és módszerek

A növények nevelése

Kísérleteinkben *Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego paradicsom növényeket használtunk fel. A csíráztatás három napon keresztül sötétben, 26 °C-on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben majd vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek. A növényeket 12 órás nappali, 12 órás éjszakai periódus, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás és 55-60 %-os relatív páratartalom mellett neveltük. Az SA kezelést a növények 4 hetes korától 7 hetes koráig végeztük, 10^{-8} - $5 \cdot 10^{-4}$ M-os koncentráció intervallumban, amiből előkísérletek után a részletes vizsgálatokra a 10^{-7} és 10^{-4} M-os koncentrációkat választottuk ki. A sókezelés 7 hetes korban történt 100 mM-os NaCl alkalmazásával, a mintákat a sókezelés előtt és megkezdése után 7-10 nappal vettük. A mérésekre a gyökereket és a csúcstól számított két legfiatalabb, de már teljesen kifejlett levelet használtuk. Ez általában a 4-5. levélemelet volt. A nem ionos ozmotikus stressz kiváltása 6000-es átlagos mólsúlyú polietilén glikollal (PEG 6000, FLUKA) történt, amelyet a tápoldatba mértünk úgy, hogy az oldat ozmózisos nyomása 100 mOsm legyen. A vízkultúrákat ebben a kísérletben, és a továbbiakban is minden PEG-kezelés esetén akvárium pumpával levegőztettük.

A vízháztartási és növekedési paraméterek meghatározása

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

K⁺ (⁸⁶Rb⁺) felvétel mérése

A K⁺ felvétel monitorozásához ⁸⁶Rb⁺ izotópos jelölést alkalmaztunk (Zsoldos, 1993). A felvételi oldat 1 mM KCl-ot, 0,5 mM CaCl₂-ot és 185 kBq/l aktivitású ⁸⁶RbCl izotópot tartalmazott. A 3 hetes paradicsom növényeket a felvételi oldatban egyidejűleg vagy az izotópos felvételt megelőzően 24 óráig 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA-val kezeltük. A felvételi kísérlet időtartama 6 óra volt. A kísérletek értékelését PACKARD PRIAS PL folyadék szcintillációs számlálóval végeztük.

Az elemtartalmak meghatározása atomabszorpciós spektroszkópiával

Az elemtartalmak meghatározása Hitachi Z-8200, Zeeman polarizált spektrofotométerrel, levegő-acetilén láng alkalmazásával történt (Trivedi és Erdei, 1992.)

A poliaminok analízise

A poliaminokat Flores és Galston (1982.) módszerével határoztuk meg. A poliaminokat HPLC-n (JASCO HPLC system, Japán), reverz fázisú kolonnán (Apex octadecyl 5 μ ; 250x4.6 mm), acetonitril:víz 45:55 (v:v) elegyével választottuk el, és UV detektor segítségével 254 nm-en azonosítottuk.

Etilénprodukción meghatározása

A növényi részek etiléntermelését Hewlett-Packard 5890 series II gázkromatográf segítségével, lángionizációs detektorral, alumínium-oxiddal töltött oszlopon mértük. A legfiatalabb, teljesen kifejlett levélből illetve a gyökérszövetből készített 1 g friss tömegű növényi anyag által 1 óra alatt sötétben termelődő etilént kvantifikáltuk. A termelt etilén mennyiségét standard állapotú, ismert koncentrációjú etilénből készített kalibrációval történő összehasonlítás után $\text{nl (g friss tömeg)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ értékben adtuk meg (Tari és Mihalik, 1998.).

Pigment analízis és a fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása

A klorofill és karotinoid tartalmakat Lichtenthaler (1987.) szerint határoztuk meg. A klorofill fluoreszcencia-méréseket pulzus amplitúdó-modulált fluoriméter, PAM-2000 (Walz, Effeltrich) segítségével végeztük. A 20 percig sötétadaptált mintákon az Fv/Fm-et, az Fo-t, a fényadaptált mintákon az effektív kvantumhasznosítást $((F_m' - F_s)/F_m' = \Delta F/F_m')$, az elektrontranszport sebességét (ETR), a steady state fluoreszcenciát (Fs), a fotokémiai kioltási paramétert $(qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o))$ és a nem fotokémiai kioltást $(NPQ = (F_m - F_m')/F_m')$ határoztuk meg, az aktív fény erőssége $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt (Váradi és mtsai, 2000.).

Az abszcizinsav tartalom mérése kompetitív ELISA-val

A növényi anyag 1 g-ját 100 mM-os NaHCO₃ és metanol 20:80 (v:v) elegyében extraháltuk, ami 100 ml-ként 1 mg butilált hidroxitoluolt (BHT) tartalmazott. Az ABS tartalmakat Phytodetek, ABA kompetitív ELISA kit segítségével (Cat. Number: PDK 09347/0096) határoztuk meg. A standard görbét (+) *cisz/transz* abszcizinsav felhasználásával a gyártó által leírt módon 0,0064-1000 pmól ml⁻¹ ABS koncentráció intervallumban készítettük el. Az alkalikus foszfatáz reakció aktivitását 405 nm-en mértük Dynatech ELISA leolvasó segítségével.

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

A növényi minta 1 g-ját jégben hűtött rendszerben 2 ml extrakciós pufferben eldörzsöltük. A homogenizátumot hűtött centrifugában 12 000 g-vel, 4°C-on, 20 percig centrifugáltuk. A továbbiakban a szupernatant gélelektroforézisre használtuk.

A fehérjetartalom meghatározása után (Bradford, 1976.) a hajtásból 400 µg, a gyökérből 100 µg fehérje került felvitelre zsebenként a poliakrilamid gélre. Az elektroforézist 7,5 %-os natív poliakrilamid gélben 3 óráig 4°C-on végeztük (Laemmli, 1970.). Az elektroforézis után a gélt 0,2 M-os foszfátpufferben (pH 7,5) mostuk 10 percig, amit enyhe rázás mellett az enzimreakció szubsztrátaival történő kezelés követett szobahőmérsékleten. Az enzimreakcióhoz 1 mM-os indol-3-aldehid vagy α-naftaldehid szubsztrátot használtunk Sagi és mtsai. (1999) szerint. A keletkező színreakció kvantifikálását KODAK Elektroforézis Dokumentációs és Analízis Rendszer (EDAS) 290 felhasználásával, KODAK 1D Image Analysis szoftver (Eastman Kodak Company, 2000-2001) segítségével végeztük.

Az összes cukortartalom, a szacharóz, glükóz és a fruktóz és szorbitol meghatározása A hexokináz (EC 2.7.1.1.) aktivitás mérése

Az összecsukor mennyiségének meghatározására a Dubois-féle (1956) fenol-kénsavas módszert használtuk.

A szabad glükóz, fruktóz és szacharóz mennyiségét a Boehringer-Mannheim/R-Biopharm 0 716 260 katalógusszámú, a NADPH UV-abszorpcióján alapuló szacharóz, glükóz, fruktóz meghatározására kidolgozott teszttel végeztük a gyártó utasításai alapján. A szorbitol meghatározása a Boehringer-Mannheim/R-Biopharm 0 670 057 katalógusszámú szorbitol/xilitol meghatározására kidolgozott teszttel történt. A hexokináz extrakciója és mérése (Whittaker és mtsai, 2001.) által leírtak szerint történt.

Az aldóz reduktáz (ALR) (EC. 1.1.1.21.) enzim mérése

Az aldóz reduktáz izoenzimek tisztítása 40 illetve 80 %-os ammóniumsulfátos kicsapással, majd a dializált csapadék feloldása után a specifikus aktivitás meghatározásával történt. A tisztított levélkivonat kinetikai paramétereinek meghatározása (K_m , V_{max}) naftaldehid, D,L-glicerinaldehid és NADPH felhasználásával történt. A levélben és gyökérben található izoenzimeket DEAE Sephadex A25120 anioncserélő oszloppal választottuk el. A NaCl enzimaktivásra gyakorolt *in vitro* hatását 50-450 mM intervallumban, a szalicilsavét 0,5-1,5 mM között határoztuk meg.

