

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Paradicsom sóstressz akklimatizációjának javítása szalicilsav előkezeléssel: a reaktív oxigénformák és a nitrogén-monoxid szerepe

Készítette

Gémes Katalin

Témavezető

Dr. habil. Tari Irma

Tanszékvezető egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2011.

BEVEZETÉS

A sóstressz világszerte az egyik legjelentősebb stresszféleség, ami a növényekben felborítja a szövetek ionhomeosztázisát és hiperozmotikus stresszt okoz. A paradicsom nagyüzemi termelése gyakran óriási üvegházakban, talajnélküli kultúrákban történik. Ezek a növények sokszor érzékenyebbek a különböző abiotikus és biotikus stresszhatásokra, mint a talajban növekvő növények. A paradicsomtermelő országok közül egyes helyeken, pl. Spanyolországban és Izraelben, sokszor magas sótartalmú öntözővíz áll rendelkezésre. Ezért fontos a sótolerancia mechanizmusának a megismerése, illetve olyan eljárások kidolgozása, amelyek a sóstressz rezisztencia fokozásával lehetővé teszik, hogy ezek a növények olyan helyeken is gazdasági növényként termesztethők legyenek, ahol az öntözővíz sótartalma magas. Ilyen eljárás lehet a szalicilsavval (SA) történő exogén előkezelés.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján elmondható, hogy a külsőleg alkalmazott SA sóstresszel szembeni rezisztenciát fokozó hatása nagymértékben függ a kezelés módjától, a növény fejlődési stádiumától és az alkalmazott koncentráció nagyságától. Az SA alacsonyabb koncentrációinak alkalmazásával (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) olyan edzési eljárás dolgozható ki, ami lehetővé teszi a sóstresszel szembeni rezisztencia kialakítását talaj nélküli kultúrákban nevelt paradicsom (*Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego) növényekben. A korábbi kutatási eredmények alapján megállapítható, hogy a 10^{-4} M-os, hosszú időtartamú SA előkezelés javítja a paradicsom sóstressz rezisztenciáját, a 10^{-7} M-os koncentráció nem hatásos, a 10^{-3} M-nál nagyobb koncentrációk pedig a növények pusztulását okozzák.

Kutatócsoportunk korábbi munkái során nem történt meg azonban a különböző hatást eredményező SA kezelések háttérében húzódó biokémiai és fiziológiai folyamatok idő függvényében történő összehasonlítása az előkezelések ideje, azaz a „priming” alatt, ami lehetővé teszi azoknak a tényezőknak a kiemelését, amelyek jelenlétében, vagy hiányában fokozódik a növények edzettsége és ennek eredményeképpen sikeres akklimatizáció, vagy ellenkező esetben sejtihal alakul ki.

Munkám során céлом volt a széles koncentráció intervallumban alkalmazott SA előkezelések háttérében húzódó biokémiai faktorok vizsgálata a „priming”, illetve az azt követő sóstressz alatt paradicsom (*Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego) növényben, mely intervallum magában foglalja a sóstresszel szembeni rezisztenciát fokozó és a növények pusztulását előidéző koncentrációkat is.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A széles koncentrációintervallumban alkalmazott SA előkezelések hatásának vizsgálata az előkezelések alatt:

- Változik-e a hosszútávú előkezelés során az SA vízháztartásra gyakorolt hatásának alapját képező sztómakonduktancia?
- Változik-e a sztómalimitáció által is kontrollált fotoszintetikus aktivitás, a CO₂ asszimilációs ráta, a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paraméterek és a különböző fotoszintetikus pigmentek mennyisége, valamint az ozmotikus adaptáció kialakításában fontos szénhidrátok akkumulációja az SA előkezelések hatására?
- Mi a szerepe a fotoszintetikus aktivitás esetleges változásának a „priming” folyamatában?
- Van-e változás már az előkezelések során a sóstressz akklimatizációban is fontos szerepet betöltő poliaminok koncentrációjában, és hogyan kapcsolódik ez a poliaminok által is szabályozott etilénprodukciónak? Része lehet-e ez a „priming”-nak?
- Hogyan befolyásolja a SA előkezelés a reaktív oxigénformák mennyiségét és a NO tartalmat paradicsom növények gyökerében az idő függvényében? A ROS, vagy az NO játszik fontosabb szerepet az SA indukált edzettségi állapot kialakulásában? Szükség van-e a ROS és/vagy az NO tartósan megemelkedett szintjére az előkezelés alatt a sóstressz akklimatizáció sikerességéhez?
- Hogyan hat a rövid, illetve a hosszú távú SA előkezelés a detoxifikációban szerepet játszó és a szövetek H₂O₂ tartalmát döntően meghatározó SOD és KAT enzimek aktivitására az idő függvényében?

