

Doktori (PhD) értekezés

Biológiailag aktív vegyület, az S-metilmethionin-szalicilát fiziológiai és stresszkivédő hatásai kukoricában

Készítette: *Oláh Csilla*

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Doktori Iskola

Prof. Dr. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológiai Program

Prof. Dr. Szigeti Zoltán

Dr. Kovács M. Gábor

Témavezető:

Dr. Rudnóczy Szabolcs
egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék



Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
Bevezetés	6
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1 Az alacsony hőmérsékleti stresszről általánosan	7
1.2 Az oxidatív stresszről általánosan	9
1.3 Stresszvédő metabolitok: a fenilpropanoid származékok	12
1.4 Az S-metilmethionin és a szalicilsav jelentősége	15
2. Célkitűzések	20
3. Anyag és módszer.....	21
3.1 A növények nevelése és kezelése	21
3.2 Fluoreszcencia indukció mérése.....	22
3.3 Pigmenttartalom meghatározása spektrofotométerrel	23
3.4 Fenilpropanoid származékok vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).....	25
3.5 Membránkárosodás-mérés	26
3.6 Génexpresszió-változás mérése.....	26
3.7 Az antioxidáns rendszer vizsgálata	29
3.8 Statisztika	31
4. Eredmények.....	32
4.1 A fotoszintézis folyamatához köthető változások	32
4.2 Membránpermeabilitás-változás	38
4.3 Génexpressziós változások a microarray vizsgálat alapján.....	39
4.4 Fenilpropanoid útvonal	49
4.5 Az antioxidáns védekezőrendszer	58
5. Az eredmények értékelése.....	66
5.1 A fotoszintézis folyamatához köthető változások	66
5.2 Membránpermeabilitás-változás	70
5.3 Génexpressziós változások a microarray vizsgálat alapján.....	71
5.4 Fenilpropanoid útvonal	75
5.5 Az antioxidáns védekezőrendszer	80
5.6 Az MMS-ről	84
5.7 Az MMS-előkezelés hatásának összefoglalása	85
6. Összefoglalás	88
7. Summary	90

8. Irodalomjegyzék	91
9. Köszönetnyilvánítás	103
10. Melléklet.....	104
11. DOI Adatlap a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához.....	118

Rövidítésjegyzék

4CL	4-kumaroil-CoA-ligáz
ABA	abszcizinsav
AdoMet	S-adenozilmetionin
APX	aszorbát-peroxidáz
AGT	antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz
C3GE	cianidin-3-glikozid ekvivalens
C4H	fahéjsav-4-hidroxiláz
CAMTA 1-3	Calmodulin binding transcription activator 1-3
CBF	C-repeat-binding factor
CHI	kalkon-izomeráz
CHS	kalkon-szintáz
COR	cold-responsive gének
CRT/DRE	C-repeat/dehydration-responsive element
DHA	dehidroaszorbinsav
DFR	dihidroflavonol-reduktáz
DREB	dehydration responsive element-binding
F3H	flavanon-3-hidroxiláz
FCR	Folin-Ciocalteu reagens
FPGS	folilpoliglutamát-szintáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSH	oxidált glutation
GST	glutation-S-transzferáz
HMT	S-metilmetionin : homocisztein S-metiltranszferáz
ICE	Inducer of CBF expression
IFH	izoflavon-2'-hidroxiláz
JA	jazmonsav
LUG	leunig

LOX	lipoxigenáz
LDOX	leukoantocianidin-dioxigenáz
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEP	membrán fehérje PB1A10.07c
MMT	S-adenozilmetionin : metionin S-metiltranszferáz
MMS	S-metilmetionin-szalicilát
MYB15	R2R3-MYB típusú fehérjecsalád
PAL	fenilalanin-ammónia-liáz
PRPO	protoporfirinogén IX-oxidáz
PSII	kettes fotokémiai rendszer
qRT-PCR	kvantitatív real-time PCR (módszer)
ROS	reaktív oxigénformák
SAT	szerin-acetiltranszferáz
SA	szalicilsav
SMM	S-metilmetionin
SOD	szuperoxid-diszmutáz
ZXE	zeaxantin-epoxidáz
$\Delta F/F_m'$	kettes fotokémiai rendszer aktuális kvantumhatékonysága
Φ_{PSII}	aktív PSII reakciócentrumok hatékonysága
Φ_{NPQ}	fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú szabályozott hődisszipáció
$\Phi_{f, D}$	fluoreszcencia és konstitutív hődisszipáció
Φ_{NF}	inaktiválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációja

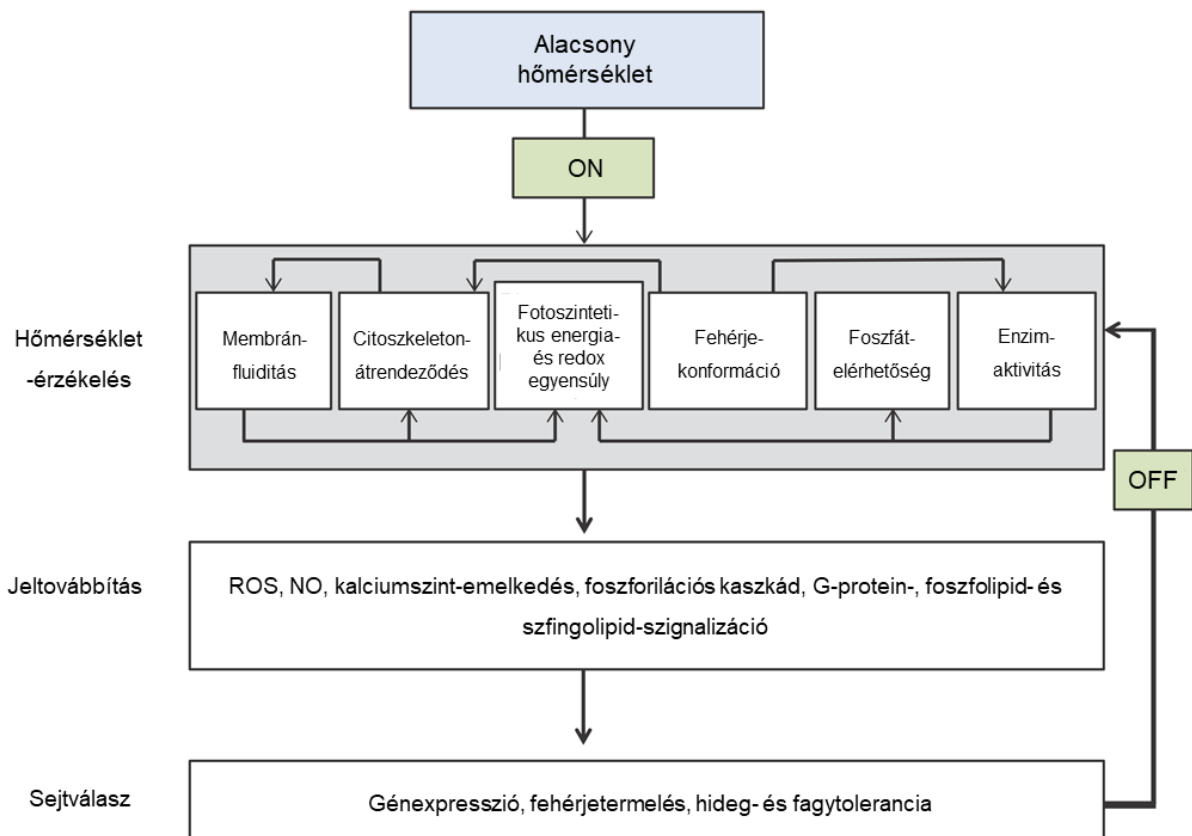
Bevezetés

A kukorica napjaink egyik legelterjedtebb haszonnövénye. Trópusi eredete miatt különösen érzékeny az alacsony hőmérsékletre, amely komoly károkat okozhat a növény fiziológiai folyamataiban. A stresszor megjelenésének egyik gyakori következménye lehet a termés mennyiségi csökkenése, ezáltal elengedhetetlen a növényi védekezőképesség fokozása. Természetes eredetű, biológiailag aktív hatóanyagok alkalmazása megoldást jelenthet különböző stresszorok, köztük az alacsony hőmérséklet által okozott károsodások kivédésében. Hidegstressz hatására a növényekben számos kedvezőtlen folyamat játszódik le. Közvetlen hatás többek között a membránok károsodása, a fotoszintézis nem megfelelő működése, az enzimek hatékonyságának romlása, továbbá számos, a transzkripció és transláció folyamán fellépő rendellenesség. Másodlagos stresszként gyakran tapasztalunk oxidatív stresszt a növényeknél, melynek folyamán reaktív oxigénformák képződnek, amelyek tovább károsíthatják az élő szervezetet. Korábbi kutatások során bizonyították, hogy természetes eredetű biológiailag aktív vegyületek, az S-metilmationin (SMM) és a szalicilsav (SA) képesek növelni a növények toleranciáját abiotikus és biotikus stresszorok esetén egyaránt. A kezelések többek között fokozták a stresszorok kivédésében szerepet játszó vegyületek, például fenilpropanoid származékok és poliaminok, továbbá hormonok szintézisét, segítették a fotoszintetikus apparátus funkciójának megőrzését és az oxidatív stressz okozta károsodások kivédését. Ezen kutatások eredményeként kombináltuk az SMM-et és a SA-at egy új, ígéretes vegyület létrehozásának reményében, amely feltételezésünk szerint hordozza a korábbi hatóanyagok pozitív tulajdonságait, hatékonyabb védelmet biztosít a stresszorok károsító hatásai ellen és stabilizálja az egyébként bomlékony SMM-et. Ez az újonnan szintetizált vegyület a természetes eredetű S-metilmationin-szalicilát (MMS), mely 1:1 arányban tartalmazza az SMM-et és a SA-at. Kutatásom során ennek a vegyületnek a hatásmechanizmusát vizsgáltam meg hidegstressznek kitett kukorica csíranövényeken.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Az alacsony hőmérsékleti stresszről általánosan

Az alacsony hőmérsékleti stressz egy széleskörben kutatott és immáron jól feltérképezett terület a növényvilágban. Számptalan publikáció született a témában, népszerűsége abban rejlik, hogy a hideg az egyik leggyakrabban jelentkező abiotikus stresszor. Megjelenése számos negatív hatást idéz elő, melynek egyik legsúlyosabb következménye lehet a termés hozam csökkenése. Ezáltal valóban fontos megismerni hatásmechanizmusát, a növényekben végbemenő változásokon keresztül, továbbá a lehetséges alkalmazkodási folyamatokat, melyek által elkerülhető, illetve csökkenthető a stresszor károsító hatása. Fontos azonban megjegyezni, hogy hatása függ az adott hőmérséklettől, a hőmérsékleti hatás időtartamától, a növény fejlődési állapotától, illetve más stresszorok jelenlététől (Longo és mtsai. 2018). Alacsony hőmérsékletnek számít a 0-15 C° közötti, még fagypont feletti hőmérséklet. Egyes növényfajták képesek lehetnek tolerálni az alacsony hőmérséklet megjelenését életfolyamataik megváltoztatása révén, ezt a folyamatot hidegakklimációnak nevezzük (Theocharis és mtsai. 2012). Ezzel szemben a trópusi, szubtrópusi eredetű növények, beleértve a kukorica is különösen érzékenyek a hidegre, és kevésbé képesek alkalmazkodni a megváltozott környezeti tényezőkhöz (Zhu és mtsai. 2007a, Zhang és mtsai. 2019a). A kukorica nemesítés által vált az egyik legjelentősebb gazdasági növényünké, közkedveltsége felhasználhatóságának sokoldalúságában rejlik (Tian és mtsai. 2009). Gazdasági jelentősége miatt fontos kutatási terület lehet a növény stresszre adott válaszreakcióinak vizsgálata. A hideghez való alkalmazkodás első feltétele, hogy a növény érzékelje a hőmérséklet csökkenését és jelátviteli hálózatok által továbbítsa ezt a jelet a sejtmag felé, ahol ezt követően génexpressziós változások előidézésével válaszol a megváltozott környezetre (1. ábra).



1. ábra Összefoglaló ábra, az alacsony hőmérséklet érzékelése és a stresszorra adott válaszreakció (Ruelland 2017 nyomán).

A hőmérséklet érzékelése rendkívül összetett folyamat, több szenzor együttesen eredményezi a jelátviteli utak aktiválódását. Az érzékelésben fontos szerepet töltenek be a membránok, a hőmérséklet csökkenésével nő a rigiditásuk, ezenfelül azt is kimutatták, hogy a lehülés befolyásolja még a citoszkeleton elrendeződését is, illetve szintén hatással van a fehérjék konformációjára, mely által így az enzimek működését is befolyásolja (Ruelland 2017, Ding és mtsai. 2019). A membránoknak mégis elsődleges szerepük van, ugyanis számos kutatás bizonyította, hogy a rigidifikáció, és az ehhez kapcsolódó citoszkeleton-átrendeződés mechanoszenzitív kalciumcsatornákat nyit meg, és aktiválja a MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaszkádot (Theocharis és mtsai. 2012, Guo és mtsai. 2018). Ez az elsődleges szerep abban is rejlik, hogy a fluiditás megváltozása pillanatok alatt végbemegy, míg például a citoszkeleton átrendeződése akár néhány percet is igénybe vehet. Az érzékelés folyamata során a szenzorok egymás aktivációjára, működésére is hatással vannak (Ruelland 2017). Az intracelluláris kalciumfelszabadulás aktiválja a CBF (C-repeat binding factor) transzkripciós faktorokat és a *COR* (cold responsive) géneket, melyek működése feltétele az akklimáció kialakulásának (Theocharis és mtsai. 2012). A hideg hatására a CBF-ek hamar aktiválódnak,

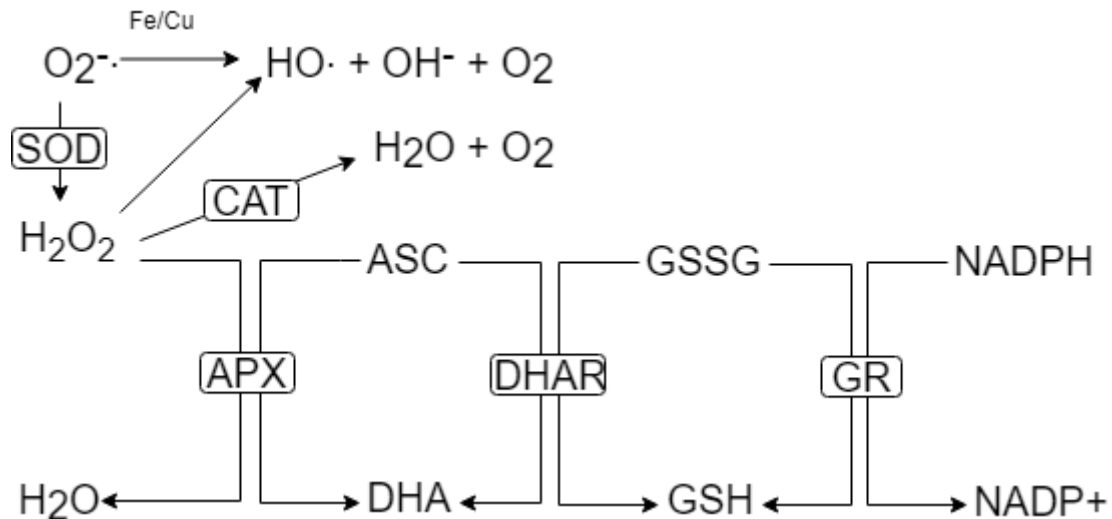
expressziós csúcukat néhány órán belül elérhetik. A transzkripciós faktorok felismerik és hozzákötődnek a CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) DNS-szabályozó szakaszokhoz, mely promóterek a *COR* gének szabályozó régióiban találhatóak meg. Ezt a lépést megelőzően a CBF-ek aktivációja is szükséges, ami az ICE (Inducer of CBF expression) transzkripciós faktorok által történik, illetve az ezekhez szorosan kapcsolt CAMTA 1-3 (Calmodulin binding transcription activator 1-3) által. A CBF-ből három transzkripciós faktort különítünk el (CBF1, CBF2, CBF3), míg az ICE-ből két különbözőt (ICE1, ICE2). Mutációs kísérleteken keresztül bizonyították, hogy az ICE1 a CBF2, de legerősebben a CBF3 expresszióját növeli, amíg az ICE2 a CBF1-re van serkentő hatással. A CAMTA 1-3 esetében mind a három faktor részt vesz a CBF-ek aktivációjában (Theocharis és mtsai. 2012, Zhao és mtsai. 2015a, Ding és mtsai. 2019). Fontos továbbá megjegyezni, hogy a CBF-ek gátolhatóak a MYB15 (R2R3-MYB típusú fehérjecsald) által, melyet viszont az ICE1 gátol, szintén serkentve ezzel a CBF expresszióját (Chinnusamy és mtsai. 2007). A szignalizációt alapvetően *Arabidopsisban* kutatták, de kukoricában is sikerült azonosítani a *CBF* géneket (Qin és mtsai. 2004). Összegezve az eddigieket, az elsődleges szenzorok érzékelik a hőmérséklet csökkenését, majd másodlagos hírvivők közreműködésével, melyek lehetnek kalcium és inozitol-1,4,5-trifoszfát, foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát és más foszfolipidek, működésbe hoznak kalciumszenzorokat, kalciumfüggő protein-kinázokat és a MAPK kaszkádot, amelyek foszforilálják az ICE1 transzkripciós faktort. Az aktivált ICE1 beköt a CBF3 transzkripciós faktort kódoló gén promóter régiójához, így serkentve annak expresszióját. A kifejeződött CBF3 szerepe ezt követően az összefoglalóan *COR* géneknek nevezett gének expressziójának fokozása, hozzájárulva ezáltal azon géntermékek keletkezéséhez, amelyek segítik a növény hidegstresszhez való alkalmazkodását (Zhu és mtsai. 2007). Míg az abszcizinsavról (ABA) kimutatták, hogy szintén szerepet játszik a hidegakklimációban, addig azon *COR* gének, amelyek rendelkeznek CRT/DRE promóterekkel, nem reagáltak az ABA-kezelésre. Ez a kaszkád tehát egy ABA-független jelátviteli útvonal, így elmondható, hogy létezik ABA-függő és ABA-független szignalizáció is (Huang és mtsai. 2012).

1.2 Az oxidatív stresszről általánosan

Hidegstresszt követően gyakorta jelentkezik másodlagosan oxidatív stressz, ilyenkor megnő a reaktív oxigénformák (ROS) képződése, amelyek tovább károsíthatják a növények fiziológiai folyamatait (Mittler 2002). A ROS-ok közé soroljuk a szuperoxid anion - (O_2^-) és

hidroxilgyököt ($\cdot\text{OH}$), továbbá a kevésbé reaktív szinglet oxigént ($^1\text{O}_2$) és hidrogén-peroxidot (H_2O_2) (Sharma és mtsai. 2012). ROS-ok folyamatosan képződnek a növényekben számos anyagcsere-folyamat melléktermékeként, mint például a kloroplasztiszban a fotoszintézis során oxigén termelődik, mely két párosítatlan elektronnal rendelkezik, ezáltal képes reaktív szabadgyökké alakulni. Továbbá a peroxiszómában is számos folyamat következtében, illetve a mitokondriumban az elektrontranszportlánc működése során is megfigyelhető a ROS-ok kialakulása (Gill és Tuteja 2010). Ezek a molekulák rendkívül ártalmasok az élő szervezetekre, lipidperoxidációt, proteinek oxidációját, nukleinsavak károsodását, enzimek működésének gátlását okozzák vagy akár programozott sejthalált is képesek előidézni (Sharma és mtsai. 2012). Fontos azonban kiemelni, hogy kettős szereppel rendelkeznek: károsító hatásaik mellett szignál molekulaként részt vesznek biológiai folyamatok szabályozásában, például növekedésben, sejtciklus-szabályozásban, hormonok jelátvitelében és biotikus és abiotikus stresszválaszokban (Miller és mtsai. 2008). Károsító vagy szignál molekula jellegük a koncentráció függvénye, amit az enzimatis és nem enzimatis antioxidáns védekezőrendszer befolyásol, mely fenntartja az egyensúlyt a sejtekben. Ezt az egyensúlyt a stresszorok megjelenése felborítja, így eltolódik a károsító folyamatok irányába, oxidatív stresszt okozva ezzel (Gill és Tuteja 2010). Az antioxidáns védekezőrendszer felelős a ROS-ok eliminálásáért. A nem enzimatis védekezőrendszerhez tartoznak: az α -tokoferol, amely többek között a lipidgyököket képes detoxifikálni és a karotinoidok, amelyek a triplet klorofill molekulák kioltásáért felelősek. Szintén ide soroljuk a glutationt és az aszkorbinsavat, amelyek közvetlenül képesek reagálni a szabadgyökökkel, de részei az enzimatis védekezőrendszernek is. A glutation és az aszkorbinsav egymást is képes redukálni az úgynevezett aszkorbát-glutation ciklusban, a megfelelő enzimek segítségével (2. ábra) (Mach és Greenberg 2004). Az aszkorbinsav normál körülmények között redukált formában van jelen a kloroplasztiszban, ahol kofaktora lehet a violaxantin-dezepoxidáznak, mely enzim fénystressz hatására képes csökkenteni a károsodás mértékét. Továbbá az aszkorbinsav közvetlenül képes redukálni a O_2^- -t, a $^1\text{O}_2$ -t, és regenerálni az α -tokoferolt és a karotinoidokat. A kloroplasztiszon kívül jelen van a citoszólban, a vakuólumban, a mitokondriumban és az extracelluláris mátrixban egyaránt, így elmondható, hogy az egyik legfontosabb antioxidáns molekula. A H_2O_2 -ot enzimatis úton képes eliminálni az aszkorbát-peroxidáz (APX) által katalizált folyamatban. A folyamat az aszkorbát-glutation ciklus része. Az enzim aszkorbinsavat felhasználva alakítja vízzé a H_2O_2 -ot, miközben dehidroaszkorbinsav (DHA) keletkezik. A DHA-t a dehidroaszkorbinsav-reduktáz regenerálja, melyhez a redukáló erőt a redukált glutation (GSH) biztosítja. A ciklusnak van még egy kulcsenzime: a glutation-reduktáz (GR),

amely az immáron oxidált glutationt (GSSH) alakítja vissza NADPH felhasználásával (Chin és mtsai. 2019, Foyer és Noctor 2011, Mach és Greenberg 2004). A folyamathoz az is hozzátartozik, hogy az aszkorbinsav monodehidro-aszkorbinsavon keresztül is átalakul dehidroaszkorbinsavvá, melyet majd a monodehidro-aszkorbinsav-reduktáz alakít vissza aszkorbinsavvá NADH közreműködésével (Gill és Tuteja 2010).



2. **ábra** Az aktív oxigénformák detoxifikálása (Mach és Greenberg 2004 nyomán). (SOD: szuperoxid-diszmutáz, CAT: kataláz, APX: aszkorbinsav-peroxidáz, DHAR: dehidro-aszkorbinsav-reduktáz, GR: glutation-reduktáz, ASC: aszkorbinsav, DHA: dehidroaszkorbinsav, GSSG: oxidált glutation, GSH: redukált glutation)

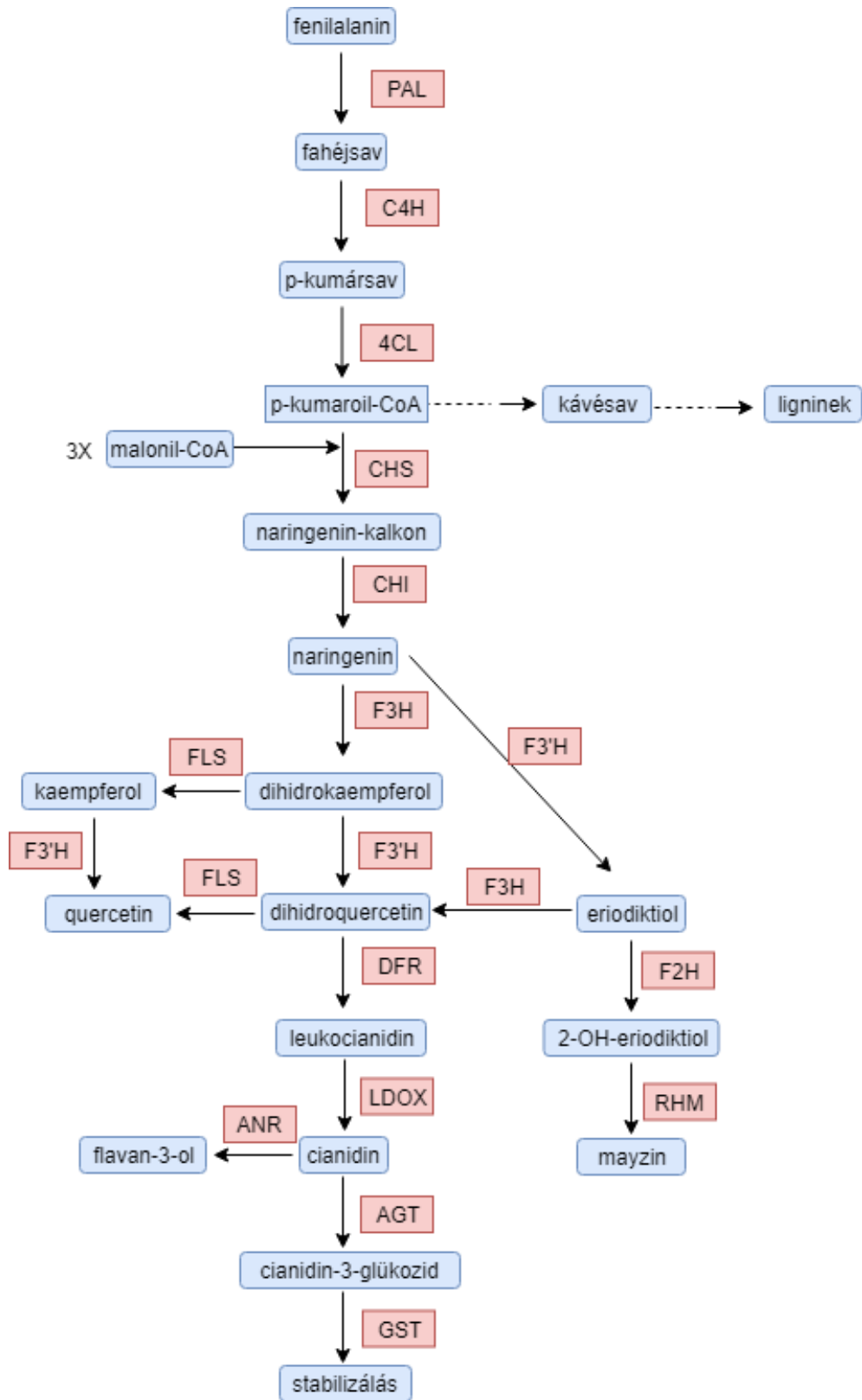
A H_2O_2 -ot a kataláz is képes hatástalanítani, végeredményként pedig víz és oxigén keletkezik (2. ábra). Az enzim a peroxiszómában lokalizált, így az elsősorban a kloroplasztiszban és citoszólban található aszkorbát-peroxidázzal kiegészítve eliminálják a reaktív oxigénformákat (Mach és Greenberg 2004). Az enzimátikus védekezőrendszer része még a szuperoxid-diszmutáz (SOD). A $O_2^{\cdot-}$ -t a SOD alakítja át H_2O_2 -dá és vízzé. Ahol lehetőség van $O_2^{\cdot-}$ képződésére, ott megtalálható a SOD is, így három különböző kompartmentben, a kloroplasztiszban, a mitokondriumban és a peroxiszómában is jelen van az enzim, ennek oka, hogy a töltéssel rendelkező $O_2^{\cdot-}$ nem képes átjutni a membránokon. Három SOD-izofórmát különítünk el az alapján, hogy milyen fém kofaktorral rendelkeznek: vas (Fe-SOD), mangán (Mn-SOD) és réz-cink (Cu-Zn-SOD). Az izoenzimek különböző partikulumban is találhatóak; a Fe-SOD a kloroplasztiszban; a Mn-SOD a mitokondriumban és a peroxiszómában, míg a Cu-Zn-SOD a kloroplasztiszban, a citoszólban és feltehetőleg az extracelluláris térben is jelen van (Gill és mtsai. 2015).

Alacsony hőmérséklet esetén a fotoszintézis folyamata sem működik kielégítően, gyakran fellépő jelenség a fénygátlás, melynek következményeként sérülhetnek az elektrontranszportlánc komponensei, különösen érzékeny a vízbontó komplex, illetve a PSII reakciócentrumának központi eleme, a D1 fehérje (Kato és mtsai. 2015, Szalai és mtsai. 2018). Az elektrontranszportlánc nem megfelelő működése esetén sérül a folyamathoz kapcsolt széndioxid-fixáció, majd a szénhidrátképzés (Allen és Ort 2001). Továbbá, ha a vízbontó komplex és az elektrontranszportlánc működése nem hatékony, a korábban leírt oxidatív stressz folyamán számos ROS képződhet a kloroplasztiszban (Vass 2012, Gururani és mtsai 2015). Ilyenkor a PSII reakciócentrumhoz köthető nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok csökkenthetik a károsodás mértékét, azáltal, hogy elvezetik a többlet energiát, amit a fotoszintetikus elektrontranszportlánc nem képes felhasználni, ezzel is csökkentve a reaktív oxigénformák képződésének lehetőségét. A nem-fotokémiai kioltó mechanizmusoknak több fajtája is ismert, ilyen például a fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás (D'Ambrosio és mtsai. 2008).

1.3 Stresszvédő metabolitok: a fenilpropanoid származékok

A fenilpropanoid útvonalon számtalan olyan másodlagos anyagcseretermék képződik, melyek szintézise fokozódik abiotikus és biotikus stresszorok megjelenése esetén, hiszen ezek a vegyületek (egyszerű fenolsavak, cinnamoidok, kumarinok, sztilbénok, flavonoidok, szalicilátok, lignánok, ligninek, melaninok, antociánok és kondenzált tanninok) rendkívül sokféle módon segítik a növényt a stresszválaszban, a környezethez való alkalmazkodásban (Naikoo és mtsai. 2019). Szerepük az olyan általános mechanizmusoktól, mint az UV-szűrés, vagy az antioxidáns védelem és részben ehhez kapcsolódva a fémionok komplexálása, olyan speciális feladatokig terjed, mint pl. célzott védekezés adott kórokozó ellen vagy az auxin anyagcseréjének szabályozása (Alkan és Yemenicioglu 2016, Demidchik 2017, Farrant és mtsai. 2017, Francini és mtsai. 2019, Jajoo és Allakhverdiev 2017, Jansen 2017). Alacsony hőmérséklet esetén fokozódik a ROS-ok felhalmozódása, destabilizálódnak a membránok és nő a fényérzékenység, így a gyökfagó, membránstabilizáló, fényszűrő és még sok egyéb módon védő hatású fenoloidok szintézise is jelentősen megnő (Christie és mtsai. 1994, Francini és mtsai. 2019, Sharma és mtsai. 2019, Wisniewski és mtsai. 2017). A fenoloidok szintézise szorosan kapcsolódik a szénhidrát-anyagcseréhez, eritróz-4-foszfát és foszfoenol-piroszőlősav kapcsolódásával keletkeznek, majd a sikimisavon keresztül aromás

aminosav (fenilalanin) képződik. Az útvonal következő lépése a fenilalanin deaminációja, melyet a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim katalizál. A PAL működésének az anyagcseretermékek szabályozásában is döntő szerepe van. A deamináció eredményeként transz-fahéjsav képződik, mely molekulából a fahéjsav-4-hidroziláz (C4H) alakítja ki a p-kumársavat (Shuab és mtsai. 2016). Az útvonal következő enzime, a 4-kumaroil-CoA-ligáz (4CL), amely az útvonal egyik kulcsmolekulájának, a p-kumaroil-CoA-nak a kialakulását katalizálja. Ebből a vegyületből számos anyagcseretermék képződhet, az egyik legfontosabb elágazási pont a bioszintetikus útvonalon. A p-kumaroil-CoA többek között a ligninszintézis kiinduló eleme, de a flavonoidok, majd antociánok felé is elágazhat az útvonal (Vogt 2010). A flavonoidok szintézise felé vezető útvonalon a kalkon-szintáz (CHS) az első kulcsenzim, amely katalizálja a naringenin-kalkon kialakulását azáltal, hogy a p-kumaroil-csoportot három malonilcsoportot kapcsol hozzá. A lépést követően egy újabb elágazási pont a bioszintézis útvonalon a naringenin keletkezése a kalkon-izomeráz (CHI) által. A későbbi lépések során az antociánok szintézisében a flavanon-3-hidroziláz (F3H) és az antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz (AGT) játszik szerepet (Saito és mtsai. 2013). A 3. ábra mutatja az általános fenilpropanoid útvonalat kukoricában, hangsúlyozva az antociánok felé vezető szintézist.



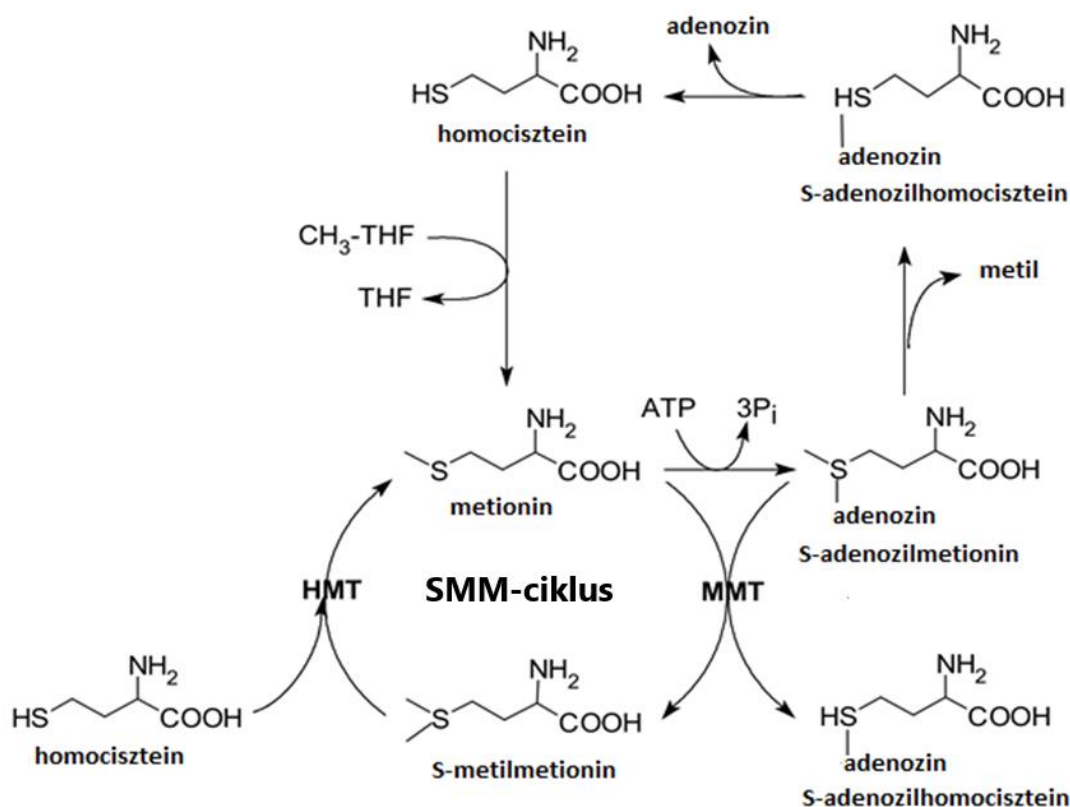
3. **ábra** A fenilpropanoid bioszintézis útvonala kukoricában (Saját készítésű ábra Yang és mtsai. 2017 nyomán). (PAL: fenilalanin-ammónia-liáz; C4H: fahéjsav-4-hidroxiláz; 4CL: 4-kumaroil-CoA-ligáz; CHS: kalkon-szintáz; CHI: kalkon-izomeráz; F3H: flavanon-3-hidroxiláz; FLS: flavonol-szintáz; F3'H: flavonoid-3'-hidroxiláz; DFR: dihidroflavonol-reduktáz; LDOX: leukoantocianidin-dioxigenáz; ANR: antocianidin-reduktáz; AGT: antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz; F2H: flavanon-2-hidroxiláz; RHM: ramnóz-szintáz)

Az antociánok és származékaik a szintézis után a citoszólból a vakuólumba szállítódnak és a folyamat során stabilizálódnak. E szállításban többféle transzporter is részt vehet, de az egyik legmarkánsabb és legtöbbet bizonyított szerepe a glutation-S-transzferáz enzimnek van (Kitamura és mtsai. 2004, Saito és mtsai. 2013). A kukoricában a GST szerepét már 20-30 évvel ezelőtt is tanulmányozták. Kutatások során három különböző GST izoformát különítettek el. A GST I állandó jelleggel expresszálódik a levelekben és a gyökerekben egyaránt, feladata közé tartozik a detoxifikáció, ami herbicidek megkötését, majd a vakuólumba szállítását foglalja magába. A GST II-nek szerepe hasonló, de magasabb a detoxifikáló hatása (Shah és mtsai. 1986). A GST III szintézise serkentődik például a nehézfémek megjelenésekor, így ezeknek a konjugálásában és eliminálásban lehet szerepe. A GST I-ről azt is kimutatták, hogy számos stresszor jelenlétében megnő a szintézise, úgymint oxidatív stressz, patogén támadás vagy dehidratáció megjelenésekor (Nianiou-Obeidat és mtsai. 2017), ezért munkám során ennek az enzimnek a relatív génexpresszióját is vizsgáltam a levelekben.

1.4 Az S-metilmethionin és a szalicilsav jelentősége

Munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a természetes eredetű S-metilmethionin-szalicilát (MMS) előkezelés csökkentheti-e a hidegstressz során kialakuló károsodások mértékét kukorica csíranövényekben, ezzel párhuzamosan segíti-e az alkalmazkodás kialakulását többek között a fenilpropanoid útvonal és az antioxidáns védekezőrendszer stimulálása révén? Kukoricában a vegyület hatásmechanizmusáról korábbi eredmény csak kutatócsoportunk munkájából született, azonban ez a vírusfertőzés körülményeit vizsgálta, alacsony hőmérséklet megjelenését nem (Ludmerszki és mtsai. 2017). Munkám és kutatócsoportunk orientációja korábbi kutatások eredményeire, illetve irodalmi adatokra épül, miszerint az S-metilmethioninnal (SMM) és a szalicilsavval (SA) való előkezelés sikeresen növelte a növények védekezőképességét különböző stresszorok fellépésekor. Ezen eredményekből kiindulva kombináltuk a két vegyületet 1:1 arányban, hogy a két kiindulási komponens pozitív tulajdonságait egy vegyületben használhassuk ki, így még hatékonyabb stresszválaszt kiváltva az előkezelt növényekben és egyúttal, hogy a kombinált vegyületben ellensúlyozzuk az SMM bomlékonyságát. Az MMS tágabb körű megismeréséhez mindenképpen ismernünk kell a kiindulási vegyületeket, az SMM-et és a SA-at, így a következőkben az alapkivonatokat szeretném röviden jellemezni.