Az aldóz reduktáz (ALR) (EC. 1.1.1.21.) enzim aktivitásának meghatározása növényi kivonatból Van der Jagt és mtsai (1992) által leírtak szerint történt.

Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása

Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1) aktivitást a nitroblue-tetrazólium (NBT) riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukciójának gátlása alapján határoztuk meg (Dhindsa és mtsai, 1981.). A kataláz (CAT) (EC 1.11.1.6) és a peroxidáz (POX) (EC 1.11.1.7) aktivitás mérését Upadhaya és mtsai (1985) szerint végeztük. Az aszkorbát peroxidáz (APX) (EC 1.11.1.11.) aktivitását az aszkorbinsav oxidációjának követésével a 290 nm-nél mért abszorpció csökkenéséből számítottuk 1 perc inkubáció után (Panchuk és mtsai, 2002.). A glutation reduktáz (GR) (EC 1.6.4.2) aktivitását Smith és mtsai (1988) szerint határoztuk meg.

A malondialdehid (MDA) tartalom mérése

A lipidperoxidáció bomlástermékeinek mérését, ami elsősorban a malondialdehid, tiobarbitursavas módszerrel végeztük. A reakciótermékek mennyiségét 532 nm-en határoztuk meg. A malondialdehid tartalmakat $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ millimoláris extinkciós koefficiens felhasználásával számítottuk (Heath és Parker, 1968.).

Protoplaszt szuszpenzió készítése

A levél protoplasztok izolálása K75 oldatban, Kao és Michayluk (1980) leírása szerint történt. A protoplasztok életképességét Evans-blue festéssel határoztuk meg (Baker és Mock, 1994.).

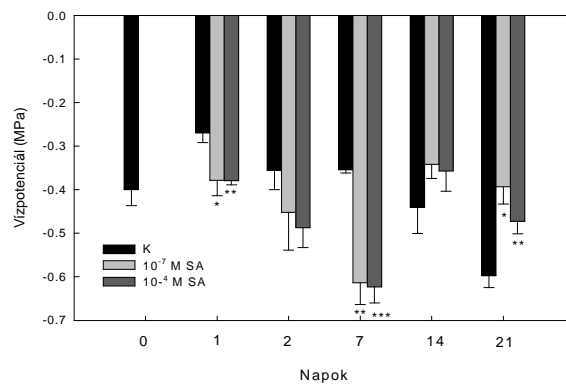
Statisztikai analízis

A kísérleteket 3-5-ször ismételtük. A kísérletben megadott átlagértékek 3-6 egymástól függetlenül készített ismétlés átlagai a sztenderd hibával. A kontrolltól való szignifikáns különbséget Student-féle t-teszttel határoztuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**) vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken. Más esetben SigmaStat 3.1 programmal a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk $P \leq 0.05$ tekintve szignifikánsnak.

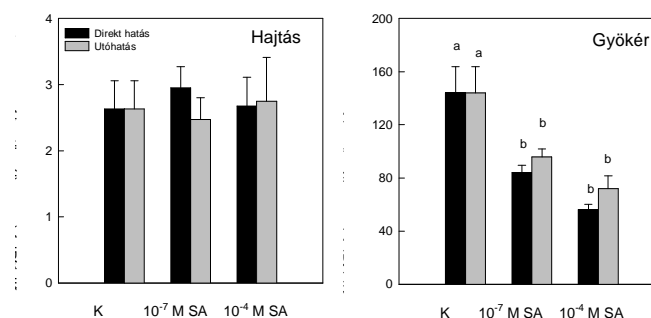
Eredmények

1. A 100 mM NaCl kezelés és PEG 6000 által kiváltott nem ionos ozmotikus stressz hatására mutatott növekedésgátlás, a vízpotenciál csökkenés, a hajtásban mért Na^+ akkumuláció és a fluoreszcencia indukciós paraméterek alapján három genotípus, a Raissa, Profilo és Rio Fuego közül a nem ionos ozmotikus és a sóstresszre jól, de nem szélsőségesen reagáló Rio Fuego fajtát választottuk kísérletünk objektumaként. Az eredményekről készült cikk benyújtásra előkészített formában van (Szepesi et al. 2006. Comparison of salt stress response of three tomato genotypes)..

2. A szalicilsav paradicsom növények vízháztartási paramétereire gyakorolt hatását három hetes előkezelések formájában végeztük. Megállapítottuk, hogy az SA az irodalmi adatoknak megfelelően csökkenti a kezelt növényekben a vízpotenciált, gátolja a K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) felvételt (1. és 2. ábra), és gyors sztómazáródást idéz elő. Az egyik legfontosabb ozmotikum, a kálium felvételének gátlásával csökken a szövetek vízmegtartó képessége. Hosszabb távon azonban, az irodalomban ismertektől eltérően, az előkezelt növényekben ozmotikus és/vagy térfogati adaptációval helyreállt, sőt, a kontrollnál kevésbé negatívvá vált a vízpotenciál, és a K^+ kivételével az iontartalmakban sem volt szignifikáns változás.



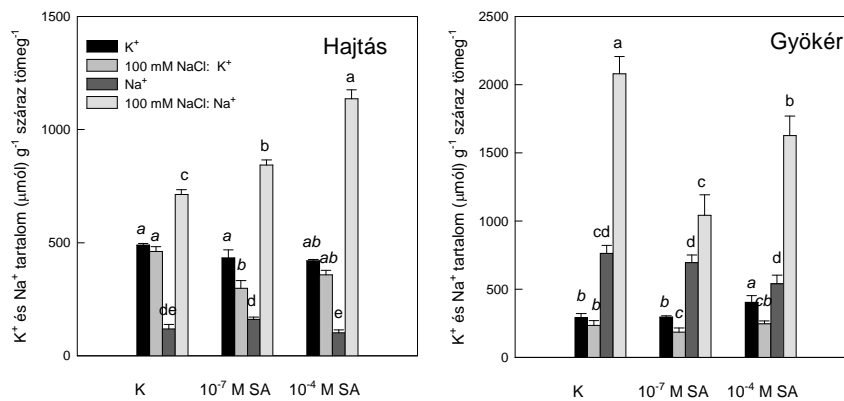
1. ábra. 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása a 4 hetes paradicsom növények vízpotenciál változására az idő függvényében. (Átlag \pm SE, n=10, a *-gal jelölt kezelt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0.01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik).



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

3. A továbbiakban az SA előkezelés hatását az egy hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követő eredményekkel együttesen foglalom össze.

Rendkívül hatékonyan bizonyult a 10^{-4} M-os SA-val történő előkezelés a sóstressz hatásainak kivédésében. A felvett Na^+ -ot az előkezelte növények jóval nagyobb arányban szállították a hajtásba, mint a kezeletlenek (3. ábra), és ott, a halofita karakterű, vad paradicsomfajokhoz (*L. pennellii*, *L. peruvianum*) hasonlóan, ozmotikumként használták, ami további jelentős relatív víztartalom és vízpotenciál emelkedést jelentett a 10^{-4} M-os SA-val előkezelte, sóstresszelt növényekben (Szepesi és mtsai, 2005.).



3. ábra. 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények hajtásának és gyökerének kálium és nátrium tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok az ANOVA-t követő Duncan teszt alapján 0,05 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek. A tesztet a K^+ és Na^+ tartalmakra külön végeztük el.

Ez ugyanakkor csökkenti a gyökér Na^+ terhelését, ami a detoxifikációs mechanizmusok sikeressége szempontjából rendkívül fontos. Ez a K^+/Na^+ arányokban is jól tükröződik. A gyökérben az előkezelés hatására sóstressz alatt az alacsonyabb K^+ tartalmak mellett is megmarad a K^+/Na^+ arány.