2. A SA előkezelések akklimatizációt fokozó hatásának vizsgálata 100 mM-os NaCl által kiváltott sóstressz alatt:

- Van-e különbség a fotoszintetikus aktivitásban a kontroll és az SA-val előkezelt növények között sóstressz alatt?
- Milyen befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a stresszrezisztencia markereket, a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paramétereket, a különböző fotoszintetikus pigmentek mennyiségét, valamint az ozmotikus adaptáció kialakításában fontos szénhidrátok akkumulációját a sóstressznek kitett növényekben?
- Hogyan hat a hosszútávú SA előkezelés a stresszválaszban fontos szerepet játszó növekedésszabályozó anyagok közül az etilénprodukciónak sóstressz alatt? Mindez miképp járul hozzá a sóstresszel szembeni sikeres akklimatizációhoz?

- Hogyan befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a ROS és NO tartalmakat sóstressz alatt?
- Miképpen befolyásolja a hosszútávú SA előkezelés a detoxifikációban szerepet játszó SOD és KAT enzimek aktivitását sóstressz alatt?

2. A reaktív oxigénformák és NO interakciójának vizsgálata mezofill protoplasztok, mint modellrendszer segítségével:

- A továbbiakban az SA hatását egy sejtszintű modellrendszeren, levél mezofillum sejtekből készült protoplasztokon vizsgáltam. Ezzel kiküszöböltem a sejtfal hatását, és könnyen detektálhatóvá váltak az egyes sejtekben lejátszódó intracelluláris változások. Ezen modellrendszer segítségével vizsgáltam, hogy a különböző koncentrációjú SA kezelések hogyan hatnak az intracelluláris ROS és NO keletkezésére, illetve a protoplasztok életképességére normál körülmények, illetve sóstressz alatt. Miképpen befolyásolják az akklimatizáció kialakítása szempontjából fontos növekedésszabályozó anyagok, így a Put, Spd, Spm, az ABS valamint a sejthalál kialakításában szerepet játszó növekedésszabályozó anyagok közül az etilént generáló ACC a protoplasztok NO és ROS tartalmát? Milyen hatással vannak az említett növekedésszabályozó anyagok a protoplasztok életképességére? Mi a szerepe a NADPH oxidáznak az egyes kezelések hatására indukálódó ROS és NO produkcióban?

ANYAGOK, MÓDSZEREK ÉS A KÍSÉRLETEK KIVITELEZÉSE

1. Intakt növényen végzett kísérletek

1.1 Növénynevelés, alkalmazott kezelések:

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar Rio Fuego paradicsom növényeket használtunk. A csíráztatás 3 napon keresztül, sötétben, 26°C-on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben, majd vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek.

A SA előkezelést a növények 3 hetes korától 7 hetes koráig végeztük 10^{-7} - 10^{-2} M-os koncentráció intervallumban. A sókezelés 6 hetes korban történt 100 mM-os NaCl alkalmazásával. A mintákat egyrészt az előkezelést követő 1 nap, 2 nap, 1 hét, 2 hét, 3 hét elteltével, másrészt a sókezelés megkezdése után 7 nappal vettük.

1.2 Fotoszintetikus paraméterek meghatározása

1.2.1 Sztómakonduktancia mérése:

A sztómakonduktanciát a levelek adaxiális és abaxiális felszínének közepén steady-state porométerrel (PMR-2, PP systems, UK) határoztuk meg.

1.2.2 A CO₂ asszimiláció és a fluoreszcencia indukció meghatározása

A fluoreszcencia indukció kinetikai paramétereinek, valamint CO₂ fixálás sebességének fényintenzitás, illetve intercelluláris CO₂ függvényében történő meghatározása hordozható fotoszintézismérő készülék (LI-6400, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével történt.