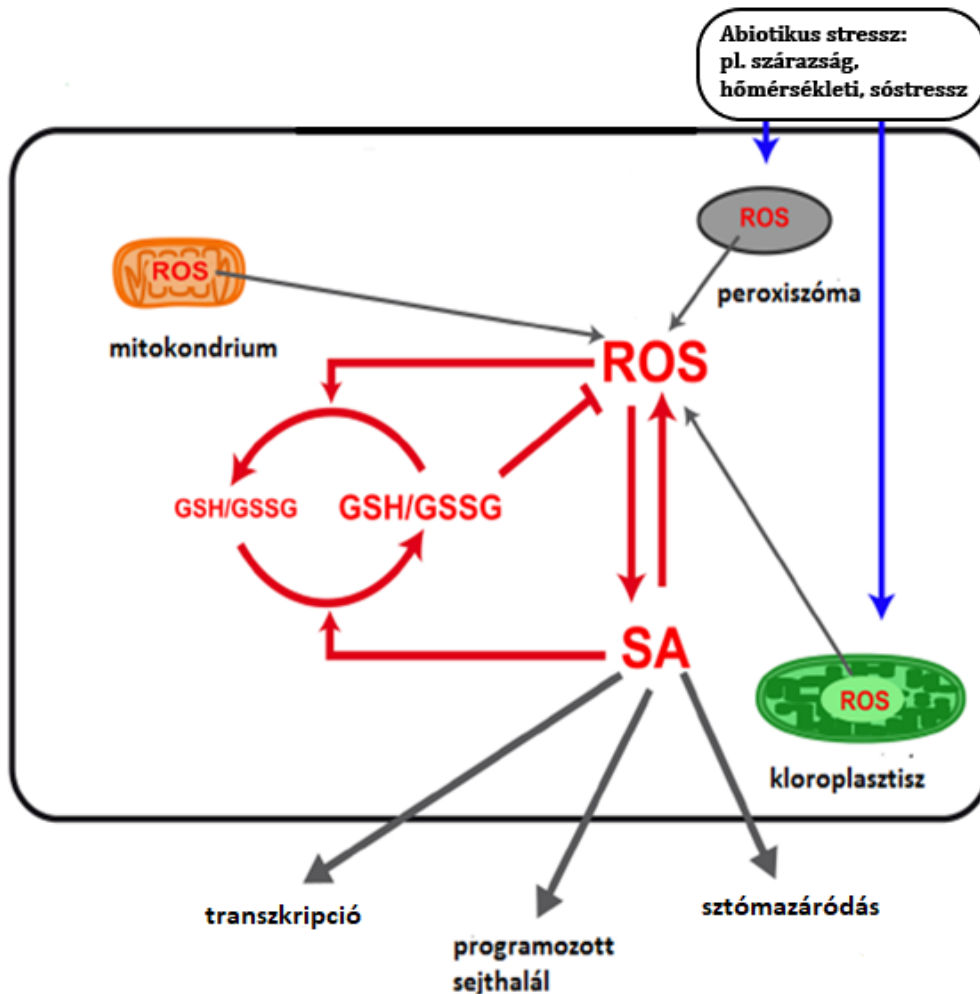
Az SMM egy kéntartalmú, nem eszenciális aminosav, amely széleskörben elterjedt a növényvilágban. Főként hidegtűrő fajokban található meg nagyobb mennyiségben, így nem okoz meglepetést, hogy káposztafélékben azonosították először (McRorie és mtsai., 1954). Ezenfelül kutatócsoportunknak is sikerült bizonyítani a stresszvédő szerepét alacsony hőmérséklet esetén (Rácz és mtsai. 2008, Páldi és mtsai. 2014). Pozitív hatása megmutatkozott a membránok védelmében is. Jól ismert folyamat, hogy hideg hatására sérülnek a membránok, változik a membránokon keresztüli transzport, megnő az ionáteresztő képességük, kevésbé lesz szabályozott a folyamat. Az SMM-előkezelés hatására csökkent a membránokban bekövetkező károsodás, a vegyület membránvédő hatását Rácz és munkatársai (2008) bizonyították. Az SMM-szintézisét metioninból az S-adenozilmetionin : metionin S-metiltranszferáz (MMT) katalizálja, metilcsoportdonorként az S-adenozilmetionin (AdoMet) szolgál (4. ábra). Az SMM képes visszaalakulni metioninná az S-metilmetionin : homocisztein S-metiltranszferáz (HMT) hatására, ezt nevezzük SMM-ciklusnak, mely által az SMM – kénraktárt képezve – szabályozza a metionin- és AdoMet-szintet (Bourgis és mtsai. 1999). Az SMM az AdoMet-szint révén befolyásolja a poliaminok (PA) termelődését is, hiszen a spermidin és spermin (két gyakori PA) szintézisében is az AdoMet az aminopropil-donor. Ugyanakkor az AdoMet az etilén szintézisének is előanyaga, így a PA-ok és az etilén termelésében verseny alakulhat ki az AdoMet felhasználásáért. A PA-ok szintéziséhez szükséges aminopropil-donor származhat közvetlenül az SMM-ből is. A folyamatot olyan kutatás során bizonyították, amiben specifikusan gátolták az AdoMet dekarboxilációját (Lásztity és mtsai. 1992), ezzel párhuzamosan az exogén SMM növelte a PA-szintet. Korábbi kutatások bizonyították, hogy az SMM-előkezelés csökkentette a biotikus (Ludmerszki és mtsai. 2011) és abiotikus (Páldi és mtsai. 2014, Rudnóy és mtsai. 2015) stresszorok károsító hatásait. Az előkezelést követően a védekező mechanizmusok gyorsabban és hatékonyabban aktiválódnak, így nő a stressztűrő képesség.



4. ábra Az *S*-metilmetionin-ciklus (Szegő és mtsai. 2007 nyomán). A reakció során *S*-metilmetioninból és homociszteinekből a HMT (*S*-metilmetionin : homocisztein *S*-metiltranszferáz) enzim 2 metionin molekulát képez. A metionin MMT (*S*-adenozilmetionin:metionin *S*-metiltranszferáz) segítségével *SMM*-mé alakul, míg az *AdoMet* (*S*-adenozilmetionin) *S*-adenozilhomociszteinné alakul. (THF: tetrahydrofolát; CH₃-THF: metilén-tetrahydrofolát)

Az MMS másik alapkomponense a szalicilsav, a növényekben hormonhatásáról is ismert molekula, amely részt vesz a növekedés, fejlődés és a környezethez való alkalmazkodás szabályozásában (Peleg és Blumwald 2011, Janda és mtsai. 2017). Biotikus stresszorok esetén szignálmolekula funkciója jól ismert, például patogéntámadást követően a szalicilsav-molekulák könnyedén tudnak mozogni sejtről sejtre, így indukálva a növények rendszerszintű szerzett rezisztenciáját (SAR). A szalicilsav szintézisének két fő útvonala is ismert. Szintetizálódhat a kloroplasztiszból korizimátból izokorizimáton keresztül, mely folyamatot az izokorizimát-szintáz és az izokorizimát-piruvát-liáz enzimek katalizálják. A másik lehetőség a fenilpropanoid útvonal kezdeti szakaszához kapcsolódik. Ebben az esetben a fahéjsavból orto-hidroxi-fahéjsav keletkezik, amely majd továbbalakul szalicilsavvá, a

fenilpropanoid útvonalon keresztül (Janda és mtsai. 2017). A szalicilsav alkalmazása sokrétű, korábbi kutatás során az is bizonyítást nyert, hogy az exogén módon adott szalicilsav indukálja az endogén szalicilsav-szintézist (Horváth és mtsai. 2007). Azonban a vegyület nagy mennyiségben gátló hatással is lehet a növény egyes anyagcsere-folyamataira. Ezzel szemben megfelelő koncentrációban a levélfelület, a levélszám, a friss és száraz tömeg növekedésén keresztül nő a fotoszintézis és a CO₂-megkötés hatékonysága és a transpirációs ráta (Hayat és mtsai. 2010). Chen és kollégái (2006) kimutatták, hogy a szalicilsav a fenilpropanoid útvonalon keletkező aromás vegyületek szintézisét is serkentette, melyek szintén fontos vegyületek a növényi alkalmazkodásban. Továbbá maga a szalicilsav-szintézis is köthető a fenilpropanoid útvonalhoz, ugyanis fenilalanin, transz-fahéjsav, majd benzoésav szintézisén keresztül is kialakulhat szalicilsav a növényekben (Shah 2003), ezáltal a fenilpropanoid útvonal serkentésén keresztül, még inkább kapcsolható az exogén adagolás pozitív hatása az endogén szalicilsav-szintézisre. Ezenfelül az antioxidáns enzimek (pl. glutation-reduktáz, gvajakol-peroxidáz) aktivitásának emelkedését is tapasztalták exogén szalicilsav-kezelés hatására éppen hidegstressz esetén (Horváth és mtsai. 2007). Más kutatások során is bizonyították antioxidáns védelmet serkentő hatását, azokban a növényekben, amelyekben szalicilsav halmozódott fel, nőtt a glutation-reduktáz aktivitása és ezáltal a redukáló erő. A szalicilsav mennyiségét a reaktív oxigénformák is növelték, mindemellett a szalicilsav is növelte a hidrogén-peroxid szintjét, amely szintén fontos szignalizációs molekula (5. ábra) (Herrera-Vasquez és mtsai. 2015).



5. **ábra** Kölcsönhatás a szalicilsav és a reaktív oxigénformák között (Herrera-Vasquez és mtsai. 2015 nyomán). (ROS: reaktív oxigénformák, SA: szalicilsav, GSH: glutation redukált formája, GSSG: glutation oxidált formája)

A kiindulási komponensek (SMM, SA) stresszkivédő hatása bizonyított, viszont az SMM erősen bomlékony molekula, ami megnehezíti használatát. Ezért hoztuk létre a két anyag 1:1 arányú vegyületét, amelyben az NMR-spektroszkópiai mérések alapján ionos kölcsönhatás van a pozitív töltésű SMM és a negatív töltésű SA között. Feltételezésünk szerint a vegyület abiotikus és biotikus stresszhatások esetén is növelheti a növény saját védekezőképességét és emellett az SMM számára is stabilabb formát jelent. Eddigi eredményeink, úgy tűnik, igazolják előzetes várakozásainkat.

2. Célkitűzések

Munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy az MMS-előkezelés milyen mértékben képes csökkenteni a kukoricákban bekövetkező károsodásokat hidegstressz esetén, továbbá hogyan fokozza a kukorica védekező mechanizmusait? Megvizsgáltam, hogy az MMS hordozza-e a két kiindulási vegyület (SMM, SA) stresszkivédő tulajdonságait, illetve hogy azokkal összehasonlítva, hogyan jellemezhető a vegyület pozitív hatása. Az SMM esetében az összehasonlítás alapjául kutatócsoportunk korábbi mérési eredményeire támaszkodtam, míg a szalicilsav esetében irodalmi adatokra.

- ❖ Tanulmányoztam a fotoszintetikus apparátusban bekövetkező változásokat, amelyből következtethetünk a növények fiziológiai állapotára. A mérés során a kettes fotokémiai rendszer (PSII) kvantumhatékonyságát és az ehhez tartozó nem-fotokémiai kioltások paramétereit vizsgáltam, illetve a klorofilltartalom változását, ezenfelül pedig a klorofill-bioszintézisben résztvevő egyes gének expressziós változását.
- ❖ Megvizsgáltam, hogy az SMM sokszor bizonyított membránvédő hatása jellemző-e az MMS-re is.
- ❖ Célom volt megvizsgálni a fenilpropanoid útvonalon képződő metabolitok mennyiségi változásait, illetve a szintézisben résztvevő enzimek génexpressziós változását, ugyanis ezek az anyagcseretermékek szerepet játszanak a hidegakklimáció kialakításában.
- ❖ Ezenfelül megmértem az antioxidáns enzimek aktivitását és génexpressziós módosulását, ugyanis másodlagos stresszként gyakori az oxidatív stressz, így az antioxidáns rendszer vizsgálatából következtetni lehet a növényekben bekövetkező károsodásra, ill. az MMS védőhatására.

3. Anyag és módszer

3.1 A növények nevelése és kezelése

A kísérleteket Mv350 hibrid szemeskukoricával (*Zea mays* L. cv Mv350) végeztem. A csíráztatás során a szemeket először 6%-os H₂O₂-ban fertőtlenítettem 30 percen keresztül, ezt követően szintén 30 percen keresztül desztillált vízzel mostam. Végezetül a szemeket egy órán keresztül ¼-es Hoagland tápoldatban duzzasztottam, majd tápoldattal átáztatott papírvattával és szűrőpapírral bélelt Petri csészében csíráztattam három napon keresztül sötétben, szobahőmérsékleten. A csírázást követően, a növényeket főzőpoharakba ültettem, a további növénynevelés hidropónikus körülmények között történt.

A nevelés körülményei: a növényeket 23°C állandó hőmérsékleten, 14 óra megvilágítási periódussal (200 μmol m⁻² s⁻¹) ~75% relatív páratartalom mellett, emelt vastartalmú ¼-es Hoagland tápoldaton neveltem, melynek pontos összetétele Hoagland és Arnon (1938) publikációjában található. A növények tápoldatát 2 naponta cseréltem. A csíranövényeket a csíráztatástól számított 10. napon kezeltem MMS-sel. A vegyületeket a kukoricák tápoldatához adtam 0,05 mM koncentrációban. A növények tápoldatát 24 óra elteltével visszacseréltem az eredeti tápoldatra, ezt követően a növényeket 24 óra időtartamú, 6 C°-os hidegstressznek tettem ki.

Alapvetően négy kezelési csoportot különböztettem meg:

- kontroll növények (K): a növényeket a fent leírt körülmények között neveltem
- MMS-kezelt növények (M): a növények 10 naposan 24 órás MMS-kezelést kaptak
- hidegkezelt növények (HK): a növények 11 naposan 24 órás hidegkezelést kaptak
- MMS-előkezelt és hidegkezelt növények (HM): a növények 10 naposan 24 órás MMS-előkezelést, majd 11 naposan 24 órás hidegkezelést kaptak

Az MMS-kezelést kapott, de a hidegstresszel nem találkozó növények mintavételezése ugyanakkor történt, mint a K, HK és HM csoporté, így a növények a mérések alkalmával egyidősek voltak.

Méréseim elején még kétféle időtartamú hidegstresszel kezeltem a növényeket, így megkülönböztettem 4 órás, illetve 24 órás hidegkezeléseket. A rövidebb időtartamú kezelést kapott növényekre és kontroll párjukra az alábbi néven hivatkozok a dolgozatban:

- M4: a növények 10 naposan 24 órás MMS-kezelést kaptak, majd mérésük a 4 órás hidegkezelést kapott növényekkel egyidőben történt

- HK4: a növények 11 naposan 4 órás hidegkezelést kaptak
- HM4: a növények 24 órás MMS-előkezelést, majd ezt követően 4 órás hidegkezelést kaptak

Azon mérések esetében, amikor a növényeket a rövidebb, 4 órás hidegstresszt követően is mértem, a 24 órás hidegstresszt kapott növényeket a megkülönböztetés végett M24, HK24 és HM24 nevekkkel jelöltem. A kontroll növények is minden esetben egyidősek voltak a hidegkezelt növényekkel, így ezekben az esetekben K4 és K24 csoport is elkülönül, mely csoportok között természetesen nincsen különbség, csupán annyi, hogy a K24 csoport növényeinek mérése 20 órával később történt.

3.2 Fluoreszcencia indukció mérése

A kettes fotokémiai rendszer (PSII) kvantumhatékonyságát és nem-fotokémiai kioltását mértem annak érdekében, hogy képet kapjak a növények általános fiziológiai állapotáról, a PSII fotoszintetikus aktivitásán, illetve a fotoszisztéma esetleges sérülésein keresztül. A mérés során PAM-101-102-103 klorofill fluorométert (Walz, Effeltrich, Németország) használtam Solti és munkatársai (2008) publikációjában leírtak alapján. A növényeket (2. levél) először 15 percig sötétadaptáltam, majd ezt követően lemértem az F_0 (minimális fluoreszcencia) és F_m (maximális fluoreszcencia) értékeket. Az F_0 értékét úgy kaptam meg, hogy a növényeket alacsony fényintenzitású vörös fényvel világítottam meg (650 nm) (modulációs frekvencia: 1,6 kHz; fényintenzitás: $<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), majd az F_m érték regisztrálásához szaturációs fényvel világítottam meg a növényeket, a két értékből kiszámolhatjuk az F_v/F_m értéket, ami a PSII maximális kvantumhatékonyságát adja meg. Ezt követően lemértem a PSII aktuális kvantumhatékonyságát ($\Delta F/F_m'$). Ehhez szükség van az F_m' értékre, ami a maximális fluoreszcencia fény adaptált értéke. Ehhez a növényeket folyamatos aktinikus fényvel (fényintenzitás: $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) világítottam meg, majd körülbelül 100 másodpercenként távoli vörös fényvel világítottam meg a levelet, amíg az F_m' értéke el nem ért egy állandó értéket, ebben az állapotban a reakciócentrumok zárt állapotban vannak. A maximális és aktuális kvantumhatékonyság számítása:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t)/F_m'$$

A nem-fotokémiai kioltások paramétereikhez a leveleket szintén aktinikus fényel világítottam meg (fényintenzitás: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de a modulációs frekvenciát 100 kHz-re átállítottam, az F_0' érték lemeréséhez lekapcsoltam az aktinikus fényt és ezt követően 3 másodperccel a növényeket távoli vörös fényel (730 nm) világítottam meg (Solti és mtsai. 2008). A paraméterek kiszámításában Hendrickson és munkatársai (2005) publikációjára támaszkodtam, amely alapján a PSII által abszorbeált fényenergiát négy összetevőre bonthatjuk fel:

$$1 = \Phi_{\text{PSII}} + \Phi_{\text{f,D}} + \Phi_{\text{NPQ}} + \Phi_{\text{NF}}$$

Φ_{PSII} : aktív PSII reakciócentrumok fotokémiai hatékonysága

Φ_{NPQ} : fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú szabályozott hődisszipáció (fluoreszcencia kioltás)

$\Phi_{\text{f,D}}$: fluoreszcencia és konstitutív hődisszipáció

Φ_{NF} : inaktiválódott PSII reakciócentrumok energiadisszipációja

A paraméterek az alábbi egyenletek alapján számolhatóak ki:

$$\Phi_{\text{PSII}} = ((1-F_t)/F_m') * ((F_t/F_m)/(F_v/F_m M))$$

$$\Phi_{\text{NPQ}} = ((F_t/F_m') - (F_t/F_m)) / ((F_v/F_m)/(F_v/F_m M))$$

$$\Phi_{\text{f,D}} = (F_t/F_m) / ((F_v/F_m)/(F_v/F_m M))$$

$$\Phi_{\text{NF}} = 1 - ((F_v/F_m)/(F_v/F_m M))$$

Az egyenletek megoldásához szükséges még az alábbi paraméterek feloldása: F_t : steady-state állapot a megvilágítást követően, $F_v/F_m M$: kezdeti energiaelnyelési hatékonyság a fénygátlás előtt (Solti és mtsai. 2014).

3.3 Pigmenttartalom meghatározása spektrofotométerrel

A klorofilltartalom meghatározáshoz a növények 2. levelét használtam, amelyből 1 cm átmérőjű korongokat (4 db) homogenizáltam 80%-os acetóban, majd centrifugálást (10 perc, 15000 g) követően a felülúszóból meghatároztam a minták klorofilltartalmát 663,6 és 646,6 nm-es hullámhosszon spektrofotométerrel (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA). A pigmenttartalmat (klorofill-a + klorofill-b) Porra és mtsai (1989) publikációja alapján az alábbi egyenletekkel számoltam:

$$\text{klorofill-a } (\mu\text{g/ml}) = (12,25 * E_{663,6}) - (2,55 * E_{646,6})$$

$$\text{klorofill-b } (\mu\text{g/ml}) = (20,31 * E_{646,6}) - (4,91 * E_{663,6})$$

A kapott értékeket korrigáltam a fényszórással (iránytangens használata a 730 és 800 nm-es mért elnyelés alapján), a hígítás mértékével, a bemért levélkorongok friss tömegével és az egységnyi levélfelülettel.

Az összes karotin- és xantofilltartalmat Lichtenthaler és Buschmann (2001) munkája alapján számoltam ki. A 2. levélből származó 1 cm átmérőjű levélkorongokat (4 db) 80%-os acetonban homogenizáltam, majd centrifugálás (10 perc, 15000 g) után 470 nm-es hullámhosszon detektáltam a pigmenttartalmat, a mennyiségét pedig az alábbi egyenlet alapján számoltam ki, mely belekalkulálja a klorofillmolekulák kék tartományban történő abszorpcióját:

$$\text{összes karotin- és xantofilltartalom } (\mu\text{g/ml}) = (1000 * E_{470} - 1.82 * C_{\text{klf-a}} - 85,02 * C_{\text{klf-b}}) / 198$$

Az egyenlethez tartozó klorofill-a és klorofill-b tartalmat a publikációban leírt egyenletek szerint határoztam meg:

$$\text{klorofill-a } (\mu\text{g/ml}) = (12,25 * E_{663,6}) - (2,79 * E_{646,6})$$

$$\text{klorofill-b } (\mu\text{g/ml}) = (21,50 * E_{646,6}) - (5,10 * E_{663,6})$$

A kapott értékeket szintén korrigáltam a hígítás mértékével és a bemért levélkorongok friss tömegével.

Az összes fenoloidtartalmat Folin–Ciocalteu reagens (FCR) hozzáadásával vizsgáltam Teklemariam és Blake (2004) publikációja alapján. A 0,5 g tömegű mintákat 10 ml metanol : víz : sósav 79 : 20 : 1 arányú keverékben homogenizáltam, majd 10 percig 15000g-n centrifugáltam, ezt követően a felülúszóhoz adtam 0,5 ml FCR-t, 3 perccel később 1 ml telített Na₂CO₃-ot, az elegyet 10 ml-re kiegészítettem a metanol : víz : sósav 79 : 20 : 1 arányú keverékével. Az összemérését követően 1 órát vártam, majd spektrofotométeren (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) 725 nm-en mértem a minták abszorbanciáját. Az eredményeket galluszsav ekvivalensben adtam meg, egy előzetes kalibrációs görbe (10⁻² M – 10⁻⁶ M) készítésével.

A növények antociántartalmának méréshez szintén a növények 2. leveléből vettem mintákat. A 0,5 g tömegű mintákat 5 ml metanolos extraktumban (metanol : víz : sósav 79 : 20 : 1 arányú keveréke) homogenizáltam. Centrifugálást követően (10 perc, 15000 g) a minták fényelnyelését spektrofotométeren (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA,

USA) 520 nm-en mértem, majd cianidin-3-glikozidra (C3GE) vonatkoztatva adtam meg az antociántartalmat a következő egyenlet alapján (Páldi és mtsai. 2014):

$$\text{antociántartalom (C3GE) (g/L)} = (A_{520} * \text{Molekuláris tömeg} * \text{hígítás mértéke}) / \text{molekuláris extinkciós koefficiens}$$

$$\text{C3GE Molekuláris tömeg} = 449,2 \text{ g/mol}$$

$$\text{hígítás mértéke} = 200\text{-os volt}$$

$$\text{extinkciós koefficiens: } 26\,900 \text{ L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

Mivel a cianidin-3-glikozid a legáltalánosabban előforduló antocián, ezért történt erre a pigmenttartalom vonatkoztatása (Lee és mtsai. 2005).

A hipokotil feletti 5 cm-es régióban szintén mértem az antociántartalmat, ugyanis az Mv350 fajtájú kukoricának szemmel láthatóan lilás árnyalatú ezen régiója. A pigmenttartalom kinyerése és mérése megegyezik a levelekben leírt módszertannal. A szárban mért antociántartalmat vonatkoztattam a bemért friss növényi tömegre.

3.4 Fenilpropanoid származékok vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC)

A növények flavonoid- és antociántartalmát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) is vizsgáltam levelekben és szárban egyaránt (Dionex Ultimate 3000 UHPLC rendszer (3000RS diódasoros detektor, TCC-3000RS oszloptermosztát, HPG-3400RS pumpa, SRD-3400 gáztalanító, WPS-3000TRS automata mintaadagoló)). A növényi fenoloid kivonatok minőségét befolyásolja az oldószer polaritása, az extrakciós idő és a hőmérséklet, illetve a növényekben található fenoloidok típusa, polimerizáltsága, ill. a különböző szacharidok kötődése. Ezekből kifolyólag nincsen univerzális procedúra a kivonatok elkészítésére, az egyik leghatékonyabb eljárás a fenoloidok metanolban való kioldása (Dai és Mumper, 2010). A mintákat liofilizáltam, majd 50 mg bemérési mennyiségeket 1 ml metanol felhasználásával extraháltam 50 °C hőmérsékleten 60 percig. Centrifugálást követően injektáltam a kivonatok a HPLC rendszerbe. A mozgó fázist 0,1% v/v hangyasav (A) és acetonitril (B) elegye adta (Wulf és Nagel, 1976). Az elválasztáshoz lineáris gradiens programot használtam: 0,0 perc, 20% B; 12,0 perc, 60% B 0,4 mL/min áramlási sebességgel

25 °C oszlophőmérsékleten. Injektált mennyiség: 2 µL. Az oszlop paraméterei: Kinetex C18 75 x 3,0 mm; 3,5 µm, (Phenomenex, USA). Az összetevők azonosításához tömegspektrometriás detektálást is használtunk a diódasoros detektor után kapcsolt Orbitrap Q Exactive Focus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) készülék alkalmazásával (ionizáció: ESI). Az összetevők mennyiségi meghatározásához külső standard kalibrációt használtunk (UV-detektálással). Ehhez rutin nevű flavonoidból készített, ismert koncentrációjú oldatokból injektáltunk a készülékbe, és az összetevők mennyiségét a rutin kalibráció alapján számítottam ki. A méréseket Boldizsár Imre (ELTE Növényiszervezettani Tanszék) segítségével végeztem.

3.5 Membránkárosodás-mérés

A mérésekhez a növények második leveléből vett 1 centiméter átmérőjű korongokat (10 db) használtam. A növényi mintákat a mérés előtt ioncserélt vízzel mostam, majd 25 ml ioncserélt vízben rotációs rázógépre (100 rpm) helyeztem. Az ionkiáramlás mérését konduktométerrel (Crison EC-Meter Basic 30+ (Crison Instruments, Spain)) végeztem, Rácz és munkatársai (2008) cikke alapján, ahol a mintákat 24 órára ioncserélt vízben rázógépre helyezték, majd ezután lemérték a kiáramlott ionok összességét. Előméréseink során azt tapasztaltam, hogy 4 óra elteltével nem nőtt tovább az ionefflux. Így a vizsgálat során a mintákból kiáramló ionok mennyiségét 1 óra, 2 óra, 3 óra és 4 óra leteltével mértem, amelyet követően lemértem az összes iontartalmat, és az eredményt ennek a százalékában adtam meg (Campos és mtsai. 2003).

3.6 Génexpresszió-változás mérése

A kísérletekhez szintén a növények 2. leveléből vettem mintát. Az RNS kinyeréséhez a Direct-zol RNA Miniprep Kitet használtam (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Kiviteleztünk egy microarray kísérletet (Agilent Platform) a Chromoscience Kft. (Gencsapáti, Magyarország) közreműködésével a 24 órás hidegkezelést követően vett minták mRNS-eiből kiindulva. Az eredmények funkcionális annotálásában martonvásári kollégánk, Kalapos Balázs (Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet) segédkezett a GenBank adatbázis *Zea mays* és *Arabidopsis thaliana* szekvenciák felhasználásával. A microarray során a következő csoportok párosításának génexpressziós mintázatának eredményei kerültek összehasonlításra $p < 0,05$ szignifikancia érték alapján: K-M; K-HK; K-HM; M-HK; M-HM; HK-HM. A vizsgálat eredményeit Venn-diagramon

(ami következő online programmal készült: Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) szemléltetem, továbbá az AgriGO 2.0 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) (azonosító: 388861644.1) verzió által készített ábrákon, melyeken a K-HM csoportok kerültek összehasonlításra (Tian és mtsai. 2017). A microarray vizsgálat eredményeinek validálását qRT-PCR technikával végeztük, a 4. táblázatban szereplő gének felhasználásával, Balassa György munkatársam közreműködésével. A qRT-PCR technika által mért relatív génexpresszió kiszámításához minden esetben 3 referenciagént normáltunk: *membrane protein PB1A10.07c gén (MEP)*, *leunig (LUG)* és *folilpoliglutamát-szintáz (FPGS)* (Manoli és mtsai. 2012). A mérésekhez szükséges cDNS-t 500 ng RNS-ből kiindulva RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) reverz transzkriptáz enzim felhasználásával írtam át az 1. számú táblázat szerint.

1. táblázat A cDNS szintézishez használt protokoll.

A reakció összetevői	Mennyiség (1 reakcióelegyre)
„Templát” RNS	500 ng
Oligo (dT) ₁₈ primer (0,5 µg/µl)	1 µl
Nukleázmentes víz	a bemért RNS függvénye, az eddigi 3 komponens maximális térfogata 12 µl
Centrifugálás után 65 C°-on 5 perc inkubulás, majd jégen hűtés.	
5X reakciópuffer	4 µl
RiboLock RNase inhibitor (20U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200U/µl)	1 µl
Centrifugálást követően a minták 60 percen keresztül 42 C°-on inkubálódnak, majd a reakció lezárásaként 70 C°-on 5 percig.	

A qRT-PCR technikával a vizsgált gének relatív expresszióváltozását mértem állandónak tekinthető expressziójú gének kifejeződéséhez viszonyítva. A módszer SYBR Green alapú (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), mely során a fluoreszcens festék hozzákötődik a DNS-szálhoz és a műszer (ABI StepOnePlus real-Time PCR) ezt a fluoreszcens jelet detektálja, melynek hozamából megtudhatjuk a DNS mennyiségét. Azonban ez a valóságban pontatlan, a DNS mennyiségi növekedése nem exponenciális, hanem a primerpárok hatékonyságának függvénye. Ebből kifolyólag az eredmények kiértékelése során a primerek reakcióhatékonyságát belekalkulálva számoltam a relatív génexpressziót Pfaffl módszerével (Pfaffl 2001). A reakcióhatékonyságot a LINREG szoftver segítségével számoltam (Ramakers és mtsai. 2003). A qRT-PCR reakció összemérése

és beállítási paraméterei a 2. és 3. táblázatban szerepelnek. A reakciók során felhasznált primerpárok, azok szekvenciái, azonosítói és hatékonyságaik a 4., 5. és 6. táblázatban láthatók.

2. táblázat A qRT-PCR reakcióba bemért reagensek mintájként.

A reakció összetevői	Mennyiség (1 reakcióelegyre)
SYBR Green fluoreszcens festék	10 µl
Primer (2x)	0,4 µl (2x)
Nukleázmentes víz	4,2 µl
25x hígított cDNS	5 µl

3. táblázat A qRT-PCR reakció hőmérsékleti beállításai.

A reakció paraméterei	
Kezdeti lépés	95 C° - 10 perc
Denaturációs lépés ^a	95 C° - 15 másodperc
Kapcsolódási lépés ^a	60 C° - 15 másodperc
Lánchosszabbítási lépés ^{a*}	72 C° - 30 másodperc
Olvadáspont-elemzés	95 C° - 15 másodperc 55 C° - 60 másodperc +0,3 C°-os emelkedés* 95 C° - 15 másodperc

^a 40 cikluson keresztül ismétlődött,* ezeknél a lépéseknél detektált a műszer.

4. táblázat A microarray elemzés validálásához qRT-PCR módszerrel vizsgált gének neve és azonosítója, a primerek szekvenciái (5' → 3'), az ampikon mérete (bp) és a reakció hatékonysága. Az első oszlopban karikával jelölt gének expresszióját Balassa György mérte. A géneket NCBI azonosítóval tüntettem fel, kivétel a csillaggal jelölt gének, amelyeket MaizeGDB azonosítóval adtam meg a táblázatban.

Gén	Bal/jobb oldali primer	(bp)	Azonosító	Hatékonyság
<i>MEP</i>	TTCCTCATGTTCTTCGTGCC/ CAGTTCATTCCATCCGTG	130	AY105120.1	1,906±0,007
<i>LUG</i>	TCCAGTGCTACAGGGAAGG/ GTTAGTCTTGAGCCACGC	178	GRMZM2G425377*	1,969±0,081
<i>FPGS</i>	ATCTCGTTGGGGATGTCTTG/ AGCACCGTTCAAATGTCTCC	132	GRMZM2G393334*	1,991±0,033
<i>PRPO</i>	CGCCTGATTGAGCCTTTCTG/ CAGTTTCTTCCTACCGCAA	99	NM_001112094.2	1,921±0,023
<i>ZXE</i>	GGTTCGTTTCCATCCTCCG/ CTGCTGCTTCCACTTCTTG	114	XM_008665022.1	2,005±0,039
<i>SAT</i>	AGAGATAGTCCATTGCCG/ CTATCCCCTCACGAAAACA	106	NP_001105083.2	1,966±0,087
<i>LOX</i>	CCCAACAGCATTTCCATCTG/ CCAATTACCACGCTTTCATTC	123	TC299191	1,798±0,0165
<i>IFH</i>	GCGACGAGAGCGAAAGTAAG/ GTTTCAGCAGCAGTGACATGG	169	NM_001319705.1	2,04±0,059
<i>AGT</i>	CGATTGAGGTGGAGAGGGAC/ CCTTGATGCTGCCTGATGTA	201	NM_001157137.1	1,934±0,014

<i>F3H</i>	CCGCACAAAAGCTAGGAAGCGC/ GTTTCGTTTCGTTTCATACAAAGAC	189	NM_001136803.2	2,04±0,029
<i>DREB1</i>	CCAGCGGTAGTTGTTGACCT/ TCCCGTTACATTCGTTTGCTT	105	NM_001111611.1	1,894±0,017
<i>ADC1</i> ^o	TTCGTCGGATTCTCTTCCTC/ CACAGGCATCTCGTCAAACA	158	GRMZM2G396553*	2,005±0,074
<i>ADC2</i> ^o	AGACGCTCCATAACGCATTC/ GACGTGCTTGTCTGGTTCA	100	GRMZM2G374302*	1,923±0,196
<i>ODC</i> ^o	ACSTCTACGGCTCGCTCAAC/ CATTCGCCGACGCTCATCTC	177	GRMZM2G140824*	1,918±0,171
<i>SPDS4C</i> ^o	ACTCACCTGCCACTTTGCTC/ ATGCCTGGATACCTCTCGAA	92	GRMZM2G060896*	2,081±0,073
<i>SPDS9C</i> ^o	CCATAGGGCTGCTTTTGTTC/TGCG GTTCTGACACTGATTC	113	GRMZM2G047867*	1,968±0,028
<i>SAMDC</i> ^o	GCTCAGAGAGTGATGCTCC/ TGATTAGGCTTGGCTGCTTC	170	GRMZM2G366392*	1,932±0,075
<i>SAMS</i> ^o	ATCGGCATAAGGTTGGGAGT/ CATCTTCTATGGAGCAGCAG	131	NM_001139395.2	1,949±0,106
<i>PAO</i> ^o	GACCTTGTTTACATGCCTGC/ CGAACGTGTAGGAGCCAAGT	182	XM_008652166.1	2,022±0,062

5. táblázat A qRT-PCR módszerrel vizsgált fenilpropanoid útvonalról származó gének és a Glutation-S-transzferáz neve és azonosítója, a primerek szekvenciái (5' → 3'), az ampikon mérete (bp) és a reakció hatékonysága.

Gén	Bal/jobb oldali primer	(bp)	Azonosító	Hatékonyság
<i>C4H</i>	GCGTAAGAAGGTGATGGCT/ AGGAGGTTGTCGTGGTTGAT	99	BT039467	1,986±0,1493
<i>CHS</i>	GCCGACTACCCGGACTACT/ CTTGCGGATCATCGACTTGT	102	NM_001148774	1,99±0,0498
<i>GST</i>	GACCATCAACTTCGCCACC/ ATCTACAAGTCACCATCCTGC	96	M16901	1,87±0,023

3.7 Az antioxidáns rendszer vizsgálata

Az aszkorbát-peroxidáz (APX) és a glutation-reduktáz (GR) gének expressziós változását szintén megvizsgáltam qRT-PCR technikával levélben és gyökérben is, a korábban leírt metodika alapján. A gének paraméterei a 6. számú táblázatban láthatóak.

6. táblázat A qRT-PCR módszerrel vizsgált antioxidáns védekezőrendszer génjeinek neve és azonosítója, a primerek szekvenciái (5' → 3'), az ampikon mérete (bp) és a reakció hatékonysága.

Gén	Bal/jobb oldali primer	(bp)	Azonosító	Hatékonyság
<i>APX</i>	CGCCCTCTTGTGGAGAAATA/GAC CATTTAAGCATCAGCATACC	107	XM_008662036.3	1,994±0,0942
<i>GR</i>	GGAACCTACCAAACCAGATTA/GG CAACGAAGACATCAACATC	124	AJ006055	1,992±0,0367

A primerek tervezésében Liu és mtsai. (2012a) cikkére támaszkodtunk, az APX esetében az adott gén a 9. kromoszómán található, ez az APX1.2 izoforma, a GR esetében az 1. kromoszómán található, mely a GR1 izoforma. Az említett két enzim aktivitását fotometriásan (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) levélben és gyökérben is megvizsgáltam Szalai Gabriella Akadémiai Doktori Értekezése (2009) alapján. A levelek és a gyökerek esetében is 0,5 g friss növényi tömegből indultam ki, melyeket folyékony nitrogénben eldörzsöltem. A kinyerő puffer összetétele a következő: 0,5 mM TRIS pH 7,4; 3 mM MgCl₂; 1 mM EDTA. A pufferből 2,5 ml-t mértem mintánként az eldörzsölt növényekhez, majd 15.000 g-n 20 percig centrifugáltam.

A mérési oldat az APX esetében: desztillált víz; 1 M TRIS puffer pH 7,8; 0,05 M aszkorbinsav; 0,1 mM EDTA; 0,1 M H₂O₂; és a minta (50 µl), melynek hozzáadása a korábbi összetevőkhöz indítja el a reakciót. A reakciót 290 nm-en detektáltam, a reakcióelegy térfogata 750 µl.

A mérési oldat a GR esetében: 0,5 M Na-foszfát puffer pH 7,5; 2 mM 5,5'-Ditiobis (2-nitro-benzoészav); 1 mM dietiléntriámin-pentaecetsav; 8,4 mM NADPH; 50 mM oxidált glutation; és a minta (100 µl), melynek bemérése elindítja a reakciót. A reakcióelegy végtérfogata 1 ml, a mérést 412 nm-en végeztem.

Az eredményt mindkét enzim esetében a minták fehérjetartalmára normáltam ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fehérje).

A szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzimaktivitását natív poliakrilamid gélen vizsgáltam. 0,1 g friss növényi anyagot homogenizáltam kinyerő pufferben (50 mM Na-K-foszfát puffer pH 7,8; 0,1 mM EDTA, 2% m/V polivinil-pirrolidin), majd az elegyet centrifugáltam (15.000g; 10 perc) (Janknecht és mtsai. 2007). A poliakrilamid gél három részből állt: 5 %-os tömörítő gél; 10 %-os és 18 %-os szeparáló gél. Mintánként 40 µl-t mértem be, melyeket előzetesen brómfenolkékkel színeztem. A mintákat a gélen való elválasztást követően (a feszültség és az áramerősség beállításai: 300 V, 4 mA, majd kb. fél óra elteltével 80 mA) negatív festési eljárással tettem láthatóvá Beauchamp és Fridovich (1971) által kidolgozott módszer módosításával (50 mM Na-K-foszfát puffer pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 13 mM metionin; 60 µM riboflavin; 2,25 mM nitroblue-tetrazólium-klorid) 30 perces sötét inkubáció után 15 perces megvilágítással (Solti és mtsai. 2016). Az egyes izoformákat gátlószerek alkalmazásával azonosítottam. A Cu-Zn-SOD működését 10 mM H₂O₂-dal gátoltam, a Mn-SOD aktivitását pedig 300 mM aszkorbát alkalmazásával akadályoztam. A Fe-SOD aktivitását szintén gátolja a H₂O₂, viszont az aszkorbát együttes adagolásával az enzim ismét működőképesé válik. Az irodalomban az izoformák elkülönítésére H₂O₂-ot és kálium-cianidot (KCN) alkalmaznak

(Bernardi és mtsai. 2004), azonban a KCN mérgező hatását figyelembe véve nem alkalmaztam. A megfestett géleket Epson Perfection V750 PRO gél szkennelrel digitalizáltuk Solti Ádám (ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék) segítségével, majd az eredményeket Phoretix 4.01 szoftverrel (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK) értékeltük ki. Az eredményeket a minták fehérjetartalmára normáltam.