4. Annak bizonyítékául, hogy a 10^{-4} M-os SA-val kezelt növények jobban tolerálják a hajtás magas Na^+ koncentrációit, mint a kontroll, a levelek sóérzékeny növényekre jellemző sárgulásán kívül a fluoreszcencia indukciós és kioltási paramétereit és a lipidperoxidáció alakulását vizsgáltuk (1. és 2. táblázat).

1. táblázat. A klorofill ($a+b$) és az összes karotinoid tartalom $\mu\text{g g}^{-1}$ friss tömeg, a malondialdehid (MDA) tartalom $\mu\text{mol g}^{-1}$ g friss tömeg értékben valamint a Kla/Klb arány SA-val előkezelt, fiatal paradicsom levelekben egy hetes, 100 mM-os NaCl kezelés után.

	Kl ($a+b$)	Kla/Klb	Karotinoidok	MDA
Kontroll (K)	1716.0±59.0 ^a	2.14±0.07 ^b	248.2±18.2 ^a	0.33±0.03 ^a
K + NaCl	1319.1±27.9 ^b	2.00±0.08 ^b	156.5± 3.6 ^c	0.36±0.06 ^a
10^{-7} M SA	1485.8±40.2 ^b	2.40±0.03 ^a	249.2±13.3 ^{ab}	0.28±0.03 ^a
10^{-7} M SA + NaCl	1387.1±150.3 ^b	2.49±0.05 ^a	199.6±29.6 ^{bc}	0.18±0.01 ^b
10^{-4} M SA	1799.9±54.1 ^a	2.28±0.08 ^a	283.8±17.1 ^a	0.34±0.06 ^a
10^{-4} M SA + NaCl	1342.9±28.8 ^b	2.37±0.08 ^a	205.4±10.9 ^{ab}	0.20±0.02 ^b

(Átlagok±SE, n=6). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Sóstressz alatt csökkent a 10^{-4} M-os SA előkezelés hatására a klorofill ($a+b$) tartalom viszont nőtt a Kla/Klb arány. Ez arra utal, hogy a SA előkezelés inkább a Klb destrukcióját fokozta. Az egyhetes sókezelés a kontrollhoz képest lecsökkentette a Kla/Klb arányt, ez a tendencia azonban az előkezelt növényekben megfordult. A fotoszintetikus pigmentek szintézisének gátlása és/vagy degradációjának fokozódása jellemző a szárazság, de különösképpen a sóstressz alatt. A degradáció általános fokozódása adaptív hatású is lehet, mivel a növény a fénybegyűjtés csökkenésével a fotoinhibíciós károsodást csökkenti

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

2. táblázat. A Klorofilla fluoreszcencia indukciós paraméterek (F_v/F_m arány, a qP, a Φ_{PSII} és az NPQ) változása 7 napos, 100 mM-os NaCl kezelést követően a 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA-val előkezelt paradicsom növények legfiatalabb, kifejtett leveleiben.

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

(Átlagok \pm SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Az általunk használt SA koncentrációknál a fotoszintézis fényreakciói nem gátlódnak drámaian, ahogyan azt a fluoreszcencia indukciós paraméterek, köztük az F_v/F_m változatlansága, az effektív kvantumhasznosítás, a $\Delta F/F_m$ SA előkezelés hatására történő növekedése, a fotokémiai (qP) és a nem fotokémiai kioltás (NPQ) arányának a fotokémiai javára történő eltolódása mutatja (2. táblázat).

Az F_v/F_m változatlansága arra utal, hogy az SA kezelés és a sóstressz által kiváltott oxidatív stressz nem okozott olyan változást a kloroplasztisban, ami jelentős fotoinhibíciót eredményezne. A PSII primér fotokémiai folyamatainak hatékonysága (Φ_{PSII}), az effektív kvantumhasznosítás és a qP növekvő értékei az NPQ-val szemben a sótoleráns növényekre jellemző változások. A sóstresszelt kontroll növényekben az előkezeltekkel szemben ugyanakkor kisebb volt az effektív kvantumhasznosítás valamint a fluoreszcencia kioltásában nagyobb volt a hődisszipáció (NPQ) aránya, mint a fotokémiai folyamatoké.

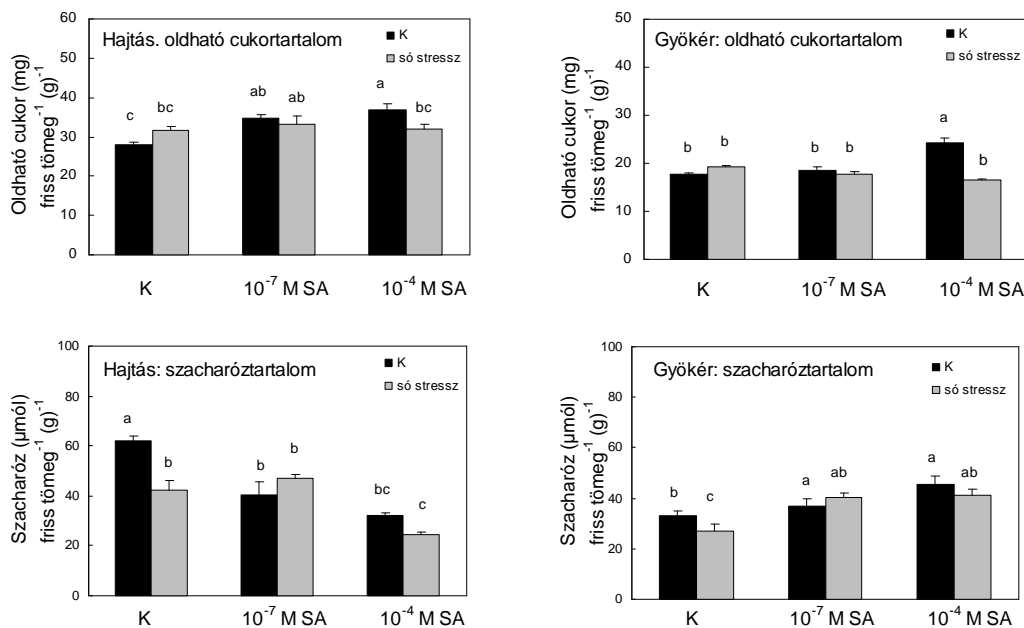
A SA előkezelés után a paradicsom növények fluoreszcencia indukciós paramétereiben történő változások a különböző fajok toleráns genotípusaiban figyelhetők meg. Sótoleráns rizs genotípusok sóstressz alatt nagyobb effektív kvantumhatékonyságot (Φ_{PSII}) és kisebb nem fotokémiai kioltást (NPQ) mutattak, mint a szenzitív genotípus (Dionisio-Sese és Tobita 2000). A rizs sótoleranciáját fokozni lehetett a kloroplasztisz glutamin szintetázát kódoló transzgen túlexpresszáltatásával. Ez utóbbi a fotorespirációs kapacitást növeli meg a fotorespiratórikus ammónia eltávolításával. Az elektrontranszport túlredukáltságának kiküszöbölésével a fotorespiráció jelentős szerepet kap a sóstressz tolerancia kialakításában a transzgenikus rizs növényekben, ami a Φ_{PSII} és a qP növekedésében is megnyilvánul (Hohsida és mtsai 2000).

5. A nátriumon kívül az előkezelt növényekben az ozmotikus adaptációhoz hozzájárulhatnak az odható cukrok is. Az SA előkezelés hatására mind a hajtásban, mind a gyökérben megnő az oldható cukrok mennyisége.

Eltérő tendenciát mutat azonban az egyes hexózok és a szacharóz koncentrációjának változása (Tari és mtsai, 2004b). A hajtásban a szacharóz koncentrációja csökken az előkezelés hatására, majd tovább csökken a sóstressz alatt. A gyökérben ezzel szemben az előkezelés megemeli a szacharóz koncentrációt, és ez a tendencia megmarad a 100 mM-os NaCl jelenlétében is. Ez jó összhangban van azzal, hogy a szénhidrátok szacharóz formában transzportálódnak a gyökérbe, és itt a különböző sejt-kompartimentumokban lokalizálódó invertáz izoenzimek által katalizált hidrolízis után alakulnak csak hexózokká (4. ábra).