1.2.3 A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása

A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározásánál Sims és mtsai. (2002.) által kidolgozott módszert használtuk fel. A klorofilok kivonása két fázisban, acetonnal történt. Az abszorpcióméréseket KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével végeztük. Az extraktumok pigmenttartalmait 470, 534 és 661 nm-en mért abszorpciók alapján számítottuk ki.

1.2.4 Az összcukortartalom meghatározása

Az összcukor mennyiségének meghatározására a Dubois-féle (1956.) fenol-kénsavas módszert használtuk. A mérés 490 nm-en KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével történt. Az összcukor mennyiségeket g/g friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

1.3 Hormonális állapot meghatározása

1.3.1 Etilénprodukción meghatározása

Az etilénprodukción méréséhez a növények leveléből és gyökeréből is 1 g mintákat vettünk, melyeket etiléngyűjtő csövekbe helyeztünk. A mérés megkezdése előtt a mintákat 1 órán át sötétben inkubáltuk.

Az etilénprodukciónak ezután Hewlett Packard 5890 Series II. típusú gázkromatográf segítségével mértük.

1.3.2 Poliaminok analízise

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

1.4 Az antioxidatív enzimek aktivitásának meghatározása

1.4.1 Szuperoxid-dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1) aktivitás mérése

A növényi szövetet extrakciós pufferben homogenizáltuk (1 mM EDTA, 1 mM fenilmetilszulfonil fluoridot (PMSF), 13 mM metionint és 1% polivinil polipirrolidont (PVPP) tartalmazó 50 mM-os foszfát puffer, pH 7.0), majd centrifugáltuk. A méréshez használt reakcióelegy enzimm kivonatot, tetrazólium kéket (NBT) és riboflavint tartalmazott. Az extinkciót 560 nm-en mértük, KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével.

1.4.2 Kataláz (KAT) (EC 1.11.1.6) aktivitás mérése

A növényi szövetet extrakciós pufferben homogenizáltuk (50 mM foszfát puffer, pH 7.0), majd centrifugáltuk. A méréshez használt reakcióelegy enzimm kivonatot, foszfát puffert (50 mM, pH 7.0), illetve 1%-os H₂O₂-t tartalmazott. A H₂O₂ bomlását 240 nm-en, az 1. és a 2. perc között mért extinkcióváltozásból határoztuk meg KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével.

1.5 ROS és NO, valamint az életképesség meghatározása

1.5.1 A O₂⁻ felszabadulás detektálása

A O₂⁻ detektálására egy erre alkalmas festéket, NBT-t használtunk, 3 mg/ml koncentrációban. A mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk, fénymikroszkóp üzemmódban. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású, digitális kamera (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével.

1.5.2 A H₂O₂ tartalom kvantitatív meghatározása

A H₂O₂ kvantitatív meghatározása Velikova (2000.) módszere alapján valósult meg. A friss növényi anyagot 0,1 %-os triklór-ecetsavban (TCA) homogenizáltuk, majd centrifugálás után a felülúszóhoz K-foszfát puffert (10 mM, pH 7.0) és kálium-jodid (1M) oldatot adtunk, majd a reakciótermék mérését 390 nm-en végeztük KONTRON Double-Beam spektrofotométer segítségével.

1.5.3 ROS és NO, valamint az életképesség in situ detektálása

A ROS in situ detektálására 2,7-diklorofluorescein-diacetátot (H₂DC-FDA), a NO szint meghatározására 4,5-diaminofluorescein diacetátot (DAF2-DA), az életképesség kimutatására pedig fluorescein diacetátot (FDA) használtunk. A mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású, digitális kamera (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével.

2. Mezofill protoplasztokon, mint modellrendszeren végzett kísérletek

2.1 Protoplasztok izolálása, majd a protoplasztok kezelése

A protoplasztok izolálása kontroll paradicsom növények csúcsához közeli, fiatal leveleiből történt két sejtfalbontó enzim: 2% celluláz (Onozuka R-10) és 0.5% macerozim (Onozuka R-10) segítségével. A protoplasztok tárolására egy arra alkalmas puffert (525.6 mM mannitol, 12.5 mM Na-acetát, 5 mM CaCl₂) használtunk. A protoplasztok kezelésére használt anyagokat ebben a pufferben oldottuk fel. A protoplasztok kezelésére egyrészt 10⁻⁷-10⁻³ M SA oldatot, 100 mM NaCl-t, valamint különböző növekedésszabályozó anyagokat: 10⁻⁵ M abszcizinsavat (ABS), 10⁻⁵ M 1-aminociklopropán-1-karbonsavat (ACC), 2.5 mM putreszcint (Put), 2.5 mM spermidint (Spd) és 2.5 mM spermint (Spm) használtunk.