Az enzimaktivitás-mérések során a mintákban lévő fehérjemennyiséget Bradford (1976) módszere szerint állapítottam meg.

3.8 Statisztika

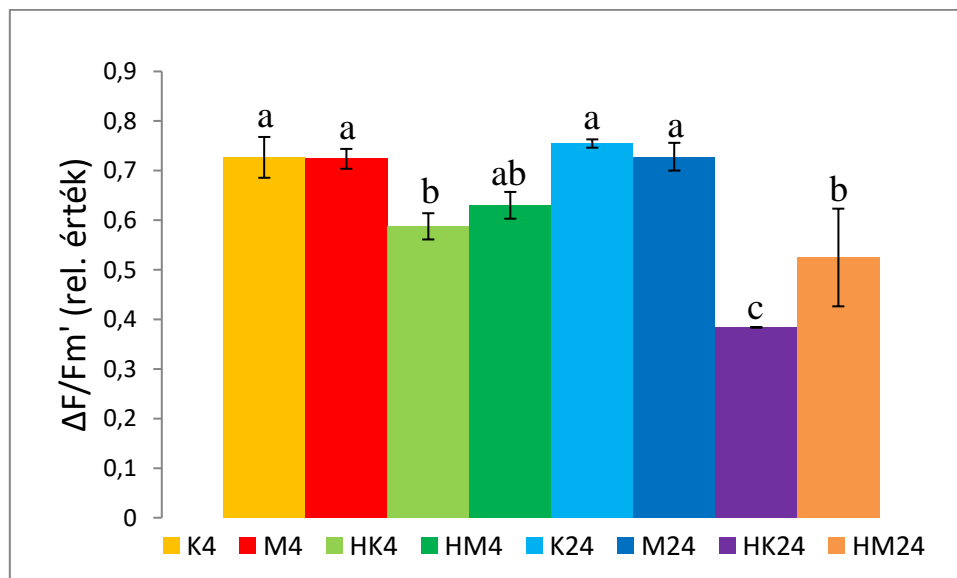
Az adatok feldolgozását, kiértékelését a Microsoft Office Excel 2016-os programmal végeztem. A vizsgálatok eredményei 3 biológiai ismétlésből származnak, melyek a fotoszintézis mérések esetében 6 technikai ismétlést tartalmaznak, minden más vizsgálat esetében pedig 3 és 5 közötti technikai ismétlés eredményeire épülnek. A kezelések hatására bekövetkező változások és különbségek meghatározására a Tukey tesztet (GraphPad InStat statisztikai szofver) használtam, ahol 5 %-os szignifikanciaszint mellett határoztam meg a különbségeket. A microarray vizsgálat három technikai ismétléssel készült, melynek kiértékelése során a kezelési csoportok elemzéseit szintén 5 %-os szignifikancia szinten ANOVA teszt felhasználásával történtek.

4. Eredmények

4.1 A fotoszintézis folyamatához köthető változások

A fiziológiai folyamatok működéseiből következtethetünk a növények állapotára, így a fotoszintézis, és azon belül is a fotoszintetikus elektrontranszportláncához kapcsolt folyamatok eredményei képet adhatnak a hidegstressz okozta károsodás mértékéről. Munkám során igyekeztem feltérképezni a vizsgált növények fiziológiai állapotát, így a fotoszintézis működését és a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét, valamint a klorofilok szintézisében szerepet játszó gének expressziós szintjét is vizsgáltam.

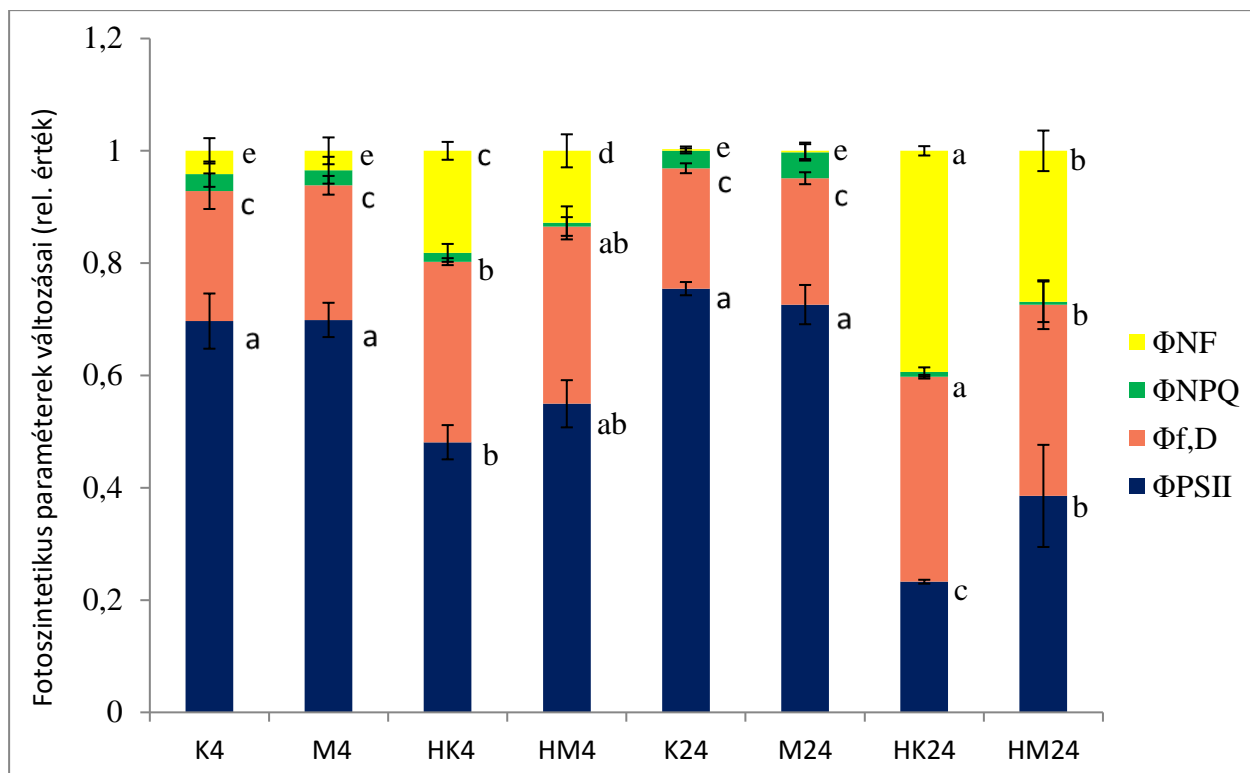
A fotoszintetikus aktivitásnak jó indikátora a PSII aktuális kvantumhatékonysága. A 6. ábra jól szemlélteti, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva az MMS-kezelés nem okoz változást (K4: $0,727 \pm 0,411$; K24: $0,755 \pm 0,008$) (M4: $0,724 \pm 0,02$; M24: $0,728 \pm 0,028$), míg a hidegstressz hatására jelentősen csökkent a kvantumhatékonyság (HK4: $0,588 \pm 0,027$; HK24: $0,384 \pm 0,004$). Az MMS-előkezelést követően a 4 órás hidegstressz után magasabb értékeket kaptam (HM4: $0,63 \pm 0,027$), bár ez még nem különbözött szignifikánsan a csak hidegkezelt minták értékeitől, viszont a 24 órás hidegstressz esetében az MMS-előkezelés jelentősen javította a $\Delta F/F_m'$ értéket (HM24: $0,525 \pm 0,098$). Ez egyértelműen mutatja, hogy az előkezelés a PSII kisebb károsodását, hatékonyabb működését biztosította alacsony hőmérsékleti stressz fennállása esetén.



6. ábra A PSII aktuális kvantumhatékonysága (K4: kontroll; M4: MMS-kezelés; HK4: 4 órás hidegkezelés; HM4: MMS-előkezelés, majd 4 órás hidegstressz; K24: kontroll; M24: MMS-kezelés; HK24: 24 órás hidegkezelés; HM24: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

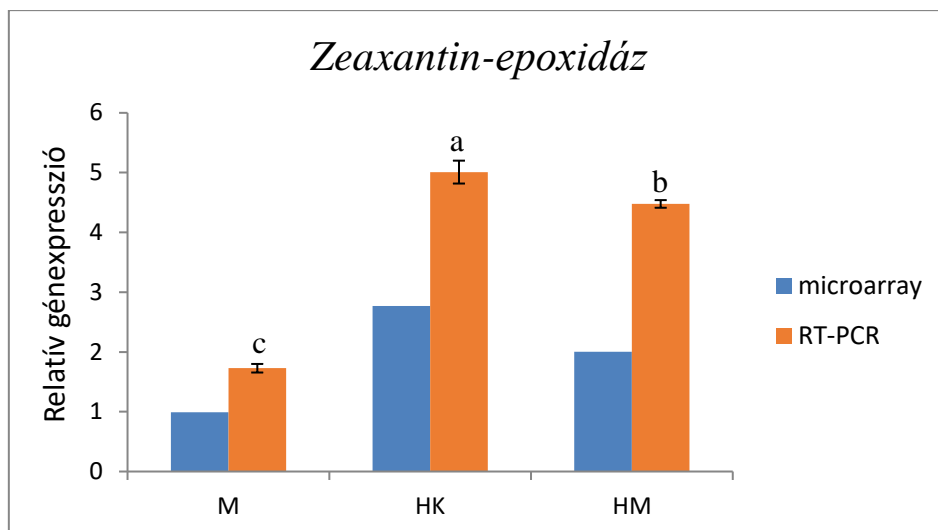
A kettős fotokémiai rendszerhez tartozó nem-fotokémiai kioltási paraméterek szintén információval szolgálnak az elektrontranszportlánc működéséről. A 7. ábra ad összefoglaló képet a PSII reakciócentrumok (RC) hatékonyságáról és a stressz hatására indukálódó kioltási mechanizmusok különbségeiről. Hendrickson és mtsai. (2005) módszere alapján az aktív PSII RC-ok hatékonysága (Φ_{PSII}), a fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú szabályozott hődisszipáció (Φ_{NPQ}), a fluoreszcencia és konstitutív hődisszipáció ($\Phi_{f,D}$) és az inaktiválódott PSII RC-ok energiadisszipáció (Φ_{NF}) összege egyenlő 1-gyel. Így látható, ahogy csökken a reakciócentrumok kvantumhatékonysága, úgy nőnek az egyes kioltási paraméterek értékei. A hidegkezeléseket követően szignifikáns csökkenést tapasztaltam a Φ_{PSII} értékekben a kontroll növények értékeihez képest (K4: $0,638 \pm 0,045$; K24: $0,691 \pm 0,01$) (HK4: $0,44 \pm 0,027$; HM4: $0,503 \pm 0,039$; HK24: $0,213 \pm 0,032$; HM24: $0,353 \pm 0,083$), ezzel szemben az MMS-kezelés nem okozott változást (M4: $0,64 \pm 0,027$; M24: $0,655 \pm 0,032$). Szintén jelentősen változtak hidegstressz hatására a $\Phi_{f,D}$ értékek (K: $0,212 \pm 0,03$; HK4: $0,294 \pm 0,006$; HM4: $0,289 \pm 0,015$; K24: $0,196 \pm 0,008$; HK24: $0,334 \pm 0,003$; HM24: $0,311 \pm 0,04$) és a Φ_{NF} értékek (K4: $0,122 \pm 0,02$; HK4: $0,25 \pm 0,015$; HM4: $0,201 \pm 0,027$; K24: $0,08 \pm 0,004$; HK24: $0,445 \pm 0,008$; HM24: $0,33 \pm 0,034$). Az MMS-kezelésnek önmagában itt sem volt jelentősége a $\Phi_{f,D}$ (M4: $0,22 \pm 0,015$; M24: $0,206 \pm 0,009$) és a Φ_{NF} paraméterekre (M4: $0,116 \pm 0,022$; M24: $0,086 \pm 0,013$). Ezzel szemben a Φ_{NPQ} paraméter esetében egyáltalán nem tapasztaltam változást, ezek az értékek minden kezelési csoportban alacsonyok voltak (K4: $0,028 \pm 0,015$; M4: $0,024 \pm 0,013$; HK4: $0,014 \pm 0,016$; HM4: $0,006 \pm 0,003$; K24: $0,028 \pm 0,001$; M24: $0,042 \pm 0,024$; HK24: $0,007 \pm 0,001$; HM24: $0,004 \pm 0,001$).

Összességében, ahogyan korábban a PSII aktuális kvantumhatékonyságának esetében, így itt sem okozott említésre méltó változást a hidegstressz nélküli MMS-kezelés (M4; M24) sem a RC-ok kvantumhatékonyságában, sem a nem-fotokémiai kioltások értékeinél. Azonban a hidegkezelt növényeknél ismét megmutatkozik az MMS-előkezelés védőhatása, miszerint magasabb volt az aktív PSII RC-ok hatékonysága, ezáltal a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése. Ezzel összhangban a PSII védelmére szolgáló nem-fotokémiai kioltási paraméterek esetében alacsonyabb értékeket mértem, ami szintén alátámasztja, hogy az elnyelt fényenergia a fotoszintézis folyamatára fordítódik.



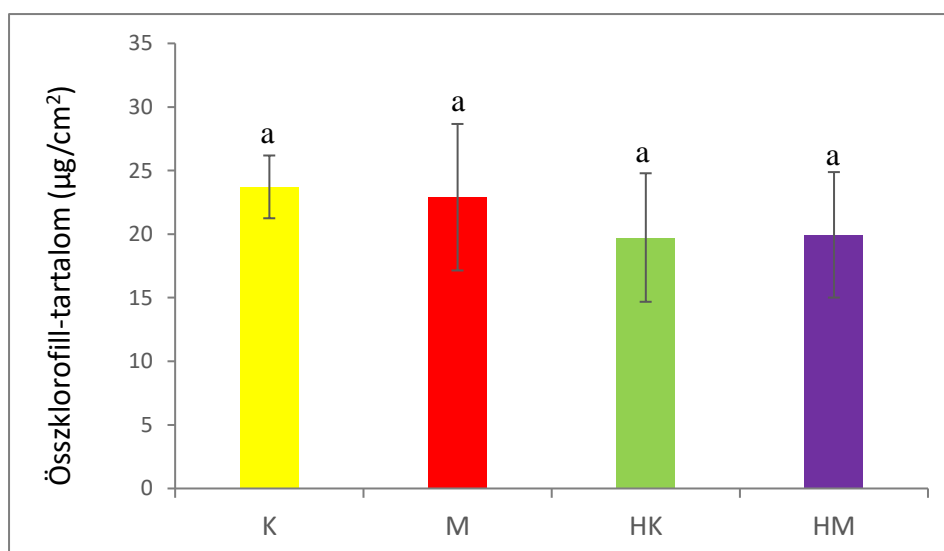
7. ábra A fotoszintetikus paraméterek értékei (Φ_{PSII} : aktív PSII reakciócentrumok hatékonysága; Φ_{NPQ} : fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás; $\Phi_{f,D}$: fluoreszcencia és konstitutív hődisszipáció; Φ_{NF} : inaktiválódott PSII RC-ok energiadisszipációja) (K4: kontroll; M4: MMS-kezelés; HK4: 4 órás hidegkezelés; HM4: MMS-előkezelés, majd 4 órás hidegstressz; K24: kontroll; M24: MMS-kezelés; HK24: 24 órás hidegkezelés; HM24: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett. A Φ_{NPQ} paraméterben a minták között nincsenek szignifikáns különbségek.

A zeaxantin-epoxidáz kapcsolódik a PSII RC-hoz tartozó fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás paraméteréhez. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc nem megfelelő működése következtében a tilakoid lumen pH-ja csökken, ami előidézi a violaxantin zeaxantinná való átalakulását. A zeaxantin gyökkioltó szereppel rendelkezik, így részt vesz a többlet abszorbeált fényenergia elvezetésében, a zeaxantin-epoxidáz pedig katalizálja a violaxantinná való visszaalakulást. Az enzim génjének expressziója emelkedett a kontroll növények értékeihez (=1) képest. Már az MMS-kezelést követően ($1,728 \pm 0,071$) is magasabb génexpressziós értékeket mértem. A hideg- és kombinált kezelések hatására még magasabb volt a relatív génexpresszió (HK: $5 \pm 0,19$; HM: $4,48 \pm 0,064$). A microarray adatok alapján is hasonló mintázat rajzolódik ki a zeaxantin-epoxidáz gén expressziójára (8. ábra).



8. ábra A zeaxantin-epoxidáz relatív génexpressziós változása (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz, a kontroll értéke=1). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A hidegstressz hatására csökken a fotoszintetikus aktivitás, ebből kiindulva szerettem volna megvizsgálni, hogy ez a jelenség együtt jár-e a klorofilltartalom csökkenésével. Az összes klorofilltartalmat és külön a klorofill-a és klorofill-b mennyiségét is megvizsgáltam, az eredményeket $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ értékben fejeztem ki. Az összklorofill-tartalomban enyhe csökkenést mértem a kezelések hatására, viszont jelentős változást egyik esetben sem tapasztaltam. (K: $23,717 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 2,468$; M: $22,905 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 5,76$; HK: $19,734 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 5,053$; HM: $19,947 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 4,933$) (9. ábra).



9. ábra Az összklorofill-tartalom változásai (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

Külön-külön vizsgálva a klorofill-a- és klorofill-b-tartalmat, szintén nem tapasztaltam szignifikáns változásokat a kezelési csoportok között.

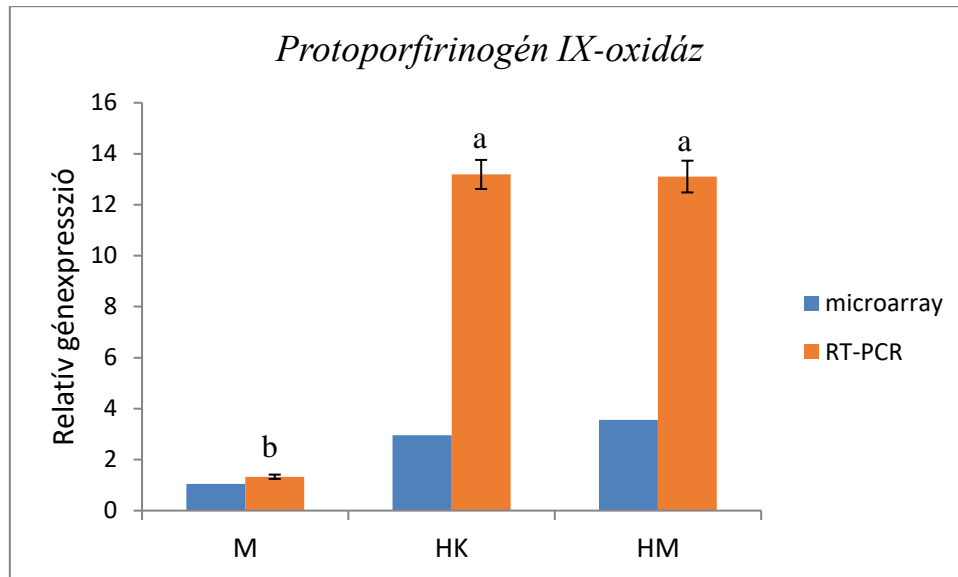
A microarray vizsgálat eredményei alapján a klorofill-bioszintézis útvonaláról 4 enzim génjénél is jelentős expressziós változást találtam (7. táblázat). A vizsgálat során az annotált gének azonosítója és a 60 bázispár méretű hibridizációs próbák szekvenciái mellékletként találhatóak a dolgozat végén (M4. táblázat). Alapvetően elmondható, a hidegkezelés stimulálta a bioszintézis útvonalán lévő enzimek génjeinek expressziós szintjét, ezzel szemben a csak MMS-kezelt növények hasonló génexpressziós szintet mutatnak, mint a kontroll növények értékei (=1). A *porfobilinogén-deamináz* az első olyan gén az útvonalról, amelynek expressziójában jelentős változást detektáltam. Az enzim a hidroxibilán kialakulását katalizálja porfobilinogénből, génexpressziója pedig a HK csoportban közel kétszeres növekedést mutatott, a HM csoportban pedig négyszeres szintre emelkedett. A következő enzim az uroporfirinogén III-dekarboxiláz, aminek génexpressziós változása a HM csoportban másfélszeres emelkedést mutatott még a hidegkezelt csoporthoz képest is, az enzim a koproporfirinogén III vegyület kialakulását katalizálja. A *protoporfirinogén IX-oxidáz* esetében a HM csoportnál szintén másfélszeres volt a génexpressziós emelkedés a HK csoporthoz viszonyítva, az enzim a protoporfirin IX kialakulását idézi elő. Míg az előző három enzim a porfirinszármazékok bioszintézisének közös részéhez tartozik, a divinil-klorofillid-reduktáz már a klorofilokra specializált alútvonalon működik. A gén expressziója a HK és a HM csoport esetében is kétszeres növekedést mutat a kontroll és MMS-kezelt csoporthoz képest.

7. táblázat A klorofill-bioszintézis útvonalán található enzimek génexpressziós változásai a microarray vizsgálat alapján. (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd és 24 órás hidegstressz, a kontroll értéke=1)

Gén	M	HK	HM
<i>Porfobilinogén-deamináz</i>	1,331	1,933	3,850
<i>Uroporfirinogén III-dekarboxiláz</i>	0,988	4,029	6,742
<i>Protoporfirinogén IX-oxidáz</i>	1,093	2,706	4,004
<i>Divinil-klorofillid-reduktáz</i>	0,910	2,225	2,072

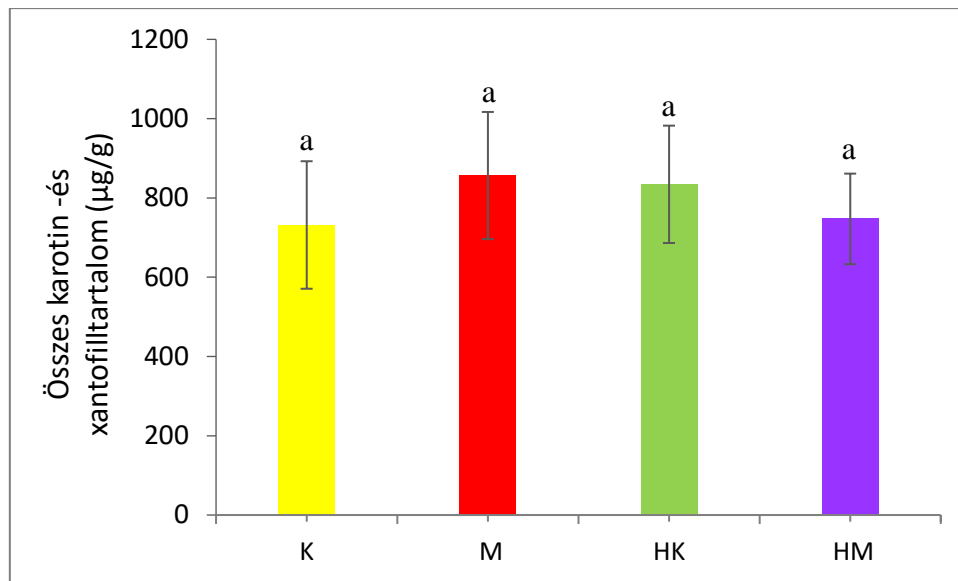
A protoporfirinogén IX-oxidáz enzim génjét qRT-PCR technikával is megvizsgáltam (10. ábra), aminek eredményei alapján elmondható, hogy a mintázat hasonló volt a microarray adatokhoz viszonyítva, miszerint az M csoport értékei ($1,327 \pm 0,085$) kismértékben növekedtek a kontrollhoz képest, amíg a hidegkezelés esetében még magasabb a *protoporfirinogén IX-oxidáz* gén expressziója, ami megjelenik a csak hidegkezelt mintákban (HK: $13,189 \pm 0,569$) és

az MMS-előkezelt növényeknél egyaránt (HM: 13,105±0,623). Ezenfelül, ahogy a microarray mérés adataiban, úgy a qRT-PCR technikával kivitelezett mérés alapján is közel hasonló a géneexpressziós változás a HK és HM csoport között.



10. ábra A protoporfirinogén IX-oxidáz relatív géneexpressziós változása (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz, a kontroll értéke=1). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

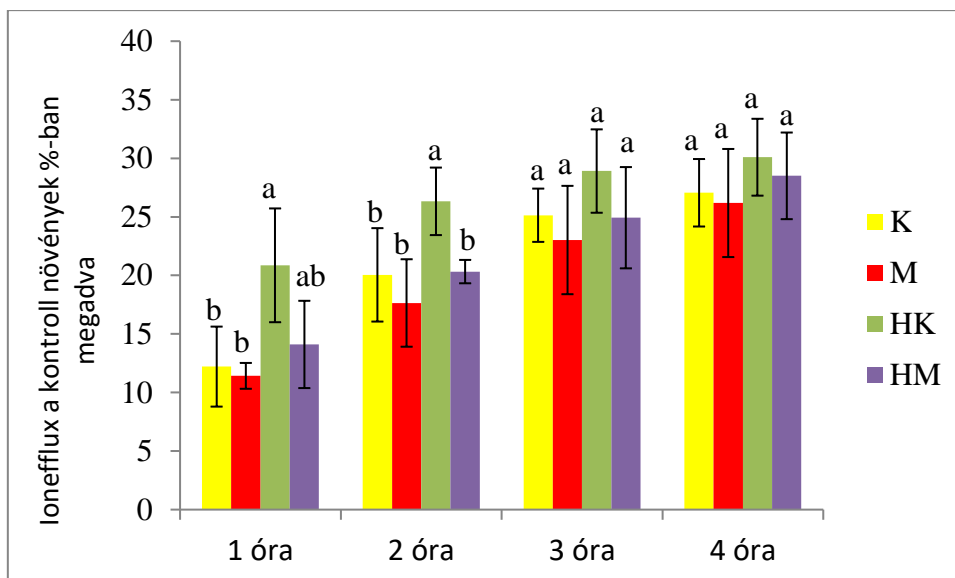
Munkám során megvizsgáltam az összes karotin- és xantofilltartalom mennyiségét fotométerrel. A vizsgálatban az M és a HK csoportban találtam változásokat, mindkét kezelési csoportban emelkedett a karotinoidok mennyisége (M: 856,5 µg/cm²±160,395; HK: 834,334 µg/cm²±148,023). A kontroll és a HM csoport közel azonos karotin- és xantofilltartalmat mutat (K: 731,736 µg/cm²±160,836; HM: 747,136 µg/cm²±114,25). A változások kismértékűek, ahogy korábban a klorofilltartalom esetében sem, szignifikáns különbségek ebben az esetben sem adódtak a kezelési csoportok között (11. ábra).



11. ábra Összes karotin- és xantofilltartalom változásai (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

4.2 Membránpermeabilitás-változás

Közismert, hogy az alacsony hőmérséklet hatására nő a membránok rigiditása, és ezzel együtt az ionok kiáramlása. Ezáltal az ionefflux szintén jó indikátor lehet a növények fiziológiai állapotának felméréséhez, melynek eredményei a 12. ábrán láthatóak, az összes ion kiáramlásának százalékában megadva 1, 2, 3 és 4 óra elteltével. Egy óra letelte után csak a hidegkezelt mintában (HK: $18,239 \pm 4,571$) láthatunk szignifikáns növekedést a kontroll csoporthoz (K: $13,264 \pm 2,983$) képest, amíg az M ($12,864 \pm 2,137$) és HM ($14,665 \pm 4,714$) csoportoknál hasonló az ionkiáramlás értéke, mint a kontrollnál. A 2. órát követően szintén jelentős a kiáramlás mértéke a HK csoportban ($26,478 \pm 2,06$), amíg a másik három csoport között nincs különbség (K: $22,375 \pm 1,3$; M: $19,732 \pm 3,84$; HM: $25,254 \pm 1,99$). A mérés harmadik és negyedik órájában – ahogy a hőmérséklet normalizálódásával megkezdődik a membránok helyreállása – már nincsenek szignifikáns különbségek a kezelési csoportok adatai között.

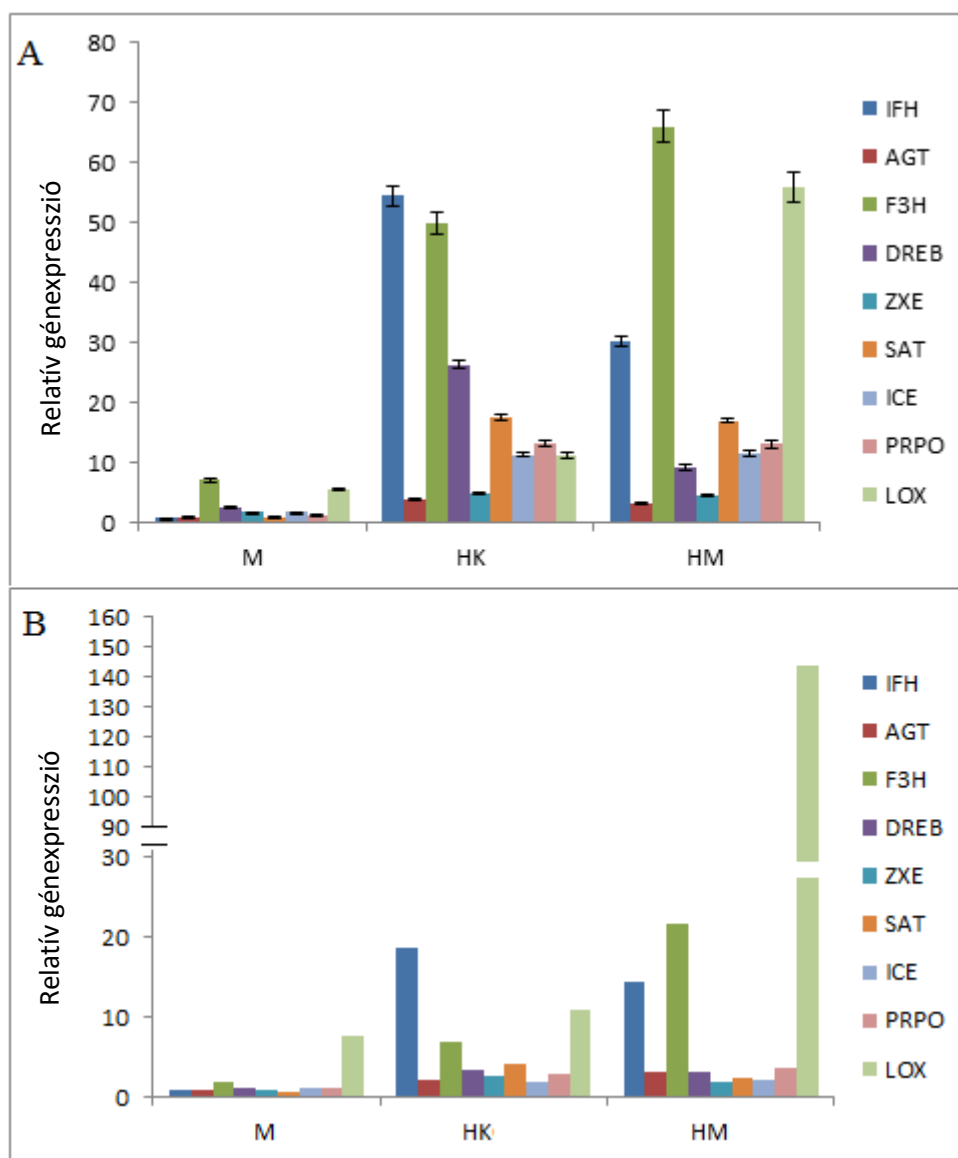


12. ábra Membránpermeabilitás-változásai 1-4 óráig detektálva (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

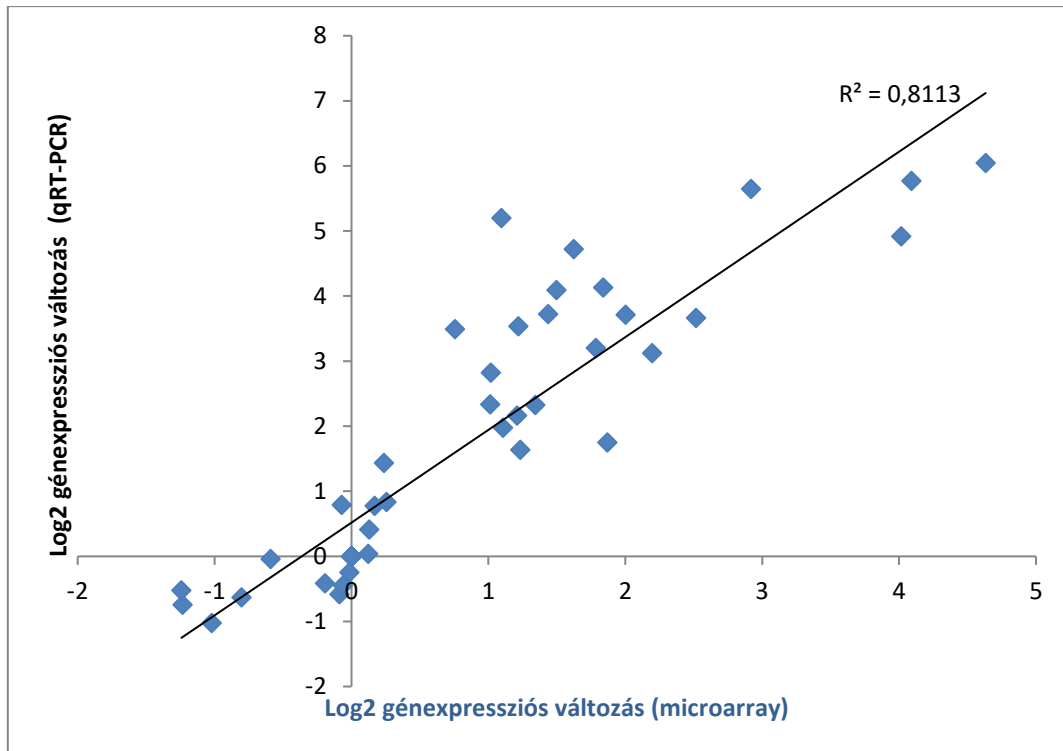
4.3 Génexpressziós változások a microarray vizsgálat alapján

Szerettük volna feltérképezni az MMS hatását a génexpressziós mintázatra, illetve hogy a kombinált kezelés valóban segíti-e a növényi védekezőképesség fokozását az alacsony hőmérséklet jelenlétekor. Ehhez elvégeztünk egy microarray vizsgálatot, aminek elemzésével átfogó képet kaphatunk a kukorica növényekben a kezelések hatására végbemenő transzkriptomikai változásokról. A vizsgálat validálását qRT-PCR technikával végeztük, 13 gén felhasználásával. A validálás során olyan géneket választottunk, amelyek szignifikáns génexpressziós változást mutattak a microarray adatsor alapján, és amelyek a kutatás szempontjából is releváns információkat hordoznak. A 13. ábrán azok a gének láthatóak, melyek expressziós vizsgálatát személyesen végeztem. A legtöbb gén a hidegstressz jelátviteléhez vagy a fenilpropanoid útvonalhoz köthető. A validálásban még a poliamin-anyagcserében szerepet játszó géneket vizsgáltuk, amelyek expressziós változását Balassa György mérte, így ezek a gének az én ábráimon nem szerepelnek. A 13. ábra B paneljén ugyanazon gének láthatóak, azonban a microarray vizsgálatból származó génexpressziós értékekkel. A két diagram összehasonlításával feltűnik, hogy a trend hasonló, az expressziós értékekben lehetnek különbségek, amelyek a qRT-PCR technika nagyobb érzékenységéből fakadnak. A lineáris regresszió elemzés eredményeként látható, hogy a kétféle technikával mért génexpressziós adatok korrelálnak egymással ($R^2=0,811$). Ebből kifolyólag a microarray

vizsgálat eredménye validáltnak tekinthető (14. ábra). Mind az Y tengelyen, a qRT-PCR vizsgálatából származó adatokat, és mind az X tengelyen lévő microarray kísérlet adatait kettes alapú logaritmikuskálán ábrázoltam.

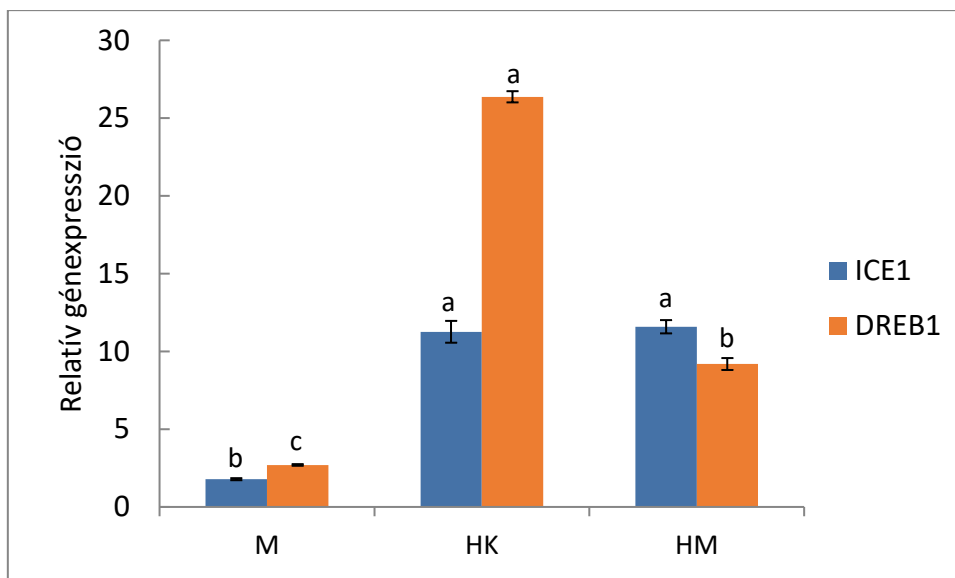


13. ábra A qRT-PCR (A) és a microarray vizsgálat (B) alapján mért relatív génexpressziós változások (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd és 24 órás hidegstressz; a kontroll értéke=1). (IFH: izoflavon-2'-hidroxiláz; AGT: antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz; F3H: flavanon-3-hidroxiláz; DREB: dehydration responsive element binding 1 (transzkripciós faktor); ZXE: zeaxantin-epoxidáz; SAT: szerin-acetil-transzferáz; ICE: inducer of CBF expression 1 (transzkripciós faktor); PRPO: protoporfirinogén IX-oxidáz; LOX: lipoxigenáz 2)



14. ábra A microarray és qRT-PCR vizsgálat regressziós elemzése kettes alapú logaritmikus skálán ábrázolva.

Az ICE1 és a DREB1 transzkripciós faktorokat szintén kiválasztottuk a microarray validáláshoz az adatsor expressziós értékei alapján. Mindkét gén jelentős expressziós emelkedést mutatott, továbbá a hidegakklimációban betöltött szerepük is vitathatatlan. A membránstruktúra hideg által előidézett megváltozása aktiválja a jelátviteli útvonalat, melynek eredményeként kialakulhat az esetleges akklimáció. A szignalizációban játszik elengedhetetlen szerepet az ICE1 és a DREB1 transzkripciós faktor. A hideg hatására a HK ($11,26 \pm 0,36$) és HM ($11,58 \pm 0,383$) csoportban több mint tízszeres emelkedést mértem az *ICE1* gén expressziójában (15. ábra). A *DREB1* gén kifejeződése a HM csoportban is jelentősen nő ($9,189 \pm 0,426$), de ezt csaknem háromszorosan, a kontrollhoz viszonyítva pedig több mint 25-szörösen haladja meg a HK csoport értéke ($26,371 \pm 0,7$). Mind a két gén esetében láthatunk emelkedést az MMS-kezelt csoportnál is, ami az *ICE1*-nél $1,784 \pm 0,053$; a *DREB1*-nél pedig $2,7 \pm 0,218$ emelkedés, azonban a gének expressziós növekedése messze elmarad a hidegkezelt csoportokhoz képest.