Ezzel szemben a hexózok, a glükóz, de különösképpen a fruktóz mennyisége megemelkedik az előkezelt növények hajtásában, amely emelkedés mértéke a sókezelés hatására ugyanitt kissé csökken. A gyökérben a 10^{-7} M-os SA előkezelés hatására elsősorban a fruktóz koncentrációjában történt szignifikáns csökkenés, míg a sóstressz a hexóz tartalmakat általánosságban is csökkentette a gyökérben.

Mivel a hexózok katabolikus folyamatokba történő lépése szorosan kapcsolódik a hexokináz enzim által katalizált foszforilálási reakcióval, ezért megvizsgáltuk az enzim aktivitását a hajtásban és a gyökérben is .



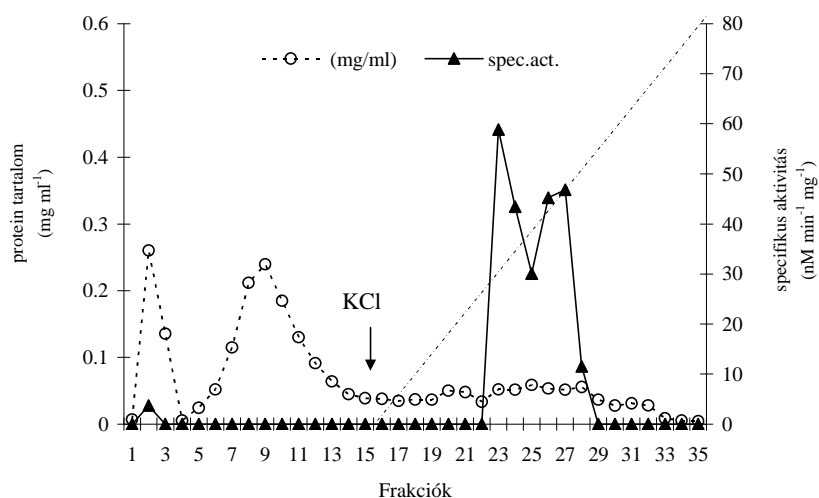
4. ábra. 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények összes oldható cukor, szacharóz, glükóz és fruktóz tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten,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

A hexokináz aktivitás a hajtásban nem változik szignifikánsan, a gyökérben azonban az előkezelés hatására mérsékelte, a sóstressz által megnövelt aktivitásban pedig drámai csökkenés figyelhető meg az SA- előkezelte növényekben. A glükóz foszforilációja egyúttal a metabolikus folyamatokba, elsősorban a glükolízisbe való belépését is jelenti. A hexokináz aktivitás csökkenése tehát szénhidrát megőrző hatású is lehet.

Juan és mtsai (2005.) szerint, a jó sótoleranciával rendelkező paradicsom növényeket magas szacharóztartalom jellemzi sóstressz alatt. Kontroll növényeinkben a 100 mM-os NaCl hatására olyan szacharóz tartalmak alakultak ki (~14 mg g⁻¹ friss tömeg), amilyen értékek jellemezték a Juan és mtsai (2005.) által leírt, termesztett, jobb sótűrő képességű genotípusokat. Kontroll növényeink azonban láthatóan sóérzékenyek. A szalicilsavas kezelés azonban megváltoztatta ezt, hiszen a szacharóz helyett a biokémiai és fiziológiailag eltérő szerepű fruktóz akkumulálódik a hajtásban. Az ozmotikus potenciál kialakításában pedig a *L. pennellii*hez hasonlóan elsősorban a szervesen Na⁺ dominál (Pérez-Alfocea et al. 1993).

6. Az ozmotikus adaptációban a cukrokon kívül különböző cukoralkoholok is részt vehetnek. A paradicsom levélben és a termésben is kimutatható a szorbitol, nem ismeretes azonban az SA hatása a szorbitol szintézisére és akkumulációjára.

A hajtásban és a gyökérben is legalább két különböző aldóz redukáz (ALR) izoenzim jelenlétét lehetett detektálni DEAE ioncserés kromatográfiával, 0-1,0 M-os lineáris KCl grádienssel (5. ábra).



5. ábra. A paradicsom gyökérextraktum aldózreduktázának tisztítása DEAE ioncserés kromatográfiával. O: fehérjetartalom, mg ml⁻¹; ▲: specifikus aktivitás, nmól min⁻¹ mg fehérje⁻¹)

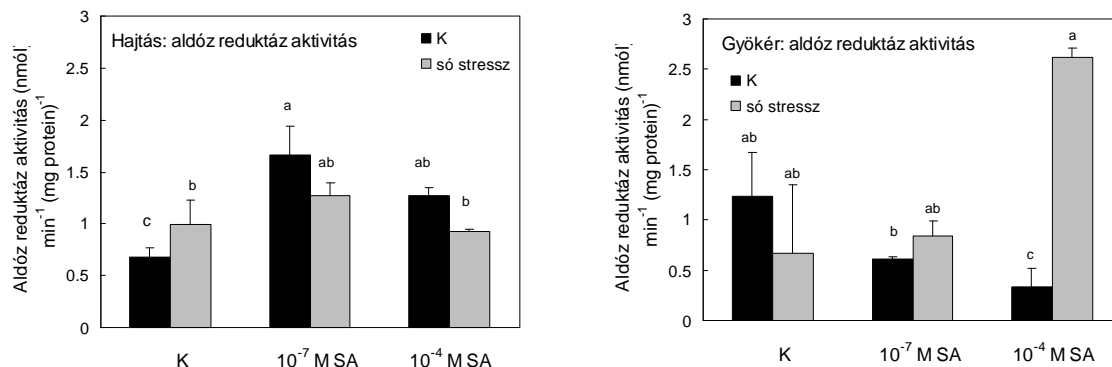
Ezért nem meglepő, hogy a különböző szubsztrátokkal kissé eltérő aktivitásokat kaptunk. A 80%-os ammóniumsulfátos kicsapást követő dialízis után a levélben 2,45-szoros tisztítást lehet elérni, ami az ezt követő dialízissel még tovább volt növelhető 7,17-szorosra. A gyökérben lévő tisztított enzimmel meghatároztuk az enzim különböző szubsztráttal mutatott K_M és V_{max} értékeit. Az adatokat a 7. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. Paradicsom gyökérből kivont aldóz reduktáz enzim kinetikai paraméterei különböző szubsztrátokkal.

Szubsztrát	Gyökérxivonat	
	K_M (mM)	V_{max} (nM min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
NADPH	1,84	35,71
glükóz-6-P	0,025	20,66
D,L-glicerin aldehid	1,2	1,7
2-naftaldehid	0,21	24,88

Az enzim elfogadta a DL-glicerin aldehidet és a 2-naftaldehidet is szubsztrátnak, a kis K_M érték miatt azonban valószínűleg a glükóz-6-foszfát a természetes szubsztrát. A gyökérből kivont enzim aktivitását *in vitro* 50 mM-tól csökkentette a NaCl, és 0.5 mM-tól kezdve a szalicilsav, míg a hajtás enzimét ugyanezen SA koncentráció aktiválta.

Az SA előkezelés a hajtásban szignifikánsan megemelte az enzim aktivitását, amely a sókezelt mintákban is megmaradt. Ezzel szemben a gyökerekben az SA inkább gátolta az enzimaktivitást. A gyökérben az SA előkezelés önmagában is gátló hatást gyakorolt az extrahálható enzimaktivásra, azonban a NaCl jelenlétében a hatás megfordult, és a 10⁻⁴ M-os SA-val előkezelt mintában már erőteljes aktiválást mérhettünk (6. ábra).