2.2 ROS és NO, valamint a protoplasztok életképességének meghatározása

A ROS detektálására 2,7-diklorofluorescein-diacetátot (H₂DC-FDA), a NO szint meghatározására 4,5-diaminofluorescein diacetátot (DAF2-DA), az életképesség kimutatására pedig fluorescein diacetátot (FDA) használtunk. A mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A mintákról fotót készítettünk nagy felbontású, digitális kamera (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) segítségével.

EREDMÉNYEK

Kutatásom célja a jelen értekezésben közölt kísérletek elvégzésével az volt, hogy megállapítsam, milyen biokémiai és fiziológiai folyamatok húzódnak a széles koncentráció intervallumban alkalmazott SA előkezelések háttérében a „priming” alatt, valamint mi vezet a 10^{-4} M-os hosszútávú SA előkezelés sóstresszel szembeni rezisztenciájának fokozásához, illetve az ennél magasabb koncentrációk esetében a növényi szövetek elhalásához.

A témával kapcsolatban a következő eredmények születtek:

1. A SA előkezelés hatásai a „priming” alatt paradicsom növényben

1.1 A fotoszintetikus aktivitás szerepe az SA által indukált kémiai edzésben

Néhány fontos stresszmarker segítségével bebizonyítottuk, hogy a 10^{-3} M SA előkezelt növények fiziológiai paraméterei már az előkezelés kezdetén rosszabb értéket mutatnak a kontroll növényekénél. Csökkent a sztómakonduktancia, ami által gátlódott a CO_2 fixáció hatékonysága. Csökkent az összcukor mennyisége gyökérben, mely kompatibilis ozmotikum hiányában a gyökér vízfelvevő képessége csökkenhet és ozmotikus stressz történhet. Az SA alacsonyabb koncentrációinál (10^{-4} M és 10^{-7} M SA) azonban nem alakult ki különbség a fotoszintetikus pigmenttartalmakban, illetve a fotoszintézis primer fotokémiai folyamataiban (F_v/F_m , Φ_{PSII} , q_p , NPQ) sem a kontroll növényekhez képest. Bár az SA alacsonyabb koncentrációi szintén csökkentették átmenetileg a növények sztómakonduktanciáját, a 3 hetes előkezelés végére a 10^{-7} M-os, illetve a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt és a kontroll növények már sztómakonduktanciájukban sem különböztek egymástól. A 10^{-4} M SA már a „priming” ideje alatt megemelte az ozmotikus adaptáció kialakítása szempontjából fontos összcukor mennyiségét gyökérben, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult az ozmotikus adaptáció kialakításához.

1.2 Az etilén szerepe az akklimatizációban

A magasabb koncentrációk közül a 10^{-3} M SA már az előkezelés kezdetén extrém mértékben fokozta az etilénprodukción a növények gyökerében, ami a 10^{-2} M SA esetén gátlásba ment át. A jelentős etilénprodukción fokozódás hozzájárult a 10^{-3} M-os SA-val kezelt növények gyökérszöveteinek elhalásához, a 10^{-2} M-os SA kezelés esetében azonban a PCD kiváltása az etilénszint emelkedésétől függetlenül történt. Az alacsonyabb koncentrációk, különösen a 10^{-4} M SA, kismértékű emelkedést okoztak az etilénszintézisben, hosszú távon azonban nem eredményeztek változást a növények levelének és gyökerének etilénprodukciónjában a kontroll növényekéhez képest, a növény adaptálódott a változásokhoz. Az etilénszintézis kismértékű és átmeneti növekedése szükséges feltétele lehet a későbbi akklimatizáció kialakulásának.