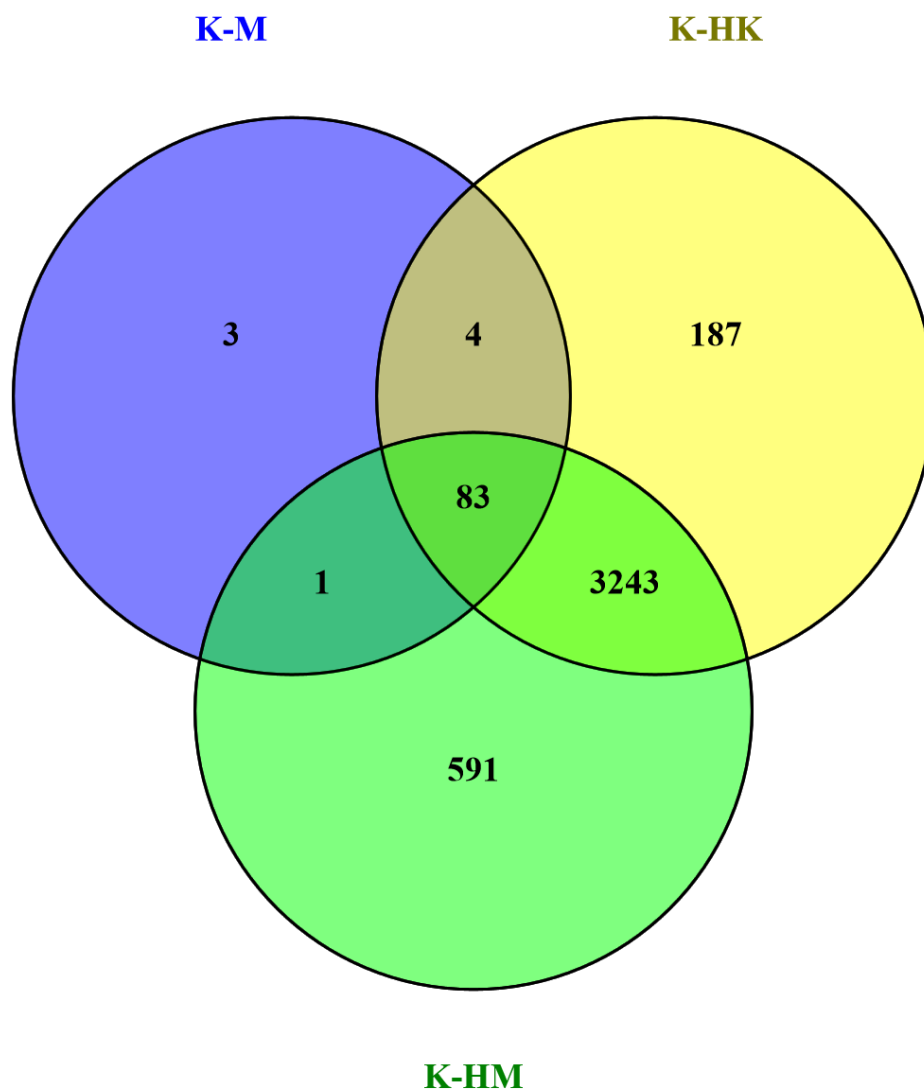


15. ábra Az ICE1 és DREB1 relatív génexpressziós változása qRT-PCR technikával mérve (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz; a kontroll értéke=1). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A microarray vizsgálat alapján összesen 4112 gén expressziójában találtam szignifikáns változást 5 %-os szignifikanciaszint mellett a kontroll csoporthoz képest. Az eredményeket Venn-diagram szemlélteti, ahol az összehasonlításban az alábbi párosítások szerepelnek (16. ábra):

- kontroll - MMS-kezelt (K-M)
- kontroll - hidegkezelt (K-HK)
- kontroll - MMS-előkezelés után hidegkezelt (K-HM)

Ahogy a korábbi mérési eredményekből kiindulva várható volt, a microarray vizsgálat adatai alapján a K-M összehasonlítás hozta a legkisebb különbséget, ebben a párosításban mindössze 91 génnél találtam szignifikáns változást, ebből 88 gén a hidegkezelésre és a kombinált kezelésre is jelentős változást mutatott a kontroll csoporthoz képest. A hidegkezelés már jóval nagyobb számban okozott változást a génexpressziós mintázatban. Számos átfedést láthatunk a diagram K-HK és K-HM halmazában, miszerint 3326 gén expressziója változott együttesen. Továbbá 187 olyan gént találtam, ami csak a hidegkezelésre adott választ. Számunkra a legérdekesebb az magának az MMS-előkezelésnek a hatása lehet, 591 olyan gént találtunk a K-HM halmazban, melyek génexpressziójában csak a kombinált kezelésre történt változás.



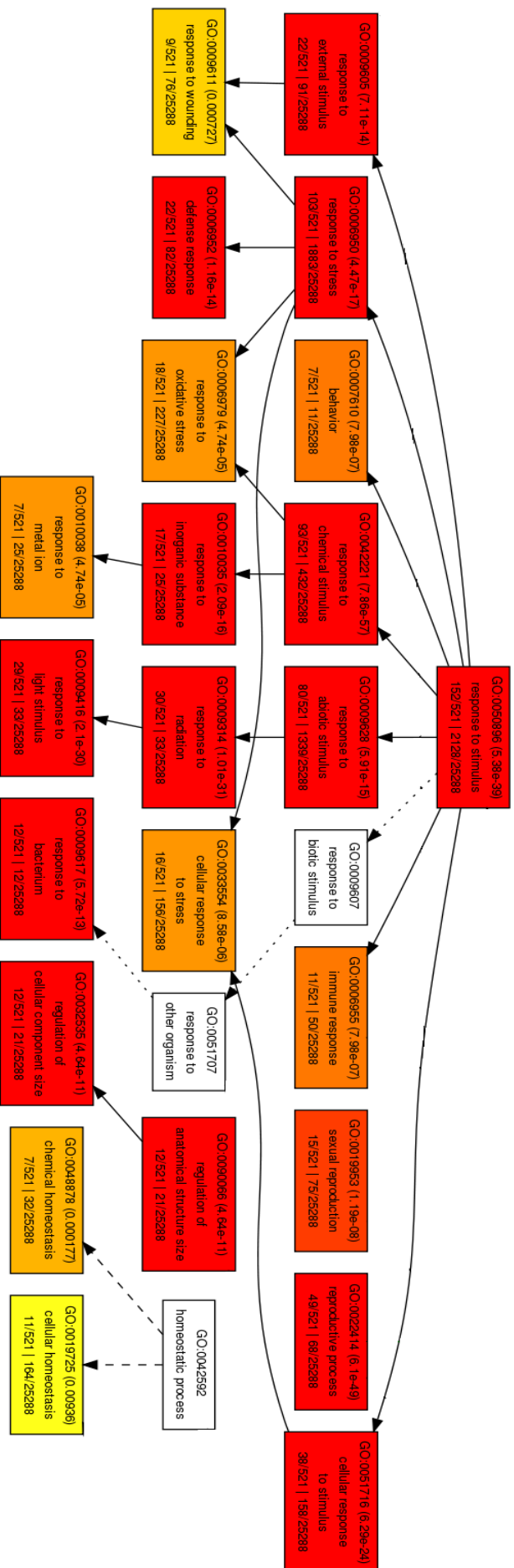
16. ábra A microarray vizsgálat alapján génexpressziósbeli aktivitás változást mutató gének száma kezelési csoportonként a kontroll csoporthoz hasonlítva 5%-os szignifikancia mellett (K-M : kontroll és MMS-kezelt csoport összehasonlítás; K-HK: kontroll és hidegkezelt csoport összehasonlítás; K-HM: kontroll és MMS-előkezelés után hidegkezelt, azaz kombinált kezelést kapott csoport összehasonlítása).

A microarray vizsgálat során mért nagyszámú génexpressziós változások átfogó feldolgozását GO (Gene Ontology) analízissel végeztem az AgriGo v2.0 online programcsomaggal (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>). A program egy algoritmust (Singular Enrichment Analysis) felhasználva annotálja, majd csoportosítja a géneket funkció, lokalizáció vagy anyagcsere-útvonalak alapján úgynevezett GO kategóriákba, melyek hierarchikus felépítésűek. Az AgriGO v2.0 programcsomaggal kifejezetten kukorica adatbázis alapján

készítettem az ábrákat. A szoftver által készített ábrák 5%-os szignifikanciaszint mellett készültek (K-HM csoport összehasonlítása). A K-M csoportosítást nem vizsgáltam, ugyanis a microarray vizsgálatnál csak a gének kis százalékánál találtam legalább kétszeres expressziós változást 5 %-os szignifikancia mellett. Ezenkívül a K-HK csoportosítással sem foglalkoztam külön, hiszen a hidegstressz okozta változásokat már számtalan dolgozatban publikálták, a munkám célja pedig elsősorban az MMS védőhatásának feltérképezése volt. A programban használt adott algoritmus színskálán mutatja a kezelések hatására felülreprezentált GO kategóriákat, ahol a fehértől az élénk pirosig a szín sötétedése jelzi a p-érték csökkenését, azaz a statisztikai szignifikancia erősödését (17. ábra). A GO kategóriák alapvetően olyan gének csoportosításai funkció vagy lokalizáció alapján, melyeknél aktivitásbeli változás következett be. Az analízis továbbá ezen GO kategóriák közötti kapcsolatot is szemlélteti, hierarchikusan felépítve mutatja a csoportokat, például a szervetlen vegyületekre mint stimulusra adott válasz része a vegyületekre adott válasznak, magába foglalja azt. Minden kategóriához tartozik egy azonosító és egy név, ami összefoglalóan megadja a kategóriába sorolt gének funkcióját vagy lokalizációját, továbbá fel van tüntetve a p-érték is, illetve, hogy az adott GO kategóriához hány gén tartozik az adatbázis alapján. Az adott kategóriákba tartozó gének kikereshetők a szoftver segítségével.

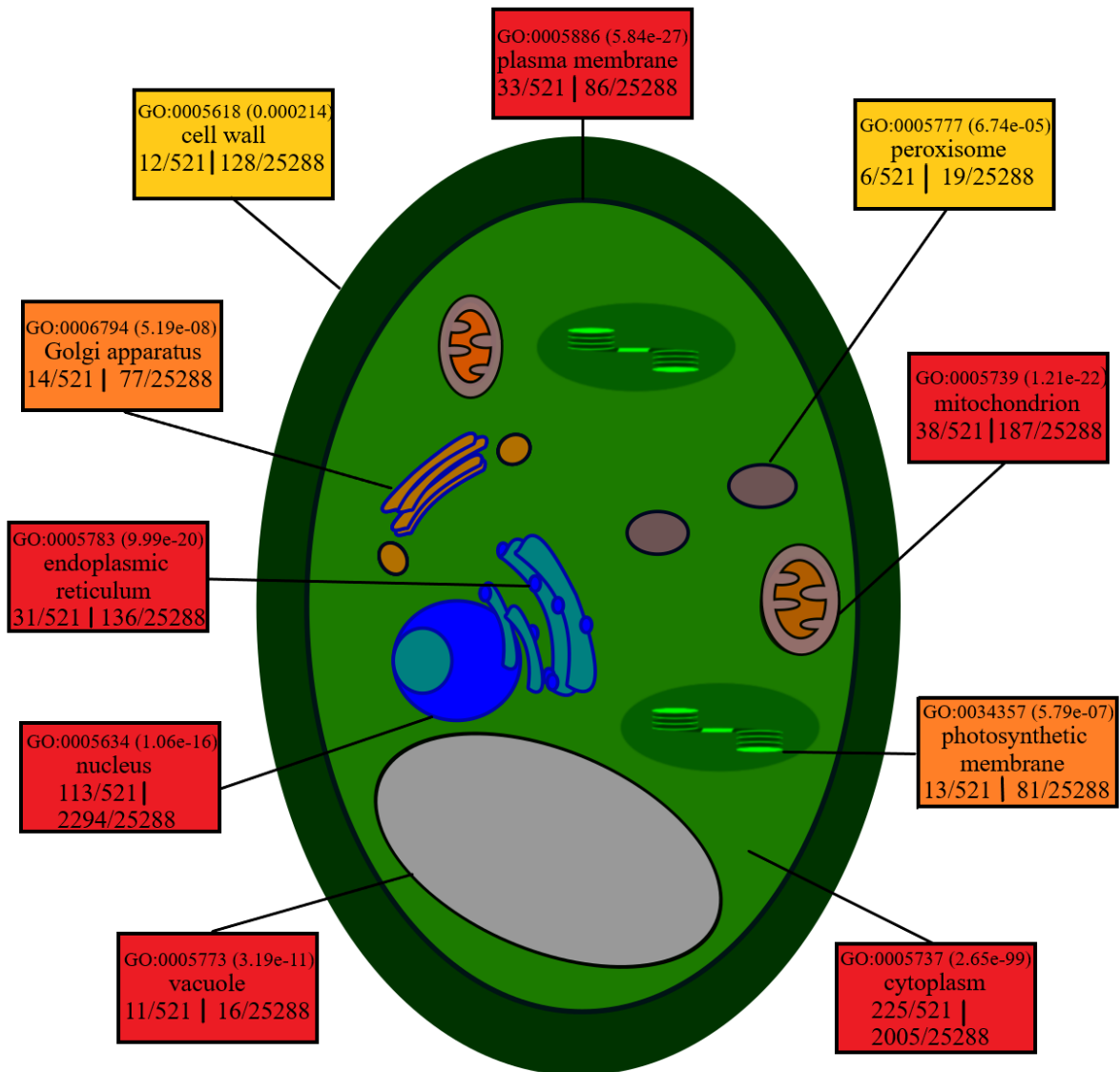
A GO kategóriákba besorolt gének háromféleképpen csoportosíthatók: *biológiai folyamatok*, *sejtkomponens*, illetve *molekuláris funkciók* alapján (Ashburner és mtsai. 2000).

A *biológiai folyamatok* esetében a K-HM összehasonlításban számos funkcionális csoportosításban találtam változásokat. A dolgozat törzsszövegében csak a kutatás szempontjából legfontosabb funkciókat említeném. Ezen adattömegből készített részletes táblázatot a méretéből kifolyólag mellékletként illesztettem be a dolgozat végén (M1. táblázat). A *biológiai folyamatok* esetében fontos kiemelni a következő GO kategóriákat, mint például a stimulusra adott választ (GO:0050896), mely magába foglalja a stresszválaszt (GO:0006950), melyen belül megtalálhatjuk az oxidatív stresszre adott választ (GO:0006979). Emellett a stimulusra adott válaszon belül szintén megtaláljuk a kémiai stimulánsra adott választ (GO:0042221) és abiotikus stresszválaszt (GO:0009628), melyek szintén változást mutatnak az MMS-előkezelés + hidegstressz hatására. Az imént leírtakon kívül az 17. ábrán láthatjuk, hogy számos GO kategória felülreprezentált, azaz mutat változást a K-HM összehasonlításban.



17. ábra Az AgriGO v2.0 programmal készített GO (gene ontology) analízis a K-HM csoportok összetételében (részlet). Az ábrán a biológiai folyamatok szerinti GO kategóriák láthatóak, melyekben géneexpressziós változás történt, ill. a GO kategóriák között lévő hierarchikus kapcsolatok. Ezen kívül az adott GO kategória neve, azonosítója, és a kategóriába tartozó annotált gének száma.

A *sejtkomponensek* GO kategória génjeit tartalmazó részletes táblázat szintén mellékletként található (M2. táblázat). A *sejtkomponensek* GO kategóriái esetében számos változást találtam az MMS-előkezelés + hidegstressz hatására, ezek közül a sejtfalat (GO:0005618), a plazmamembránt (GO:0005886), a peroxiszómát (GO:0005777), a vakuólumot (GO:0005773), az endoplazmatikus retikulumot (GO:0005783), a fotoszintetikus membránokat (GO:00034367), a mitokondriumot (GO:0005739), a Golgi apparátust (GO: 0005794) és a sejtmagot (GO:0005634) emeltem ki (18. ábra), amelyekben számos GO kategória felülreprezentált a lokalizáció alapján.



18. ábra Az AgriGO v2.0 programmal készített GO (gene ontology) analízis a K-HM csoportok összevetésében (részlet). Az ábrán a sejtkomponensek szerinti GO kategóriák láthatóak, melyekben génexpressziós változás történt, ill. a GO kategóriák között lévő hierarchikus kapcsolatok. Ezen kívül az adott GO kategória neve, azonosítója, és a kategóriába tartozó annotált gének száma.

A sejtkomponensek szerinti GO analízis alapján sok sejtalkotó kiemelhető lenne, azonban a következőkben – az SMM és az MMS membránokra és plasztiszokra gyakorolt hatását is figyelembe véve – a fotoszintetikus membránok GO kategória génjeire fókuszálok. A 8. táblázatban láthatóak ebbe a GO kategóriába sorolt gének, melyekben génaktivitás-változás történt. Választásom azért is esett erre a GO kategóriára, mert a fotoszintézis működéséből képet kaphatunk a növény fiziológiai állapotáról, továbbá a kutatás során más mérések során is vizsgáltam a fotoszintézis folyamatát és folyamatban bekövetkező változásokat, így az

eredmények jól kiegészíthetik egymást. A GO kategóriába sorolt génekhez a microarray adatsor génexpressziós adatait rendelttem, a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, amely minden esetben 1 volt. Sikerült azonosítani a *lipoxigenáz11* NP_001105981.1 gént (*LOX11*), amely a jazmonsav (JA) keletkezésében játszik szerepet. A szintézis kezdeti lépései a kloroplasztisban mennek végbe, a szintézis mértéke stresszorok hatására nő (Wasternack 2014). Az általam mért eredmények is ezt tükrözik, mivel a HK és a HM csoportban a *lipoxigenáz11* gén expressziója 3-4-szeresére nőtt a kontrollhoz képest. A validáláshoz vizsgáltunk egy másik lipoxigenáz gént is, a *LOX2*-t. A microarray és a qRT-PCR technika adatai is azt az eredményt mutatják, hogy több tízszerese a génexpresszió a HK és HM csoportokban (13. ábra). A fotoszintetikus membránhoz rendelhető gének között még az alábbiakat találtam meg: *klorofill a/b-kötő apoprotein CP26 prekursor* NP_001105374.2; *klorofill a/b-kötő protein* NP_001130616.1; *NADH-dehidrogenáz 4L alegység* NP_043089.1; *PSII 29-es alegység* NP_001105502.1. Ezeknél a géneknél expresszióbeli csökkenést tapasztaltam, ami leginkább a hidegstressznek kitett kezelési csoportoknál volt jellemző (8. táblázat).

8. táblázat Sejtkomponensek szerinti GO kategóriákon belül a kloroplasztisához, ezáltal a fotoszintézishez köthető gének relatív expressziós változásai. (M: MMS-kezelt; HK: 24 órás hidegkezelés, HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

azonosító, gén	rel. génexpressziós változás		
	M	HK	HM
ref[NP_001105981.1 <i>lipoxigenase11</i>	1,319	3,237	4,242
ref[NP_001105374.2 <i>chlorophyll a/b-binding apoprotein CP26 precursor</i>	0,872	0,434	0,384
ref[NP_001130616.1 <i>chlorophyll a-b binding protein</i>	0,799	0,040	0,094
ref[NP_043089.1 <i>NADH dehydrogenase subunit 4L (chloroplast)</i>	0,735	0,649	0,483
ref[NP_001105502.1 <i>photosystem II subunit29</i>	0,845	0,261	0,473

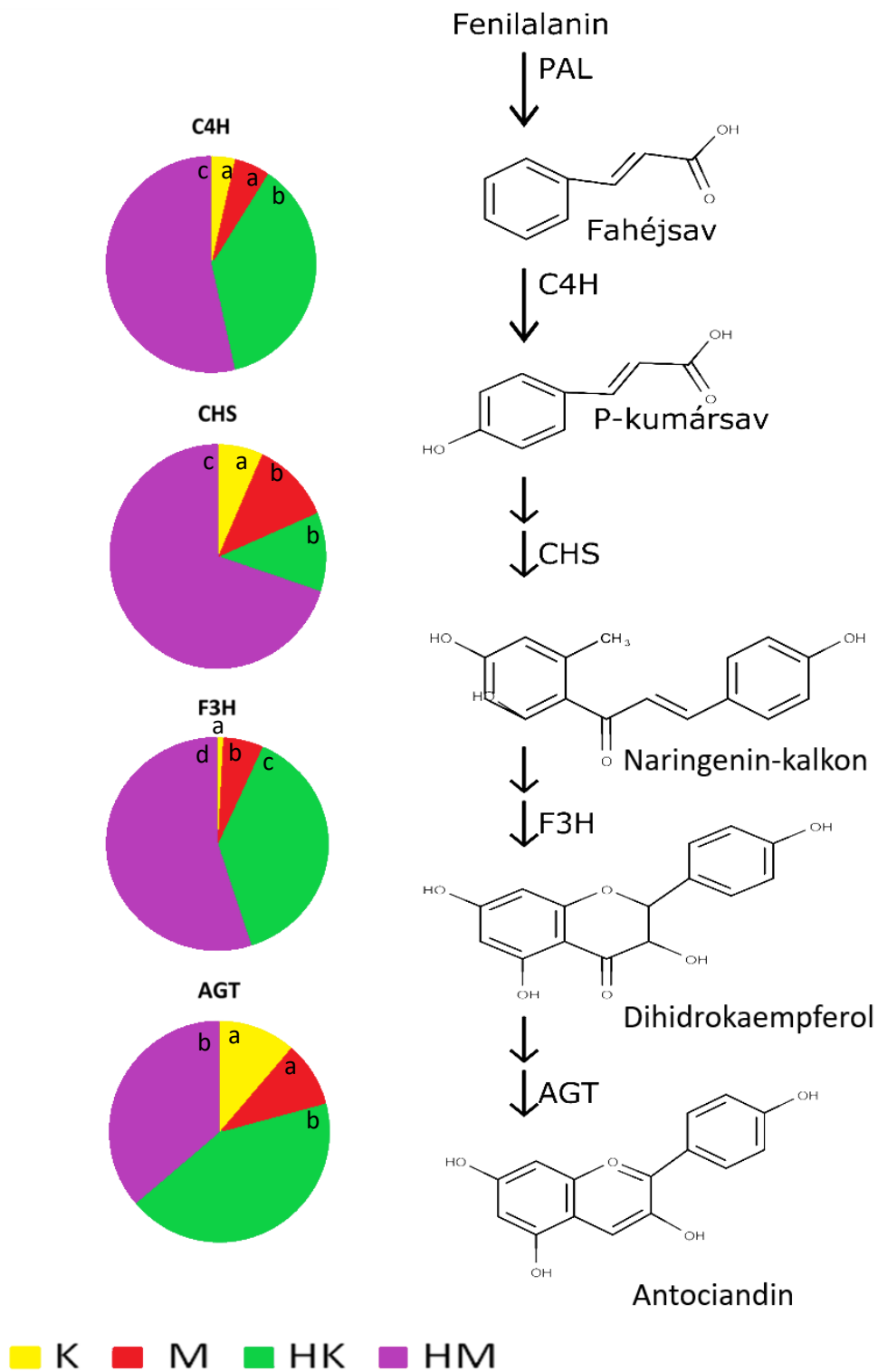
A *molekuláris funkciók* szerinti GO analízis alapján, többek között a glutation-S-transzferáz aktivitása (GO:0004364), az S-adenozil-metionin függő metiltranszferáz (GO:0008757) expressziója vagy akár a fehérjék szerin/treonin-foszfátáz (GO:0004722) expressziója mutatott a HM csoport változást a kontroll csoporthoz képest. A *molekuláris funkciók* részletes eredményeit tartalmazó táblázat szintén a mellékletben található (M3. táblázat).

4.4 Fenilpropanoid útvonal

A fenilpropanoid bioszintézis útvonaláról korábban számos publikációban leírták, hogy aktiválódik a hidegstressz hatására, ugyanis számos stresszvédelemben jelentős metabolit szintetizálódik az útvonalon. A microarray vizsgálat alapján én is tapasztaltam génexpressziós növekedést a metabolitok képződésében résztvevő enzimeknél. Ebből kifolyólag ezeket a géneket is felhasználtam a microarray validálásához, hiszen nemcsak változást mutatnak 5 %-os szignifikancia mellett, de a kutatás szempontjából is jelentősek. Munkám során vizsgáltam, hogy az útvonalon található, akklimációban szerepet játszó enzimek génexpressziós mintázata magasabb-e az MMS-előkezelés + hidegstressz hatására, mint a csak hidegkezelt növényekben. A 19. ábra sematikusan ábrázolja a bioszintetikus útvonalat, aszerint, hogy mely enzimek génjének expressziós változását vizsgáltam qRT-PCR technikával, a gének expressziós értékei az ábra bal oldalán láthatók, kördiagrammal ábrázolva, hogy az egyes kezeléseknél hányad részével magasabb a génexpresszió a kontroll csoporthoz képest. A kontroll csoportnál a génexpresszió értéke minden esetben 1 volt. A 9. táblázat a microarray vizsgálat eredményei alapján szemlélteti a génexpressziós változásokat. A microarray analízisben felhasznált fenilpropanoid-fenoloid anyagcserének azonosítási és expressziós adatai az M5. táblázatban láthatók. A qRT-PCR technikával mért génexpressziós eredmények értékei és az azokhoz rendelt hibasávok is láthatók diagram formájában a mellékletben (M1. ábra).

Négy különböző enzim génexpressziós változását mértem qRT-PCR technikával. Ezek a gének a *fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H)*, a *kalkon-szintáz (CHS)*, a *flavanon-3-hidroxiláz (F3H)* és az *antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz (AGT)*. A C4H az útvonal kezdeti szakaszán található, közvetlen a fenilalanin-ammónia-liázt (PAL) követi a sorban. Az enzim a fahéjsav p-kumársavvá való átalakulását katalizálja. Az MMS-kezelés hatására már láthatunk emelkedést a génexpresszióban (M: 1,479±1,224), a kontroll növényekhez képest a génexpresszió mértéke másfélszeres (a kontroll növények génexpressziós értéke minden esetben 1). A hidegkezelés 10-szeresére növeli a génexpresszió értékét (HK: 10,194±2,182), az MMS-előkezelést követő hidegstressz esetében pedig még jelentősebb ez a növekedés (HM: 14,634±1,441). Az útvonalról a következő vizsgált enzim a CHS, ami 4-kumaroil-CoA-t és három malonilcsoprotot kapcsol össze, kialakítva ezzel a naringenin-kalkon vegyületet. Az MMS-kezelt és a hidegkezelt növények esetében közel azonos génexpressziós emelkedést tapasztaltam (M: 1,773±0,104; HK: 1,724±0,082), míg a HM csoportnál jóval számottevőbb,

szignifikáns növekedést mértem (HM: 10,448±2,05). A soron következő általam mért enzim a F3H, amelynél igencsak magas génexpressziós értékeket detektáltunk már az MMS-kezelés hatására is (M: 7,637±0,236). A hidegkezelt növényeknél is erősen megnőtt a génexpresszió (HK: 50,334±1,898), ezenfelül az MMS-előkezelt növényeknél még aktívabb volt a génexpresszió (HM: 71,678±2,789). Az általam vizsgált negyedik és egyben utolsó gén az útvonal végén található, az antociánok végleges struktúrájának kialakításban játszik szerepet. Az AGT esetében szignifikáns génexpressziós változást nem tapasztaltam az MMS-kezelt növényeknél (M: 0,843±0,029), ezzel szemben a hidegstressz hatására génexpresszió-növekedést detektáltam (HK: 3,805±0,1; HM: 3,205±0,041).



19. ábra A fenilpropanoid útvonal sematikus ábrája a vizsgált génekkel. Az ábra bal oldalán kördiagrammok szemléltetik az általam qRT-PCR technikával mért gének relatív expressziós változásait (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). (PAL: fenilalanin-ammónia-liáz; C4H: fahéjsav-4-hidroxiláz; CHS: kalkon-szintáz; F3H: flavanon-3-hidroxiláz; AGT: antocianidon-3-O-glikoziltranszferáz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

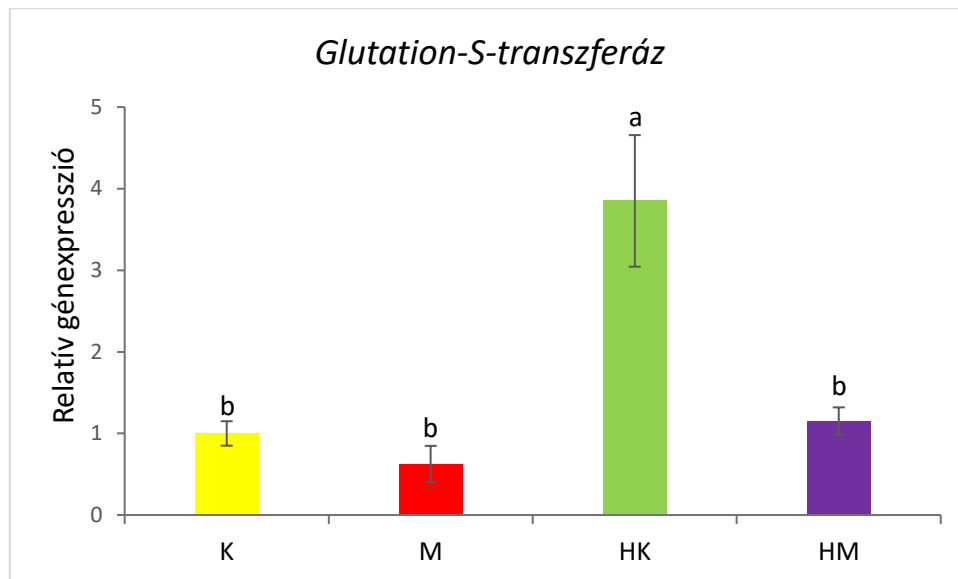
A microarray vizsgálat adatai alapján egy még átfogóbb képet kaphatunk a fenilpropanoid útvonal génextpressziós mintázatáról az alkalmazott kezelések hatására. A bioszintetikus útról számos enzim génjét sikerült annotálnunk (9. táblázat). A legelső és egyben egyik legfontosabb gén az útvonalról a *PAL*, ami a fahéjsav kialakulását katalizálja. Az enzim génjére serkentőleg hat a hidegstressz, a HK csoport esetében körülbelül 2-szeresére, a HM csoport esetében pedig több mint 2,5-szeresére nőtt az expresszió, az MMS-kezelés önmagában nem okozott jelentős változást. A következő azonosított enzim a 4-kumaroil-CoA-ligáz (4CL), ami a p-kumársavat egy CoA-hoz köti. E gén esetében az MMS-kezelés hatására 1,5-szeresére nőtt az expresszió, továbbá a hidegkezelés hatására még inkább megnövekedett génextpressziót mértünk, illetve ebben az esetben is elmondható, hogy a HM csoportnál a legmagasabb a relatív génextpresszió. A CHS enzim génjét a microarray vizsgálat alapján is megtaláltuk, az M csoportnál azonos értékű az expresszió a kontrolléval, amíg a HK-nél 2-szeres, a HM csoportnál közel 2,5-szeres volt a génextpressziós emelkedés. A microarray vizsgálat alapján a soron következő enzimet, a kalkon-izomerázt (CHI) is azonosítottuk, ami a naringenin-kalkont alakítja át naringeniné. Az M és HK csoportnál hasonló génextpressziós növekedést láthatunk, mint a *CHS* esetében, ennél kissé magasabb mértékű, 4-szeres emelkedést látunk a HM csoport esetében a kontrollhoz képest. Az *F3H* génextpresszióját szintén mértem qRT-PCR technikával is, az expressziós mintázat hasonló a microarray vizsgálat esetében is, miszerint már az MMS-kezelés is növekedést okoz, ennek többszöröse a HK csoport relatív génextpressziós növekedése, és itt is a HM csoportnál volt a legmagasabb az emelkedés, több mint 40-szeres. Ezen gén esetében mértük a legmagasabb génextpressziós változásokat. A következő gén az útvonalról a *dihidroflavonol-reduktáz* (DFR), ami dihidroquercetin \rightarrow leukocianidin átalakulásban vesz részt. Az MMS-kezelés itt nem okozott emelkedést, a HK csoportnál pedig körülbelül 3-szoros, míg a HM csoportnál közel 4-szeres emelkedést kaptam. A következő enzim a sorban a leukoantocianidin-dioxigenáz (LDOX), ami katalizálja a cianidinek kialakulást leukocianidinből. Az enzim génjének expressziója itt is növekedett, az M csoportnál majd 1,5-szeresre, a HK-nél több mint 3,5-szeresére és a HM csoportnál volt az expresszió a legmagasabb az *LDOX* esetében is, szám szerint 5,5-szeres. Az *AGT*-nél is van már egy expressziós adatunk qRT-PCR technikával meghatározva, amihez hasonló génextpressziós értékeket láthatunk a microarray vizsgálatból származó adatokból, miszerint az M csoportnál nincs változás a kontrollhoz képest, a HK csoport 2-szeres emelkedést mutatott, amíg a HM csoportnál 4-szeres volt relatív génextpresszió.

9. táblázat A fenilpropanoid bioszintézis útvonalán található enzimek génexpressziós változása a micorarray vizsgálat alapján. (M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz, a kontroll értéke=1) (PAL: fenilalanin-ammónia-liáz; 4CL: 4-kumaroil-CoA-ligáz; CHS: kalkon-szintáz; CHI: kalkon-izomeráz; F3H: flavanon-3-hidroziláz; DFR: dihidroflavonol-reduktáz; LDOX: leukoantocianidin-dioxigenáz; AGT: antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz).

gén	M	HK	HM
<i>PAL</i>	1,131	2,191	2,684
<i>4CL</i>	1,491	3,378	4,004
<i>CHS</i>	0,863	2,061	2,452
<i>CHI</i>	1,040	2,227	4,048
<i>F3H</i>	2,454	8,492	40,835
<i>DFR</i>	1,022	3,114	3,882
<i>LDOX</i>	1,462	3,670	5,544
<i>AGT</i>	1,040	2,227	4,048

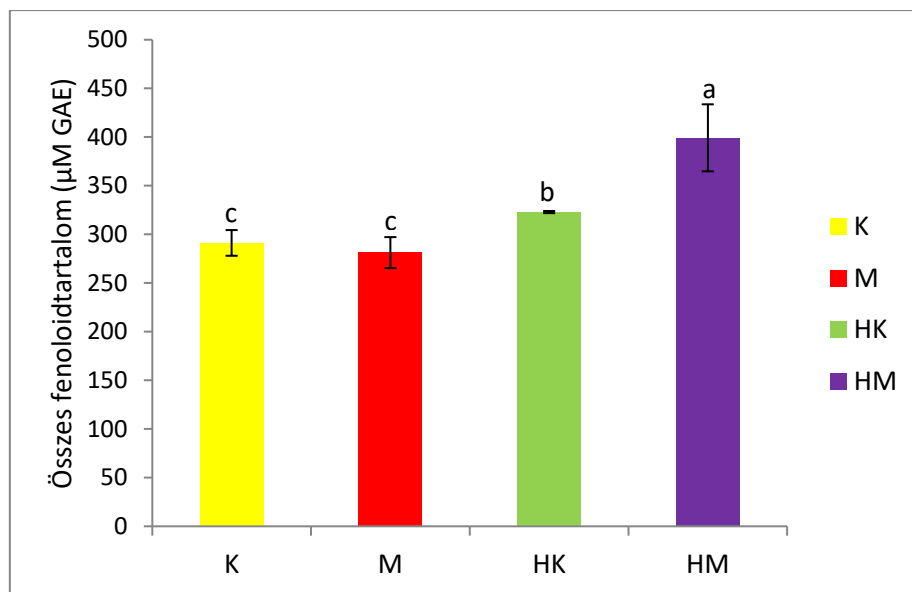
Összeségében elmondható, az esetek nagy százalékában maga az MMS-kezelés kismértékű génexpressziós emelkedést okozott a növényekben, vagy nem volt hatással a fenilpropanoid útvonalon lévő enzimek génexpressziójára. Ezzel szemben a hidegstressz növelte az útvonalon található enzimek génexpresszióját, mindemellett viszont az MMS a hidegstresszel kombinálva még magasabb génexpressziós emelkedést okozott. Ezek a változások megfigyelhetőek mindkét módszer esetében, azzal a különbséggel, hogy a qRT-PCR technikával végzett mérések a módszer érzékenységéből fakadóan arányaiban magasabb változást mutatnak a microarray vizsgálat által elvégzett génexpressziós értékekhez viszonyítva.

A fenilpropanoid útvonalon képződött antociánok és származékaik jelentős részben a vakuólumba szállítódnak, a folyamat során stabilizálódnak, ezáltal képesek ellátni sokrétű funkciójukat. A molekulák végleges helyére szállításában és stabilizálásban a glutation-S-transzferáznak (GST) fontos szerepe van. Munkám során megvizsgáltam a GST1 enzim génjének relatív expresszióváltozását (20. ábra). Maga ez enzim számos folyamatban vesz részt, többek között detoxifikálásban, mely során a mérgező vegyületeket, herbicideket szintén a glutationhoz kötve a vakuólumba szállítja a növény. A GST1 expresszója hidegstressz következtében jelentősen emelkedett (HK: $3,85 \pm 0,8$). A többi kezelési csoportnál nem tapasztaltam jelentős különbségeket a kontroll csoporthoz képest, melynek relatív értéke 1 (M: $0,623 \pm 0,2245$; HM: $1,152 \pm 0,168$).



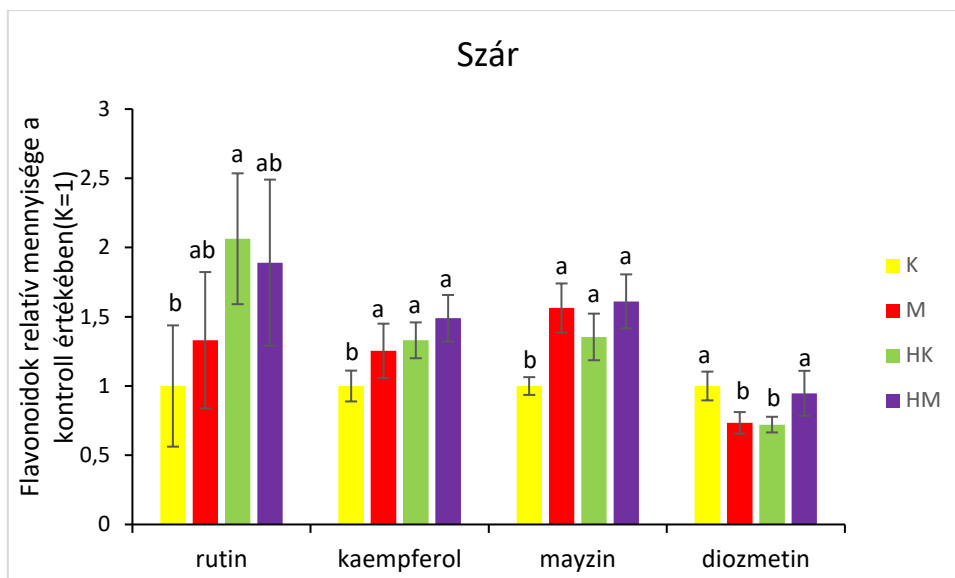
20. ábra A glutation-S-transzferáz génexpressziós változása levélben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikán különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

Számos publikációban mérték az összes fenoloidtartalmat Folin–Ciocalteu reagens hozzáadásával. A metabolit szintű mérés eredményeit galluszsav ekvivalensben adtam meg. A 21. ábrán látható, hogy a HM csoport összes fenoloidtartalma szignifikánsan magasabb a kontroll és a többi kezelési csoport eredményeitől (K: $291,212 \pm 13,206$; M: $281,272 \pm 15,93$; HK: $322,926 \pm 1,08$; HM: $399,227 \pm 34,426$). Ezenfelül a hidegkezelés önmagában is eredményezett növekedést, illetve ahogyan más mérési eredmények esetében is, az MMS-kezelt növények a kontroll növényekkel azonos fenoloidtartalmat mutatnak.