6. ábra. 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények a levél és a gyökér aldózreduktáz aktivitására glicerin aldehid szubsztráttal 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0,05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Az ugyanezen mintákból származó szorbitoltartalmak a hajtásban közelítőleg követték az ALR aktivitás változásait. A gyökérben az SA előkezelések nem okoztak szignifikáns szorbitoltartalom változást, és ez csak minimálisan módosult a NaCl jelenlétében is. A keletkezett szorbitol mennyisége azonban, hasonlóan az irodalmi adatokhoz, nem elegendő arra, hogy ozmotikumként számításba jöhessen. Nagyobb jelentősége lehet annak, hogy a szorbitol szintézis hozzájárul a redukált NADPH oxidációjához, ami stresszor hatása alatt fontos lépés a NADP⁺ reciklizációjában szempontjából. A szorbitol többek között antioxidánsként is szerepelhet.

7. Detoxifikációs mechanizmusok: reaktív oxigénformák eltávolítása

A szalicilsavról közismert, hogy oxidatív stressz generálásával programozott sejthalált indukál a hyperszenzitív reakció során. Az abiotikus stresszorokkal szembeni védőhatást is az antioxidáns enzimszisztéma aktiválásával magyarázzák. Vizsgáltuk a legfontosabb, a reaktív oxigénformák eltávolítását katalizáló enzimek aktivitását az SA-val előkezelte növényekben az egyhetes sókezelést követően (4. táblázat). Ezek a hatások a hajtásban és a gyökérben eltértek.

4. táblázat. 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények gyökérzetének és hajtásának kataláz (CAT), szuperoxid dizmutáz (SOD), guajakol peroxidáz (POX) és glutation reduktáz (GR) aktivitására (U mg⁻¹ protein) (Átlag±SD, n=3).

	CAT	SOD	POX	GR
	(U mg ⁻¹ protein)			
Gyökér				
Kontroll	4.06±0.03 ^a	294.75±16.1 ^a	2145.8±63.81 ^c	11.12±0.65 ^a
K + Na	2.67±0.02 ^b	19.24±4.33 ^b	3519.6±489.6 ^{ab}	2.79±0.36 ^c
10 ⁻⁷ M SA	1.33±0.57 ^c	70.81±30.63 ^b	890.8±54.17 ^d	3.67±0.11 ^c
10 ⁻⁷ M SA + Na	2.51±0.34 ^b	16.73±7.80 ^b	4626.5±217.0 ^a	5.46±0.49 ^b
10 ⁻⁴ M SA	2.71±0.09 ^b	339.41±97.2 ^a	3912.2±521.6 ^a	8.89±0.50 ^a
10 ⁻⁴ M SA + Na	2.71±0.34 ^b	15.92±5.00 ^b	2534.8±191.4 ^b	10.12±0.80 ^a

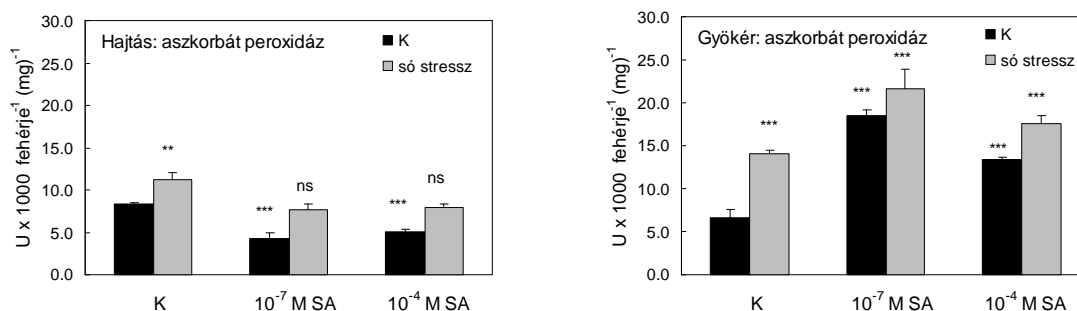
Hajtás				
Kontroll	1.37±0.17 ^a	180.88± 7.17 ^b	208.10± 4.9 ^{bc}	4.84±0.13 ^c
K +Na	0.70±0.07 ^b	123.49± 11.4 ^c	282.23±41.9 ^b	7.62±0.57 ^b
10 ⁻⁷ M SA	1.14±0.26 ^a	131.62± 21.9 ^c	156.80±15.1 ^c	6.38±0.48 ^b
10 ⁻⁷ M SA + Na	0.34±0.02 ^b	86.12±16.34 ^c	405.00±57.7 ^a	6.65±0.50 ^b
10 ⁻⁴ M SA	1.48±0.19 ^a	274.30±66.33 ^a	339.10±30.5 ^b	6.37±0.49 ^b
10 ⁻⁴ M SA + Na	0.65±0.09 ^b	86.78± 11.01 ^c	492.99±39.5 ^a	10.10±0.70 ^a

Az SA előkezelés a gyökérben szignifikánsan csökkentette a kataláz aktivitását, a hajtásban viszont nem okozott jelentős változást. A sóstressz az SA előkezelt növények gyökerei kivételével minden esetben tovább csökkentette a CAT aktivitást.

Csökkenés figyelhető meg a SOD aktivitásban a hajtásban és a gyökérben, 10⁻⁷ M SA előkezelésnél. A sóstressz mindenütt további SOD aktivitás csökkenést eredményez. A hajtásban tehát a 100 mM NaCl hatására lecsökkent, hidrogénperoxidot bontó katalázaktivitás, és a csökkent SOD aktivitás valóban kiindulópontja lehet reaktív oxigén formákat generáló reakciósornak.

A H₂O₂ eltávolítását végezhetik a különböző peroxidázok, amelyek közül a kloroplasztisban, a mitokondriumban és a peroxiszómákban kiemelt szerepe van az aszorbát peroxidáznak (APX). A guajakol peroxidáz aktivitás mind a hajtásban, mind a gyökérben magasabb volt a 10⁻⁴ M-os SA-val előkezelt növényekben, amit a hajtásban minden mintában, a gyökérben a kontroll és a 10⁻⁷ M-os SA előkezelésnél a sóstressz fokozott.

Az oxidatív stresszel szembeni akklimatizációban szereplő egyik kulcsenzim, az APX aktivitása a hajtásban lecsökkent az SA előkezelés hatására, ezzel szemben a gyökérben igen jelentős aktivitásnövekedés figyelhető meg. Sóterhelésnél mind a hajtásban, mind a gyökérben fokozódik az APX aktivitás, ami az SA előkezelt mintákban a kontrollénál szignifikánsan magasabb értékeket eredményez (7.ábra).



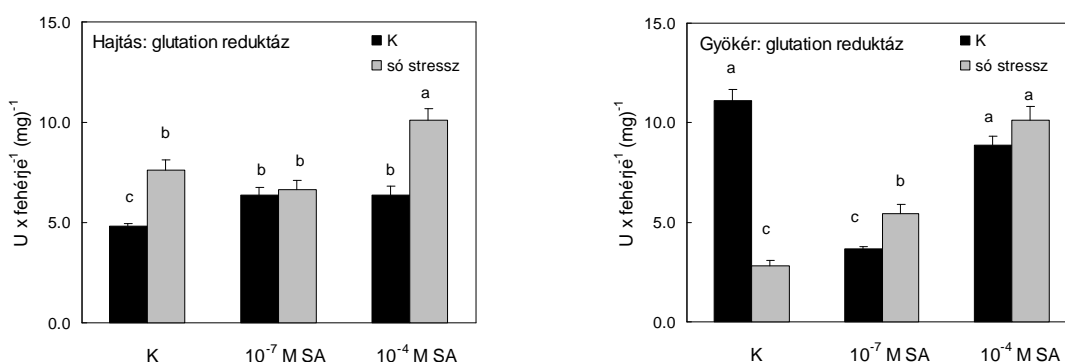
7. ábra. 10⁻⁷ M-os és 10⁻⁴ M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények a levelének és a gyökérzetének aszorbát peroxidáz aktivitására 1 hetes 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minta a kezeletlen kontrolltól P<0,05 (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik.