1.3 A poliaminok akkumulációja az előkezelés alatt

A SA magasabb koncentrációi közül a 10^{-3} M és a 10^{-2} M SA különböző módon fejtette ki hatását a növekedésszabályozó anyagok szintézisére. A 10^{-2} M SA mintegy ötszörösére emelte a Put és mintegy húszonötszörösére a Spm koncentrációját és ezzel egyidőben jelentősen mérsékelte az etilén szintézisét a növények levelében. Megállapítottuk, hogy a poliaminok akkumulációja a gyors szöveti dezorganizációt eredményező 10^{-2} M-os SA előkezelések esetén is megtörténik. A 10^{-3} M-os SA nagymértékben és tartósan fokozta az etilénprodukción, mellyel párhuzamosan jelentős mértékben növelte a Put és a Spd akkumulációját is a növények gyökerében. Megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA előkezelés a poliaminok és az etilén bioszintézisének együttes indukálásán, és az ennek eredményeképpen keletkező növekedésszabályozó anyagok gyors és nagymértékű akkumulációján keresztül fokozhatja az oxidatív stresszt, ami a gyökérszövetek elhalásához vezethet. Ezzel szemben az SA alacsonyabb koncentrációi közül a 10^{-4} M SA az etilénszintézis átmeneti és kismértékű fokozásával, valamint a Put koncentrációjának növelésével levélben, a Spd és a Spm akkumulációjának fokozásával gyökérben a halofita növényekre jellemző spektrumot alakított ki.

1.4 ROS, vagy NO, esetleg mindkettő

Megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációi (10^{-3} M és 10^{-2} M SA) már az előkezelés kezdetén csökkentették a O_2^- termelést, ugyanakkor jelentős mértékben fokozták a SOD és csökkentették a KAT aktivitását, ami levélben nagymértékű és tartós H_2O_2 , gyökérben pedig ROS akkumulációhoz vezetett. Mindkét magas koncentrációban alkalmazott kezelés a ROS szintek fokozásával egyidőben jelentős mértékű NO akkumulációt okozott az apikális gyökérszövetekben. A NO és a ROS szintek együttes és jelentős mértékű megemelkedése pedig az apikális gyökérsejtek vitalitásának csökkenéséhez, végül pedig sejthalálhoz vezetett. Hosszú távon gyökérben nem emelkedett meg 10^{-4} M-nál a SOD aktivitás, de ehhez a KAT aktivitás jelentős gátlása is társult, ami hozzájárulhatott a gyökércsúcsok emelkedett ROS szintjéhez. A NO termelésben azonban a kontroll és a 10^{-4} M SA-val előkezelt növények az edződés végére nem különböztek egymástól. A ROS mérsékelt megemelkedése önmagában nem csökkentette a gyökérsejtek életképességét, éppen ellenkezőleg, növelte a növény antioxidáns kapacitását, ami által hozzájárult a védelmi mechanizmusok aktiválásához.

2. A SA előkezelés sóstresszel szembeni akklimatizációt fokozó biokémiai mechanizmusai paradicsom növényben

2.1 A fotoszintetikus aktivitás változása SA előkezelt paradicsom növényekben sóstressz alatt

A sóstressz erőteljes sztómazáródást okozott, melynek eredményeképpen csökkent a CO_2 fixáció hatékonysága, a klorofill *a*, a klorofill *b*, a karotinoidok és az antocianin mennyisége és

gátlódtak a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatai (Φ_{PSII} , qP). Ezzel szemben sóstressz alatt mindkét SA előkezelés, de különösen a 10^{-4} M-os SA hatására a növények sztómakonduktanciája a sókezelt kontrollhoz képest nagyobb volt, ami ily módon hatékonyabb CO_2 fixációt eredményezett. 10^{-4} M SA előkezelés hatására növekedett a maximális CO_2 asszimiláció mértéke (A_{max}), valamint a karboxiláció hatékonysága (CE), mely a CO_2 fixáció hatékonyságának fokozásához vezetett. A SA előkezelés mindkét koncentrációnál, de különösen 10^{-4} M-nál növelte a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét és javította a fotoszintézis primer fotokémiai folyamatait (Φ_{PSII} , qP) is a sókezelt kontrollhoz képest. A 10^{-7} M-os SA a sókezelt kontroll növényekhez hasonlóan nem változtatta gyökérben az össz cukortartalmat, a 10^{-4} M-os SA előkezelés azonban ezzel szemben növelte azt, ami a hatékony fotoszintézis mellett hozzájárult a sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ozmotikus adaptáció kialakításához.