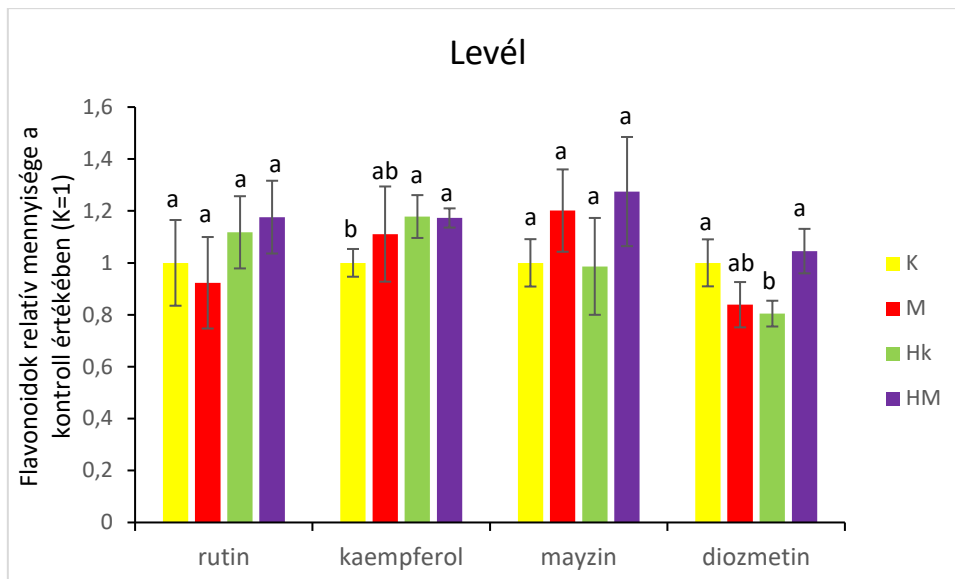
21. ábra A levelek összfenoloid-tartalom mérése Folin–Ciocalteu reagens (F-C) hozzáadásával, az eredmények μM galluszsav ekvivalensben vannak megadva (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A legjellemzőbb fenilpropanoid vegyületek azonosítását és mennyiségi analizisét HPLC/LC-MS vizsgálattal végeztük. A szárban és a levélben is ugyanazt a 4 vegyületet sikerült meghatározni, melyeket a tömegspektrumok és összegképletük alapján azonosítottunk. Az első vegyület a rutin, melynek molekulatömege 610 g/mol és az összegképlete $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$. A rutin két alkomponensre bontható fel, a quercetinre és egy diszacharid molekulára (ramnoglükózid). A következő vegyület a kaempferol-3-O-rutinozid, melynek molekulatömege 595 g/mol, összegképlete $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$. Szintén sikerült még azonosítani a mayzint, a $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{O}_{14}$ összegképlete, és a molekulatömege alapján, ami 576 g/mol. Az utolsó azonosított vegyület a diozmetin-7-O-neoheszperozid, amelynek összegképlete $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$, a molekulatömege 608 g/mol, a vegyület neodiozmin néven is ismert. Az eredményeket a kontroll növények értékeihez viszonyítottam. Alapvetően elmondható, a mérés során levelekben kisebbek voltak a változások, mint a szárban, ahol a kezelésekre hatására nagyobb arányban fordulnak elő az adott vegyületek (rutin: M: $1,33 \pm 0,492$; HK: $2,06 \pm 0,472$; HM: $1,89 \pm 0,598$; kaempferol-3-O-rutinozid: M: $1,254 \pm 0,196$; HK: $1,33 \pm 0,129$; HM: $1,489 \pm 0,167$; mayzin M: $1,563 \pm 0,177$; HK: $1,35 \pm 0,168$; HM: $1,611 \pm 0,194$). A diozmetin-7-O-neoheszperozid esetében a HM ($0,947 \pm 0,162$) csoport mutat azonos értéket a kontroll csoport értékével, amíg az M ($0,733 \pm 0,078$) és HK ($0,721 \pm 0,056$) csoport szignifikánsan lecsökkent ehhez képest (22. ábra).



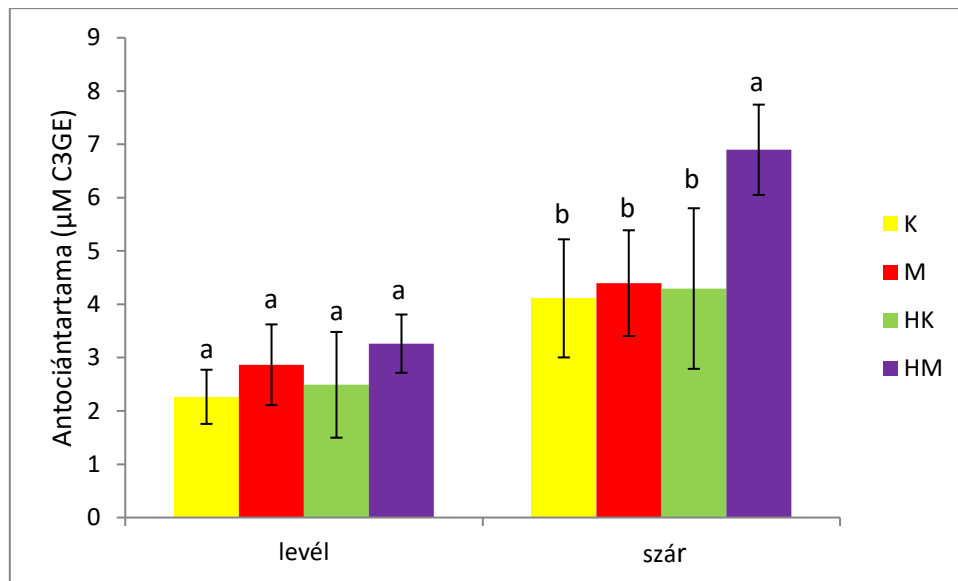
22. ábra A szár flavonoidtartalom mérése HPLC-vel (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (kaempferol: kaempferol-3-O-rutinozid, diozmetin: diozmetin-7-O-neoheeszperozid). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A levelek esetében kisebb mértékűek a változások, csupán a kaempferol-3-O-rutinozid (M: $1,11 \pm 0,18$; HK: $1,178 \pm 0,082$; HM: $1,173 \pm 0,037$) esetében jelentősek, továbbá a diozmetin-7-O-neoheeszperozid esetében látjuk viszont ugyanazt a változást, mint szár esetében, miszerint a K és a HM ($1,04 \pm 0,08$) csoportok azonosak, és az M ($0,839 \pm 0,08$) és HK ($0,804 \pm 0,05$) csoportok jelentősen alacsonyabb metabolittartalommal rendelkeznek. A rutin esetében nincs jelentős különbség (M: $0,923 \pm 0,176$; HK: $1,11 \pm 0,139$; HM: $0,176 \pm 0,14$), ahogyan a mayzin esetében sem (M: $1,201 \pm 0,168$; HK: $0,98 \pm 0,186$; HM: $1,27 \pm 0,21$) (23. ábra).



23. ábra A levelek flavonoidtartalom mérése HPLC-vel (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (kaempferol: kaempferol-3-O-rutinozid, diozmetin: diozmetin-7-O-neohezsperozid). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

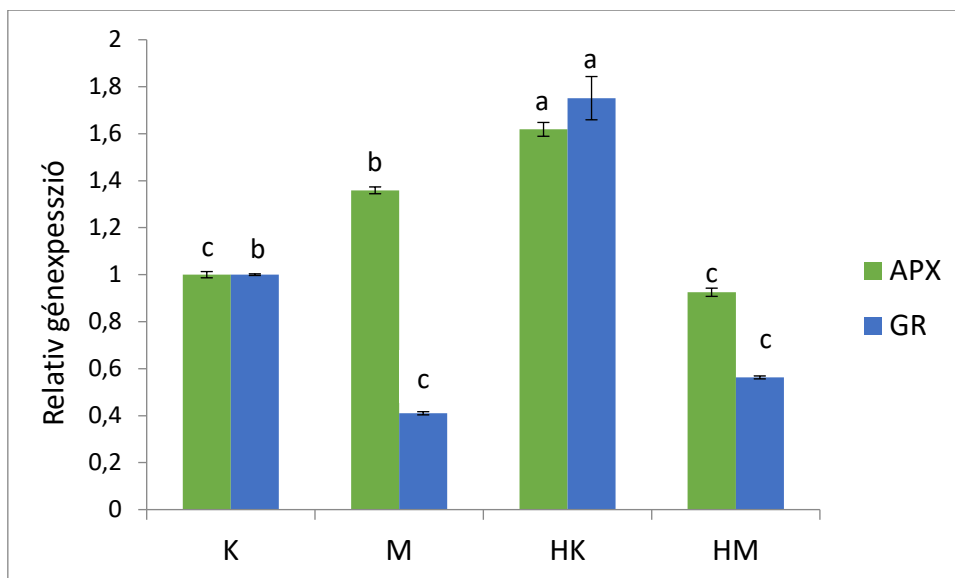
Az összes antociántartalmat fotométerrel is mértem, mely mérés eredményeként a levelekben nem találtam szignifikáns különbséget az egyes kezelési csoportok között (K: $2,264 \pm 0,507$; M: $2,867 \pm 0,578$; HK: $2,49 \pm 0,794$; HM: $3,26 \pm 1,061$). Az Mv350 fajtájú kukoricának szemmel láthatólag lilás árnyalatú a szár része, ebből kiindulva a hipokotil régió felett található 5 cm-es szakasz antociántartalmát is lemértem fotométerrel. Ebben az esetben az MMS-kezelt, és hidegkezelt növények antociántartalma a kontroll növényekével megegyező (K: $4,11 \pm 0,271$; M: $4,39 \pm 0,547$; HK: $4,29 \pm 0,846$), viszont az MMS-előkezelt növényeknél szignifikánsan magasabb antociántartalmat mértem (HM: $6,899 \pm 0,337$). Az antocián mérések esetében az eredményeket μM cianidin-3-glikozid ekvivalensre vonatkoztattam (24. ábra).



24. ábra A levelek és a szár antociántartama (μM cianidin-3-glikozid ekvivalensben, C3GE) (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

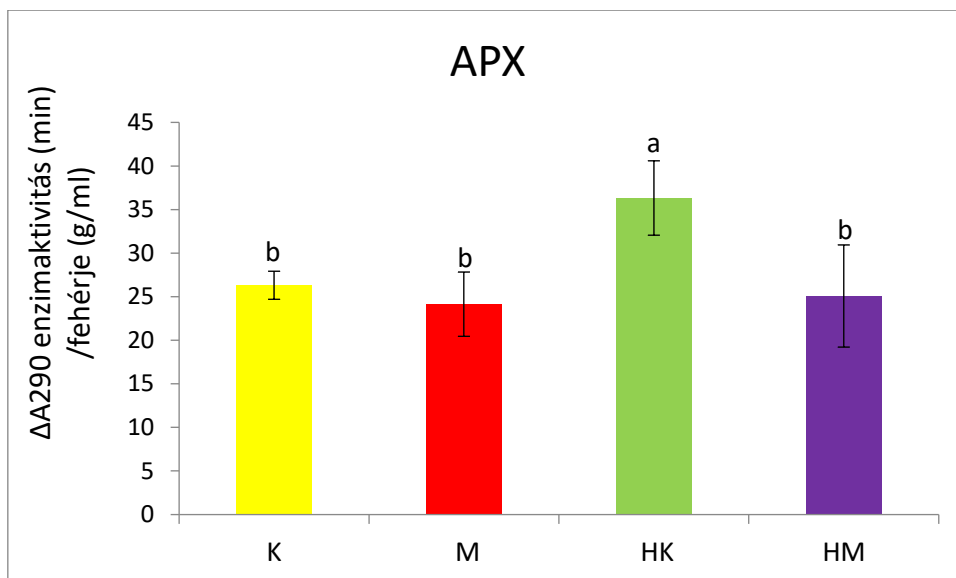
4.5 Az antioxidáns védekezőrendszer

Oxidatív stressz gyakorta jelentkezik az alacsony hőmérsékleti stressz kísérő jelenségeként. Ilyenkor a növekvő koncentrációjú reaktív oxigénformákat az antioxidáns védekezőrendszer hivatott eliminálni. Az enzimatis védekezőrendszer része a citoszólban is jelenlévő glutation-aszkorbát ciklus (2. ábra). Ennek a rendszernek része az általam is vizsgált *glutation-reduktáz* (GR) 1, ami a kukoricában az 1. kromoszómán kódolt, és az *aszkorbát-peroxidáz* (APX) 1.2, ami a 9. kromoszómán kódolt. A két gén relatív expressziós változását qRT-PCR technikával vizsgáltam, levelekben és gyökerekben, viszont jelentősebb változást csak a gyökerekben tapasztaltam. Az eredményeket a 25. ábra szemlélteti, ahol a kontroll növényekhez viszonyított relatív változás látható, a kontroll növények értéke minden esetben 1. Az APX esetében emelkedést mértem az MMS-kezelt és hidegkezelt növényekben (M: $1,359 \pm 0,014$; HK: $1,619 \pm 0,029$), az MMS-előkezelt növényeknél viszont a kontroll növényekkel közel megegyező értéket kaptam (HM: $0,925 \pm 0,017$). A GR esetében csak a hidegkezelt növényeknél mértem magasabb génexpressziót (HK: $1,751 \pm 0,029$). Az MMS-kezelt és kombinált kezelést kapott növényeknél csökkenést detektáltam (M: $0,41 \pm 0,004$; HM: $0,562 \pm 0,018$).

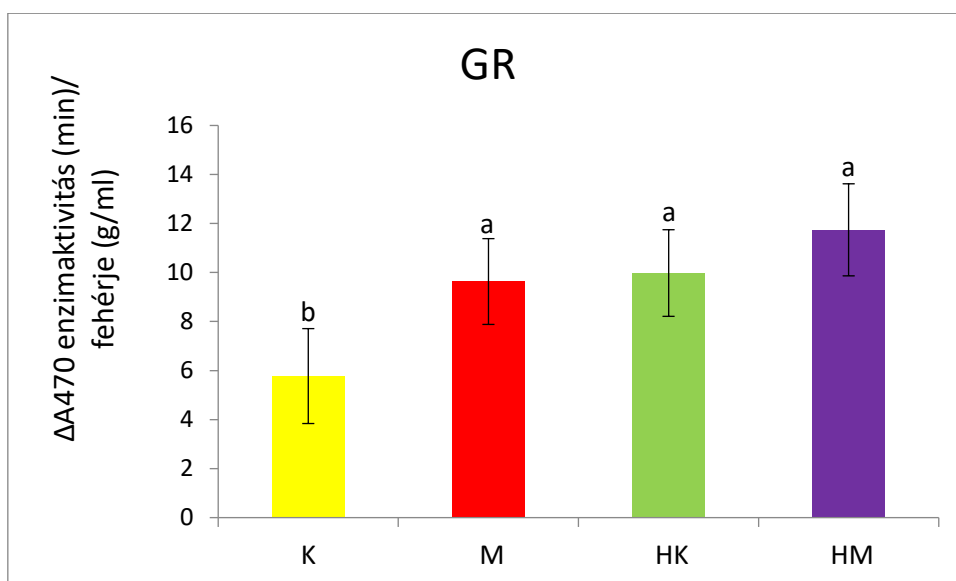


25. ábra Az antioxidáns enzimek génexpressziós változásai gyökérben (APX: aszkorbát-peroxidáz; GR: glutation-reduktáz) (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). A betűk eltérő szignifikancia szintet jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

Az APX és GR enzimek aktivitását fotometriás méréssel vizsgáltam, a levelekben jelentős változást nem tapasztaltam, így itt is csak a gyökerekben mért változást emelem ki (26. ábra). Az APX esetében szignifikáns növekedést csak a hidegkezelt mintákban tapasztaltam (HK: $36,232 \pm 4,265$). Az MMS-kezelt és kombinált kezelést kapott növényeknél a kontroll növények értékeivel megegyező enzimaktivitást mértem (K: $26,312 \pm 1,609$; M: $24,143 \pm 3,689$; HM: $25,067 \pm 5,858$). A GR esetében minden kezelési csoportnál magasabb értékeket kaptam, mint a kontroll növényeknél, a legmagasabb eredményt a HM csoportnál tapasztaltam (K: $5,775 \pm 1,936$; M: $9,632 \pm 1,75$; HK: $9,979 \pm 1,767$; HM: $11,741 \pm 1,87$).



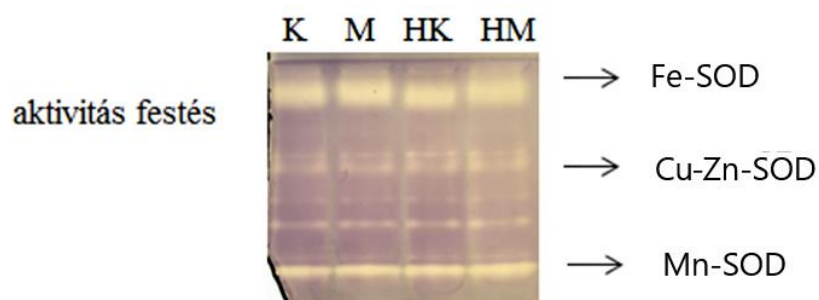
26. ábra Az aszkorbát-peroxidáz aktivitásváltozása gyökérben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). A betűk eltérő szignifikancia szintet jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.



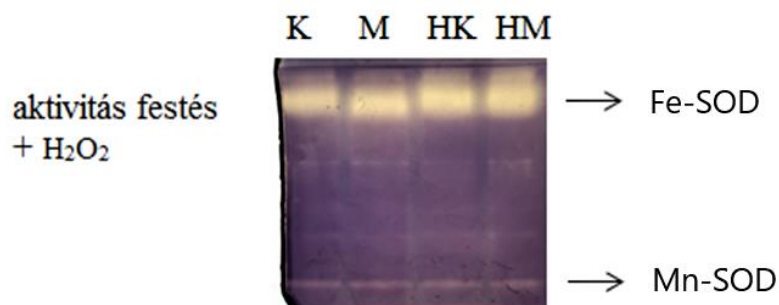
27. ábra A glutation-reduktáz aktivitásváltozása gyökérben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). A betűk eltérő szignifikancia szintet jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A szuperoxid-diszmutáz (SOD) szintén az enzimatikus antioxidáns védekezőrendszer fontos tagja, részt vesz a H₂O₂ eliminálásban. Alapvetően 3 típusú SOD-ot különböztetünk meg, a Fe-SOD-ot, a Cu-Zn-SOD-ot és a Mn-SOD-ot. A SOD-ok kompartmentalizációja is komplex.

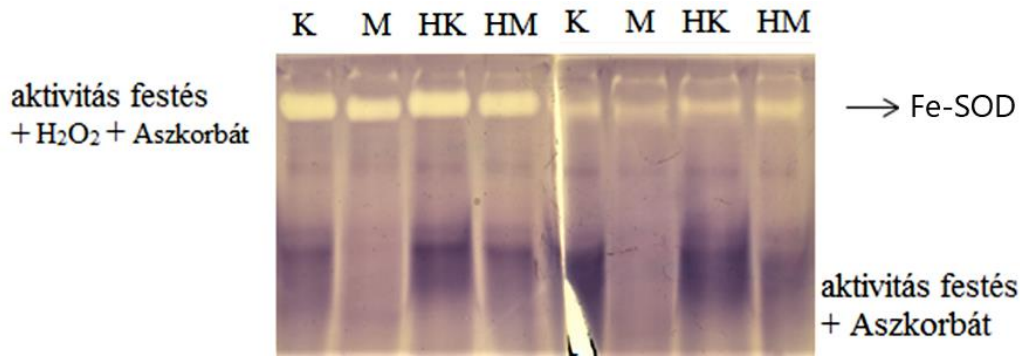
A natív fehérje gélelektroforézis alapján 6 izoformát különítettem el, melyeket gátlószerekkel azonosítottam. A 28.A ábrán a gélen az összes izoformát láthatjuk. A 28.B ábrán a Cu-Zn-SOD izoforma azonosítása látható, a gélt H_2O_2 -dal kezeltem, ezáltal a Cu-Zn-SOD izoforma aktivitása gátolt, így nem látható. A 28.C ábrán látható a Fe-SOD izoformák azonosítása, miszerint a bal oldali gélen az izoforma aktivitását duplán gátoltam H_2O_2 -dal és aszkorbáttal, itt látható a Fe-SOD izoforma aktivitása, míg a jobb oldali gélen, ahol csak aszkorbátot adtam gátlószerként, az enzim csökkent aktivitása látható. A két gél között látható enzimaktivitásbeli különbség oka, hogy a duplán gátolt gélen a H_2O_2 oxidálhatta az aszkorbátot, így az nem tudta kifejteni redukáló hatását, emiatt erősebben látszik a Fe-SOD működése a bal oldali gélen.



28. A ábra A szuperoxid-diszmutáz izoformák azonosítása natív fehérje gélelektroforézissel, különböző gátlószerek adagolásával (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (H_2O_2 : hidrogén-peroxid; Fe-SOD: vas-szuperoxid-diszmutáz; Cu-Zn-SOD: réz-cink-szuperoxid-diszmutáz; Mn-SOD: mangán-szuperoxid-diszmutáz).

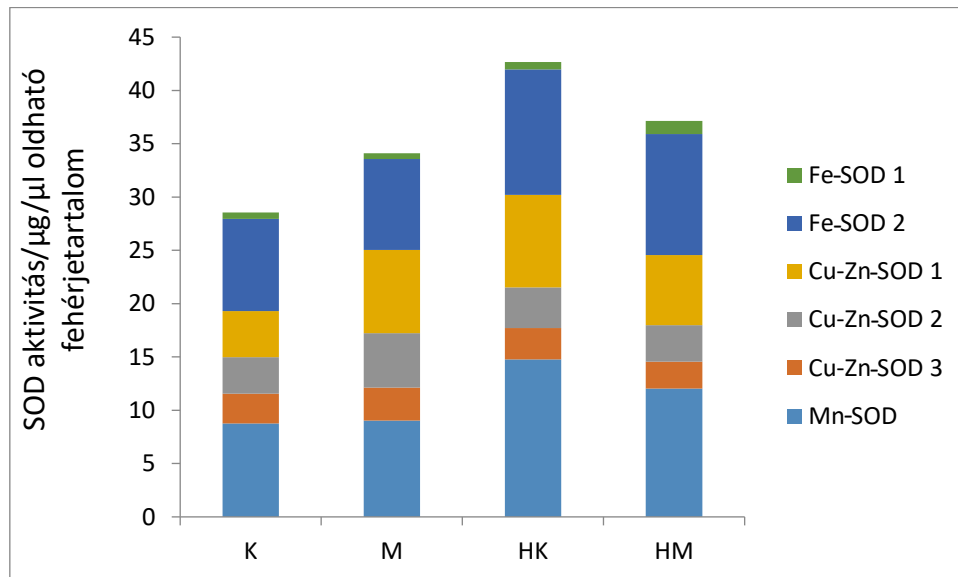


28. B ábra A réz-cink szuperoxid-diszmutáz izoforma azonosítása natív fehérje gélelektroforézissel hidrogén-peroxid gátlószer hozzáadásával (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (H_2O_2 : hidrogén-peroxid; Fe-SOD: vas-szuperoxid-diszmutáz; Mn-SOD: mangán-szuperoxid-diszmutáz).



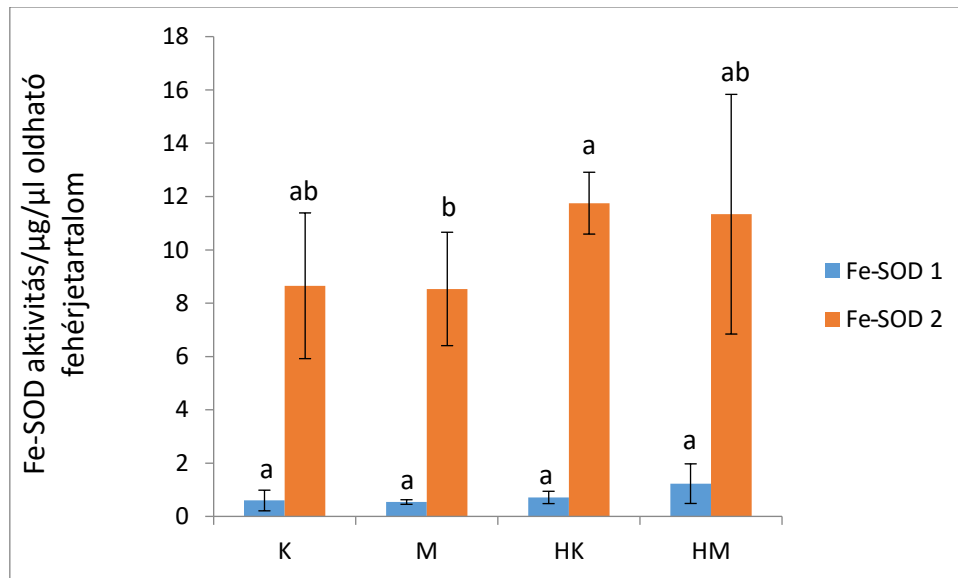
28. C ábra A vas szuperoxid-diszmutáz izoforma azonosítása natív fehérje gélelektroforézissel, a bal oldali gélen hidrogén-peroxid és aszkorbát gátlószerek hozzáadásával, a jobb oldali gélen csak aszkorbáttal gátolva. A bal oldali, duplán gátolt gélen a H_2O_2 oxidálhatta az aszkorbátot, így az nem tudta kifejteni redukáló hatását, emiatt erősebben látszik a Fe-SOD működése (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (H_2O_2 : hidrogén-peroxid; Fe-SOD: vas-szuperoxid-diszmutáz).

A 29. ábra az összes izoformát és azok aktivitását szemlélteti a kontroll növények és a különböző kezelési csoportok esetében. Összesítve látható, hogy a HK csoportban a legmagasabb az aktivitás, ezt követi a HM, majd az M csoport.



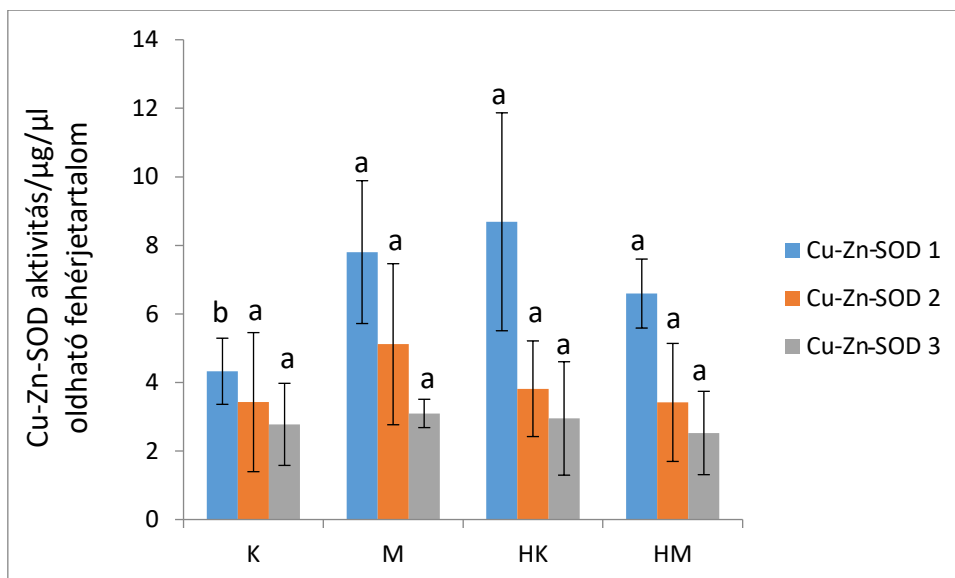
29. ábra A szuperoxid-diszmutáz izoformák aktivitásváltozása levélben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz) (Fe-SOD: vas-szuperoxid-diszmutáz; Cu-Zn-SOD: réz-cink-szuperoxid-diszmutáz; Mn-SOD: mangán-szuperoxid-diszmutáz).

A következőkben izoformákra lebontva mutatom be az eredményeimet. A Fe-SOD enzimből két izoformát sikerült elkülöníteni a natív gélelektroforézis alapján, egy kisebb és egy nagyobb molekulatömegű izoformát (30. ábra). A HK (Fe-SOD 1: $0,711\pm0,231$; Fe-SOD 2: $11,752\pm1,16$) és HM (Fe-SOD 1: $1,228\pm0,742$; Fe-SOD 2: $11,338\pm4,595$) csoport magasabb aktivitást mutat, de a növekedés nem szignifikáns a kontroll növényekben (Fe-SOD 1: $0,596\pm0,388$; Fe-SOD 2: $8,651\pm2,73$) mért adatokhoz képest. Az MMS-kezelt csoportban a kontrollal megegyező értékeket mértem (Fe-SOD 1: $0,539\pm0,085$; Fe-SOD 2: $8,533\pm2,127$).



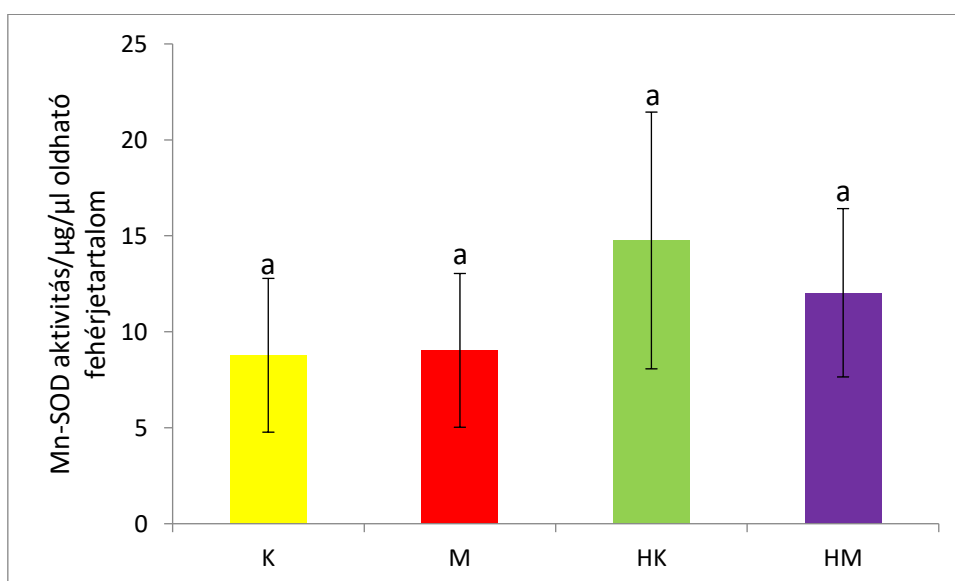
30. ábra A vas-szuperoxid-diszmutáz 1 és 2 izoformák aktivitásváltozása levélben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). A betűk eltérő szignifikancia szintet jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.

A Cu-Zn-SOD enzimből három izoformát találtam a növények leveleiben (31. ábra). Az elsőnél láthatunk jelentős változásokat az M (Cu-Zn-SOD 1: $7,8\pm2,083$), a HK (Cu-Zn-SOD 1: $8,688\pm3,179$) és a HM (Cu-Zn-SOD 1: $6,595\pm1$) csoportokban a kontroll növényekhez képest (Cu-Zn-SOD 1: $4,326\pm0,956$). A második izoforma esetében az M esetében mértem magasabb enzimaktivitást (Cu-Zn-SOD 2: $5,115\pm2,35$), mely azonban nem volt szignifikáns a K (Cu-Zn-SOD 2: $3,425\pm2,029$) a HK (Cu-Zn-SOD 2: $3,816\pm1,395$) és a HM (Cu-Zn-SOD 2: $3,417\pm1,721$) csoporthoz képest sem. A harmadik izoforma esetében pedig egyáltalán nem tapasztaltam változást a kezelések hatására a kontroll csoporthoz képest (Cu-Zn-SOD 3: K: $2,777\pm1,198$; M: $3,095\pm0,413$; HK: $2,95\pm1,654$; HM: $2,53\pm1,23$).



31. ábra A réz-cink-szuperoxid-diszmutáz 1, 2 és 3 izoformák aktivitásváltozása levélben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget mutat 5%-os szignifikancia szint mellett.

A Mn-SOD esetében csak egy izoformát sikerült elkülönítenem (32. ábra). Ennél az enzimnél a HK csoportnál mértem a legmagasabb aktivitást ($14,759 \pm 6,69$), ezt követte a HM csoport ($12,03 \pm 4,386$), de az aktivitásbeli növekedések nem szignifikánsak a kontroll csoportokhoz képest. A kontroll és az MMS-kezelést kapott növényeknél azonos enzimaktivitást mértem (K: $8,776 \pm 4$; M: $9,033 \pm 4$).



32. ábra A mangán-szuperoxid-diszmutáz aktivitás változása levélben (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

A glutation-S-transzferáz (GST) mérés eredményeit már bemutattam a dolgozatban a fenilpropanoid útvonal kapcsán, viszont az enzim sokrétű feladatát lát el, így az antioxidáns védekezőrendszer fejezetben is említést teszek róla, hiszen szerepet játszik a sejtek redox egyensúlyának fenntartásában is. Az enzim génjének expressziós változásait mértem levelekben a következő eredményekkel: M: $0,623 \pm 0,2245$; HK: $3,85 \pm 0,8$; HM: $1,152 \pm 0,168$ (20. ábra). Az enzim génexpressziós változása egybeesik az általam mért antioxidáns enzimek által mutatott expressziós és/vagy aktivitás változásokkal, miszerint a csak hidegkezelést kapott csoportoknál a legmagasabb génexpresszió vagy az enzimaktivitás, kivételt a glutation-reduktáz enzimaktivitásánál tapasztaltam, de szignifikáns különbség ebben az esetben nem volt a kezelések között.

5. Az eredmények értékelése

5.1 A fotoszintézis folyamatához köthető változások

Kutatómunkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy az MMS-előkezelés milyen mértékben és hogyan csökkenti a hidegstressz hatására végbemenő károsodások mértékét kukorica csíranövényekben. A kutatás során szerettem volna feltérképezni az MMS hatásmechanizmusát, milyen változásokat idéz elő a növények anyagcsere-folyamataiban, továbbá miképpen járulhat hozzá az esetleges akklimációhoz.

Fontosnak tartottam vizsgálni a növények fiziológiai állapotát, melynek egyik indikátora a fotoszintézis hatékonysága. A PSII aktuális kvantumhatékonysága képet adhat az elektrontranszportlánc működéséről. Az alacsony hőmérséklet szignifikánsan csökkentette a paraméter értékét, az MMS-előkezelte növényeknél ezzel szemben kevésbé esett vissza, kisebb volt a károsodás mértéke (6. ábra). Az MMS hatását korábban még nem vizsgálták hidegkezelte kukoricákon, ezzel szemben a kiindulási komponens, az SMM-et már alkalmazták (Kósa és mtsai. 2011; Páldi és mtsai. 2014). Ezen publikációk az SMM jótékony hatásáról számoltak be, miszerint az előkezelés következtében kisebb volt a fotoszintézis folyamán bekövetkező károsodások mértéke. Ez a pozitív eredmény valószínűleg a membránvédő hatásában rejlik, mely a tilakoid membránok védelmére is kihathat, így segíthet megőrizni a PSII reakciócentrumok integritását, és más, a membránokban lokalizált nagyméretű proteinkomplexek épségét. A szalicilsav kis koncentrációban alkalmazva szintén segíti a hidegstresszhez való alkalmazkodást (Horváth és mtsai. 2007; Hayat és mtsai. 2010). Továbbá exogén módon 10^{-5} M koncentrációban adagolva kimutatták, hogy növelte a nettó fotoszintetikus rátát (Fariduddin és mtsai. 2003). Az eredményeimből kiindulva és az irodalmi adatokra támaszkodva láthatjuk az MMS jótékony hatását, amely lehet az SMM membránvédő és a SA nettó fotoszintézis növelő hatásának együttes eredménye. Maga az MMS-kezelés hidegstressz nélkül nem befolyásolta a PSII aktuális kvantumhatékonyságát.

A PSII reakciócentrumhoz tartozó nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok paramétereiből szintén következtethetünk a hideg által indukált károsodások mértékeire a fotoszintetikus apparátusban. Hendrickson publikációja alapján (2005) az abszorbeált fény elvezetésére négy lehetőség van, amelyből csak egy fordítódik magára a fényenergia hasznosulására, ez a Φ_{PSII} : az aktív PSII reakciócentrumok fotokémiai hatékonysága, a másik három paraméter a többlet abszorbeált energia elvezetésére szolgál. Ezek a paraméterek az alábbiak: Φ_{NPQ} : fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás; $\Phi_{f,D}$: fluoreszcencia és konstitutív hődisszipáció;

Φ_{NF} : inaktiválódott PSII RC-ok energiadiSSIPációja. Az aktív PSII RC-ok hatékonysága – ahogyan az várható volt – jelentősen lecsökkent a hidegkezeléseket követően (7. ábra), viszont az MMS-előkezelés pozitív hatása itt is megmutatkozik, ahogyan a PSII aktuális kvantumhatékonysága esetében is. A kioltási paraméterek a Φ_{PSII} -vel fordítottan arányosan nőnek. Ami szembetűnően növekszik, az a Φ_{NF} paraméter, ami az inaktív reakciócentrumok energiakibocsátása. Ennek oka lehet, hogy a D1 proteinek degradálódnak a RC-ban, így nem képesek ellátni többé a funkciójukat és mint egy kioltó központként működnek tovább. Ez a folyamat gyakori a fénygátlásnál, amikor az abszorbeált fényenergiát nem képes a növény elvezetni az elektrontranszportlánc által (Banerjee és Roychoudhury 2019, Kato és mtsai. 2015 Takahashi és Murata 2008). Az MMS-előkezelt növényeknél kevésbé nőtt meg a Φ_{NF} értéke. Ha már bekövetkezett a károsodás, a PSII-nek léteznek javító mechanizmusai, ilyen lehet a D1 fehérje *de novo* szintézise (Li és mtsai 2018). A megnövekedett ROS-szintézis viszont gátolhatja ezt a folyamatot, így maga az antioxidáns védekezőrendszer jelenléte is fontos szerepet játszik a károsodások csökkentésében (Takahashi és Badger 2011). Ezért is tartottam fontosnak az antioxidáns enzimek vizsgálatát a munkámban. Hidegstresszt követően szintén növekedést tapasztaltam a $\Phi_{f,D}$ paraméter esetében, az MMS-előkezelésnek köszönhetően ez a kioltási paraméter is kisebb volt. Azonban a Φ_{NPQ} , azaz a fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás esetében nem tapasztaltam változást a kontroll csoport és a kezelt csoportok értékei között. A Φ_{NPQ} paraméterhez kapcsolódó zeaxantin-epoxidáz enzim génexpressziós működését szintén megvizsgáltam (8. ábra), annak érdekében, hogy magyarázatot kapjak arra, miért nem tapasztaltam változást a Φ_{NPQ} értékében egyik kezelés esetében sem. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc nem megfelelő működése következtében a tilakoid lumen pH-ja lecsökken, amely savasodás előidézi a violaxantin zeaxantinná való átalakulását, mely molekula gyökkioltó funkcióval rendelkezik. Ezek a molekulák az LHCII fénygyűjtő komplexben vannak jelen. Reverzibilis folyamat révén, a zeaxantin-epoxidáz katalizálja a violaxantinná való visszaalakulást (Kress és Jahns 2017). Az enzim génjének expressziója emelkedett már az MMS-kezelést, a hideg- és kombinált kezeléseket követően egyaránt. A microarray adatok alapján a zeaxantin-epoxidáz génexpressziós mintázata hasonló. Az emelkedett génexpresszióból arra következtek, hogy ez a folyamat is részt vehetett a többlet energia elvezetésében, de a mérés pillanatában már nem dominált, hiszen a zeaxantin-epoxidáz megnövekedett expressziója arra utal, hogy a zeaxantin ismét violaxantin formájában van jelen a fénygyűjtő komplexekben.