A dehidroaszorbinsav glutationnal történő redukcióját végző glutation reduktáz aktivitása a hajtásban nem változik, a gyökérben inkább csökken az előkezelések hatására, bár 10⁻⁴ M-nál ez minimális. A sóstressz a hajtásban emeli, a gyökérben gátolja az enzimaktivitást a kontroll növényekben. A 10⁻⁴ M-os SA előkezelésnél a hajtásban a 100 mM NaCl hatására a GR

aktivitás szignifikánsan növekszik, a gyökérben pedig nem csökken a kontrollhoz képest (8. ábra).

Mivel a magas NaCl koncentrációk elsősorban a gyökér szöveteit károsíthatják, ezért lényeges a gyökér akklimatizációs folyamatát kiemelten és elsődlegesen kezelni.

Megállapíthatjuk, hogy a gyökérben az előkezelések hatására csökkenő CAT aktivitás H_2O_2 akkumulációhoz vezethet, amit a jelentősen fokozódó aktivitású POX és/vagy APX bonthat le. Az aszkorbát reciklizációját biztosító GR aktivitásának jelentős csökkenése sóstressz alatt, illetve aktiválódásának elmaradása 10^{-7} M-os SA előkezelésnél, előidézhetheti az akklimatizáció sikertelenségét a 10^{-7} M-os SA-val előkezelt növényekben, ami magas GR aktivitás mellett a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növényekben nem következik be.



8. ábra. 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os SA előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények a levelének és a gyökérzetének glutation reduktáz aktivitására 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=3).

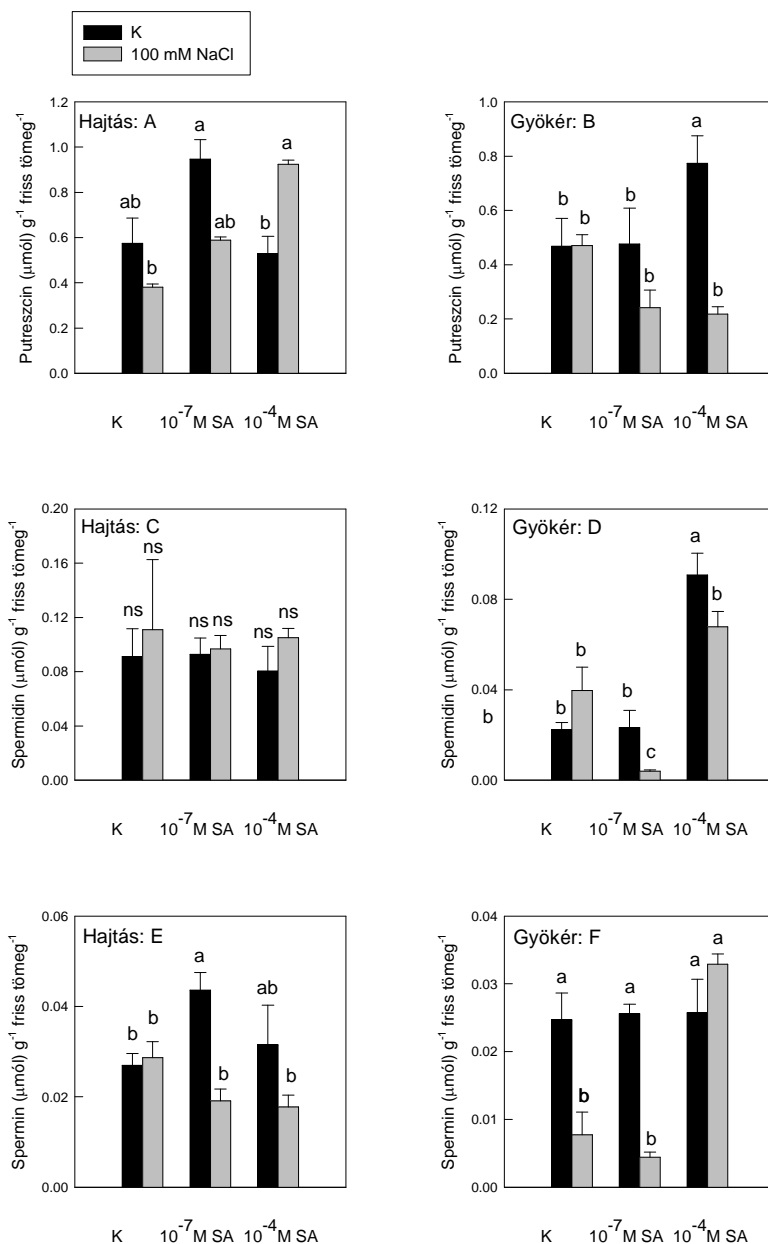
A hajtásban a sóstressz gátolja a CAT aktivitását. Itt elsősorban a guajakol peroxidáz járulhat hozzá a H_2O_2 lebontásához. Az antioxidatív kapacitást azonban nem enzimatisz komponensek, mint például a szignifikánsan megnövekedett karotinoid tartalom is növeli a 10^{-4} M-os SA előkezelésnél.

Markáns, az idő függvényében azonos irányú változások következnek be a *L. pennellii* vad paradicsom gyökerében az antioxidatív enzimek aktivitásának változásában 100 mM-os NaCl kezelés hatására az 5. nap után (Shalata és mtsai, 2001). Az idézett szerzők a *L. esculentum* szemben az aszkorbát peroxidáz és a CAT aktivitásának szignifikáns növekedését, és a GR nem szignifikáns csökkenését detektálták a sókezelt *L. pennellii* növények gyökereiben. Hasonlóképpen, a vad paradicsomfajban csökkent lipidperoxidáció, kisebb MDA tartalom mérhető. Az APX és a GR aktivitásban és az MDA tartalomban hasonló irányú változások történtek 10^{-4} M-os SA előkezelés hatására a *L. esculentum* cv. Rio Fuego termesztett fajtában is.

A poliamintartalom növekedése a sóstressz hatására kialakuló adaptív válasznak tekinthető. A levelekben a sóstressz következtében csökken a Put tartalom a kontrollban és a 10^{-7} M-os SA előkezelésnél, míg a 10^{-4} M-nál szignifikáns emelkedést kaptunk. A gyökerekben a 10^{-4} M-os SA előkezelés megemeli a Put mennyiségét, ami 100 mM NaCl jelenlétében lecsökken (9. ábra).

A poliaminok spektrumában megfigyelhető változás igen lényeges a sóstresszel szembeni ellenállóság kialakulásában. Fontos tényezői az antioxidáns védőmechanizmusoknak, ami részben közvetlen ROS kioltó hatásuk következménye, ugyanakkor szerepet játszhatnak az antioxidatív enzimek aktiválásában. A Put nagyon hatásosnak bizonyult az APX, a GR és a SOD aktivitásának fokozásában (Tang és Newton,

2005.). Ugyanakkor gátolta a hiperszenzitív reakció ROS-generáló enzimét, a NADPH oxidázt dohány mikroszóma frakcióban, ezáltal mérsékli a $\cdot\text{O}_2^-$ képződését. (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005.).



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

Így a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt gyökerekben a sókezelés kezdetekor mért magas Put tartalom fontos tényező a gyökércsúcsi sejtek elhalásának megakadályozásában.

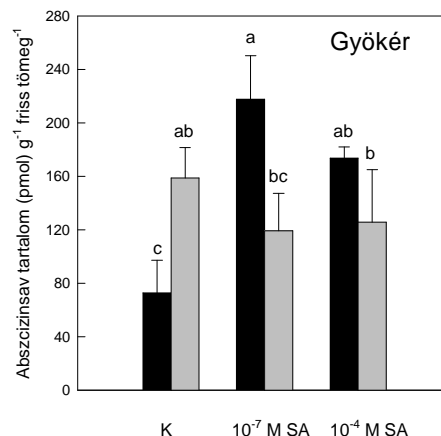
A poliaminonok, mint polikationok kapcsolódnak a nukleinsavakhoz, foszfolipidekhez, fehérjékhez és egyéb anionos komponensekhez a sejtben, ezzel együtt védő funkciót is ellátnak. Különösen fontos a plazmamembrán integritásának és szeletív permeabilitásának a megőrzése. Put-tal kezelt paradicsom levelek hidegstressz rezisztenciája

jelentősen megemelkedett azáltal, hogy a poliamin jelenlétében megmaradt a plazmalemma szelektív permeabilitása, míg Put nélkül a sejtek kieresztették elektrolit tartalmukat (Kim és mtsai, 2002.).