2.2 Az etilénprodukciónak változása az SA előkezelt növényekben sóstressz alatt

Sóstressz hatására fokozódott az etilén szintézise a növények levelében, azonban az SA előkezelések, különösen a 10^{-4} M-os mérsékelte azt 100 mM-os sókitettség alatt. Gyökérben az SA előkezelések közül a 10^{-4} M-os SA önmagában is mérsékelte az előkezelés végére az etilénprodukciónak, ami sóstressz alatt ezen SA előkezelés esetében további csökkenést mutatott. Megállapítottuk, hogy a 10^{-4} M-os SA előkezelés az etilénprodukciónak mérséklésével sóstressz alatt hozzájárult a sikeres akklimatizáció kialakulásához.

2.3 A ROS és NO produkció szerepe a sóstressz akklimatizációban

A sóstressz fokozta a SOD és mérsékelte a KAT aktivitását, növelve a H_2O_2 akkumulációját levelben, valamint a ROS keletkezését gyökérben. Sóstressz hatására jelentősen fokozódott a NO produkció is gyökérben, a ROS és NO nagymértékű akkumulációja pedig az apikális gyökérsejtek életképességének csökkenéséhez vezetett. A sóstressz az SA előkezelt levelekben is fokozta a SOD aktivitását, gyökérben azonban a KAT aktivitásának növelésével hozzájárult a só indukálta ROS hatékony eliminálásához. Sóstressz alatt a SA előkezelt növények gyökérben csökkent a NO produkció is a sókezelt kontrollhoz képest, amin keresztül pedig javult az apikális gyökérsejtek életképessége.

3. A NO és ROS közötti interakciók tisztázása paradicsom növények leveléből izolált protoplasztok, mint modellrendszer segítségével: gyors hatás

Protoplasztokon végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a 10^{-3} M SA kezelés, illetve a sóstressz oxidatív robbanást okozva tartósan és nagymértékben megemelte mind a ROS, mind pedig a NO intracelluláris szintjét, ami a sejtek életképességének jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett. Ugyanakkor a 10^{-3} M SA, illetve a 100 mM-os sókitettség NO és ROS

tartalmat növelő és életképességet csökkentő hatása javítható volt a PM lokalizált NADPH oxidáz gátlásán keresztül. DPI hatására csökkent a sejtek ROS és NO szintje és javult az életképessége. A SA alacsonyabb koncentrációban csökkentette a sóindukált ROS és NO akkumulációt, aminek eredményeképpen a SA előkezelések hatására sóstressz alatt is a kontrollhoz hasonló maradt a protoplasztok életképessége. Mivel intakt növényekkel végzett kísérleteink során bebizonyosodott, hogy egyes stresszfolyamatokban a növekedésszabályozó anyagok koncentrációjának változása hozzájárulhat az akklimatizáció, vagy éppen a sejthalál kialakulásához, a továbbiakban megnéztük, hogy a különböző növekedésszabályozó anyagok hogyan befolyásolják a sejtek általi ROS és NO produkciót és mindez hogyan hat a protoplasztok életképességére. Kísérleti rendszerünkben a Spd és a Spm növelte a ROS és NO szintet és szignifikánsan csökkentette az életképességet, ami utalhat arra, hogy a hosszú szénláncú poliaminokat oxidáló, H_2O_2 -t generáló poliamin oxidáz a paradicsomban is lokalizálódhat a belső sejt-kompartumokban, így pl. a peroxiszómában, ami protoplasztok esetén is hozzájárulhat a ROS-ok keletkezéséhez. A Put szintén növelte a NO akkumulációját, de kisebb mértékben, mint a Spm, illetve a Spd és nem csökkentette a protoplasztok életképességét sem. Ez összhangban van korábbi kísérleti eredményeinkkel, miszerint az akklimatizációt javító SA előkezelések a „priming” alatt a Put koncentrációját paradicsom növények levelében, míg a Spd és a Spm tartalmat gyökérben emelték meg. A mezofillum protoplasztok ebből a szempontból a levél reakcióját modellezzik.