Az MMS-előkezelés jótékony hatása megmutatkozik a fotoszintézis esetében, miszerint magasabbak a Φ_{PSII} értékei, és alacsonyabbak a nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok paramétereinek az értékei, mint a csak hidegkezelést kapott növényekben. Az MMS-kezelésnek hidegstressz nélkül ismételtén nem volt hatása a nem-fotokémiai kioltási paraméterekre. Vírusfertőzött (MDMV) kukoricáknál már kutatták az MMS-előkezelés hatásait, a stresszor jelenléte szintén negatívan befolyásolja a fotoszintézis folyamatát, ha lehet mondani még drasztikusabban. Az MDMV vírus replikációja részben a kloroplasztiszhoz kötött, ahol sérülnek a tilakoid membránok, emiatt csökken a fotoszintetikus elektrontranszportlánc hatékonysága is, amely nem képes ellátni a funkcióját, ezzel együtt pedig nőnek a nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok értékei. Az MMS-előkezelés hatására csökken a vírusmennyiség, emiatt funkcióképesebb fotoszintetikus apparátus volt megfigyelhető a növényekben (Ludmerszki és mtsai. 2017). Továbbá Janda és munkatársai (2017) is vizsgálták az MMS-előkezelés hatását sóstressznek kitett búza növényeken. Eredményeik alapján az előkezelt növényeknél kisebb volt a károsodás mértéke a PSII-ben.

Hidegstressz hatására csökken a fotoszintetikus aktivitás, ebből kiindulva szerettem volna megvizsgálni, hogy ez a jelenség együtt jár-e a klorofilltartalom csökkenésével. A méréseim során nem tapasztaltam jelentős változást metabolit szinten, sem az összes klorofilltartalomban (9. ábra), sem pedig külön vizsgálva a klorofill-a és klorofill-b tartalmat. A folyamat génszintű vizsgálatához a validált microarray kísérlet eredményeit felhasználva mértem a klorofill-bioszintézis útvonalán bekövetkező génexpressziós változásokat. A metabolit vizsgálattal ellentétben, génexpressziós szinten már sikerült változásokat detektálnom a hidegkezelések hatására (7. táblázat). Négy gént sikerült azonosítani az útvonalról, melyek szignifikáns változást mutattak. A *porfobilinogén-deaminázt*, az *uroporfirinogén III-dekarboxilázt*, a *protoporfirinogén IX-oxidázt* és a *divinil-klorofillid-reduktázt*. A négy gén lefedi a bioszintézist, a *porfobilinogén-deamináz* az útvonal kezdeti szakaszán található, az *uroporfirinogén III-dekarboxiláz* és a *protoporfirinogén IX-oxidáz* az útvonal középső szakaszán, a *divinil-klorofillid-reduktáz* pedig a végszakaszon működik. Összességében a *divinil-klorofillid-reduktáz* kivételével, minden génnél az MMS-előkezelt növényeknél volt a legmagasabb az expresszió. A *divinil-klorofillid-reduktáz* esetében pedig közel azonos volt a HK és HM csoport expressziós növekedése. Ez arra enged következtetni, hogy bioszintézis elágazhat más tetrapirrol származékok szintézise felé, hiszen a négy gén közül egyedül a *divinil-klorofillid-reduktáz* elköteleződött enzim a klorofill-bioszintézis irányában. A *protoporfirinogén IX-oxidázt* qRT-PCR technikával is vizsgáltam, az eredmény korrelál a

microarray vizsgálat eredményével. Az MMS-kezelés hideg nélkül nem okozott génexpressziós változást az útvonalon. A klorofill mennyiségében nem találtam jelentős változásokat, ezzel ellentétben a bioszintézis útvonalán levő enzimek génexpressziója emelkedett. Vavilin és Vermaas (2002) összefoglalója részletesen leírja a bioszintetikus útvonalat és a lehetséges szabályozási lépéseket. Maguk az enzimek a kloroplasztisban találhatóak, a burkoló membránhoz kötötten vagy a sztrómában. A szintézis utolsó lépése, az észterifikáció a tilakoid membránhoz kötötten történik, ezért is fontos a membránok védelme. Ebben a kiindulási vegyületnek, az SMM-nek a membránvédő hatása fontos szerepet játszhat. A bioszintézist nagymértékben befolyásolja a fény intenzitása és eloszlása, ugyanis hatnak a fehérje-pigment komplexek mennyiségére. A szabad klorofilok, amik lehetnek prekursor vagy már degradálódott molekulák, negatívan hatnak vissza a bioszintézisre, így a klorofilkötő fehérjék és a klorofilok szintézisének összhangban kell lennie. A mennyiségi változásokat befolyásolja a molekulák érési ideje, illetve hogy stabilan kötődjenek a PSII RC-hoz, ami egy nem stabil kapcsolat, abban az esetben, ha a D1 protein degradálódása fokozódik a hidegstressz következtében. A klorofill-a/b arány megváltozása is árulkodó lehet, hiszen magas fényintenzitáson a klorofill-b átalakul klorofill-a-vá, ugyanis a növénynek előnyös, ha kisebb a fénygyűjtő komplex, és ezzel arányosan nő a RC-ok mérete, amihez több klorofill-a-ra van szükség (Liu és mtsai. 2012b). Úgy gondolom, 24 órás hidegstressz még nem feltétlenül elég a metabolit szinten történő változáshoz, vagy ha fehérje-klorofill komplexek már sérültek is a hideg hatására, még a teljes degradáció nem következett be. Továbbá elképzelhetőnek tartom azt is, hogy rövidtávú hidegkezelés esetén még nem teljesül a negatív vissz szabályozás, hanem a növény megpróbál kompenzálni a növekedett anyagcserével. Mindemellett a poszttranszkripciós szabályozás lehetőségeit sem zárhatjuk ki, mely szintén magyarázatul szolgálhat arra, hogy a klorofillszintézisben résztvevő enzimek génexpressziója növekedett, azonban nem detektáltunk ezzel összhangban lévő magasabb klorofill-metabolit tartalmat. Szalai és munkatársai (2018) szintén vizsgálták a fotoszintézis folyamatát és a klorofill mennyiségi változását 4 napig tartó hidegstressz esetén, melyet egy edzőési fázis előzött meg (3 nap 15/13 C°). Kísérleteik során vizsgálták a fény hidegakklimációban betöltött szerepét. Eredményként tapasztalták, hogy a hidegstressz szignifikánsan csökkentette a klorofilltartalmat, azonban azt is kimutatták, hogy a stresszválaszában meghatározó a csíranövény állapotban jelenlévő fényintenzitás is.

Fotométerrel vizsgáltam az összes karotin- és xantofilltartalom mennyiségét is (11. ábra). A mérés alapján nem találtam szignifikáns különbséget a kezelési csoportok között. A

karotinmolekulák a fénygyűjtő komplexben a klorofillmolekulák mellett lokalizáltak, fontos szerepet játszanak a többlet abszorbeált fény hő formájában való kibocsátásában, melyet a fotoszintetikus elektrontranszportlánc már nem képes hatékonyan elvezetni. Ennek egyik formája lehet, hogy a karotinmolekulák átveszik a gerjesztett triplet klorofillmolekulák gerjesztési energiáját (Kirilovsky 2015). A xantofillciklus molekulái szintén a karotinoid bioszintézis útvonalán keresztül keletkeznek, és a már korábban leírt folyamatban a nem-fotokémiai kioltó paraméterek közül a fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltásnak a kulcsmolekulái (Jahns és Holzwarth 2011). Ahogyan korábban említést tettem róla, nem találtam szignifikáns különbséget a karotinoidtartalomban a kontroll csoport növényei és a különböző kezelést kapott növények között. Ez az eredmény összefügghet azzal, hogy magában a fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú nem-fotokémiai kioltás paraméterében sem találtam szignifikáns különbségeket, amelyből szintén arra következtettek, nem ez a domináns folyamat a mérés pillanatában, hanem az inaktív RC-ok energiakibocsátása. Ezenfelül a jövőben érdemes lenne vizsgálni a különböző xantofill molekulák eloszlását is. Az eredmények alapján az MMS-előkezelte növényeknél kisebb mértékű volt a PSII-ben bekövetkező károsodás, amely következhet a vegyület membránvédő hatásából.

5.2 Membránpermeabilitás-változás

Számos publikáció foglalkozik a hidegstressz hatásaival, annak érzékelésével és jelátvitelével, amelyben fontos szerepet játszik a membránok szerkezeti megváltozása. A közelmúltban azonosították a COLD1 transzmembrán fehérjét, melynek szerepe lehet a hideg érzékelésben és a kalciumcsatornák aktivitásában, ezáltal a jelátvitelben (Zhu 2016). Alacsony hőmérsékleti stresszor hatására nő a membránok rigiditása, és ezzel együtt az ionok kiáramlása. Ennek okán is nélkülözhetetlen a membránok védelme. Szalai és munkatársai (2018) kukoricákban már 15 °C-os hőmérséklet esetén is igazolták, hogy közel háromszorosára emelkedett az ionkiáramlás mértéke, mely paraméter szintén jó indikátora lehet a növények fiziológiai állapotának felméréséhez. A mérés során Rácz és munkatársai (2008) publikációjára is támaszkodtam, akik korábban vizsgálták a kiindulási vegyület, az SMM-előkezelés hatását a membránintegritásra. Kutatásuk során szintén azt találták, hogy az SMM-előkezelés csökkentette az ionkiáramlást, levelekben és gyökerekben egyaránt. Az általam kivitelezett kísérletekben szintén azt az eredményt kaptam, hogy levelekben a hidegstresszt követően 1 és 2 órával lemérve az ioneffluxot, a HK csoportban szignifikánsan magasabb volt a paraméter

értéke, míg az MMS-előkezelést kapott növények a kontroll növények értékeivel megegyező ionkiáramlást mutatnak. A 3. és 4. óra letelte után még mindig a HK csoportban a legmagasabb ionefflux, de a különbség már nem jelentős a többi csoporthoz képest (12. ábra). Így feltételezhetjük, hogy az MMS hordozza a kiindulási vegyület membránvédő hatását, hiszen minden mérési pillanatban alacsonyabb volt az ionefflux, ezáltal a membránkárosodás az MMS-sel előkezelt növényekben.

5.3 Génexpressziós változások a microarray vizsgálat alapján

Szerettünk volna egy átfogó képet kapni az MMS hatásáról génexpressziós szinten, így kutatócsoportunk elvégzett egy microarray vizsgálatot, ami teljeskörű képet adhat a kukoricákban végbemenő transzkriptomikai változásokról. A vizsgálat alapján több mint 4000 génnél találtunk legalább kétszeres expressziós változást 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A microarray kísérlet eredményeit qRT-PCR technikával validáltuk. A regressziós vizsgálat alapján a két kísérletből származó expressziós adatok jól korrelálnak egymással (14. ábra). A validáláshoz olyan géneket használtunk fel, amelyek alapvetően nagy változást mutatnak, ezenfelül köthetők a hidegstresszhez, a szignalizációhoz, vagy az alkalmazkodáshoz, például a poliaminok vagy fenilpropanoidok szintézisében résztvevő gének. A gének listája a 4. táblázatban látható. A validálás során 13 gént használtunk fel, melyből 9 gén mérését végeztem el én, így a következőkben csak ezeknek az eredményeit elemzem. A microarray és a qRT-PCR vizsgálatok eredményeit a 13. ábra szemlélteti, amelyen látható, hogy a génexpressziós mintázatok hasonlóak, azzal a különbséggel, hogy qRT-PCR technikával magasabb expressziós változásokat kaptam (13. ábra, A). Ennek oka a módszer érzékenyebb mivoltában rejlik. Az általam vizsgált gének között a szignalizációban fontos szerepet betöltő ICE1 és a DREB1 transzkripciós faktorok génjeit is vizsgáltam. A sérült membránokon keresztül érzékeli először a növény a hidegstressz káros hatását. Majd jelátviteli útvonalon keresztül aktiválódik az ICE1 transzkripciós faktor, mely aktiválja a soron következőt, a DREB1-et, mely hozzákötődik a *COR* gének promóteréhez, aktiválva azt (Chinnusamy és mtsai. 2007). Hidegkezelt és kombinált kezelést kapott növényekben is több mint 10-szeresére emelkedett az *ICE1* génexpressziója, ami összefüggésben lehet a membránok sérülésével (15. árba). Hidegkezelt növényekben a *DREB1* gén kifejeződése kiugróan magas emelkedést mutat, ezzel szemben az MMS-előkezelt csoportban alacsonyabb a génexpresszió, azonban még így is érzékelhető a hidegstressz okozta károsodás a növényekben, és az erre adott válaszreakció. Hidegstressznél

a szignalizáció során alapvetően az ABA-független DREB1 útvonal aktiválódik, a DREB2 útvonalát pedig inkább a só- és szárazságstressz indukálja (Agarwal és mtsai. 2006). A validálás során kiválasztottam még olyan stresszválaszhoz köthető géneket, mint a fenilpropanoid útvonal génjei: *izoflavon-2'-hidroxiláz*; *flavanon-3-hidroxiláz*; *antocianidin-3-O-glikoziltranszferáz*.

A microarray vizsgálat validálását követően az abból származó génexpressziós értékeket elfogadhatónak tekintettem. A vizsgálat alapján 4112 génnél találtunk szignifikáns változást, az eredményeket Venn-diagram szemlélteti, ahol az összehasonlításban az alábbi csoportok párosításai szerepelnek (16. ábra) K-M; K-HK; K-HM. A Venn-diagram használata igencsak elterjedt ha a különböző kezelési csoportokban vagy különböző fajtákban szeretnénk összehasonlítani a génexpressziós mintázatot (Majláth és mtsai. 2012; Pál és mtsai. 2018). A korábbi eredményekből kiindulva nem meglepő, hogy a K-M összehasonlítás hozta a legkisebb különbséget. A hidegkezelés és a kombinált kezelés hatására már jóval nagyobb számban detektáltunk változást a génexpresszióban.

A MMS-előkezelés további hatását az AgriGO 2.0 verziójú szoftverrel vizsgáltam, amely a géneket funkció és lokalizáció alapján GO kategóriába sorolja be. Ezek alapján három nagy csoportba sorolja a géneket: *biológiai folyamatok*, *sejtkomponens* és *molekuláris funkciók* alapján. A szoftver általi kiértékeléshez szintén a microarray adatsort használtam fel 5 %-os szignifikancia mellett, a K-HM párosításban. A *biológiai folyamatok* közül a leginkább szembetűnő a stimulusra adott válaszreakcióban bekövetkezett változás. Mely magába foglalja a stresszorra adott válaszreakciót és a kémiai stimulánsra, mint a külső ingerre adott válaszreakciót, melyek mind a kombinált kezelés együttes hatásai a növényekben (17. ábra). A *sejtkomponensek* esetében szintén nagy változások következtek be a kombinált kezelésekre hatására, ezek közül a sejtfalat, a plazmamembránt, a peroxiszómát, a citoszólt, a vakuólumot, az endoplazmatikus retikulumot, a fotoszintetikus membránokat, a mitokondriumot, a Golgi apparátust és a sejtmagot emeltem ki. Összességében elmondható, hogy minden sejtkompartmenthez kapcsolható génexpressziós mintázatban jelentős változás megy végbe, ami alapvetően a hidegstressz és arra adott válaszreakciónak köszönhető (18. ábra). A sejtfal és a plazmamembrán fehérjeihez köthető génexpressziós változás nem meglepő, hiszen a hidegstressz érzékelésében elengedhetetlen szerepet játszanak ezek a komponensek. A membrán fluiditásának megváltozásáról biztosan tudjuk, hogy komoly szerepe van a hideg érzékelésében. Hidegstressz esetén megnő a telítetlen zsírsavak aránya a deszaturázok enzimaktivitás-növekedésének köszönhetően, ami az endoplazmatikus retikulumra is jellemző.

A megnövekedett kettős kötésekkel próbálja a növény fenntartani a membránok rugalmasságát, fluiditását (Heidervand és Amiri 2010). A mitokondriumhoz és a peroxisómához köthető fehérjék génaktivitás is változott, aminek a másodlagosan kialakuló oxidatív stressz állhat a hátterében és az ezek eliminálásában résztvevő antioxidáns védekezőrendszer. A kloroplasztiszban szintén magas a kockázata a ROS-ok kialakulásának, ebben a kompartmentben szintén több típusú antioxidáns enzim jelen van, melyek génexpressziója szintén növekedhet stresszorok jelenlétére (Mittler és mtsai. 2004). Az eredmények alapján hidegstressz esetén az antioxidáns védekezőrendszer fokozott működését tapasztaltam, génexpressziós és enzimaktivitás szinten is (25., 26., 27., 29., 30., 31., 32. ábra). A sejtmaghoz is számos génexpressziós változás köthető, ami szintén nem okoz meglepetést, hiszen a hidegakklímációhoz elengedhetetlen a génexpressziós szintű alkalmazkodás. A plazmamembrán rigiditása indukálja a *COR* (cold responsive) gének expressziós növekedését, amelyek hozzásegítik a növényeket a hideg tolerálásához (Chinnusamy és mtsai. 2007). Részletesebben megvizsgáltam a fotoszintetikus membránhoz kötött gének változását. A GO annotálás és a microarray adatsor alapján sikerült több gént is azonosítani és génexpressziós változást hozzárendelni. Irodalmi adatok és a saját eredményeim alapján választottam ki ezt a GO funkciós csoportot, melynek eredményei a 8. táblázatban láthatók. Sobkowiak és munkatársai (2016) is szerették volna megismerni kukoricában a hidegakklímáció genetikai hátterét, szintén kiviteleztek egy microarray vizsgálatot, majd az eredményeken GO analízist végeztek. Ehhez két hidegérzékeny és egy toleráns beltenyésztési vonalat vizsgálták. Összességében azt tapasztalták, hogy mindhárom fajtában csökkentek azon gének expressziója, amelyek a redox egyensúlyhoz és a fotoszintézis folyamataihoz köthetők. A fotoszintetikus membránhoz rendelhető gének között az alábbiakat azonosítottam: *klorofill a/b-kötő apoprotein CP26 prekurzor* NP_001105374.2; *klorofill a/b-kötő protein* NP_001130616.1; *NADH-dehidrogenáz 4L alegység* NP_043089.1; *PSII 29-es alegység* NP_001105502.1 (8. táblázat). Ezen gének esetében eredményeim alapján magam is csökkenést tapasztaltam az expresszióban, leginkább azoknál a kezelési csoportoknál, amelyek hidegstressznek voltak kitéve. A klorofill-a/b kötő fehérjék közé tartoznak az antenna komplexet, és a reakciócentrumot felépítő fehérjemolekulák. Az Lhcb fehérjék a PSII körül elhelyezkedő antenna komplex részei, míg az Lhca fehérjék a PSI fénygyűjtő rendszerét alkotják (Pietrzykowska és mtsai. 2014). A klorofill-a/b kötő proteinek szintézise alulszabályozott, melynek oka lehet a fénygátlás, ami a hidegstressz gyakori következménye, melynek következtében károsodik a PSII. A fiziológiai mérésekből már következtettünk a PSII D1 proteinjének a károsodására. Fénygátlás folyamata során gyakori, hogy a PSII-höz tartozó

fénygyűjtő antenna komplex mérete lecsökken, ennek részei a CP29 és CP26 fehérjék is, amelyek a nagyobb Lhcb fehérjék és a reakciócentrum körül helyezkednek el (Takahashi és Badger 2011). Az antenna komplex lecsökkentésével, illetve, ha kevesebb klorofill-b molekula van jelen a rendszerben, csökkenthető az abszorbeált fényenergia mennyisége. Valószínűsíthetőleg ez a folyamat állhat a háttérben a klorofill-a/b fehérjék, ill. CP29 és CP26 szabályozásának is. A NADPH-dehidrogenáz egyik alegységének génje szintén alulszabályozott, ennek háttérben megint csak a fotoszintetikus elektrontranszportlánc csökkent működése állhat. A NADP a fényszakasz utolsó lépésében redukálódik és a Calvin-ciklus működéséhez elengedhetetlen, a NADPH-t a folyamatban a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz használja fel. Stressz esetén a ciklikus elektrontranszportlánc működése megnő, ez esetben a PSI-ről az elektron visszakerül a citokróm_{b6/f} komplexre és nem jut el a fényszakasz utolsó lépéséig az elektron. Ennek több oka is lehet, ha a komponensek már redukált állapotban vannak, nem képesek elektront felvenni, illetve a lineáris elektrontranszportlánc ha nem működik megfelelően – ahogy méréseim alapján is csökkent a működése – felborul az ATP:NADPH arány, ezeket a kompenzálja ciklikus elektrontranszportlánc. Továbbá a ciklikus elektrontranszportlánc működésének következménye, beindítani az NPQ folyamatait, amelyhez szükséges a megfelelő pH (Joliot és Johnson 2011).

A korábbiakkal ellentétben, a kloroplasztiszhoz rendelt GO kategóriában emelkedést tapasztaltam a *lipoxigenáz11* gén aktivitásában, a gén a jazmonsav szintézisében játszik szerepet, ami leginkább biotikus, de abiotikus stresszeknél is fontos jelátviteli molekula. Bioszintézisének kezdeti lépései a kloroplasztiszban történnek (Wasternack 2014). A *LOX11* a 13-lipoxigenáz enzimet kódolja, ami az alfa-linolénsav továbbalakulását katalizálja a jazmonsav kialakulása felé. A microarray validálása során a *LOX2* gént is felhasználtuk, ami nagymértékű génextpressziós növekedést mutatott a vizsgálat során (13. ábra). A gén a 9-lipoxigenáz enzimet kódolja, ami az alfa-linolénsav egyik kettős kötését oxidálja. Az enzim aktivitása többek között patogének jelenlétekor emelkedik (Woldemariam és mtsai. 2018). Összességében elmondható, az alfa-linolénsav és az abból kialakuló molekulák fontos szerepet játszanak az abiotikus és biotikus stresszek elleni védelemben.

A molekuláris funkciók GO kategória esetében kisebb volt a mintázatváltozás, itt többek között a glutation-S-transzferáz aktivitásában, az S-adenozil-metionin függő metiltranszferáz aktivitásában mutatott változást a HM csoport a kontroll csoporthoz képest (M3. táblázat). A glutation-S-transzferáz szerepet játszik egyes metabolitok, például flavonoidok stabilizálásában

és vakuólumba való szállításában. A flavonoidok hozzájárulnak a hidegakklímáció kialakulásához, így szintén számíthatunk a gén aktivitásának növekedésére (Dixon és mtsai. 2002). Továbbá kukoricában is azonosították a GST1 izoformát, és kimutatták, hogy génexpressziója növekszik magas H₂O₂ koncentráció esetén, ebben az esetben antioxidáns szerepe is lehet (Polidoros és Scandalios 1999). Az S-adenozil-metionin függő metiltranszferáz aktivitás növekedése magyarázható a külsőleg adott SMM-mel, a vegyületről tudjuk, hogy szerepet játszik a kén-anyagcserében közvetlenül, emellett a fehérje-anyagcserét is befolyásolja közvetetten az SMM-cikluson keresztül (Bourgis és mtsai. 1999).

Összegezve a Venn-diagramm ábráján (16. ábra) láthatjuk a génexpressziós mintázatban bekövetkező változásokat a kezelések hatására, az AgriGO v2.0 szoftver erről ad egy pontosabb képet, hogy milyen funkciókban történtek aktivitásbeli változások, de a gének konkrét felül- vagy alulszabályozását a microarray adatsorból, illetve qRT-PCR technikával mért génexpressziós mérésekből ismerhetjük meg.

5.4 Fenilpropanoid útvonal

A fenilpropanoid útvonalon számos másodlagos anyagcseretermék képződik, melyeknek szerepük lehet a stresszorok okozta károsodások kivédésében. Különböző stresszorok megjelenésekor már bizonyított, hogy emelkedik a növényekben a flavonoidtartalom, a folyamat hátterében az esetek nagy százalékában a másodlagosan jelentkező oxidatív stressz állhat. A keletkező reaktív oxigénformák eliminálásban pedig komoly szerepet játszhatnak a flavonoidok (Hernández és mtsai. 2009). Irodalmi adatok alapján a flavonoid származékok közül, leginkább az antociánoknak írták le azon tulajdonságát, hogy képesek lehetnek elvezetni a többlet gerjesztési fényenergiát a fotoszintézis során (Hernández és Van Breusegem 2010). Hidegstressz esetén pedig gyakori a fotoinhibíció és az oxidatív stressz, ezen eredményekre alapozva magam is számítottam a hidegkezelt kukorica növényekben a fenilpropanoid útvonal génexpressziós növekedésére és a metabolitok mennyiségi emelkedésére.

A qRT-PCR alapú génexpressziós vizsgálatoknál 4 különböző enzim génjének expresszióját vizsgáltam (19. ábra), melyek lefedik a bioszintézis útvonalát a kezdeti szakaszától az antociánok képződéséig. Az első általam vizsgált gén a *fahéjsav-4-hidroxiláz*, ami a fahéjsav p-kumársavvá való alakulását katalizálja. A gént már korábban is vizsgálták kukoricában (*Zea mays* L. cv. Norma) hidegstressz esetén, azonban a kiindulási komponenssel, az SMM-

előkezeléssel kombinálva. A vegyületet a csírázástól számított 9. napon 24 órán keresztül a tápoldathoz adták $0,001 \text{ g/dm}^3$ koncentrációban. Szintén tapasztalták, hogy az SMM serkentőleg hat a *C4H* expressziójára 24 órás hidegkezelést követően. A kombinált kezelés hatására közel 70-szeresére nőtt a génexpresszió ($69,07 \pm 10,76$), ezzel szemben a csak hidegkezelést kapó növényeknél kisebb mértékű génexpresszió növekedést detektáltak ($24,26 \pm 3,88$) (Páldi és mtsai. 2014). Az eredményeim szintén azt mutatják, hogy maga a hidegkezelés is emelte a génexpressziót (HK: $10,194 \pm 2,182$), azonban a kombinált kezelés esetében ez az emelkedés még jelentősebb volt (HM: $14,634 \pm 1,441$). Habár mindkét kísérlet során láthatjuk az SMM és az MMS stresszvédő hatását, a kiindulási vegyület esetében a változások nagyobb mértékűek voltak. Ennek oka lehet, hogy a kísérlet során eltérő fajtájú kukoricákat vizsgáltunk, illetve az SMM és MMS közötti különbségekből is származhatnak. Így annak érdekében, hogy feltárjuk az eltéréseket, a jövőben fontos lenne vizsgálni, a növények hogyan és mennyire hatékonyan veszik fel a tápoldatból a vegyületeket, hogyan szállítják azokat, és pontosan hogyan befolyásolja az anyagcsere folyamatokat az SMM és az MMS. Az exogén SA-kezelés növelte az endogén SA szintézisét, hiszen maga a SA is a sikimisav-fenilpropanoid útvonalon keresztül képződik magasabbrendű növényekben (Horváth és mtsai. 2007). Ebből kiindulva a jelátvitelre komoly befolyással lehet egy olyan külsőleg adott molekula, ami tartalmazza a SA-at. A molekula hatását hidegstresszel kombinálva is vizsgálták, többek között Chen és munkatársai (2006), akik a fenilalaninból fahéjsavvá való átalakulást katalizáló PAL enzimet vizsgálták, ami szintén az útvonal kezdeti szakaszán működik akár csak a *C4H*. Kísérleteiket szőlőn végezték (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) és ugyancsak azt tapasztalták, hogy a szalicilsavval való előkezelés ($150 \mu\text{M}$ -os, 30 percig tartó infiltráció a bogyókban) hatására kétszeresére nőtt a fenilpropanoid útvonalon található PAL enzim aktivitása 16 és 24 órás hidegstresszt követően, ezenfelül kimutatták, hogy a szalicilsav a PAL aktivitását mRNS-ek átíródásán és új PAL proteinek szintézisének keresztül indukálja. Mindemellett a szalicilsavval előkezelte bogyókban az összfenoloid-tartalom is közel a duplájára növekedett. Az irodalmi adatokból kiindulva azt feltételezhetjük, ha a két alapkomponeus, az SMM és a SA is serkentették a fenilpropanoid útvonal kezdeti szakaszán található gének expresszióját, akkor a két vegyületből kombinált vegyület, az MMS esetében szintén erre az eredményre számíthatunk. A következő általam vizsgált gén a *kalkon-szintáz* volt, amelynek az expressziós növekedését rövidtávú hidegkezelést követően már régen publikálták kukorica csíranövényekben (Christie és mtsai., 1994). A CHS kulcsenzim a flavonoidszintézisben, az enzim 1 molekula p-kumaroil-CoA-ból és 3 molekula malonil-CoA-ból állít elő naringeninkalkont, ami fontos közbülső termék a flavonoidok szintézisének során (Napoli és mtsai. 1990,

Saito és mtsai. 2013). Kutatócsoportunk szintén vizsgálta az enzim génextpresszióját SMM-előkezelés és hidegkezelés növényeken 24 órás hidegkezelést követően. A mérés során, ahogy a *C4H* esetében is, a 9 napos kukoricák (*Zea mays* L. cv. Norma) tápoldathoz 24 órán keresztül exogén módon $0,001 \text{ g/dm}^3$ koncentrációban alkalmazták az SMM-et a hidegstresszt megelőzően. A *CHS*-nél is azt tapasztalták, a hidegstressz önmagában is növelte a génextpressziót ($5,9 \pm 0,92$), de a kombinált kezelések hatására még emelkedettebb volt a génextpresszió mértéke ($10,09 \pm 0,86$) (Páldi és mtsai. 2014). Az MMS-előkezelés következtében szintén ezzel megegyező eredményt kaptam (19. ábra), a kombinált kezelés szignifikáns növekedést eredményezett (HM: $10,448 \pm 2,05$), amíg a csak hidegkezelés növényeknél ez a növekedés mindössze közel kétszerese volt (HK: $1,724 \pm 0,082$). A *CHS* gén expressziós növekedésében a hidegkezeléseknél láthatunk különbségeket, ami feltételezhetőleg az eltérő kukorica fajtákból adódik. A következő általam vizsgált enzim a flavanon-3-hidroxiláz volt, amelynek mRNS-szintje jelentősen növekedett. Az enzim a naringenin tovább alakulását katalizálja dihidrokaempferollá. Az irodalmi adatok alapján, qRT-PCR technikával végzett vizsgálat során, a búza növények (*Triticum aestivum* L. cv. Mv Emese) tápoldathoz adott, egynapos $0,5 \text{ mM}$ SA-kezelés közel negyvenszeresére stimulálta levelekben a *F3H* expresszióját. Az eredmények igazolják a SA, mint szignalizációs molekula szerepét (Gondor és mtsai. 2016). A fenilpropanoid útvonalról, az általam vizsgált enzimek közül az *F3H* gén mutatta a legkiemelkedőbb expressziós növekedést. A másik alapkomponeus, az SMM hatását korábban még nem vizsgálták a *F3H* expressziójára, így csak a saját eredményeimre és a SA-kezelést leíró irodalmi adatokra támaszkodhatok. Az *F3H* mRNS-szintje már csak az MMS-sel való kezelés következtében is növekedett, akárcsak Gondor és kollégái (2016) eredményei alapján, a SA-kezelést követően. A kombinált kezelés hatására azonban már több mint hetvenszeres volt a génextpresszió a kontroll csoporthoz képest. Ezenfelül arra vonatkozólag is vannak adatok, hogy a SA-előkezelés milyen hatást idéz elő hidegkezeléssel kombinálva kukoricákon. A publikáció alapján a SA-előkezelés csökkentette a hideg által bekövetkező károsodásokat, amit leginkább az antioxidáns védekezőrendszer változásain keresztül írtak le (Janda és mtsai. 1999). A fenilpropanoid útvonalon szintén számos vegyület képződik, amelyek részt vesznek az oxidatív stressz elleni védekezésben, így közvetve az irodalmi adatokból és közvetlenül a saját mérési adataimból is látható, hogy a hidegkezelés serkentőleg hat az útvonal ezen szakaszának génextpressziójára, de ami még fontosabb, a kombinált kezelés esetében még magasabb volt az *F3H* expressziója, így az MMS-előkezelés egy még hatékonyabb stresszválaszt idézhet elő a növényeknél. Az utolsó általam qRT-PCR technikával vizsgált gén az *antocianidin-3-O-glikoziltransferáz* volt. Az enzim az antociánok

végleges struktúrájának kialakításában játszik szerepet. Az antociánokról is leírták, hogy mennyiségük növekszik abiotikus stresszek megjelenésekor. Fontos szerepet töltenek be a stresszválaszban, többek között az UV-B sugárzás és az oxidatív stressz elleni védekezésben, melyek természetesen szoros kapcsolatban állnak egymással (Page és mtsai. 2012, Zhang és mtsai. 2019b). A glikolizációs folyamatok során nő az antocianinok kémiai diverzitása és stabilizálódnak is (Yonekura-Sakakibara és mtsai. 2012). Az *AGT* esetében már kisebb génexpressziós emelkedést tapasztaltam, mint az útvonal korábbi szakaszain található gének esetében, továbbá nem volt szignifikáns különbség a hidegkezelte és MMS-előkezelte növények között. Ezáltal itt csupán arra következtethetünk, hogy a hidegkezelés növeli a gén expresszióját, viszont az MMS-előkezelés nincs rá további hatással. A hideg okozta növekedést az antociántartalom esetében sem okozott meglepetést, hiszen leírták már korábban is (Chalker-Scott 1999).

A microarray vizsgálat alapján szintén kaphatunk egy képet a fenilpropanoid útvonalon található gének mRNS-szintjéről, ezáltal a génexpressziós változásokról. A mérés során több gént is sikerült annotálnunk, melyek még inkább lefedik a bioszintetikus útvonalat. Kiegészítésképpen a qRT-PCR technikával mért adatokhoz, láthatjuk a génexpresszióját a *phenilalanin-ammónia-liáznak*; a *4-kumaroil-CoA-nak*, a *kalkon-izomeráznak*, a *dihidroflavonol-reduktáznak* és a *leukoantocianidin-dioxigenáznak* (9. táblázat). Minden gén esetében azt találtuk, hogy nőtt a génexpresszió hidegkezelés esetében, de a kombinált kezelések következtében egy még magasabb génexpressziós szintet detektált a műszer. A microarray vizsgálat során az útvonalról utolsóként detektált gén az *AGT* volt, amely átfedést mutat a qRT-PCR technikával mért génexpressziós adatsorral, viszont a microarray esetében elmondható, hogy magasabb volt az expressziós emelkedés az MMS-előkezelte növényeknél. A *CHS* és a *F3H* esetében hasonló képet kapunk, mint korábban a qRT-PCR technikával mért adatoknál, annyi különbséggel, hogy kisebb mértékűek az expressziós növekedések. Alapvetően a qRT-PCR technikával mért adatsor és a microarray mérésből származó adatsor jól kiegészítik egymást, a két módszer eredményei által teljes képet kapunk a fenilpropanoid útvonal ezen szakaszán bekövetkező molekuláris változásokról. A két vizsgálat együttesen 9 gén változásait tárja fel és lefedik a teljes útvonalat a kezdeti szakaszától a végéig.

Az antociánok vakuólumba szállításában a glutation-S-transzferáz (GST) játszik szerepet. Számos növényfajnál kimutatták, hogy a GST képes kötődni a flavonoidokhoz és antociánokhoz, többek között lúdfűben, szőlőben, petúniában és kukoricában is (Nianiou-Obeidat és mtsai. 2017). Habár az antociánok szintézise jól ismert folyamat, a szállításuk és beépülésük már

kevésbé ismert (Kitamura és mtsai. 2004). A molekulák szállítására többféle mechanizmus is létezik, melyek ki is egészíthetik egymást: vezikulák általi szállítás, membrán transzportereken keresztüli vagy GST általi szállítás (Zhao 2015b). Azonban petúniával és kukoricával végzett kutatások során azt is kimutatták, hogy azok a mutáns növények, amelyek nem rendelkeztek GST-aktivitással, antocián-hiányos fenotípussal rendelkeztek (Kitamura és mtsai. 2004) Kukorica GST esetében szintén született olyan publikáció, ahol azt találták, hidegstresszt követően nőtt az enzim aktivitása (Rahman és mtsai. 2015). Ez a növekedés azért is lehet fontos, mert az ilyenkor másodlagosan jelentkező, oxidatív stressz károsító hatásait is segíthet csökkenteni többrétű funkciója révén. Egyrészt a flavonoidok és antociánok stabilizálása során, melyek fontos szerepet játszanak a reaktív gyökök kioltásában, másrészt az enzim a sejt redox egyensúlyának fenntartásában is szerepet játszik.

A génextpressziós vizsgálatok eredményei alapján, a fenilpropanoid útvonal metabolit-szintű emelkedésére számítottam. A Folin–Ciocalteu reagens mérés eredményei szerint, jelentős különbségek vannak a kezelési csoportok között, miszerint az alacsony hőmérséklet stimulálta az útvonalat, és növelte a fenoloidtartalmat, továbbá az MMS-előkezelt növényekben, még magasabb az össz-fenoloid tartalom (21. ábra). A kiindulási vegyülettel, az SMM-mel végzett kísérletek során szintén tapasztalták az összes fenoloidtartalom emelkedését hidegstressz fellépésekor, ebben az esetben is az SMM-előkezelt növények metabolit tartalma volt a legmagasabb (Páldi és mtsai. 2014). A fenoloid származékok metabolit szintű emelkedése hozzájárul védekezőképesség fokozásához. Petúnia növényeken végzett kísérlet során szintén tapasztalták, hogy az összes fenoloidtartalom emelkedés – az antioxidáns kapacitás növekedésén keresztül – összefüggést mutatott a hidegtolerancia kialakulásával (Pennycooke és mtsai. 2004).

A fenilpropanoid útvonal metabolit mennyiségét HPLC-technikával is vizsgáltam, majd LC-MS-sel azonosítottuk az egyes anyagcseretermékeket molekulatömegük és összegképletük alapján. Az azonosított vegyületek közül a kaempferol-3-O-rutinozid és a rutin (quercetin-3-O-rutinozid) szintézise szorosan kapcsolódik a fenilpropanoid útvonal azon szakaszához, melynek végeredményeként az antociánok képződnek. Gondor és munkatársai (2016) metabolit szinten is vizsgálták a szalicilsav hatását a fenilpropanoid útvonalra. A HPLC-vel végzett eredményeik alapján az egynapos szalicilsav-kezelés levelekben a rutin és a quercetin szintet szignifikánsan növelte, azonban a kaempferol esetében nem tapasztalták emelkedést. Eredményeikkel ellentétben, méréseim alapján, maga az egynapos MMS-kezelés sem a szárban, sem a levelekben nem okozott jelentős változásokat. Kizárólag a hideg és a kombinált kezelések

hatására tapasztaltam emelkedett metabolit mennyiséget a rutin és a kaempferol esetében, továbbá a mayzinnál, amit már korábban is azonosítottak az útvonalról kukoricaszemekben LC-MS-sel (Casas és mtsai. 2014). Az utolsó általunk meghatározott vegyület a diozmetin-7-O-neoheszperozid, a vegyületet azelőtt citrus-félében detektálták, amelyek köztudottan magas antioxidáns hatóanyagakkal rendelkeznek (Stewart és mtsai. 2005). Ezen vegyület esetében azonban csökkenést tapasztaltam az MMS-kezelt és hidegstressznek kitett növények gyökereiben és leveleiben is.