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

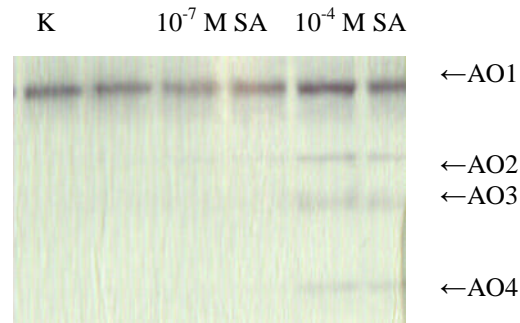
8. A 100 mM-os NaCl-dal kiváltott sóstressz és a PEG 6000-rel kiváltott nem ionos ozmotikus stressz kivédésében a SA előkezeléseknek eltérő szerepe van. A nem ionos ozmotikus stresszel szembeni akklimatizációban hatékony volt a 10^{-7} M-os SA előkezelés, ami nem aktiválta előzetesen az antioxidáns enzimeket, viszont elsősorban szénhidrát akkumuláción alapuló ozmotikus adaptációt indukált. A sóstressz akklimatizáció fokozásához az antioxidatív védőmechanizmusok aktiválódására is szükség van, ami a 10^{-4} M-os SA előkezelésnél következett be (Szepesi és mtsai, 2005.).

9. Az SA előkezelés fokozta az abszcizinsav szintézisét. Ennek alapja az SA hatására bekövetkező vízpotenciál csökkenés, ami az ABS bioszintézisében szerepet játszó enzimek közül többet, így az abszcizinaldehidet ABS-sá alakító abszcizinaldehid oxidáz (AO) enzimet is indukálja. Az ABS szintézise azonban nemcsak az ozmotikus stressz által szabályozódik, hanem oxidatív stressz által is regulált.



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

A 10^{-4} M-os SA előkezelés fokozta az aldehidoxidáz 1 (AO1) aktivitását is gyökérben (11. ábra), és az előkezelés hatására új izoenzimek is megjelennek (AO2-4).

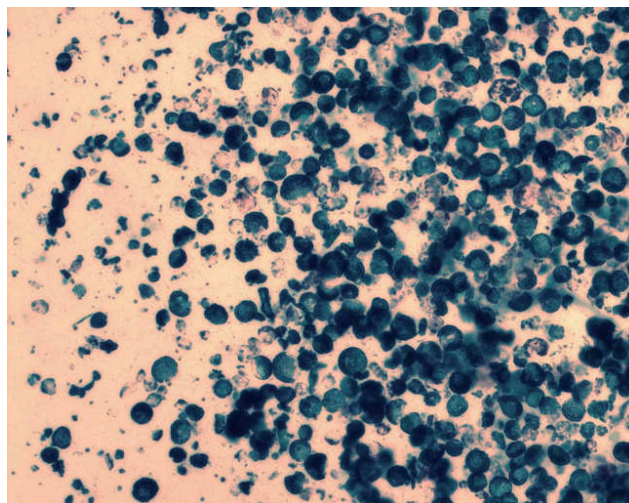


11. ábra. Az aldehid oxidáz izoenzimek (AO1-4) aktivitásának változása 10^{-7} és 10^{-4} M-os SA előkezelést követően aktivitás gélben paradicsom gyökérben. Szubsztrát: 1 mM-os naftaldehid.

A fenti témakörben készült cikk közlésre benyújtva (Szepesi és mtsai, 2006 Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* Mill. L. to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *Lycopersicon pennellii*).

10. Megállapítottuk, hogy a használt SA előkezelések nem gátolták a paradicsom növényekben az etilénproduktiót. Eredményeink azt mutatták, hogy az etilén prekursorával, az 1-aminociklopropán-1-karbonsav alacsony koncentrációival az SA-hoz hasonlóan fokozni lehetett a paradicsom növények stresszrezisztenciáját, aminek alapja az antioxidáns mechanizmusok aktiválódása és az abszcizinsav szintézis indukciója volt (Bajkán, 2004.).

11. Paradicsom levélből protoplaszt szuszpenziót készítettünk, és vizsgáltuk a SA, az SA jelenlétében mérhető etilén, az ACC-indukált etilén, a poliaminok és az ABS hatását az SA-indukált sejthalálra. A sejtek életképességét az Evans-kék festődés hiánya mutatja (12. ábra).



12. ábra. A mezofillum protoplasztok 10^{-2} M-os SA oldatban inkubálva Evans kékben kékre festődnek majd lizálnak.

Összefoglalás

1. A szalicilsav előkezelés alkalmas volt a paradicsom növények ionos és nem ionos ozmotikus stressz akklimatizációjának javítására.
2. A szalicilsav kezelés önmagában is ozmotikus stresszt váltott ki, ami a második stresszor előtt már aktiválta a legfontosabb védekezési mechanizmusokat.
3. Ezek első eleme az ozmotikus és/vagy térfogati adaptáció.
A 100 mOsm PEG 6000-rel kiváltott nem ionos ozmotikus stressz akklimatizációt már a 10^{-7} M-os előkezelés is javította, elsősorban az előzetes ozmotikus adaptáció miatt, ami főleg az oldható cukrok akkumulációján alapult.
4. Másik fontos tényező az antioxidáns mechanizmusok aktiválása. A 100 mM NaCl-dal kiváltott sóstresszel szemben a 10^{-4} M-os SA előkezelés volt hatékony, amely az antioxidáns enzimszisztemet, elsősorban az aszkorbát peroxidázt és guaiakol peroxidázt aktiválta a gyökérben, és nem csökkentette drámaian a kataláz és a glutation reduktáz aktivitást. Ugyanaz az előkezelés megnövelte a nem enzimikus antioxidánsok, mint pl. a karotinoidok és a putreszcin mennyiségét a hajtásban, sóstressz alatt.
5. Harmadik fontos eleme a szalicilsav hatásának az ABS szintézisének indukciója és a hormon akkumuláció fokozása az előkezelés alatt, ezáltal már a második stresszor hatása előtt indukálódnak az ABS jelátviteli út elemei és az így szintetizálódó védőfaktorok. Az ABS szintézisének fokozódása az abszcizinaldehid oxidáz AO1 izoenzime aktiválódásának következménye.
6. Az SA előkezelés a termesztett paradicsomban a halofita vad paradicsomfajhoz, a *L. pennellii*hez hasonló fiziológiai változásokat indukált. Elősegítette a Na^+ hajtásba irányuló transzportját és ott szervesen ozmotikumként való felhasználását, ami a halofitákhoz hasonlóan megnövelte e relatív növekedési sebességet sóstressz alatt.

Megjegyzések

Egyetemi oktató lévén nagyon fontosnak tartom, hogy a fenti pályázat nagyban segítette Fehérné Kiss Gabriella és Gémes Katalin biológia-kémia illetve biológia tanár szakos hallgatók szakdolgozatának elkészítését. Diplomamunkát készített a témából Szepesi Ágnes, Bajkán Szilvia és Kis Gyöngyi biológus hallgató. Az utóbbi két hallgató a 2004-es helyi diákköri konferencián a Biokémia-Növényélettan szekcióban 1. illetve 2. helyezést ért el, mindketten doktorandusz hallgatói a Biológus doktori iskolának. Ugyancsak doktori disszertációt készít a témából Szepesi Ágnes is, aki várhatóan 2006-ban be tudja fejezni a munkát.

Nem hagyható szó nélkül az sem, hogy az OTKA támogatást többször is pénzügyi megszorítás súlytotta. Ennek kapcsán először a 25 %-os ÁFA bevezetését, majd 14 és 10 % elvonását kellett elszenvednünk. Ennek ellenére, a kutatási feladatokban nem szeretnénk volna a pénzügyi támogatáshoz hasonló redukciónak végrehajtani.