A sikeres akklimatizáció szempontjából fontos ABS a putreszcinhez hasonlóan átmenetileg növelte a ROS-ok és a NO szintjét és csökkentette az életképességet, hosszú távon azonban kisebb mértékű ROS produkciót eredményezett és javította az életképességet. Ezzel szemben az etilén bioszintézisében szerepet játszó, sejthalál kialakításában részt vevő ACC tartósan és nagymértékben fokozta a protoplasztok ROS és NO akkumulációját, mindez pedig az életképesség tartós és jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett.

Kísérleti eredményeink alapján összességében megállapítottuk, hogy a SA magasabb koncentrációban csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát és oxidatív robbanást okoz, ami a ROS és NO szintjének együttes és nagymértékű növelésén keresztül a gyökérrendszer dezorganizációjához vezet. Ugyanakkor a SA alacsonyabb koncentrációban (10^{-7} M és 10^{-4} M SA) hosszú távon alkalmazva javítja a fotoszintézis hatékonyságát sóstressz alatt. A 10^{-4} M SA hosszú távon alkalmazva már a „priming” alatt az össz-cukor mennyiségének növelésével gyökérben hozzájárul az ozmotikus adaptáció kialakításához, mérsékli a növények etilénprodukciónak és a halofita növényekre jellemző poliamin spektrumot alakít ki, ami 100 mM-os sókitettség mellett hozzájárul a sikeres akklimatizáció kialakulásához.

Önmagában a 10^{-4} M SA az előkezelés ideje alatt növeli a gyökerek apikális zónájának ROS produkcióját, azonban sóstressz alatt a sókezelt kontrollhoz képest kisebb ROS szintet eredményez. A

gyökércsúcsban a 10^{-4} M SA hatására a kontrollhoz képest megmaradó kismértékű ROS fokozódás, a NO szint emelkedése nélkül, lehetővé teszi az oxidatív stresszhez való sikeres alkalmazkodást. Tehát a SA által indukált edzettségi állapot (eustressz) kialakításában a NO önmagában nem játszik szerepet, viszont a ROS igen, a kettő együtt pedig sejthalál kiváltásához vezet.

IRODALOMJEGYZÉK

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

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

Sims, D.A., and Gamon, J.A.: Relationship between pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment 81: 337-354. 2002.

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A.: Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci 151: 59-66. 2000.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

(*Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

9. 2 Publikációs lista

(* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

* **Gémes K**, Poór P, Horváth E, Kolbert Zs, Szopkó D, Szepesi Á, Tari I. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum* 2011; DOI: 10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x **IF: 2,708**

* Poór P, **Gémes K**, Horváth F, Szepesi Á, Simon LM and Tari I. Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology* 2011; 13: 105-114. **IF: 2,223**

Tari I, Kiss G, Deér AK, Csiszár J, Erdei L, Gallé Á, **Gémes K**, Horváth F, Poór P, Szepesi Á and Simon LM. Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum* 2010; 54 (4): 677-683. **IF: 1,656**

Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Horváth E, Horváth F, Simon LM, Tari I. Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum Lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* 2009; 166: 914-925. **IF: 2,5**

Tari I, Camen D, Coradini G, Csiszár J, Fediuc E, **Gémes K**, Lazar A, Madosa E, Mihacea S, Poor P, Postelnicu S, Staicu M, Szepesi Á, Nedelea G, Erdei L. Changes in chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress responses of bush bean genotypes for selecting contrasting acclimation strategies under water stress. *Acta Biologica Hungarica* 2008; 59(3):335-345. **IF: 0,619**

Tari I, Csiszár J, **Gémes K** and Szepesi Á. Modulation of Cu²⁺ accumulation by (aminoethoxyvinyl)glycine and methylglyoxal *bis*(guanylhydrazone), the inhibitors of stress ethylene and polyamine synthesis in wheat genotypes. *Cereal Research Communications* 2006; 34: 989-996. **IF: 1.037**

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

* Szepesi Á, Csiszár J, Gallé Á, **Gémes K**, Poór P and Tari I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. *Acta Agronomica Hungarica* 2008; 56(2): 129-138.

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

Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress tolerance: changes in processes related to photosynthesis and detoxifying defense system. Magyar-Román PHARE CBC 2003. évi Program. Project Report 2006; pp: 171-185.

Szepesi Á, Csiszár J, Bajkán Sz, **Gémes K**, Horváth F, Erdei L, Deér A, Simon LM., Tari I. Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis* 2005; 49(1-2):123-125.