Az antociántartalmat levélben és szárban is mértem spektrofotométerrel. Levélben csak enyhe emelkedést sikerült kimutatnom a HM csoportban, a szárban ezzel szemben már szignifikáns különbséget mértem. Az antociántartalomban nem vártam nagymértékű változásokat, hiszen az *AGT* gén expressziós változásai is eltörpültek az útvonal kezdeti és középső szakaszán található gének expressziós változásaihoz képest. Ezen eredményekkel összecsengően a levelekben nem detektáltam különbségeket, mindössze a szárban mért összes antociántartalom mérésénél láthatunk jelentős különbséget az MMS-előkezelt növényeknél. Továbbá a szár metabolit szintje magasabb, mint levelekben mérté (24. ábra). Ezt az eredményt a HPLC mérés is igazolja, miszerint ebben az esetben is magasabb metabolit mennyiség volt megfigyelhető, illetve jelentősebb különbségek is alakultak ki az egyes csoportok között, mint levelekben. Ennek hátterében állhat, hogy a növények a gyökérkéiken keresztül veszik fel a hatóanyagot a tápoldatból, mely a floémában szállítható, akárcsak korábban az SMM esetében (Bourgis és mtsai. 1999), így hamarabb fejti ki hatását a szárban, mint a leveleknél. Ezzel szemben génexpressziós szinten a vegyület védőhatását levelekben már korábban detektálhatjuk (19. ábra, 9. táblázat).

5.5 Az antioxidáns védekezőrendszer

Az aerob életforma kísérőjelensége a reaktív oxigénformák képződése, melyek eliminálása az antioxidáns védekezőrendszer feladata, amely ezáltal egy egyensúlyi állapotot tart fenn a szervezetben. Ha a ROS-ok gyorsabb mértékben képződnek, mint ahogy azt a szervezet képes eltávolítani, ez az egyensúly felborul és fellép az oxidatív stressz állapota. Különböző abiotikus stresszorok gyakori kísérője az imént leírt jelenség. Hidegstressz esetén csökken a nettó fotoszintetikus aktivitás, ami megnövekedett ROS-szintézishez vezet, ilyenkor a növény a védekező mechanizmusok által próbálja enyhíteni a stresszt, például hődisszipáció által. Ha a ROS-ok nagymértékben képződnek, akkor az antioxidáns védekezőrendszer révén

is próbálja hatástalanítani ezeket a növény, ennek része az aszkorbát-glutation ciklus és a szuperoxid-diszmutáz is (Gill és Tuteja 2010). A munkám során ezen enzimeknek aktivitását és génexpressziós szintjét is mértem. A mérések során csak a gyökerekben tapasztaltam változásokat. Az APX gyorsan reagál a hidrogén-peroxiddal, a reakció során az aszkorbinsavból monodehidro-aszkorbinsav (MDA) keletkezik, melynek regenerációja többféle folyamat révén történik. Ennek egyik lehetősége hogy a MDA spontán dehidroaszkorbinsavvá alakul, ami majd a dehidroaszkorbinsav-reduktáz enzim által visszaalakul aszkorbinsavvá, mialatt a glutation oxidálódik, melynek regenerációját a glutation-reduktáz végzi NADPH felhasználásával, lényegében ez az aszkorbát-glutation ciklus (Apel és Hirt 2004). Az általam génexpressziósan vizsgált APX és GR izoformák a citoszólban találhatóak. Az eredményeim által azt tapasztaltam, hogy valóban bekövetkezett az oxidatív stressz állapota a növényekben, ahogyan az irodalmi adatok alapján ez várható volt, ugyanis a HK csoportban szignifikánsan magasabb volt az APX és a GR enzimek génexpressziója a kontroll csoporthoz képest (28. ábra). Ezzel ellentétben a kombinált kezelést kapott csoportnál a kontroll szintjével megegyező volt a génexpresszió az APX esetében, amíg a GR esetében ennél még alacsonyabb értéket kaptam. A csak MMS-kezelést kapott növények APX génexpressziós értékei is növekedtek, maga a szalicilsav, amely egyik alapkomponensük, hatással van a H₂O₂ szintjére, így elképzelhető, hogy stimulálja az APX működését, és annak génexpressziós növekedést, mely reakció során keletkezett MDA más úton a monodehidro-aszkorbinsav-reduktáz által is képes regenerálódni (Apel és Hirt 2004; Martínez és Araya 2010, Potters és mtsai. 2002).

A fotometriás mérések során ennél kissé eltérő eredményt kaptam, ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben az összes izoforma aktivitását együttesen mértem, és nem csak a citoszólban található 1-1 izoforma aktivitását. Az APX esetében csak a HK csoportban kaptam aktivitásbeli növekedést, az M és HM csoport értékei megegyeztek a kontroll csoporttal (26. ábra). A GR esetében minden csoportnál növekedés volt megfigyelhető a kontrollhoz képest, a legmagasabb értéket pedig a HM csoportban mértem, ami, ha nem is jelentősen, de magasabb volt, mint a HK csoportban mért aktivitás (27. ábra). Ami még megfigyelhető, hogy az APX esetében magasabb enzimaktivitás értékeket kaptam.

A szuperoxid-diszmutáz (SOD) szintén fontos tagja az enzimatisz védekezőrendszernek. Az enzim a szuperoxidion gyököt alakítja tovább, így H₂O₂ keletkezik, melynek az eliminálásában többek között a korábban leírt aszkorbát-glutation ciklus játszik szerepet. A SOD több sejtszervecskében is jelen van, többek között, ahol elektrontranszportlánc működik,

így a kloroplasztiszban és a mitokondriumban, de mindenhol megtalálható, ahol az oxigén részt vesz valamilyen folyamatban, így a peroxiszómában, citoszólban, sejtfalban stb. Az alapján, hogy milyen fém kofaktor van jelen az enzimből három izoformát különböztetünk meg: Fe-SOD, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD. Az izoformák elkülönítésére gátlószereket alkalmaztam (27. ábra), miszerint Fe-SOD inaktiválható H_2O_2 -dal, de rezisztens kálium-cianidra (KCN), a Mn-SOD rezisztens KCN és H_2O_2 -ra is, míg a Cu-Zn-SOD gátolható hidrogén-peroxiddal (Alscher és mtsai. 2002). Natív gélelektroforézis során nekem is sikerült több izoformát elkülöníteni egymástól, szám szerint hatot. A Cu-Zn-SOD működését H_2O_2 -dal gátoltam, a Mn-SOD aktivitását pedig aszkorbát alkalmazásával akadályoztam. A Fe-SOD aktivitását szintén gátolja a H_2O_2 viszont az aszkorbát együttes adagolásával, az enzim ismét működőképessé válik. A KCN-ot mérgező mivoltából kiindulva nem szerettem volna alkalmazni. Fe-SOD-ból két izoformát találtam (30. ábra), Alscher és kollégái (2002) publikációja alapján egy kisebb molekulásúlyú homodimer és egy nagyobb molekulatömegű tetramer található a magasabbrendű növényekben. A hidegkezelés hatására magasabb aktivitást mértem a HK és HM csoportokban, de ez az emelkedés sem a kontroll növényekhez képest, sem pedig a HK és HM csoport között nem volt szignifikáns. A Cu-Zn-SOD esetében minden kezelési csoportban magasabb aktivitást mutatott, mint a kontroll növényekben, a HK csoport esetében ez jelentős emelkedést mutatott (31. ábra). A Mn-SOD-ból csak egy izoformát detektáltam (32. ábra), itt is elmondható, hogy növekedés látható a hidegkezelések hatására, de itt nem jelentős ez a különbség. A 29. ábra együttesen szemlélteti a SOD különböző izoformáit, ezen az ábrán jól látszik, hogy alapvetően magasabb volt az aktivitás a kezelések hatására. A legmagasabb a hidegkezelt csoportban volt, amit a kombinált kezelést kapott csoport követett. Ami még szembetűnő, hogy három izoformában jelentkezett változás, ez a Fe-SOD2; a Cu-Zn-SOD 1 és a Mn-SOD volt, a másik három izoforma aktivitásában nem tapasztaltam változást. A SOD és az APX jelentőségét is bizonyították a ROS-ok eliminálásban transzgenikus növényekben. Tang és munkatársai (2006) bizonyították, hogy Cu-Zn-SOD és APX kulcsszerepet játszik a tolerancia kialakításában oxidatív stressz és magas hőmérsékleti stressz esetén, mindezt olyan burgonya növényekben bizonyították, melyekben a két enzimet konstitutívan expresszáltatták a kloroplasztiszban, ennek következtében kisebb volt a stresszorok okozta károsodás, és jobbak voltak a fiziológiai paraméterek ezen növényekben. Egy másik kísérletben Shafi és munkatársai (2015) szintén vizsgálták a SOD és APX szerepét transzgenikus növényekben sóstressz esetén, melyekben magasabb volt az enzimaktivitás, ami magasabb toleranciával járt együtt, melyet fiziológiai és metabolit szintű mérésekkel, úgy, mint az ionefflux, prolin és cukor mennyiségi mérése és a lignin bioszintézisen keresztül is alátámasztottak. A glutation-S-transzferáznak

(GST), ahogy korábban írtam számos funkciója ismert, többek között detoxifikálás, redox egyensúly fenntartása, antocián származékok stabilizálása. A GST I enzim génexpressziója jelentős növekedést mutatott a hidegkezelt növényekben (20. ábra). A GST-nek a növényekben három csoportját különítik el. A GST I felel többek között a herbicidek detoxifikálásáért, azonban szintén az enzim felelős búzában a telítetlen zsírsavszármazékok, úgymint a 4-hidroxi-nononol megkötéséért, ami lipidperoxidáció következtében keletkezik (Edwards és mtsai. 2000). A magas *GST* génexpressziós szintjéből arra következtettek, hogy a hidegstressz által bekövetkezett károsodás, akár a korábban leírt membránkárosodás mértéke nagyobb volt. AbdElgawad és munkatársai (2016) sóstressz hatására bekövetkező oxidatív stressz hatását figyelték kukoricában és a stresszorra adott válaszreakciókat. Szintén számos antioxidáns enzimben bekövetkező aktivitás változást mérték. Habár a sóstressz és a hidegstressz eltérő abiotikus stresszorok, megjelenésük mégis indukál azonos folyamatokat, mint például a csökkent fotoszintézis és persze a másodlagosan jelentkező oxidatív stressz bekövetkezése. A kutatócsoport sóstressz hatására szintén magasabb aktivitást mért gyökerekben az APX és GR esetében, mint leveleknél, bár ezt az eredményt összefüggésbe hozták a magasabb Na^+ felhalmozódással, illetve a GST esetében is szignifikáns növekedés volt tapasztalható az aktivitásban sóstressz esetén. Munkám során én is hasonló eredményeket tapasztaltam, miszerint az APX és GR aktivitás gyökerekben volt számottevő, nőtt az enzimaktivitás, illetve a SOD enzimaktivitás is magasabb volt a csak hidegkezelt növényekben, továbbá a *GST* génexpressziós emelkedése is, mely változások árulkodnak az oxidatív stressz jelenlétéről.

A méréseim alapján a hidegstressz hatására egyértelműen nőtt az antioxidáns enzimek génexpressziója és aktivitása is. A legtöbb mérésnél a HK csoportban magasabb eredményeket kaptam, mint az MMS-előkezelt csoportnál, habár szignifikáns különbségeket nem minden esetben találtam. A magasabb génexpressziós és aktivitásbeli adatok utalhatnak akár arra is, hogy magasabb volt az oxidatív stressz mértéke ezekben a növényekben, így egy még erőteljesebb védekezés és válaszreakció szükséges. Korábban írtam a fenilpropanoid úton képződő vegyületek jelentőségéről az oxidatív stresszválaszban, melyek bioszintézisét az MMS-előkezelés növelte. Ezekben a növényekben kisebb lehet a reaktív oxigénformák mennyisége, ezáltal az oxidatív stressz okozta károsodás mértéke, mint a csak hidegkezelt növényekben, ahol egy hatékonyabb antioxidáns válaszra van szükség.

5.6 Az MMS-ről

A kombinált vegyület, az MMS hatásával kevesen foglalkoztak, mindössze két publikáció született a témában, az egyik vírusfertőzés esetén vizsgálta az MMS jótékony hatását (Ludmerszki és mtsai. 2017) kukoricában, míg a másik irodalmi adat sóstressznek kitett búza növények vizsgálatából származik (Janda és mtsai. 2018). Hidegstresszel kapcsolatos vizsgálatok eddig nem születtek a témában. Mindkét korábbi publikációban sikerült igazolni a vegyület hatását, miszerint elősegíti a stresszválaszt a növényekben. Janda és munkatársai (2018) a korábbi kiindulási komponensek hatását is vizsgálták az MMS hatásával egyidőben, mely alapján összehasonlíthatóak a különböző komponensek védőhatárai. Publikációjukban igazolták, hogy a vegyületekkel való előkezelés csökkentette a sóstressz okozta károsodás mértékét a fotoszintetikus apparátusban, amit vírusfertőzés esetén szintén sikerült bizonyítani (Ludmerszki és mtsai. 2017). Janda és munkatársai továbbá azt is kimutatták, hogy az MMS-előkezelés növelte a szabad és kötött formában jelenlévő SA-szintet, ami a szignalizáció hatékonyságát növelheti a stresszorok megjelenése esetén, ez válaszul szolgálhat arra, hogy a vegyülettel való előkezelés stimulálja az olyan anyagcsereutakat, ahol stresszvédő metabolitok képződnek. Ezt a hatást nekünk is sikerült igazolnunk a fenilpropanoid anyagcsere esetén (Oláh és mtsai. 2018), illetve a poliamin bioszintézis útvonal esetében is (Oláh és mtsai. – készülében lévő publikáció). A microarray adatsorból és az abból származó bioinformatikai elemzésből számos adatunk van, melyeket érdemes lenne górcső alá venni, például a hormonháztartásban végbemenő változásokat. Továbbá az is bizonyos, hogy a növények könnyedén felveszik az MMS-t a hidropónikus tápoldatból a gyökereiken keresztül, amely eljut a levelekig. Az MMS levélben kifejtett hatását sikerült bizonyítani több mérés esetében is, viszont a későbbiekben érdemes lenne tüzetesebben vizsgálni a vegyület transzportfolyamatát a növényben. A vegyület alkalmazása mezőgazdasági szempontból is fontos lehet a jövőben, hiszen ezek a típusú vegyületek nélkül tudnák fokozni az ellenállóképességet, hogy ezzel káros anyagokat juttatnánk a környezetünkbe. Így érdemes lenne vizsgálni a vegyület hatásmechanizmusát szabadföldes kísérletek során is, ez esetben a vegyületet permetezéssel juttatnánk a növények felületére. Ebből a szempontból is releváns lenne megismerni, hogyan képes felvenni a növény az MMS-t és miként szállítódik a vegyület a növényekben. Összességében, azt gondolom az MMS és a hozzá hasonló természetes eredetű vegyületek környezetbarát megoldást jelenthetnének a stresszorok ellen, csökkentve ezzel negatív hatásait, esetlegesen növelve a különböző mezőgazdasági növények terméshozamát.

5.7 Az MMS-előkezelés hatásának összefoglalása

Munkám során vizsgáltam az MMS-előkezelés hatását, miszerint képes-e fokozni a növényi védekezést hidegstressz fellépése esetén. Az előkezelt növények hatékonyabban reagáltak a stresszre, így kisebb volt a hideg okozta károsodás. Eredményeimet összefoglalva pontokba szedve ismertetem.

- ❖ A növények fiziológiai állapotára a fotoszintézis működéséből következtethetünk. Így szerettem volna ezt a folyamatot több aspektusból megvizsgálni. A PSII reakciócentrum kvantumhatékonysága alacsony hőmérséklet hatására lecsökkent, ezt az aktivitáscsökkenést mérsékelte az MMS-előkezelés. A fotoszintetikus aktivitással fordítottan arányosan nőttek a PSII reakciócentrumhoz tartozó nem-fotokémiai kioltó folyamatok értékei, melyek az MMS-előkezelt növényeknél a hidegkezelt növények értékei alatt maradtak. Leginkább a D1 protein károsodásából származó Φ_{NF} érték növekedett a hidegkezelt növényeknél, ami az inaktiválódott PSII RC-k energiakibocsátása. Vizsgáltam a zeaxantin-epoxidáz enzim génexpresszióját, mely enzim szorosan kapcsolódik a PSII RC-hoz tartozó fényfüggő, ΔpH - és xantofillciklus alapú kioltás paraméteréhez. Ahogy azt előzetesen vártam, a hideg hatására megnőtt az enzim génexpressziója. Különbséget találtam az MMS-előkezelt növényekben, amelyekben ugyan nem jelentősen, de alacsonyabb volt a génexpresszió a hidegkezelt növényekhez viszonyítva. A qRT-PCR technikával mért adatokat alátámasztja a microarray vizsgálat. A klorofill-bioszintézis útvonalán a hidegstresszt követően emelkedtek az itt található enzimek génexpressziós értékei a microarray vizsgálat alapján, továbbá az MMS-előkezelés még inkább fokozta az útvonal génexpresszióját. Metabolit szinten hidegkezelések hatására nem detektáltam magasabb klorofilltartalmat, sem karotin- és xantofilltartalmat.
- ❖ Az MMS-előkezelés hatására csökkent a membránkárosodás mértéke, ebből kifolyólag szintén vizsgáltam, hogy az MMS rendelkezik-e a kiindulási vegyület jótékony hatásával, és szintén képes-e csökkenteni az ioneffluxot. Eredményeim azt tükrözik, hogy a hideg hatására bekövetkező membránpermeabilitás alacsonyabb volt azokban a növényekben, amelyeket a hidegstressz előtt MMS-sel kezeltem elő.
- ❖ A hideg szignalizációban résztvevő transzkripciós faktorok, az ICE1 és a DREB1 esetében is jelentősen emelkedett génexpressziót mértem, a hidegkezelt és a kombináltkezelést kapott csoportok esetében.

- ❖ A microarray vizsgálat során több mint 4000 génnél találtunk szignifikáns változást 5 %-os szignifikanciaszint mellett a kontroll csoporthoz képest, mely változások nagy része a hidegkezeléshez köthető. Átfedést láthatunk a HK és HM csoportok között, miszerint mindkét kezelési csoportnál 3005 gén expressziója változott. Továbbá 187 olyan gént találtunk, ami csak a hidegkezelésre adott választ. A MMS-előkezelés is számos génnél okozott változást, 591 gént találtunk, melyek csak a kombinált kezelésre változtak, ez magának az MMS-előkezelésnek lehet a hatása. A microarray vizsgálat eredményeit qRT-PCR módszerével validáltam.
- ❖ Az AgriGO 2.0 verziójú szoftverrel a génexpressziós adatokból készített ábrák szintén 5%-os szignifikanciaszint mellett készültek. Számos génexpresszióbeli változást detektáltam a K-HM összehasonlításban. A *biológiai folyamatok*nál kiemelném például a stimulusra bekövetkező válaszreakciót, ami magába foglalja a következő GO kategóriákat: stresszválasz, továbbá stresszvédelem és oxidatív stresszre adott válasz. Mindemellett a stimulusra adott válaszon belül megtalálható a kémiai stimulánsra adott válasz és az abiotikus stresszválasz is, mely kategóriákban szintén génexpresszióbeli változás történt az MMS-előkezelés hatására. A *sejtkomponensek* esetében szintén nagymértékű változások következtek be a kombinált kezelésekre hatására, számos GO kategória felülreprezentált, ezek közül a sejtfalat, a plazmamembránt, a peroxisómát, a citoszólt, a vakuólumot, az endoplazmatikus retikulumot, a fotoszintetikus membránokat, a mitokondriumot, a Golgi-apparátust és a sejtmagot emeltem ki. A *molekuláris funkciók* esetében kisebb volt az aktivitásbeli változás, itt többek között a glutation-S-transzferáz aktivitásában, az S-adenozil-metionin függő metiltranszferáz aktivitásában vagy akár a fehérjék szerin/treonin-foszfataz aktivitásában mutatott a HM csoport aktivitás változást a kontroll csoporthoz képest.
- ❖ A fenilpropanoid útvonalon számos stresszvédő vegyület képződik. Az útvonal génjeinek expresszióját önmagában a hidegstressz is stimulálta, az MMS-előkezelt növényeknél pedig még magasabb volt a génexpressziós emelkedés. Az imént említett qRT-PCR technikával mért adatokat a microarray vizsgálat is megerősítette, ezenfelül egy még részletesebb képet kaptunk a bioszintézis útvonal génexpressziós változásairól. Az útvonalon képződő anyagcseretermékek mennyiségi változását is mértem. Az összes fenoloidtartalomban szintén a kombinált kezelést kapott csoportban kaptam a legmagasabb metabolit szintet. Az antociántartalom levélben és szárban is magasabb volt az MMS-előkezelt csoportnál, a szár esetében ez a növekedés szignifikáns volt.

- ❖ Az antioxidáns enzimek esetében az aszkorbát-peroxidáz és a glutation-reduktáz sem génexpressziósan, sem aktivitásban nem mutatott változást a levelekben. Ezzel szemben a gyökérben már detektáltam szignifikáns különbségeket. A qRT-PCR technikával mért génexpressziós méréseknél az aszkorbát-peroxidáz és a glutation-reduktáz is a csak hidegkezelt növényeknél volt a legmagasabb, ezzel ellentétesen az MMS-előkezelt csoportnál alacsonyabb volt a génexpresszió, vélhetően a kisebb mértékű oxidatív stressznek köszönhetően. Az aktivitásmérés megerősítette a génexpressziós eredményt az aszkorbát-peroxidáz esetében, míg a glutation-reduktáz aktivitás növekedése ezzel ellentmondásos, hiszen az MMS-előkezelt csoportnál volt a legmagasabb. A szuperoxid-diszmutáz aktivitását levélben mértem. Munkám során hat izoformát különítettem el, összességében a szuperoxid-diszmutáz esetében is az MMS-előkezelt növényeknél alacsonyabb volt az enzimaktivitás, mint a csak hidegkezelt növényeknél.

6. Összefoglalás

Doktori munkám során arra kérdésre kerestem a választ, hogy a természetes eredetű S-metilmethionin-szalicilát (MMS) képes-e növelni a növényi védekezőképességet alacsony hőmérsékleti stresszrel szemben.

A stresszor hatására lecsökken a kettős fotokémiai rendszerhez tartozó reakciócentrumok fotoszintetikus hatékonysága, ezzel párhuzamosan nő a nem-fotokémiai kioltási paraméterek (NPQ) szerepe, melyek a többlet abszorbeált fényenergia elvezetésére szolgálnak. Az előkezelés hatására magasabb volt a fotoszintetikus aktivitás, és kevésbé nőttek meg az NPQ paraméterek értékei, mely értékek a fotoszintetikus apparátus csökkent károsodására engednek következtetni. Ezenfelül a klorofill-bioszintézisben résztvevő gének expresszióját is serkentette az MMS-előkezelés. A vegyület membránvédő hatását szintén sikerült bizonyítani, az MMS-előkezelést kapott növényeknél alacsonyabb volt az ionefflux, mint a csak hidegkezelt növényeknél.

Szerettük volna feltérképezni az MMS teljeskörű hatását a génexpresszióra, valóban segíti-e a vegyület alkalmazása a tolerancia kialakulását az alacsony hőmérséklet jelenlétekor. Ehhez elvégeztünk egy microarray vizsgálatot, ami teljeskörű képet ad a kukoricákban végbemenő génexpressziós változásokról. A vizsgálat alapján – melyet qRT-PCR technikával mért vizsgálatok támasztanak alá – számos génnél találtunk legalább kétszeres génexpressziós változást, a kezelések közötti összevetésben (hidegstressz és/vagy MMS-előkezeléssel kombinálva, vagy csak az MMS hatása hidegstressz nélkül). A legkiemelkedőbb a fenilpropanoid útvonal génexpressziós növekedése, melyről bizonyított, hogy számos fontos stresszvédő molekula szintetizálódik ezen az anyagcsere útvonalon. A hidegkezelések következtében is detektálható volt az emelkedés génexpressziós és metabolit szinten egyaránt, viszont az MMS-előkezelés hatására ez a változás még markánsabb volt. Az eredményekből feltételezzük az MMS serkentőleg hat ezen másodlagos anyagcsere-termékek szintézisére.

Az antioxidáns védekezőrendszer vizsgálata szintén képet adhat számunkra a növényeket ért károsodások mértékéről, hiszen alacsony hőmérséklet esetén az oxidatív stressz másodlagosan mindig jelen van. Az aszkorbát-peroxidáz esetében magasabb génexpressziót detektáltam a csak hidegkezelést kapott csoportnál, ezenfelül az enzim aktivitása is ezeknél a növényeknél volt a legmagasabb. A glutation-reduktáz esetében génexpressziós szintén a csak hidegkezelt növényeknél mértem a legmagasabb génexpressziót, az enzimaktivitás vizsgálat esetében az MMS-előkezelést kapott növényeknél magasabb értéket kaptam. A szuperoxid-diszmutáz vizsgálatánál is a hidegkezelt növényeknél volt a legnagyobb az enzimaktivitás.

Összességében az eredmények arra engednek következtetni, hogy az MMS-előkezelés hatására a növényekben csökkent hidegstressz okozta károsodások mértéke, a vegyülettel való előkezelés segítette a növényi alkalmazkodást, ezáltal pedig mérsékelte a másodlagosan bekövetkező oxidatív stresszt és annak negatív hatását.

7. Summary

During my Ph.D work my aim was to examine, that the naturally occurring S-methylmethionine-salicylate (MMS) is able to stimulate the stress response against cold stress.

In recent work, physiological parameters such as photosynthetic activity were studied in cold-stressed maize plants. The efficiency of PSII reaction centers was decreased after cold stress, parallel the non-photochemical quenching (NPQ) parameters of PSII were increased, which may lead the excess light energy, throw mitigate the damages in the reaction centers. In MMS-pretreated plants, the PSII electron flow was higher, and NPQ parameters had lower values, which means the photosynthetic efficiency and the utilization of light energy was more effective. Moreover, according to the microarray results, the chlorophyll biosynthesis was more stimulated in MMS-pretreated plants. Furthermore, the exogenous application of MMS has a membrane protective effect as well, the pre-treated plants had lower ion efflux values than cold-stressed plants.

In order to gain more information about the changes in gene expression pattern, a microarray analysis was carried out. More than 4000 genes were found, that showed at least two-folded expression change in any experimental relation (low-temperature treatment with or without MMS-pretreatment, MMS-treatment without cold stress). The results were validated by real-time PCR. The most important genes expression changes were on the phenylpropanoid pathway, it is important to note, that numerous stress protective molecule is synthesized on this pathway. The chilling also stimulated the expression of phenylpropanoids derivatives, however, the changes were even pronounced in MMS-pretreated plants at gene expression and metabolite level as well.

Since oxidative stress is a common secondary effect in chilling, changes in the antioxidant system were also studied. In the case of ascorbate peroxidase higher gene expression and enzymatic activity were detected in cold-stressed plants. In the case of glutathione reductase also higher gene expression was measured in cold-stressed plants without MMS-pretreatment, however, the enzyme activity of glutathione reductase was higher in these plants, than in cold-stressed plants. We also monitored the enzyme activity of superoxide dismutase, this enzyme also shows the highest activity in cold-stressed plants.

According to our results, MMS is capable of increasing the defence potential of cold-stressed maize plants, furthermore pre-treatment with the compound also contributes to decrease the damaging effects of oxidative.

8. Irodalomjegyzék

1. Abdelgawad H, Zinta G, Hegab MM, Pandey R, Asard H, Abuelsoud W (2016): High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–11.
2. Agarwal PK., Agarwal P, Reddy MK., Sopory SK (2006): Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*. 25(12):1263–1274.
3. Alkan D, Yemenicioğlu A (2016): Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens. *Food Hydrocolloids*. 55:1–10.
4. Allen DJ, Ort RD (2001): Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6(1):36–42.
5. Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*. 53(372):1331–1341.
6. Apel K, Hirt H (2004): reactive oxygen: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55(1):373–399.
7. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 25:25–29.
8. Banerjee A, Roychoudhury A (2019): Cold stress and photosynthesis. In: Ahmad, P., Ahanger MA, Alyemeni MN, Alam P (eds.) *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress, 1999-2019* John Wiley & Sons, Inc. 27–37. ISBN: 9781119501770.
9. Beauchamp C, Fridovich I (1971): Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 287:276–287.
10. Bernardi R, Nali C, Ginestri P, Pugliesi C, Lorenzini G, Durant M (2004): Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biologia Plantarum*. 48(1):41–48.

11. Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Gage DA, Hanson AD (1999): S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *The Plant Cell*. 11(8):1485–1498.
12. Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2):248–254.
13. Campos PS, Virginia Q, José Cochicho R, Maria AN (2003): Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea Sp.* plants. *Journal of Plant Physiology*. 160(3):283–292.
14. Casas MI, Duarte S, Doseff IA, Grotewold E (2014): Flavone-rich maize: An opportunity to improve the nutritional value of an important commodity crop. *Frontiers in Plant Science*. 5:1–11.
15. Chalker-Scott L (1999): Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*. 70(1):1–9.
16. Chen J-Y, Wen P-F, Kong W-F, Pan Q-H, Zhan J-C, Li J-M, Wan S-B, Huang W-D (2006): Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*. 40(1): 64–72.
17. Chin D-C, Kumar RS, Suen C-S, Chien C-Y, Hwang M-J, Hsu C-H, Xuhan X, Lai Z, Yeh K-W (2019): Plant cytosolic ascorbate peroxidase with dual catalytic activity modulates abiotic stress tolerances. *iScience* 16:31–49.
18. Chinnusamy V, Zhu J, Kang Zhu JK (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*. 12(10):444–451.
19. Christie JP, Alfenito RM., Walbot V (1994): Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. 194:541–549.
20. D'Ambrosio N, Guadagno CR, Virzo de Santo A (2008): Is qE always the major component of non-photochemical quenching? In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (eds.) *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer, Dordrechtin. 1001-1004.
21. Dai J, Mumper RJ (2010): Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(10):7313–7352.

22. Demidchik V (2017): Reactive oxygen species and their role in plant oxidative stress. In: Plant Stress Physiology. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
23. Ding Y, Shi Y, Yang S (2019): Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist*. 222:1690–1704.
24. Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002): Plant glutathione transferases. *Genome Biology*. 3(3):1–10.
25. Edwards R, Dixon PD, Walbot V (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science*. 5(5):193–198.
26. 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(2):281–84.
27. Farrant JM, Cooper K, Dace HJ, Bentley J, Hilgart A (2017): Dessication tolerance. In: Plant Stress Physiology. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
28. Foyer C, Noctor G (2011): Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155:2–18.
29. Francini A, Giro A, Ferrante A (2019): Biochemical and molecular regulation of phenylpropanoids pathway under abiotic stresses. In: Plant Signaling Molecules. Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (eds.) Elsevier. 183–192. ISBN: 978-0-12-816451-8.
30. Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015). *Environmental Science and Pollution Research*. 22:10375–10394.
31. Gill SS, Tuteja N (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress Tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(12):909–30.
32. Gondor KO, Janda T, Soós V, Pál M, Majláth I, Adak KM, Balázs E, Szalai G (2016): Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Frontiers in Plant Science*. 7:1–12.
33. Guo X, Liu D, Chong K (2018): Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 60(9):745-756.
34. Gururani MA, Venkatesh J, and Tran LSP (2015): Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*. 8:1304–1320.

35. Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010): Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*. 68(1):14–25.
36. Heidervand L, Amiri MR (2010): What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*. 32(3):419–31.
37. Hendrickson L, Fo B, Pogson JB, Chow WS (2005): A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of photosystem II. *Photosynthesis Research*. 84:43–49.
38. Herrera-Vasquez A, Salinas P, Holouige L (2015): Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense gene expression. *Frontiers in Plant Science*. 6:1–9.
39. Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S (2009): How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*. 14(3):125–32.
40. Hernández I, Van Breusegem F (2010): Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's swiss army knife? *Plant Science*. 179(4):297–301.
41. Hoagland DR, Arnon DI (1938): The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, 347., Berkeley, California.
42. Horváth E, Szalai G, Janda T (2007): Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26(3):290–300.
43. Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Gou Z-F (2012): Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*. 39(2): 969–987.
44. Jahns P, Holzwarth AR (2011): The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817:182–193.
45. Jajoo A, Allakhverdiev IS (2017): High-temperature stress in plants: Consequences and strategies for protecting photosynthetic machinery. In: Plant Stress Physiology. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
46. Jansen AKM (2017): Ultraviolet-B radiation: Stressor and regulatory signal. In: Plant Stress Physiology. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
47. Janda T, Szalai G, Tari I, Pádi E (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208(2):175–180.

48. Janda T, Pál M, Darkó É, Szalai G (2017): Use of salicylic acid and related compounds to improve the abiotic stress tolerance of plants: Practical aspects. In: *Salicylic acid: A Multifaceted Hormone*. Nazar R, Iqbal N, Khanpp A N (eds.) Springer Nature Singapore Pte Ltd.35–46. ISBN: 978-981-10-6067-0
49. Janda T, Khalil R, Tajti J, Pál M, Szalai G, Rudnóy S, Rácz I, Kátay Gy, Molnár BA, Lejmel AM, Marcek T, Gell Gy, Birinyi Zs, Darkó É (2018): The newly synthesized plant growth regulator S-methylmethionine salicylate may provide protection against high salinity in wheat. *Plant Growth Regulation*. 85:305–315.
50. Janknegt PJ, Jan W, Rijstenbil WJ, van de Poll HW, Gechev ST, Buma AGJ (2007): A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 87(3):218–26.
51. Joliot P, Johnson GN (2011): Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(32), 13317–13322.
52. Kato Y, Ozawa S, Takahashi Y, Sakamoto W (2015): D1 fragmentation in photosystem II repair caused by photo-damage of a two-step model. *Photosynthetic Research*. 26:409–416.
53. Kirilovsky D (2015): Photosynthesis: Dissipating energy by carotenoids. *Nature Chemical Biology*. 11(4):242–243.
54. Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. (2004): Transparent testa 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 37(1), 104–114.
55. Kósa E, Szegő D, Horváth E, Rácz I, Szigeti Z, Lásztity D, Páldi E (2011): Effect of S-methylmethionine on the photosynthesis in maize at different chilling temperatures. *Central European Journal of Biology*. 6 (1): 75–83.
56. Kress E, Jahns P (2017): The dynamics of energy dissipation and xanthophyll conversion in *Arabidopsis* indicate an indirect photoprotective role of zeaxanthin in slowly inducible and relaxing components of non-photochemical quenching of excitation energy. *Frontiers in Plant Science*. 8:1–17.
57. Lásztity D, Rácz I, Páldi E (1992): Effect of DL-S-methylmethionine on polyamin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*. 85:368–389.
58. Lee J, Durst WR, Wrolstad ER (2005): Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88(5):1269–78.

59. Li L, Aro EM, Millar AH (2018): Mechanisms of photodamage and protein turnover in photoinhibition. *Trends in Plant Science*. 23(8):667–676.
60. Liu Y-J, Yuan Y, Liu Y-Y, Fu J-J, Zheng J, Wang G-Y (2012a): Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*. 169(2):183–92.
61. Liu X-G, Xu H, Zhang JY, Liang GW, Liu YT, Guo AG (2012b): Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis in albinism line of wheat (*Triticum aestivum*) FA85. *Physiologia Plantarum*. 145(3):384–394.
62. Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001): Chlorophylls and carotenoids : Measurement and characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 1: F4.3.1–F4.3.8.
63. Longo V, Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S: (2018). What can small molecules tell us about cold stress tolerance in plants? In: *Cold Tolerance in Plants*. Wani SH, Herath V (eds.) Springer Nature Switzerland AG. 127–157.
64. Ludmerszki E, Chounramany S, Oláh Cs, Rácz I, Almási A, Solti Á, Bélai I, Rudnóy S (2017): Protective role of S-Methylmethionine-Salicylate in maize plants infected with maize dwarf mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*. 149(1):145–156.
65. Ludmerszki E, Rudnóy S, Almási A, Szigeti Z, Rácz I (2011): The beneficial effects of S-methyl-methionine in maize in the case of maize dwarf mosaic virus infection. *Acta Biologica Szegediensis*. 55 (1):109–112.
66. Majláth I, Szalai G, Soós V, Sebtyén E, Balázs E, Vanková R, Bobrev IP, Tari I, Tandori J, Janda T (2012): Effect of light on the gene expression and hormonal status of winter and spring wheat plants during cold hardening. *Physiologia Plantarum*. 145(2):296–314.
67. Mach JM, Greenberg JT (2004): Free radicals and oxidative stress. In: *Plant Cell Death Processes*. Noodén DL (ed.) Elsevier. 203–214. ISBN 978-0-12-520915-1.
68. Manoli M, Sturaro A, Trevisan S, Quaggiotti S, Nonis A (2012): Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology*. 169:807–815.
69. Martínez JP, Araya H (2010): Ascorbate–glutathione cycle: Enzymatic and non-enzymatic integrated mechanisms and its biomolecular regulation. In: Anjum N, Chan MT, Umar S (eds.) *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer, Dordrecht. 302–322. ISBN 978-90-481-9403-2
70. McRorie RA, Sutherland GL, Lewis GL, Barton MS, Glazener MR, Shive W (1954): Isolation and identification of a naturally occurring analog of methionine. *Journal of the American Chemical Society*. 76:115–118.

71. Miller G, Shulaev V, Mittler R.(2008): Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*. 133(3):481–89.
72. Mittler R (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(9):405–10.
73. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9(10):490–98.
74. Naikoo MI, Dar MI, Raghieb F, Jaleel H, Ahmad B, Raina A, Khan FA, Naushen F (2019): Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance. In: *Plant Signaling Molecules*. Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (eds.) Elsevier. 183–192. ISBN: 978-0-12-816451-8
75. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell*. 2:279–289.
76. Nianiou-Obeidat I, Panagiotis O, Christos M, Kissoudis C, Voulgari G, Chronopoulou E, Tsaftaris A, Labrou EN (2017): Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance : functions and biotechnological applications. *Plant Cell Reports*. 36(6):791–805.
77. Oláh Cs, Ludmerszki E, Rácz I, Balassa G, Rudnóy S (2018): S-Methylmethionine-Salicylate pretreatment reduces low temperature stress in maize. *Russian Journal of Plant Physiology*. 65(1): 63–68.
78. Page M, Sultana N, Paszkiewicz K, Florance H, Smirnoff N (2012): The Influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: Further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell and Environment*. 35(2):388–404.
79. Pál M, Majláth I, Németh E, Kamirán HÁ, Szalai G, Rudnóy S, Balassa Gy, Janda T (2018): The effects of putrescine are partly overlapping with osmotic stress processes in wheat. *Plant Science*. 268:67–76.
80. Páldi K, Rácz I, Szigeti Z, Rudnóy S (2014): S-Methylmethionine alleviates the cold stress by protection of the photosynthetic apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Biologia Plantarum*. 58(1):189–94.
81. Peleg Z, Blumwald E (2011): Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(3):290–95

82. Pennycooke JC, Cox S, Stushnoff C (2004): Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*. 53:225–232.
83. Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:2004–2007.
84. Pietrzykowska M, Suorsa M, Semchonok DA, Tikkanen M, Boekema EJ, Aro E, Jansson S (2014): The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 26: 3646–3660.
85. Polidoros AN, Scandalios JG (1999): Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea Mays* L.). *Physiologia Plantarum*. 106(1):112–20.
86. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 975:384–394.
87. Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N (2002): Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 537–548.
88. Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y-Q, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004): Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in Cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology*. 45(8):1042–1052.
89. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne RH, Moorman AFM (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 339:62–66.
90. Rahman M, Mian K, Ahmed A, Rohman M (2015): Roles of glutathione S-transferase in maize (*Zea mays* L.) under cold stress. *Research in Agriculture, Livestock and Fisheries*. 2:9–15.
91. Rácz, I., Páldi, E., Szalai, G., Janda T., Pál, M., Lásztity, D. (2008): S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. *Journal of Plant Physiology*. 165:1483–1490.