A pályázat során egyszer kértem a pénzügyi rovatok átcsoportosítására vonatkozó módosítást, amit megkaptunk, és amit hálással köszönök. Ennek oka az volt, hogy a költségtervben szereplő 18.1022 000BOEWIN 2x2 csatornás adatállomást a felsőoktatás finanszírozási viszonyai és az egyetemek pénzügyi mozgásában tapasztalható anomáliák miatt egy más pályázatból kellett kifizetnünk. A Beruházás rovatban megmaradó 645 eFtmaradvány Dologi kiadásokhoz történő átcsoportosítására az engedélyt megkaptuk

Irodalom

- Amtmann, A., Sanders, D. (1999) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. – *Adv. Bot. Res.* 29: 75-112.
- 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.
- Ananieva, E.A., Christov, K.N., Popova, L.P. (2004) Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. – *J. Plant Physiol.* 161: 319-328.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2004.) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. – *Plant Science* 166: 3-16.
- Bajkán, Sz. (2004) Etiléntermelés hatása paradicsom növények ozmotikus adaptációjára és az oxidatív stresszel szembeni akklimatizációs folyamataira. (Diplomamunka, Szegedi Tudományegyetem, TTK, Növényélettani Tanszék).
- Baker, C.J., Mock, N.M. (1994) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. – *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 7-12.
- Barkosky, R.R., Einhellig, F.A. (1993) Effects of salicylic-acid on plant water relationships. – *J. Chem. Soc.* 19: 237-247.
- Baziramakenga, R., Simard, R.R., Leroux, G.D. (1994) Effects of benzoic and cinnamic-acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. – *J. Chem. Ecol.* 20: 2821-2833.
- Bezrukova, M.V., Sakhabutdinova, R., Fatkhutdinova, R.A., Kyldiarova, I., Shakirova, F. (2001) The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. – *Agrochemiya (Russ)* 2: 51-54.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. - *Plant Physiol.* 126: 1024-1030.
- Bourbouloux, A., Raymond, P., Delrot, S. (1998) Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. – *J. Exp. Bot.* 49: 239-247.
- 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.
- Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. (1993) Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9533-9537.
- Chen HY, Zhang JH, Zhuang TM (2001) Evaluation of salt tolerance of the wild tomato species and its utilization. *East China Univ. Sci. Technol.* 271: 51-55. (kínaiul, angol nyelvű ábrákkal és ábrafeliratokkal).
- Chou, C-H., Patrick, Z.A. (1976) Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. – *J. Chem. Ecol.* 2: 369-387.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M. (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. – *Plant Physiol.* 116: 1351-1357.
- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S. (2000) Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. - *J. Plant Physiol.* 157: 54-58.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. – *Current Opinion in Plant Biol.* 1: 258-266.

- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A. (1981) Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. – *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.
- 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.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and health. – *Trends in Plant Sci.* 5: 193-198.
- Flores, H.E., Galston, A.W. (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. – *Plant Physiol.* 69: 701-706.
- Freeman, J.L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A., Salt, D.E. (2005) Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. – *Plant Physiol.* 137: 1082-1091.
- Gronwald, J.W., Plaisance, K.L. (1998) Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. – *Plant Physiol.* 117: 877-892. 367.
- Heath, R.L., Parker, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. – *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
- Horváth, 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.
- Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi Y., Tanaka, A., Takabe, T., Takabe, T. (2000). Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthase. – *Plant Mol. Biol.* 43: 103-111.
- Janda T., Szalai G., Tari, I. and Páldi, E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) -*Planta* 208: 175-180.
- 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.
- Kao, K.N., Michayluk, M.R. (1980) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. – *Z. Plant Physiol.* 96: 135-141.
- Kim, T.E., Kim, S-K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C. (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). – *Physiol Plant* 115: 370-376
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – *Nature* 227: 680-685.
- Larkindale, J., Knight, M. (2002) Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. – *Plant Physiol.* 128: 682-695.
- Lichtenthaler, H. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. – *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A. (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. – *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Manthe, B., Schulz, 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.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A. (1999) Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration in rice. – *Biol. Plant.* 42: 409-415.
- Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Fehér, A., Dudits, D., Horváth, G.V. (2000). A novel alfalfa aldose/aldehyde reductase protects transgenic

- plants against lipid peroxidation under chemical and drought stress. – *Plant J.* 24: 437-446.
- 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.
- Panchuk, I.I., Volkov, R.A., Schöffl, F. (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. – *Plant Physiol.* 129: 838-853.
- 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.
- Pérez-Alfocea F, Estañ MT, Caro M, Guerrier G (1993) Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol Plant* 87: 493-498
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., 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.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Rus, A.M., Panoff, M., Perez-Alfocea, F., Bolarin, M.C. (1999) NaCl responses in tomato calli and whole plants. – *J. Plant Physiol.* 155: 727-733.
- Sagi, M., Fluhr, R., Lips, S.H. (1999) Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a flacca tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. – *Plant Physiol.* 120: 571-577.
- Sahu, G.K., Kar, M., Sabat, S.C. (2002) Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. – *Plant Biology*, 4: 321-328.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarin, M.C. (1999) Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. - *Plant Physiol. Biochem.* 37: 65-71.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A., Fatkhutdinova, D.R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. - *Plant Sci.* 164: 317-322.
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol Plant* 112: 487-494
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithio-bis(2-nitro-benzoic acid). – *Anal. Biochem.* 175: 691-699.
- Szalai, G., I. Tari, T. Janda, A. Pestenác and E. Páldi (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. - *Biol. Plant.* 43:637-640.
- Szegletes, Zs. Erdei, L., Tari, I., Cseuz, L. (2000) Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. – *Cer. Res. Comm.* 28: 403-410.
- 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., Tari, I. (2006) Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* Mill. L. to high salinity by conveying its salt stress response to that of a wild species *Lycopersicon pennellii* (submitted to *Physiol. Plant.*)

- Tang, W., Newton, R.J. (2005) Polyamines reduce salt-induced damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. - *Plant Growth Regul* 46: 31-43.
- Tari, I. and Mihalik, E. (1998) Comparison of the effects of white light and the growth retardant paclobutrazol on the ethylene production in bean hypocotyls. - *Plant Growth Regul.* 24:67-72.
- 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., Gallé Á., Bajkán Sz., Szepesi Á., Vashegyi Á. (2004a) Élettani megközelítések gazdasági növények szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Bot. Közlem.* 90: 139-158.
- Tari, I., Simon, LM., Deér, KA, Csiszár, J., Bajkán, Sz., Kis, Gy., Szepesi, Á. (2004b) Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation. . – *Acta Physiol. Plant.* , The 14th FESPB Congress, August 23-27, 2004, Cracow, Poland, Book of Abstracts, pp. 237.
- Trivedi, S., Erdei, L. (1992) Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca²⁺ and K⁺ and on the influx and translocation of K⁺ in wheat of low and high K⁺ status. – *Physiol. Plant.* 84: 94-100.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N., Smith, B.N. (1985) Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. – *J. Plant Physiol.* 121: 453-461.
- Van der Jagt, D.L., Robinson, B., Taylor, K.K., Hunsaker, L.A. (1992) Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal and diabetic complications. – *J. Biol. Chem.* 267: 4364-4369.
- Váradi, Gy., Darkó, É., Lehoczki, E. (2000) Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* L. *Cronq.* – *Physiol. Plant.* 123: 1459-1469.
- Whittaker, A., Bochicchio, A., Vazzana, C., Lindsey, G., Farrant, J. (2001) Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. – *J. Exp. Bot.* 52: 961-969.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., León, J., Raskin, I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. – *Planta*, 193: 373-376.
- Zhu, J-K. (2001) Plant salt tolerance. – *Trends in Plant Sci.* 6: 66-72.
- Zsoldos, F., Haunold, E., Vashegyi, Á., Herger, P. (1993) Nitrite in the root zone and its effects on ion uptake and growth of wheat seedlings. - *Physiol. Plant.* 89: 626-631.