Posztterek

Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid improves the acclimation of tomato to high salinity by stimulating abscisic acid biosynthesis and accumulation. XV FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology. 2006. Július 17-21. Lyon, Franciaország, Book of Abstracts, pp. 174.

Tari I, Csiszár J, Gémes K, Horváth E, Szepesi Á, Poór P, Sulyok Z. A szalicilsav, mint allelopatikus anyag. IX. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2008. július 7-9.

Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*. 3rd EPSO Conference, "Plant Dynamics: from Molecules to Ecosystems". 2006. Május 28-Június 1. Visegrád, Magyarország, Book of Abstracts, pp. 163.

Gémes K, Szepesi Á, Guóth A, Tari I. Role of photosynthetic performance in salt stress acclimation of tomato after salicylic acid pre-treatment. 2nd World Conference of Stress. 2007. Augusztus 23-26. Budapest, Magyarország. Book of Abstracts, pp. 213.

Szepesi Á, **Gémes K**, Tari I. Salicylic acid pre-treatment induced antioxidant defence processes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) during salt stress. „RoS in Plants” Conference. 2007. Szeptember 12-14. Gent, Belgium.

Gémes K, Poór P, Sulyok Z, Szepesi Á, Szabó M, Tari I. Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego) under salt stress. IX. Congress of Hungarian Society for Plant Biology. 2008. Július 7-9. Szeged, Magyarország.

Szepesi Á, Poór P, **Gémes K**, Horváth E, Tari I. Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants. IX. Congress of Hungarian Society of Plant Biology. 2008. Július 7-9. Szeged, Magyarország.

Tari I, **Gémes K**, Poór P, Csiszár J. Acclimation of the photosynthetic performance of tomato to high salinity after salicylic acid pre-treatment. Plant Abiotic Stress Tolerance, International Conference. 2009. Február 8-11. Bécs, Ausztria. Book of Abstracts, pp. 82.

Poór P, Gémes K, Rózsavölgyi T, Tari I. Szalicilsav kezelés hatása paradicsom növények sztómaregulációjára. 8. Magyar Ökológus Kongresszus, Posztterek összefoglalói, szerkesztette: Körmöczy László. 2009. augusztus 26-28. Szeged, Magyarország. 184. old. ISBN: 987-963-482-948-5. <http://www.ecology.hu/mok2009/8MOKabstract.pdf>

Moschou PN, Andronis E, Toumi I, **Gémes K**, Paschalidis KA, Papadakis AK. and Roubelakis Angelakis KA. What is new on the role(s) of polyamines in the response of plants to stresses? Cost 858 Viticulture Final Meeting, 2009. Október 27-30. Bordeaux, Franciaország.

Poór P, **Gémes K**, Szepesi Á. and Tari I. Involvement of NO and reactive oxygen species in salicylic acid-induced stomatal closure in abaxial epidermal peels of tomato. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. 2010. július 4-9. Valencia, Spanyolország. Book of Abstracts pp. 44.

Gémes K, Poór P, Kolbert Zs, Tari I. Salicylic acid-generated NO and reactive oxygen species during salt stress in tomato roots: acclimation or programmed cell death. 3rd International Plant NO Club, 2010. július 15-16. Olmütz, Csehország

Tari I, Poór P, **Gémes K**, Szepesi Á, Szopkó D, Simon LM, Csiszár J. Improvement of salt stress acclimation of tomato by salicylic acid: the role of osmotic adaptation. 11th International Symposium

"Interdisciplinary Regional Research" 2010. október 13-15., ISIRR Magyarország – Románia – Szerbia (előadás) Book of Abstract, pp. 7

Szepesi Á, Csiszár J, **Gémes K**, Orosz G, Poór P, Takács Z, Tari I. Oxidative stress responses of salicylic acid pre-treated tomato plants during salt stress. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional Research" 2010. október 13-15., ISIRR Magyarország – Románia – Szerbia (előadás) Book of Abstract, pp. 7

Díjak, elismerések

MTA, Szegedi Akadémiai Bizottság 2007. évi pályázata: **I. díj**

Görög Kormányzati Ösztöndíj 2009/2010 nyertese, Krétai Egyetem, Növénybiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Heraklion, Kréta, Görögország