92. Rudnóy S, Majláth I, Pál M, Páldi K, Rácz I, Janda T (2015): Interactions of S-methylmethionine and UV-B can modify the defence mechanisms induced in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37:1–11.
93. Ruelland E (2017): Plant responses to chilling temperatures. In: Plant Stress Physiology. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
94. Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, Fernie RA (2013): The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72:21–34.
95. Shafi A, Chauhan R, Gill T, Swarnkar KM, Sreenivasulu Y, Kumar S, Kumar N, Shankar R, Ahuja SP, Singh KA (2015): Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. *Plant Molecular Biology*. 87(6):615–31.
96. Shah DM, Hironaka CM, Wiegand RC, Harding EI, Krivi GG, Tiemeier C, Louis S (1986): Structural analysis of a maize gene coding for glutathione S-transferase involved in herbicide detoxification, *Plant Molecular Biology*. 4:203–211.
97. Shah J (2003): The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(4):365–71.
98. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. 2012:1–26.
99. Sharma P, Sharma P, Arora P, Verma V, Khanna K, Saini P, Bhardwaj R (2019): Role and regulation of ROS and antioxidants as signaling molecules in response to abiotic stresses. In: Plant Signaling Molecules. Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA. (eds.) Elsevier. 183–192. ISBN: 978-0-12-816451-8
100. Shuab R., Lone R, Koul KK (2016): Cinnamate and cinnamate derivatives in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38(3):1–9.
101. Sobkowiak A, Jończyk M, Adamczyk J, Szczepanik J, Solecka D, Kuciara I, Sowiński, P (2016): Molecular foundations of chilling-tolerance of modern maize. *BMC Genomics*. 17(125):1–22.
102. Solti Á, Gáspár L, Mészáros I, Szigeti Z, Lévai L, Sárvári É (2008): Impact of iron supply on the kinetics of recovery of photosynthesis in Cd-stressed poplar (*Populus glauca*). *Annals of Botany*. 102:771–782.

103. Solti, Á., Lenk, S., Mihailova, G., Mayer, P., Barócsi, A., Georgieva, K. (2014). Effects of habitat light conditions on the excitation quenching pathways in desiccating *Haberlea rhodopensis* leaves: an Intelligent FluoroSensor study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 130:217–225.
104. Solti Á, Sárvári É, Szöllősi E, Tóth B, Mészáros I, Fodor F, Szigeti Z (2016). Stress hardening under long-term cadmium treatment is correlated with the activation of antioxidative defence and iron acquisition of chloroplasts in *Populus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 71(9-10):323–334.
105. Stewart JA, Mullen W, Crozier A (2005): Online High-Performance Liquid Chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Molecular Nutrition and Food Research*. 49(1):52–60.
106. Szalai, G. (2009): A szalicilsav szerepe gazdasági növények stressztűrő képességében. Akadémia Doktori értekezés. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár.
107. Szalai G, Majláth I, Pál M, Gondor KO, Rudnóy S, Oláh C, Vanková R, Kalapos B, Janda T (2018): Janus-faced nature of light in the cold acclimation processes of maize. *Frontiers in Plant Science*. 9:1-17.
108. Szegő D, Kósa E, Horváth E (2007): Role of S-methylmethionine in the plant metabolism. *Acta Agronomica Hungarica*. 55(4):491–508.
109. Takahashi S, Murata N (2008): How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. 13(4):178–182.
110. Takahashi S, Badger MR (2011): Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*. 16(1):53–60.
111. Tang L, Kwon S-Y, Kim S-H, Kim J-S, Choi SJ, Cho YK, Sung KC, Kwak SS, Lee H-S (2006): Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports*. 25(12):1380–1386.
112. Teklemariam AT, Blake JT (2004): Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in Jack Pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*. 122(2):244–253.
113. Theocharis A, Clément C, Barka AE (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235(6):1091–1105.
114. Tian F, Stevens MN, Buckler SE (2009): Tracking footprints of maize domestication and evidence for a massive selective sweep on chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106:9979–9986.

115. Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Wu W, Su Z (2017): agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 45:122–129.
116. Vass I (2012): Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817:209–217.
117. Vavilin VD, Vermaas FJW (2002): Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*. 115(1):9–24.
118. Vogt T (2010): Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 3(1):2–20.
119. Wasternack C (2014): Action of jasmonates in plant stress responses and development - Applied aspects. *Biotechnology Advances*. 32(1):31–39.
120. Woldemariam M G, Ahern K, Jander G, Tzin V (2018): A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. *Plant Signaling and Behavior*. 13(1):1–4.
121. Wisniewski M, Willick JR, Gusta LV (2017): Freeze tolerance and avoidance in plants. In: *Plant Stress Physiology*. Shabala S (ed.) CAB International. 97-138. ISBN: 9781780647296
122. Wulf LW, Nagel WC (1976): Analysis of phenolic acids and flavonoids by HPLC. *Journal of Chromatography*. 116(1):271–79.
123. Yang F, Li W, Jiang N, Yu H, Morohashi K, Ouma WZ, Morales-Mantilla ED, Gomez-Cano AF, Mukundi E, Prada-Salcedo LD, Velazquez AR, Valentin J, Maria Katherine Meji'a-Guerra MK., Gray J, Doseff IA, Grotewold E (2017): A maize gene regulatory network for phenolic metabolism. *Molecular Plant*. 10(3):498–515.
124. Yonekura-Sakakibara K, Fukushima A, Nakabayashi R., Hanada K, Matsuda F, Sugawara S, Inoue E, Kuromori T, Ito T, Shinozaki K, Wangwattana B, Yamazaki M, Saito K (2012): Two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification delineated by transcriptome independent component analysis in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Journal*. 69(1):154–67.
125. Zhang J, Li X-M, Lin H-X, Chong K (2019a): Crop improvement through temperature resilience. *Annual Review of Plant Biology*. 70(1):753–780.
126. Zhang L, Gong F, Song Y, Liu K, Wan Y (2019b): De novo transcriptome analysis of lettuce (*Lactuca sativa L.*) and the identification of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in response to UV-B radiation. *Acta Physiologiae Plantarum*. 41(148):2–16.

127. Zhao C, Lang Z, Zhu K J (2015a): Cold responsive gene transcription becomes more complex. *Trends in Plant Science*. 20(8):466–68.
128. Zhao J (2015b): Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends in Plant Science*. 20(9):576–585.
129. Zhu J, Dong HC, Zhu KJ (2007): Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 10(3):290–295.
130. Zhu J (2016): Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 167:313–324.

9. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani Dr. Fodor Ferencnek a Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunkám elvégzését és a disszertáció elkészítését.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Rudnóy Szabolcsnak az elmúlt évek során nyújtott iránymutatását, szakmai és emberi támogatását és a dolgozatom megírása során nyújtott sok segítséget.

Köszönettel tartozom a kutatócsoport tagjainak, Dr. Rácz Ilonának, Dr. Szigeti Zoltánnak, Dr. Lásztity Demeternek, Dr. Rudnóy Szabolcsnak, Pardi Sándorné Balogh Györgyinek, Dr. Ludmerszki Editnek, Oláh Kingának, Balassa Györgynek, hogy tanácsaikra, amelyek sokat segítettek szakmai fejlődésemet, mindig számíthattam, különösen hálás vagyok Oláh Kingának és Dr. Ludmerszki Editnek a dolgozat, illetve a téziszüzetek átolvasásáért. Külön szeretnék köszönetet mondani Pardi Sándorné Balogh Györgyinek, akitől az első pillanattól fogva rengeteget tanultam és aki sok munkával járult hozzá az eredményeim megszületéséhez. Mindezek mellett szeretném megköszönni közvetlen kollégáimnak, hogy nem csak szakmai fejlődésemet segítették, de bármilyen kérdésben bizalommal fordulhattam hozzájuk. Továbbá, hogy mindig jó hangulat, légkör volt meghatározó a kutatólaboratóriumban, ami egy plusz löketet, motiváltságot adott a kutatómunka során.

Szeretnék köszönetet mondani a Tanszék minden kollégájának a szakmai és baráti beszélgetésekért. Külön köszönettel tartozok Dr. Solti Ádámnak, akitől nem tudtam olyat kérdezni, amire ne tudott volna válaszolni, illetve a fotoszintézis és enzimaktivitás mérések során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Boldizsár Imrének a HPLC mérések során nyújtott segítségét, és köszönöm Dr. Kalapos Balázs segítségét a microarray adatok annotálásában.

Köszönetemet fejezem ki korábbi munkahelyem minden dolgozójának, a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Osztályáról, hogy segítettek szakmai fejlődésemet. Szeretnék köszönetet mondani jelenlegi kollégáimnak, az Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika dolgozóinak. A doktori éveim után szerzett munkatapasztalatok sokat segítettek a dolgozatom megírásában.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom és barátaim támogatását, külön köszönettel tartozom Édesanyámnak, legnagyobb támogatómnak.

10. Melléklet

M1. táblázat Az AgriGO v2.0 programmal készített GO (gene ontology) analízis a K-HM csoportok összevetésében, a táblázatban a biológiai folyamatok szerinti csoportosításban láthatóak a GO kategóriák, melyek génaktivitásbeli változást mutatnak. Továbbá a táblázat tartalmazza a GO kategóriákhoz tartozó annotált gének számát, a vizsgálat során annotált gének számát és az adatbázisban megtalálható annotált gének számát.

GO azonosító	Biológiai folyamatok	annotált gének száma	összes annotált gének száma	maximálisan annotálható gének száma	összes elemszám	p-érték
GO:0042221	response to chemical stimulus	93	521	432	25288	4.5E-60
GO:0022414	reproductive process	49	521	68	25288	6.9E-52
GO:0000003	reproduction	52	521	137	25288	5.9E-44
GO:0050896	response to stimulus	152	521	2128	25288	1.2E-41
GO:0009314	response to radiation	30	521	33	25288	2.9E-34
GO:0009416	response to light stimulus	29	521	33	25288	7.2E-33
GO:0032501	multicellular organismal process	103	521	1390	25288	1.3E-28
GO:0051716	cellular response to stimulus	38	521	158	25288	2.9E-26
GO:0051704	multi-organism process	35	521	132	25288	1.7E-25
GO:0048519	negative regulation of biological process	23	521	37	25288	7.5E-24
GO:0009987	cellular process	357	521	11754	25288	7.4E-24
GO:0048523	negative regulation of cellular process	22	521	33	25288	2.3E-23
GO:0044237	cellular metabolic process	293	521	9105	25288	1.2E-20
GO:0007242	intracellular signaling cascade	41	521	297	25288	3.2E-20
GO:0006950	response to stress	103	521	1883	25288	3.8E-19
GO:0010035	response to inorganic substance	17	521	25	25288	1.9E-18
GO:0019748	secondary metabolic process	22	521	67	25288	3.8E-18
GO:0007049	cell cycle	18	521	35	25288	7.8E-18
GO:0016043	cellular component organization	64	521	865	25288	9.3E-18
GO:0009628	response to abiotic stimulus	80	521	1339	25288	6.7E-17
GO:0006952	defense response	22	521	82	25288	1.4E-16
GO:0009605	response to external stimulus	22	521	91	25288	8.9E-16
GO:0008152	metabolic process	342	521	12161	25288	1E-15
GO:0050789	regulation of biological process	142	521	3517	25288	2.6E-15
GO:0006996	organelle organization	40	521	411	25288	5.4E-15
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	38	521	373	25288	7E-15

GO:0009617	response to bacterium	12	521	12	25288	8.8E-15
GO:0050794	regulation of cellular process	136	521	3392	25288	2.2E-14
GO:0048522	positive regulation of cellular process	12	521	16	25288	9.2E-14
GO:0031324	negative regulation of cellular metabolic process	14	521	33	25288	2.9E-13
GO:0010605	negative regulation of macromolecule metabolic process	14	521	35	25288	5.5E-13
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	14	521	35	25288	5.5E-13
GO:0022402	cell cycle process	13	521	27	25288	5.8E-13
GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	11	521	14	25288	7.1E-13
GO:0090066	regulation of anatomical structure size	12	521	21	25288	9.7E-13
GO:0032535	regulation of cellular component size	12	521	21	25288	9.7E-13
GO:0016071	mRNA metabolic process	14	521	37	25288	1E-12
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	30	521	304	25288	1.1E-11
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	30	521	304	25288	1.1E-11
GO:0000097	sulfur amino acid biosynthetic process	11	521	20	25288	1.2E-11
GO:0022403	cell cycle phase	11	521	20	25288	1.2E-11
GO:0000096	sulfur amino acid metabolic process	12	521	31	25288	3.5E-11
GO:0008283	cell proliferation	9	521	10	25288	4E-11
GO:0042440	pigment metabolic process	12	521	33	25288	6.3E-11
GO:0006575	cellular amino acid derivative metabolic process	17	521	93	25288	8.1E-11
GO:0016481	negative regulation of transcription	9	521	12	25288	1.2E-10
GO:0000279	M phase	10	521	19	25288	1.5E-10
GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process	10	521	20	25288	2.2E-10
GO:0010629	negative regulation of gene expression	9	521	14	25288	3.3E-10
GO:0019953	sexual reproduction	15	521	75	25288	3.5E-10
GO:0009058	biosynthetic process	163	521	5027	25288	7.5E-10
GO:0040011	locomotion	10	521	25	25288	1.2E-09
GO:0043436	oxoacid metabolic process	44	521	742	25288	1.3E-09
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	44	521	742	25288	1.3E-09
GO:0044248	cellular catabolic process	33	521	451	25288	1.4E-09
GO:0006082	organic acid metabolic process	44	521	744	25288	1.4E-09

GO:0042180	cellular ketone metabolic process	44	521	749	25288	1.7E-09
GO:0044249	cellular biosynthetic process	157	521	4857	25288	2.3E-09
GO:0006397	mRNA processing	11	521	37	25288	2.4E-09
GO:0065007	biological regulation	154	521	4740	25288	2.5E-09
GO:0006519	cellular amino acid and derivative metabolic process	38	521	600	25288	3.5E-09
GO:0015994	chlorophyll metabolic process	8	521	13	25288	4.2E-09
GO:0006366	transcription from RNA polymerase II promoter	11	521	40	25288	4.7E-09
GO:0000278	mitotic cell cycle	8	521	14	25288	6.5E-09
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	148	521	4581	25288	8.8E-09
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	20	521	188	25288	9.7E-09
GO:0006555	methionine metabolic process	8	521	15	25288	9.8E-09
GO:0006396	RNA processing	24	521	273	25288	1E-08
GO:0009890	negative regulation of biosynthetic process	10	521	33	25288	1.1E-08
GO:0010558	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	10	521	33	25288	1.1E-08
GO:0031327	negative regulation of cellular biosynthetic process	10	521	33	25288	1.1E-08
GO:0044272	sulfur compound biosynthetic process	11	521	49	25288	2.9E-08
GO:0007610	behavior	7	521	11	25288	3.4E-08
GO:0006955	immune response	11	521	50	25288	3.4E-08
GO:0008610	lipid biosynthetic process	24	521	294	25288	3.9E-08
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	24	521	295	25288	4.1E-08
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	28	521	395	25288	4.8E-08
GO:0016568	chromatin modification	10	521	40	25288	5.1E-08
GO:0009086	methionine biosynthetic process	6	521	6	25288	5.5E-08
GO:0002376	immune system process	11	521	53	25288	5.8E-08
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	85	521	2250	25288	6.7E-08
GO:0007165	signal transduction	54	521	1184	25288	9.8E-08
GO:0019222	regulation of metabolic process	87	521	2373	25288	1.6E-07
GO:0006790	sulfur metabolic process	12	521	78	25288	2.7E-07
GO:0046148	pigment biosynthetic process	8	521	26	25288	3E-07

GO:0016070	RNA metabolic process	74	521	1932	25288	3.3E-07
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	30	521	493	25288	3.6E-07
GO:0006778	porphyrin metabolic process	9	521	39	25288	4.3E-07
GO:0033554	cellular response to stress	16	521	156	25288	4.6E-07
GO:0006629	lipid metabolic process	36	521	674	25288	4.9E-07
GO:0006631	fatty acid metabolic process	15	521	140	25288	6.3E-07
GO:0051641	cellular localization	28	521	470	25288	1.3E-06
GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	5	521	6	25288	1.4E-06
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	16	521	176	25288	0.000002
GO:0008380	RNA splicing	8	521	36	25288	2.4E-06
GO:0009309	amine biosynthetic process	17	521	202	25288	2.5E-06
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	81	521	2312	25288	2.6E-06
GO:0042398	cellular amino acid derivative biosynthetic process	9	521	50	25288	2.7E-06
GO:0033013	tetrapyrrole metabolic process	9	521	50	25288	2.7E-06
GO:0010038	response to metal ion	7	521	25	25288	2.9E-06
GO:0006979	response to oxidative stress	18	521	227	25288	2.8E-06
GO:0007005	mitochondrion organization	5	521	8	25288	3.7E-06
GO:0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	5	521	8	25288	3.7E-06
GO:0044106	cellular amine metabolic process	28	521	502	25288	4.3E-06
GO:0007010	cytoskeleton organization	11	521	89	25288	5.7E-06
GO:0006066	alcohol metabolic process	26	521	455	25288	6.3E-06
GO:0046907	intracellular transport	23	521	372	25288	6.5E-06
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	80	521	2335	25288	6.9E-06
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	76	521	2208	25288	0.00001
GO:0048878	chemical homeostasis	7	521	32	25288	0.000012
GO:0006721	terpenoid metabolic process	5	521	11	25288	0.000012
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	12	521	119	25288	0.000015
GO:0051649	establishment of localization in cell	25	521	456	25288	0.000018
GO:0009966	regulation of signal transduction	10	521	86	25288	0.000025

GO:0010646	regulation of cell communication	10	521	86	25288	0.000025
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	189	521	7062	25288	0.000025
GO:0006470	protein amino acid dephosphorylation	10	521	89	25288	0.000032
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	14	521	175	25288	0.000032
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	74	521	2210	25288	0.000034
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	74	521	2210	25288	0.000034
GO:0010468	regulation of gene expression	74	521	2216	25288	0.000037
GO:0009066	aspartate family amino acid metabolic process	8	521	55	25288	0.000038
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	5	521	15	25288	0.00004
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	5	521	15	25288	0.00004
GO:0044085	cellular component biogenesis	28	521	576	25288	0.000046
GO:0009611	response to wounding	9	521	76	25288	0.000055
GO:0009067	aspartate family amino acid biosynthetic process	6	521	28	25288	0.000055
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	73	521	2210	25288	0.000058
GO:0009308	amine metabolic process	29	521	619	25288	0.000063
GO:0051179	localization	78	521	2423	25288	0.000072
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	8	521	61	25288	0.000074
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	11	521	121	25288	0.000079
GO:0044042	glucan metabolic process	11	521	121	25288	0.000079
GO:0046165	alcohol biosynthetic process	5	521	18	25288	0.000082
GO:0016311	dephosphorylation	10	521	101	25288	0.000086
GO:0050877	neurological system process	5	521	19	25288	0.0001
GO:0051276	chromosome organization	17	521	291	25288	0.0002
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	16	521	264	25288	0.0002
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	24	521	502	25288	0.0002
GO:0016044	cellular membrane organization	5	521	23	25288	0.00022
GO:0051234	establishment of localization	75	521	2392	25288	0.00022
GO:0006810	transport	75	521	2392	25288	0.00022

GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	19	521	355	25288	0.00024
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	41	521	1097	25288	0.00027
GO:0045449	regulation of transcription	69	521	2172	25288	0.00028
GO:0006644	phospholipid metabolic process	9	521	97	25288	0.0003
GO:0034637	cellular carbohydrate biosynthetic process	12	521	168	25288	0.00031
GO:0006350	transcription	74	521	2389	25288	0.00035
GO:0003008	system process	5	521	26	25288	0.00036
GO:0033036	macromolecule localization	23	521	497	25288	0.00042
GO:0006886	intracellular protein transport	17	521	315	25288	0.00046
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	7	521	62	25288	0.00048
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	49	521	1434	25288	0.00051
GO:0070727	cellular macromolecule localization	17	521	320	25288	0.00055
GO:0034613	cellular protein localization	17	521	320	25288	0.00055
GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process	11	521	155	25288	0.00058
GO:0043170	macromolecule metabolic process	202	521	8085	25288	0.00069
GO:0006779	porphyrin biosynthetic process	5	521	32	25288	0.00084
GO:0019637	organophosphate metabolic process	9	521	113	25288	0.00084
GO:0032774	RNA biosynthetic process	50	521	1508	25288	0.00085
GO:0019725	cellular homeostasis	11	521	164	25288	0.0009
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	6	521	50	25288	0.00091
GO:0010467	gene expression	103	521	3707	25288	0.001
GO:0016265	death	10	521	149	25288	0.0015
GO:0008219	cell death	10	521	149	25288	0.0015
GO:0019318	hexose metabolic process	14	521	262	25288	0.0016
GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	5	521	38	25288	0.0017
GO:0042254	ribosome biogenesis	6	521	61	25288	0.0023
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	12	521	218	25288	0.0026
GO:0007017	microtubule-based process	11	521	190	25288	0.0027
GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	5	521	43	25288	0.0028
GO:0008654	phospholipid biosynthetic process	5	521	43	25288	0.0028
GO:0006793	phosphorus metabolic process	59	521	1969	25288	0.003

GO:0006364	rRNA processing	5	521	44	25288	0.003
GO:0016072	rRNA metabolic process	5	521	44	25288	0.003
GO:0006605	protein targeting	6	521	65	25288	0.0031
GO:0006325	chromatin organization	14	521	284	25288	0.0032
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	8	521	113	25288	0.0032
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	15	521	321	25288	0.0037
GO:0019751	polyol metabolic process	5	521	48	25288	0.0043
GO:0022607	cellular component assembly	20	521	497	25288	0.0045
GO:0006796	phosphate metabolic process	58	521	1969	25288	0.0046
GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	5	521	49	25288	0.0046
GO:0005984	disaccharide metabolic process	5	521	50	25288	0.005
GO:0009311	oligosaccharide metabolic process	5	521	52	25288	0.0058
GO:0043687	post-translational protein modification	54	521	1832	25288	0.0061
GO:0045184	establishment of protein localization	19	521	480	25288	0.0066
GO:0015031	protein transport	19	521	480	25288	0.0066
GO:0046486	glycerolipid metabolic process	5	521	57	25288	0.0083
GO:0006650	glycerophospholipid metabolic process	5	521	57	25288	0.0083
GO:0015979	photosynthesis	8	521	134	25288	0.0083
GO:0008104	protein localization	19	521	494	25288	0.0087
GO:0006576	cellular biogenic amine metabolic process	5	521	60	25288	0.01
GO:0000160	two-component signal transduction system	5	521	62	25288	0.011
GO:0051186	cofactor metabolic process	12	521	266	25288	0.011
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	6	521	87	25288	0.011
GO:0043412	macromolecule modification	58	521	2069	25288	0.012
GO:0006464	protein modification process	56	521	2013	25288	0.015
GO:0006820	anion transport	6	521	98	25288	0.019
GO:0006457	protein folding	12	521	288	25288	0.02
GO:0034470	ncRNA processing	6	521	99	25288	0.02
GO:0012501	programmed cell death	7	521	129	25288	0.021
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	18	521	509	25288	0.022
GO:0016192	vesicle-mediated transport	10	521	234	25288	0.027

GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	94	521	3777	25288	0.031
GO:0006006	glucose metabolic process	10	521	240	25288	0.031
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	94	521	3782	25288	0.032
GO:0051169	nuclear transport	5	521	86	25288	0.037
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	5	521	86	25288	0.037
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	18	521	546	25288	0.039
GO:0009250	glucan biosynthetic process	5	521	88	25288	0.04
GO:0045454	cell redox homeostasis	7	521	150	25288	0.041
GO:0065003	macromolecular complex assembly	16	521	483	25288	0.048
GO:0006974	response to DNA damage stimulus	7	521	157	25288	0.049

M2. táblázat Az AgriGO v2.0 programmal készített GO (gene ontology) analízis a K-HM csoportok összevetésében, a táblázatban a sejtkomponensek szerinti csoportosításban láthatóak a GO kategóriák, melyek génaktivitásbeli változást mutatnak. Továbbá a táblázat tartalmazza a GO kategóriákhoz tartozó annotált gének számát, a vizsgálat során annotált gének számát és az adatbázisban megtalálható annotált gének számát.

GO azonosító	Sejtkomponens	annotált gének száma	összes annotált gének száma	maximálisan annotálható gének száma	összes elemszám	p-érték
GO:0005737	cytoplasm	225	521	2005	25288	6.90E-102
GO:0043227	membrane-bounded organelle	253	521	2791	25288	6.40E-98
GO:0044444	cytoplasmic part	191	521	1518	25288	6.30E-92
GO:0044424	intracellular part	303	521	5133	25288	1.40E-77
GO:0005622	intracellular	315	521	6032	25288	5.40E-69
GO:0044464	cell part	381	521	9123	25288	6.80E-65
GO:0005623	cell	381	521	9123	25288	6.80E-65
GO:0044422	organelle part	108	521	1167	25288	6.10E-38
GO:0044446	intracellular organelle part	106	521	1167	25288	1.50E-36
GO:0012505	endomembrane system	41	521	124	25288	7.30E-33
GO:0005829	cytosol	37	521	95	25288	7.30E-32
GO:0005886	plasma membrane	33	521	86	25288	2.30E-28
GO:0031090	organelle membrane	45	521	266	25288	2.60E-25
GO:0005739	mitochondrion	38	521	187	25288	5.40E-24
GO:0005783	endoplasmic reticulum	31	521	136	25288	4.70E-21
GO:0043233	organelle lumen	29	521	125	25288	5.80E-20
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	29	521	133	25288	2.50E-19
GO:0070013	intracellular organelle lumen	28	521	125	25288	5.70E-19
GO:0005634	nucleus	113	521	2294	25288	9.10E-18
GO:0044428	nuclear part	27	521	170	25288	4.70E-15
GO:0005773	vacuole	11	521	16	25288	2.00E-12
GO:0031981	nuclear lumen	19	521	99	25288	2.90E-12
GO:0009579	thylakoid	16	521	89	25288	3.60E-10
GO:0016020	membrane	131	521	3707	25288	4.20E-10
GO:0042651	thylakoid membrane	10	521	25	25288	1.20E-09
GO:0044436	thylakoid part	12	521	49	25288	2.90E-09
GO:0005794	Golgi apparatus	14	521	77	25288	4E-09
GO:0042175	nuclear envelope-endoplasmic reticulum network	11	521	40	25288	4.70E-09
GO:0044432	endoplasmic reticulum part	11	521	45	25288	1.30E-08
GO:0031975	envelope	21	521	228	25288	4.20E-08
GO:0031967	organelle envelope	19	521	186	25288	4.10E-08

GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	10	521	40	25288	5.10E-08
GO:0034357	photosynthetic membrane	13	521	81	25288	5.40E-08
GO:0044425	membrane part	77	521	1975	25288	9.20E-08
GO:0005654	nucleoplasm	13	521	95	25288	2.90E-07
GO:0005615	extracellular space	5	521	5	25288	7.60E-07
GO:0044454	nuclear chromosome part	5	521	5	25288	7.60E-07
GO:0043234	protein complex	55	521	1324	25288	1.30E-06
GO:0005811	lipid particle	5	521	7	25288	2.30E-06
GO:0019866	organelle inner membrane	13	521	122	25288	3.70E-06
GO:0000228	nuclear chromosome	5	521	9	25288	5.70E-06
GO:0031224	intrinsic to membrane	60	521	1591	25288	7.60E-06
GO:0044421	extracellular region part	7	521	30	25288	0.000008
GO:0005777	peroxisome	6	521	19	25288	8.40E-06
GO:0042579	microbody	6	521	19	25288	8.40E-06
GO:0044451	nucleoplasm part	11	521	95	25288	0.00001
GO:0016021	integral to membrane	59	521	1574	25288	1.10E-05
GO:0005618	cell wall	12	521	128	25288	2.80E-05
GO:0030312	external encapsulating structure	13	521	168	25288	8.50E-05
GO:0031982	vesicle	8	521	64	25288	0.0001
GO:0031410	cytoplasmic vesicle	8	521	64	25288	0.0001
GO:0044429	mitochondrial part	13	521	174	25288	0.00012
GO:0016023	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	7	521	50	25288	0.00014
GO:0031988	membrane-bounded vesicle	7	521	50	25288	0.00014
GO:0009523	photosystem II	6	521	37	25288	0.00021
GO:0032991	macromolecular complex	73	521	2352	25288	0.00036
GO:0009521	photosystem	6	521	59	25288	0.002
GO:0015934	large ribosomal subunit	5	521	41	25288	0.0023
GO:0031966	mitochondrial membrane	9	521	136	25288	0.0028
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	8	521	121	25288	0.0047
GO:0005740	mitochondrial envelope	9	521	153	25288	0.0058
GO:0008287	protein serine/threonine phosphatase complex	6	521	89	25288	0.013
GO:0005667	transcription factor complex	5	521	85	25288	0.036

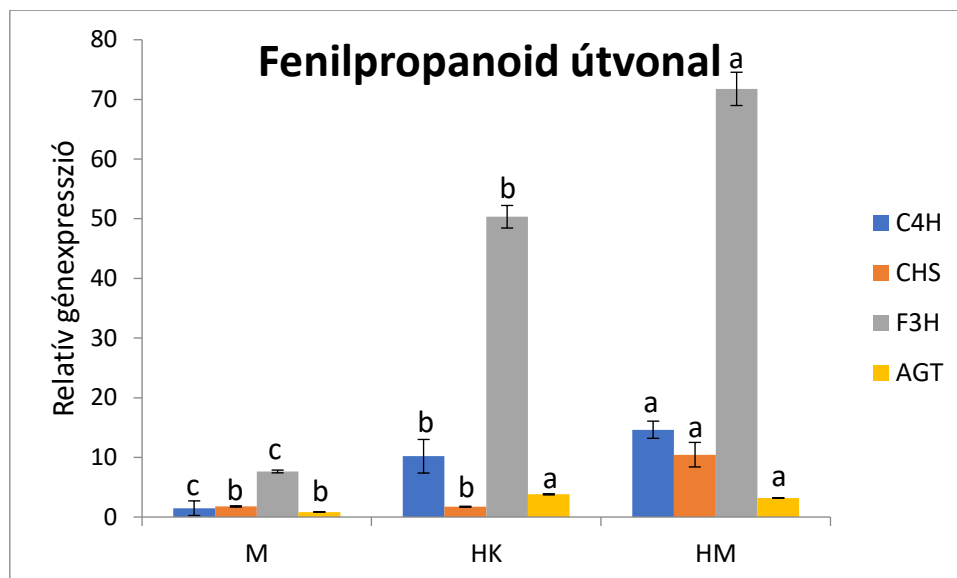
M3. táblázat Az AgriGO v2.0 programmal készített GO (gene ontology) analízis a K-HM csoportok összevetésében, a táblázatban a molekuláris folyamatok szerinti csoportosításban láthatóak a GO kategóriák, melyek génaktivitásbeli változást mutatnak. Továbbá a táblázat tartalmazza a GO kategóriákhoz tartozó annotált gének számát, a vizsgálat során annotált gének számát és az adatbázisban megtalálható annotált gének számát.

azonosító	Molekuláris folyamatok	annotált gének száma	összes annotált gének száma	maximálisan annotálható gének száma	összes elemszám	p-érték
GO:0005515	protein binding	135	521	3250	25288	2.00E-15
GO:0000287	magnesium ion binding	17	521	126	25288	5.20E-09
GO:0016564	transcription repressor activity	8	521	16	25288	1.40E-08
GO:0003824	catalytic activity	295	521	11249	25288	2.50E-08
GO:0016740	transferase activity	120	521	3613	25288	9.20E-08
GO:0004364	glutathione transferase activity	7	521	19	25288	6.20E-07
GO:0005516	calmodulin binding	7	521	23	25288	1.80E-06
GO:0016563	transcription activator activity	6	521	17	25288	0.000005
GO:0042803	protein homodimerization activity	5	521	10	25288	8.40E-06
GO:0042802	identical protein binding	9	521	61	25288	1.10E-05
GO:0008374	O-acyltransferase activity	6	521	20	25288	1.10E-05
GO:0030955	potassium ion binding	5	521	12	25288	1.70E-05
GO:0031420	alkali metal ion binding	5	521	12	25288	1.70E-05
GO:0016791	phosphatase activity	16	521	211	25288	1.70E-05
GO:0042578	phosphoric ester hydrolase activity	18	521	261	25288	1.70E-05
GO:0008168	methyltransferase activity	18	521	265	25288	2.10E-05
GO:0008415	acyltransferase activity	14	521	169	25288	2.30E-05
GO:0008134	transcription factor binding	8	521	53	25288	0.00003
GO:0003723	RNA binding	28	521	560	25288	2.90E-05
GO:0004721	phosphoprotein phosphatase activity	11	521	109	25288	3.30E-05
GO:0008757	SAM-dependent methyltransferase activity	9	521	74	25288	4.50E-05
GO:0004722	protein serine/threonine phosphatase activity	8	521	57	25288	4.80E-05
GO:0051213	dioxygenase activity	5	521	25	25288	0.00031
GO:0016829	lyase activity	18	521	372	25288	0.0011
GO:0016853	isomerase activity	16	521	318	25288	0.0014
GO:0030528	transcription regulator activity	47	521	1432	25288	0.0015
GO:0015144	carbohydrate transmembrane transporter activity	5	521	39	25288	0.0019
GO:0016830	carbon-carbon lyase activity	10	521	157	25288	0.0022
GO:0008171	O-methyltransferase activity	5	521	44	25288	0.003
GO:0016854	racemase and epimerase activity	5	521	48	25288	0.0043
GO:0046527	glucosyltransferase activity	6	521	70	25288	0.0044
GO:0016831	carboxy-lyase activity	7	521	105	25288	0.0077
GO:0016410	N-acyltransferase activity	5	521	58	25288	0.0088
GO:0016407	acetyltransferase activity	5	521	64	25288	0.013

GO:0016787	hydrolase activity	100	521	3943	25288	0.016
GO:0003924	GTPase activity	9	521	195	25288	0.023
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	34	521	1166	25288	0.03
GO:0015267	channel activity	9	521	214	25288	0.038
GO:0043167	ion binding	108	521	4439	25288	0.036
GO:0022838	substrate-specific channel activity	9	521	214	25288	0.038
GO:0022803	passive transmembrane transporter activity	9	521	214	25288	0.038
GO:0043169	cation binding	108	521	4439	25288	0.036
GO:0016835	carbon-oxygen lyase activity	5	521	88	25288	0.04
GO:0008047	enzyme activator activity	5	521	91	25288	0.045

M4. táblázat A microarray vizsgálat során azonosított gének, melyek szerepet játszanak a klorofill-bioszintézisben és az azonosítás során használt 60 nukleotidos szekvenciák. (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

GÉN	Szekvencia	génexpressziós hozam			
		K	M	HK	HM
ref NP_001130048.2 porphobilinogen deaminase [Zea mays]	GCCCCATTCAGCTTTTGTGTTTCTCATGTTCTTTTAGCACTCTGGGTTAGAGAGAGCCG	3262	4343	6306	12560
sp O81220.1 DCUP_MAIZE RecName: Full=Uroporphyrinogen decarboxylase, chloroplastic	TTTTTTGGTGTTCATGGCTTCAAGGGCTTAGTG CACACTAGCATTACTGGAAGCCAAGAGA	111	110	449	752
ref NP_001105564.2 protoporphyrinogen IX oxidase (plastidic)1 [Zea mays]	CTTGCCATGCTTCCAAATGCCATTACATCCAG CTTGGGTAGTAAAGTCAAACACTATCATGG	313	342	847	1253
sp B6SZW0.1 DCVR_MAIZE RecName: Full=Divinyl chlorophyllide a 8-vinyl-reductase, chloroplastic	CCACAACAAAAAACAGATATTCTATCGTCAG CAATCCTGCGTTCCTGCCCGACGGAGGT	144	131	321	298



M1. ábra A fenilpropanoid útvonal qRT-PCR technikával mért géneexpressziós változásai (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz , a kontroll értéke=1). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek 5%-os szignifikancia mellett.).

M5. táblázat A microarray vizsgálat során azonosított gének, melyek szerepet játszanak a fenilpropanoid metabolitok bioszintézisében és az azonosítás során használt 60 nukleotidos szekvenciák (K: kontroll; M: MMS-kezelés; HK: 24 órás hidegkezelés; HM: MMS-előkezelés, majd 24 órás hidegstressz).

GÉN	Szekvencia	géneexpressziós hozam			
		K	M	HK	HM
ref NP_001151482.1 phenylalanine ammonia-lyase [Zea mays]	AAACAAAAGTATAGCAGCACAAAACAGAGC GTTTCAAGGTCGTTGTGAAGTGCTTTACGA	143	162	314	384
ref XP_008678540.1 PREDICTED: probable 4-coumarate--CoA ligase 1 isoform X2 [Zea mays]	AGTTTCATTATCTATGCAACGTTTCTCGGATG TAATAATTGTCTTGTGTGGGCTGTACGC	84	126	285	337
sp P24825.1 CHS2_MAIZE RecName: Full=Chalcone synthase C2; AltName: Full=Naringenin-chalcone synthase C2	TTGAGCCACTGTGGTCTTAGGGTGTGAGCCG CGACTTTTAACACGGCGGAATTGTGCTTT	89	77	184	219
sp Q08704.1 CFI_MAIZE RecName: Full=Chalcone--flavonone isomerase;	CGCCGTCAACATTGACATCGCTGATGCCGAT TTTTCTTTTAGCATGCGGTGACCTGACCT	1296	1348	2886	5247

Short=Chalcone isomerase					
ref NP_001130275.1 flavanone 3-hydroxylase 1 [Zea mays]	TGCAGGACTGGCGTGAGATCGTGACCTACTTCTCGTACCCGGTGAAGGCCCGCGACTACT	15	36	124	597
sp P51108.1 DFRA_MAIZE RecName: Full=Dihydroflavonol-4-reductase; Short=DFR;	TAGCTAGCTAGTACCCGCTCTTCTCGCAATTC TCCCTTCGTTTTTCGTTTCTTTTTTGTTT	157	161	490	610
sp P41213.1 LDOX_MAIZE RecName: Full=Leucoanthocyanidin dioxygenase; Short=LDOX;	GTGAATGGTGACAAGGGAGTGGTTTACACCC ACAAGGATCTTCCTTTGCAATGAGGCAAA	57	56	122	207
ref XP_008670983.1 PREDICTED: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like [Zea mays]	CTGTGCCAAACAGGGGCCATAATGTATTTAG AGGGCGTTTGGACTATTTACGCATGATTG	195	208	2312	2128
sp P46420.2 GSTF4_MAIZE RecName: Full=Glutathione S-transferase 4	GAAGGTGAAGACTGCCAGGGTCTTCTTTCT CTGGCCAACAGGAAGCAGATGAGCACCAC	195	208	231	2128

11. DOI Adatlap a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Oláh Csilla

MTMT-azonosító: 10051826

A doktori értekezés címe és alcíme: Biológiaiilag aktív vegyület, az S-metilmetionin-szalicilát fiziológiai és stresszkivédő hatásai kukoricában

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2020.003

A doktori iskola neve: Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Kísérletes Növénybiológiai Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Rudnóy Szabolcs, egyetemi adjunktus

A témavezető munkahelye: Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológia Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2020.01.05.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet