

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A szalicilsav szerepe gazdasági növények
stressztűrő képességében**

SZALAI GABRIELLA

**MTA MEZŐGAZDASÁGI KUTATÓINTÉZETE
MARTONVÁSÁR**

2009

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A NÖVÉNYI STRESSZ	6
2.1.1. ALACSONY HŐMÉRSÉKLETI STRESSZ.....	7
2.1.2. SZÁRAZSÁGSTRESSZ	11
2.1.3. SÓSTRESSZ	13
2.1.4. KADMIUM-STRESSZ.....	14
2.1.5. OXIDATÍV STRESSZ.....	17
2.2. SZALICILSAV	20
2.2.1 A SZALICILSAV BIOSZINTÉZISE.....	21
2.2.2. A SZALICILSAV HATÁSAI ABIOTIKUS STRESSZFOLYAMATOK SORÁN	23
2.2.3. A SZALICILSAV FELTÉTELEZETT HATÁSMECHANIZMUSA	26
2.2.3. A SZALICILSAV FELTÉTELEZETT HATÁSMECHANIZMUSA	27
2.3.1. OZMOPROTEKTÁNS ANYAGOK ALKALMAZÁSA	28
2.3.2. ANTIOXIDÁNSOK ÉS HIDROGÉN-PEROXID HASZNÁLATA.....	29
2.3.3. NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓ ANYAGOK HASZNÁLATA	30
3. KUTATÁSI CÉL.....	32
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
4.1. A NÖVÉNYNEVELÉS KÖRÜLMÉNYEI, NÖVÉNYI ANYAGOK	33
4.1.1. TÁPOLDATOS KUKORICANÖVÉNYEK NEVELÉSE	33
4.1.1.1. EXOGÉN SA HATÁSA HIDEGSTRESSZ SORÁN	34
4.1.1.2. EXOGÉN SA ÉS A HIDEGEDZÉS HATÁSA AZ ACC ÉS MACC TARTALOMRA HIDEGSTRESSZ SORÁN	34
4.1.1.3. EXOGÉN SA HATÁSA SZÁRAZSÁGSTRESSZ SORÁN	34
4.1.1.4. A FITOKELATIN SZINTÉZIS ENZIMEINEK VIZSGÁLATA	34
4.1.1.5. EXOGÉN SA HATÁSA KADMIUMSTRESSZ SORÁN	34
4.1.1.6. IN VIVO SA-SZINT VÁLTOZÁSA ABSZCIZINSAV ÉS HIDEGKEZELÉS HATÁSÁRA	35
4.1.1.7. IN VIVO SA-SZINT VÁLTOZÁSA SZÁRAZSÁG- ÉS SÓSTRESSZ SORÁN	35
4.1.1.8. IN VIVO SA-SZINT VÁLTOZÁSA KADMIUMSTRESSZ SORÁN	35
4.1.2. SA MAGÁZTATÁS HATÁSA BORSÓ ÉLETTANI FOLYAMATAIRA KONTROLL KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	35
4.1.3. SA MAGÁZTATÁS HATÁSA KUKORICA ÉLETTANI FOLYAMATAIRA HIDEGSTRESSZ SORÁN	36
4.1.4. SA MAGÁZTATÁS HATÁSA BORSÓ ÉS KUKORICA ÉLETTANI FOLYAMATAIRA NEHÉZFÉMSTRESSZ SORÁN	36
4.2. ÉLETKÉPESSÉG MÉRÉSEK	36
4.2.1. IONKIÁRAMLÁS MÉRÉSE.....	36
4.2.2. GYÖKÉR ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLAT TTC-VEL	37
4.3. LIPID PEROXIDÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA	37
4.4. KLOOROFILLTARTALOM MÉRÉSE.....	37
4.5. KLOOROFILL FLUORESCENCIA INDUKCIÓ MÉRÉSE	38
4.6. A FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁS MÉRÉSE	38
4.7. ANTIOXIDÁNS ENZIMEK KIVONÁSA ÉS AKTIVITÁS MÉRÉSE	38
4.7.1. KATALÁZ (EC 1.11.1.6).....	39
4.7.2. GVAJAKOL-PEROXIDÁZ (EC 1. 11.1.7).....	39
4.7.3. ASZKORBÁT-PEROXIDÁZ (EC 1.11.1.11)	39
4.7.4. GLUTATION-REDUKTÁZ (EC 1.6.4.2).....	39
4.7.5. GLUTATION-S-TRANSFERÁZ (EC 2.5.1.18)	40
4.8. PROLIN TARTALOM MEGHATÁROZÁSA	40
4.9. KADMIUM TARTALOM MEGHATÁROZÁSA	40
4.10. ACC ÉS MACC TARTALOM MEGHATÁROZÁSA	40
4.11. POLIAMINTARTALOM MEGHATÁROZÁSA.....	41
4.12. SZALICILSAV EXTRAKCIÓ ÉS MENNYISÉGI ANALÍZIS	42
4.12. GAMMA-GLUTAMIL-CISZTEIN-SZINTÁZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE.....	44

4.13. GLUTATION-SZINTÁZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE	45
4.14. GLUTATION ÉS □-GLUTAMIL-CISZTEIN TARTALOM HPLC-S MÉRÉSE	45
4.15. FITOKELATIN-SZINTÁZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE ÉS FITOKELATINOK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA	46
4.16. STATISZTIKAI ANALÍZIS.....	47
5. EREDMÉNYEK.....	48
5.1. EXOGÉN SZALICILSAV HATÁSA KÜLÖNBÖZŐ ABIOTIKUS STRESSZHATÁSOK SORÁN	48
5.1.1. POLIAMINOK MENNYISÉGÉNEK VÁLTOZÁSA SZALICILSAV ELŐKEZELÉS HATÁSÁRA HIDEGSTRESSZ FOLYAMÁN.....	48
5.1.2. ACC ÉS MACC MENNYISÉGÉNEK VÁLTOZÁSA SZALICILSAV ELŐKEZELÉS HATÁSÁRA HIDEGSTRESSZ SORÁN.....	50
5.1.3. EXOGÉN SA HATÁSA OZMOTIKUSSTRESSZ FOLYAMÁN	52
5.1.4. SZALICILSAV ELŐKEZELÉS HATÁSA CD-STRESSZ FOLYAMÁN	54
5.1.4.1. FITOKELATIN-SZINTÁZ ENZIM VIZSGÁLATA	54
5.1.4.2. EXOGÉN SA HATÁSA KADMIUMSTRESSZ SORÁN	57
5.2. AZ ENDOGÉN SA VÁLTOZÁSAI ABIOTIKUS STRESSZFaktorok HATÁSÁRA.....	64
5.2.1. ABA KEZELÉS HATÁSA HIDEGSTRESSZ SORÁN	64
5.2.2. ENDOGÉN SA VÁLTOZÁSA SZÁRAZSÁGSTRESSZ FOLYAMÁN	70
5.2.3. ENDOGÉN SA VÁLTOZÁSA SÓSTRESSZ FOLYAMÁN	73
5.2.4. ENDOGÉN SA VÁLTOZÁSA CD-STRESSZ FOLYAMÁN.....	77
5.3 A SZALICILSAVAS MAGÁZTATÁS ÉLETTANI HATÁSAINAK VIZSGÁLATA	81
5.3.1. A SZALICILSAVAS MAGÁZTATÁS HATÁSAI KONTROLL KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT BORSÓ NÖVÉNYBEN	81
5.3.2. A SZALICILSAVAS MAGÁZTATÁS HATÁSAI ALACSONY HŐMÉRSÉKLETEN KUKORICÁBAN	89
5.3.3. A SZALICILSAVAS MAGÁZTATÁS HATÁSAI CD-STRESSZ SORÁN BORSÓBAN ÉS KUKORICÁBAN	96
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	101
6.1. A KÜLSŐLEG, TÁPOLDATHOZ ADAGOLT, SZALICILSAV HATÁSAI.....	101
6.1.1. ALACSONY HŐMÉRSÉKLETI STRESSZ.....	101
6.1.2. SZÁRAZSÁGSTRESSZ	103
6.1.3. CD-STRESSZ	104
6.2. AZ ENDOGÉN SZALICILSA- SZINT VÁLTOZÁSAI KÜLÖNBÖZŐ ABIOTIKUS STRESSZFOLYAMATOK SORÁN ..	108
6.2.1. ALACSONY HŐMÉRSÉKLETI STRESSZ.....	108
6.2.2. SZÁRAZSÁG- ÉS SÓSTRESSZ	109
6.2.3. CD-STRESSZ	111
6.3. A SZALICILSAVAS MAGÁZTATÁS HATÁSAI.....	113
7. ÖSSZEFOGLALÁS	117
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	121
9. FELHASZNÁLT IRODALOM	122
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	138

Rövidítések jegyzéke

ABA:	abszcizinsav
ACC:	1-amino-ciklopropán-1-karbonsav
ACN:	acetonitril
APX:	aszorbát-peroxidáz
BA:	benzoesav
CAT:	kataláz
DTNB:	5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoesav)
GR:	glutation-reduktáz
GSH:	redukált glutation
GSSG:	oxidált glutation
GST:	glutation-S-transzferáz
γ EC, γ Glu-Cys:	γ glutamil-cisztein
ICS:	izokorizimát-szintáz
MACC:	malonyl-ACC
MDA:	malondialdehid
MeOH:	metanol
<i>NahG</i> :	szalicilát-hidroxiláz enzimet kódoló gén
<i>o</i> -ANI:	<i>orto</i> -anizinsav
<i>o</i> HCA:	<i>orto</i> -hidroxi-fahéjsav, <i>orto</i> -kumársav
PC:	fitokelatin
PCS:	fitokelatin szintáz
PA:	poliaminok
PEG:	polietilén-glikol
POD:	gvajakol-peroxidáz
<i>p</i> -HBA:	<i>para</i> -hidroxi-benzoesav
ROS:	reaktív oxigénformák (reactive oxygen species)
SA:	szalicilsav
SOD:	szuperoxid-dizmutáz
TBA:	tiobarbitursav
TCA:	triklór-ecetsav
TFA:	triflór-ecetsav
TTC:	trifenil-tetrazólium-klorid

1. Bevezetés

Az abiotikus stresszek, mint a szárazság, só, magas és alacsony hőmérséklet, nehézfém, oxidatív stressz, komoly veszélyt jelentenek a mezőgazdaság számára és a környezetre is káros hatással vannak. Az abiotikus stressz világszerte jelentős mértékben csökkenti a fő gabonafélék termésmennyiségét. A klímaváltozás miatt a szárazságstressz és az emiatti öntözéssel együtt járó sóstressz egyre több területet érint, és komoly szikesezéshez vezethet az öntözött területeken. Hazánkban a növénytermesztőknek szintén minden évben számítaniuk kell többféle stressztényezőre is. Ezek közé tartozik az alacsony és magas hőmérséklet, a szárazság, a nehézfém-szennyezés, valamint a különböző patogének támadásai. A magasabbrendű növények, helyhez kötöttségük miatt, nem tudnak elvándorolni környezetük kedvezőtlen változásai elől. Ezek hatással vannak a növényi anyagcserefolyamatokra is, ami a növény védekező mechanizmusainak indukálódásában, a "stresszválaszokban" tükröződik. A megváltozott környezeti körülményekre adott stresszválaszok kialakulásának gyorsasága és hatékonysága meghatározhatja az egyedek, sőt még a fajok életképességét is. A rövid ideig tartó stresszválaszok ("akklimatizáció") az egyes növényegyedek túléléséhez szükségesek, azok a fiziológiai változások pedig, amelyek stresszkörülmények közt történő folyamatos növekedés során alakulnak ki (adaptációs folyamatok) a fajok hosszú távú életben maradásáért felelősek. A növények többféle védekező mechanizmust dolgoztak ki az egyes stresszféleségek kivédésére. A természetben a növényeket ért stresszek általában nem izoláltan jelentkeznek, hanem többféle stresszhatás is érheti a növényt egy időben. Ennek hatására a különböző stresszekre adott válaszok azonos folyamatokat indíthatnak be, és a különböző jelátviteli utak és védekezési mechanizmusok átfedése figyelhető meg. Stresszre általánosan indukálódó mechanizmus pl. az ozmoprotektáns anyagok (prolin, szénhidrátok), valamint a makromolekulák védelmében szerepet játszó komponensek (poliaminok, glicin-betain) szintézise, antioxidáns tulajdonságú vegyületek (pl. tiolok, aszkorbinsav) felhalmozódása, az antioxidáns enzimek aktivitásának növekedése.

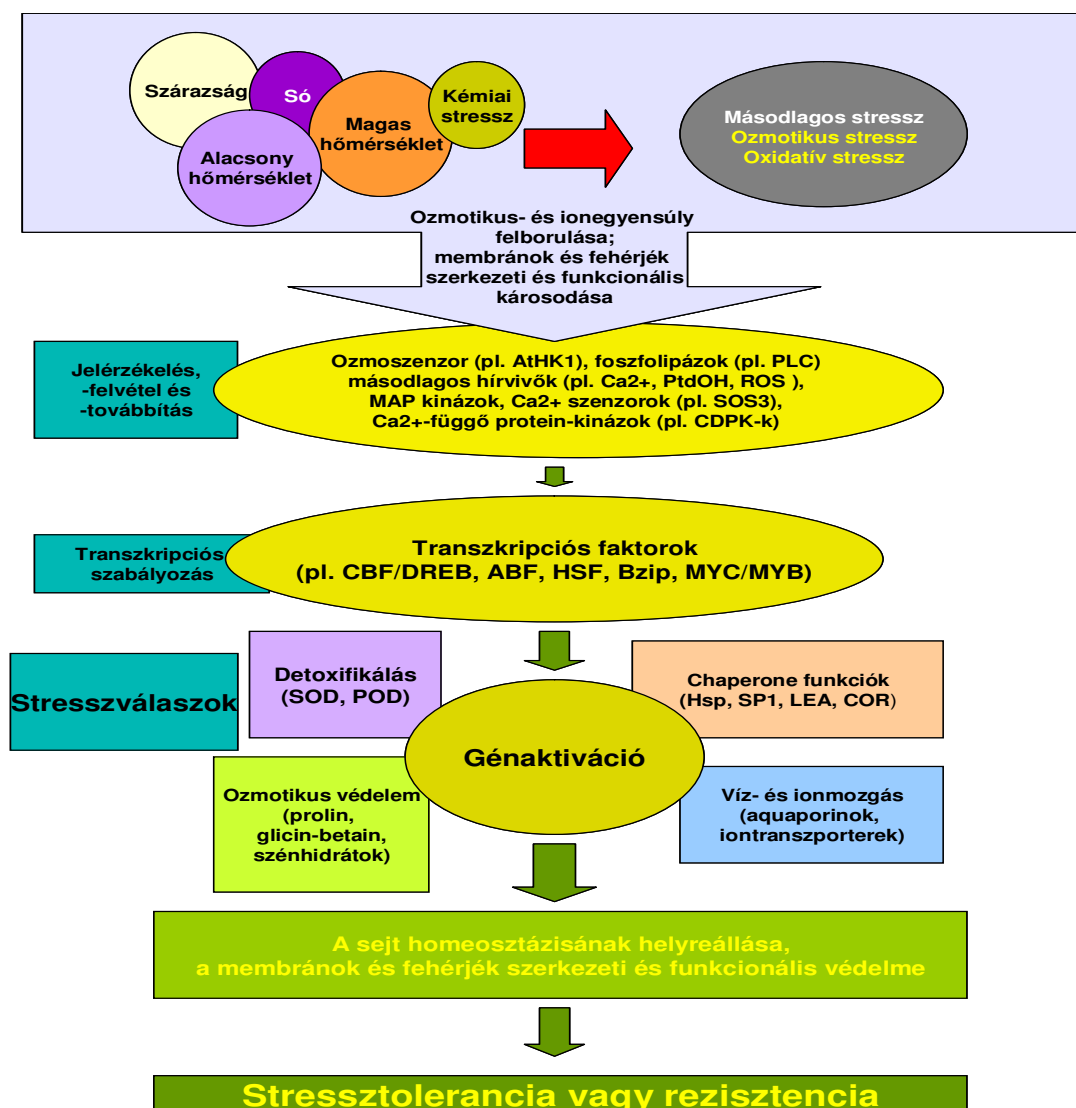
Az utóbbi időben derült ki, hogy a szalicilsav több élettani folyamatban szerepet játszik, köztük egyes stresszhatások védelmének kiváltásában is. Az emberiség már évszázadok óta használta a fűzfa kérgét láz- és fájdalomcsillapításra, mely - mint utóbb kiderült- szalicint tartalmaz. Az élő szervezetben ez szalicilsavvá alakul. Tehát a „szalicilsav” név a fűzfa latin nevéből, a *Salix*-ból származik. A szalicilsav stresszélettani szerepe elsősorban a biotikus stressztolerancia jelátviteli folyamataival kapcsolatban vált ismertté, mindezek mellett azonban az elmúlt években számos bizonyíték gyűlt össze az abiotikus stresszhatások (például alacsony és magas hőmérséklet, UV-B sugárzás, ózon, nehézfémek stb.) során játszott szerepéről is. Ezek a munkák nagyrészt a külsőleg adott szalicilsav abiotikus stressz ellen nyújtott védőhatásáról számoltak be. Megfelelő koncentrációban alkalmazva a szalicilsav átmeneti oxidatív stresszt okozhat a növénynek, és ez mint egy edzési folyamat, a növény antioxidatív kapacitását megnövelheti. A szalicilsav ill. származékainak pontos hatásmechanizmusa még ma sem ismert. Elsősorban exogén SA alkalmazásakor kérdéses, hogy az elért hatásban mennyire játszik közvetlen szerepet a felvett szalicilsav, mennyire a belőle keletkezett metabolitok.

Mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentősége van azon anyagok vizsgálatának, melyek a gazdasági növények stresszérzékenységét csökkenteni képesek. A szalicilsav védőhatásáról megjelent dolgozatok sem a kezelés módját, sem a stressztípust illetően nem voltak specifikusak: több esetben találtak védőhatást különböző stressztípusokkal szemben is mind öntözés, mind permetezés, mind az elvetésre kerülő mag szalicilsavban történő áztatásával. Ezek az eredmények egyértelműen azt sugallják, hogy érdemes a szalicilsavnak gyakorlati felhasználhatóságával behatóbban foglalkozni. Mindezek alapján jelen munkában egyrészt a külsőleg adagolt szalicilsav által kiváltott hatásokat tanulmányoztuk, különös tekintettel a gyakorlati szempontból is hasznosítható magáztatásos alkalmazásra, másrészt hogy a különböző abiotikus stresszfolyamatok hogyan hatnak az endogén szalicilsav szintre. Eredményeink gyakorlati hasznosíthatóságát elsősorban abban látjuk, hogy alapot szolgáltathatnak jobb stresszellenállóságú haszonnövények előállításában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növényi stressz

Az elsődleges stresszhatások, mint pl. a szárazság, só, alacsony és magas hőmérséklet, kémiai szennyeződés, gyakran egymással átfednek, károsítják a sejteket és másodlagos stresszt (ozmotikus- és oxidatív stressz) váltanak ki. A kezdeti stressz szignálok (mint pl. a hőmérsékletváltozás, a membránfluiditás, az oszmotikus- és ionháztartás megváltozása) beindítják a jelátviteli és transzkripció folyamatokat, melyek aktiválják a homeosztázis és a sérült membránok és fehérjék helyreállításáért felelős válaszreakciókat (1. ábra).



1. ábra Stresszválaszok növényekben (Wang és mtsai 2003 nyomán).

Ha nem a megfelelő válaszreakció alakul ki, akkor irreverzibilis károsodás érheti a strukturális és funkcionális fehérjéket és membránokat, felborulhat a sejt homeosztázisa, s

mindez a növény halálához vezethet. (Wang és mtsai, 2003). Az abiotikus stresszfolyamatok számos morfológiai, fiziológiai, biokémiai és molekuláris változást okoznak, mely végső soron a növekedést és a termésmennyiséget befolyásolja (Wang és mtsai, 2001a). A szárazság-, só-, alacsony- és magas hőmérsékleti, valamint az oxidatív stressz gyakran együttjárnak, és nagyon hasonló változásokat indukálnak a növényekben. Pl. a szárazság és sóstressz elsődlegesen ozmotikus stresszként jelenik meg, mely a homeosztázis és az ionháztartás zavarával jár (Serrano és mtsai, 1999; Zhu, 2001). Az oxidatív stressz, mely általában minden abiotikus stressz kísérője, a strukturális és funkcionális fehérjék denaturációját okozhatja (Smirnoff, 1998).

2.1.1. Alacsony hőmérsékleti stressz

Számos fontos gazdasági növényünk szubtrópusi eredetű, így fokozottan érzékenyek az alacsony hőmérsékletre. A kukorica esetében, mely hazánkban és a világ számos más országában egyaránt az egyik legfontosabb gazdasági növény, a hideg károsító hatásával elsősorban a növény fejlődésének kezdeti szakaszában kell számolni. Mivel a növények nem tudják szabályozni hőmérsékletüket, nagyon fontos számukra a környezet hőmérséklete. A 0 és 15 °C közötti hőmérséklet (chilling) jelentős károsodásokat okozhat az erre érzékeny növényekben. Ezek a károsodások láthatóan is megnyilvánulhatnak, például hervadásban, a növekedés leállásában, szöveti elhalásban, de zavarokat okozhat az anyagcsere-folyamatokban és a fotoszintetikus rendszerben is már azelőtt, hogy a növényen a látható károsodások megjelentek volna. A chilling-stressz okozta károsodások reverzibilisek és irreverzibilisek lehetnek. Ha a chilling periódust egy magasabb hőmérsékleti periódus követi (mint például a természetben a nappalok és az éjszakák), akkor a hideg-indukált anyagcserezavarok megszűnnek. Ha azonban hosszabb idejű chilling-stressznek tesszük ki az arra érzékeny növényeket, akkor irreverzibilis károsodást szenvedhetnek.

Tekintettel arra, hogy az anyagcserefolyamatok jelentős része membránhoz kötött, a membránok állapotának megváltozása kiemelkedő szerepet játszik a hidegstressz, illetve az alacsony hőmérsékletre való alkalmazkodás során. A chilling-érzékeny növények hidegkárosodásánál a membránlipidek nagyrésznél nem történik fázisátmenet, bár előfordulhat, hogy kisebb lipidfrakciók lokálisan fázisátalakulást szenvedhetnek alacsony hőmérsékleten (Quinn, 1988), itt valószínűleg inkább funkcionálisan károsodik a membrán, mint strukturálisan. A membránösszetétel különbségei részben megmagyarázhatják a chillingérzékenységekben tapasztalt eltéréseket. Kimutatták, hogy hidegérzékeny növények

levelei lipidextraktumának foszfatidil-gliceridjei általában lényegesen több palmitin- és transz- Δ^3 -hexadekánsavat (t16:1) tartalmaztak, mint a hidegtűrő növényekéi (Murata és mtsai, 1982). Elsősorban hidegtűrő növények esetében ismert, hogy tartós alacsony hőmérséklet hatására a membránfluiditás megnövekszik (adaptáció). Különböző fagyállóságú búzafajtákban esetében korrelációt mutattak ki a transz- Δ^3 -hexadekánsav tartalomban a hidegedzés során bekövetkezett változás és a fagyállóság között (Szalai és mtsai, 2001), valamint, hogy az alacsony hőmérsékleti edzés során kialakuló membránfluiditás növekedés szintén korrelál a fagyállósággal (Nishida és Murata, 1996). Ez egyrészt a telítetlen lipidek arányának növekedéséből ered, bár feltételezik, hogy tilakoid membránok esetében - ahol a telítetlen lipidek aránya általában magas - a fluiditásváltozás a lipid/fehérje arány megváltozásának az eredménye (Chapman és mtsai, 1983). Csicseriborsóban azt találták, hogy a lipidek megnövekedett telítetlensége megóvhatja a sejteket a pusztulástól alacsony hőmérsékleten, habár a membránfluiditás-változás nem korreált az LT_{50} értékekkel (Bakht és mtsai, 2006). Kimutatták, hogy chilling-szenzitív növényekben stressz hatására megnő a galaktolipáz aktivitása, ez megnöveli a szabad zsírsavak szintjét, melyek már a lipoxigenáz enzim szubsztrátjai lehetnek (Kaniuga, 2008). A kloroplasztisztban különösen sok telítetlen zsírsav található, ezekből a lipoxigenáz enzim hatására zsírsav-hidroperoxidok és szuperoxid-anionok képződnek, melyek roncsolják a membránt. A lipidperoxidáció membránkárosító hatását általában indirekt mérésekkel tudjuk nyomonkövetni, mint pl. az ionkiáramlás vagy pedig a malondialdehid mérésével.

Egyes növekedésszabályozó anyagok, mint az abszcizinsav, etilén és a különböző PA, mennyisége is megnő a növényekben stresszhatásokra. Az abszcizinsav a leggyakrabban vizsgált növényi hormon a stresszfiziológiában. Hidegérzékeny növényekben alacsony hőmérsékleten megnő az abszcizinsav szintje (Vernieri és mtsai, 1991). Arról azonban megoszlanak a vélemények, hogy ez az abszcizinsav akkumuláció közvetlenül a hideg hatásának köszönhető (Fracheboud és Stamp, 1993), vagy pedig az alacsony hőmérsékleten fellépő vízhiány okozza (Capell és Dörffling, 1989). Ha a növények levelét vagy gyökerét az alacsony hőmérsékleti kezelés előtt vagy alatt abszcizinsavval kezelték, az csökkentette a hideg okozta károsodásokat (Pardossi és mtsai, 1992, Bakht és mtsai, 2006). Abszcizinsavval kezelt uborka hajtásokban megnőtt az oldható cukrok mennyisége, valamint a sztachióz-szintáz aktivitásának szabályozásával a sztachióz szintet is kontrollálta (Meng és mtsai, 2008). Hidegkezelt kukoricahajtásokban az abszcizinsav megvédte a mitokondriumokat az irreverzibilis oxidatív károsodástól azáltal, hogy indukálta az antioxidáns enzimeket (Prasad és mtsai, 1994a). Azt is kimutatták különböző kukorica genotípusokban, hogy az alacsony

hőmérsékleti kezelés során szoros összefüggés van a chilling-tolerancia, a vízellátottság és az abszcizinsav akkumuláció között (Capell és Dörffling, 1993; Janowiak és Dörffling, 1996). Ezek alapján feltételezik, hogy a chilling-toleranciának az a feltétele, hogy a növény gyorsan és hatékonyan tudjon abszcizinsavat szintetizálni. Az abszcizinsav-kezelés utáni megnövekedett chilling-tolerancia kukorica sejtszuspenziós kultúrában génexpresszió változással és új specifikus fehérjék szintézisével járt együtt (Xin és Li, 1992, 1993). Kukorica kalluszok abszcizinsav és alacsony hőmérsékleti kezelésre prolint halmoztak fel (Duncan és Widholm, 1987). Valószínűleg több hatás együttese játszik közre az abszcizinsav chilling-stressz elleni védőhatásában.

A PA az élő szervezetek fontos alkotóelemei. Valószínűleg a hormonokhoz hasonlóan regulátor szerepet töltenek be a növényekben. A legáltalánosabban előforduló PA a putreszcin, a spermidin és a spermin. Többféle úton szintetizálódhatnak a növényekben. A PA számos növekedés- és fejlődésélettani folyamathoz szükségesek, mint például a sejtosztódás, az embriogenezis, virágzás (Koetje és mtsai, 1993). Mennyiségük abiotikus stresszfolyamatok során általában megnő (Evans és Malmberg 1989, Shen és mtsai, 2000). Megfigyelték, hogy a stressztűrő növények stresszkörülmények között általában növelik a PA-szintézist és emiatt kétszer-háromszor is magasabb az endogén PA- szintjük, mint a nem stresszelt növényeké (Kasukabe és mtsai, 2004). Mivel polikationok, ezért erősen tudnak kötődni negatív töltésű makromolekulákhoz, így pl. a nukleinsavakhoz, fehérjékhez, lipidekhez. A PA csökkenti a hideg károsító hatását egyrészt azzal, hogy gátolja a lipid-peroxidációt (Tachibana, 2000), másrészt a membránokhoz kötődve stabilizálja a foszfolipid-kettősréteget, valamint a tilakoidok molekuláris komplexeit (Bouchereau és mtsai, 1999). Számos stresszhatásnál kimutatták, hogy megnő a putreszcin szint. Azt is megfigyelték, hogy a putreszcin akkumuláció és az alacsony hőmérséklet okozta károsodások között egyenes arányosság van egyes hidegérzékeny gyümölcsök (citrom, grape fruit) esetében. Hasonló összefüggést spermidin és spermin esetében nem tudtak kimutatni (McDonald és Kushad 1986). Mások kimutatták, hogy a kukorica egyes részeiben más-más poliamin mennyisége korrelál a hideghatással: a gyökérben a spermidin mennyisége, a mezokotilban a putreszcin és a spermidin, míg a koleoptilban a spermidin és a spermin (Gao és mtsai, 2009). Mutáns *Arabidopsis* növényekben, melyek nem tudtak putreszcint szintetizálni, csökkent a hidegtűrés, mely hatás külsőleg adagolt putreszcinnel vagy abszcizinsavval kivédhető volt. Viszont olyan mutánsoknál, melyek nem tudtak abszcizinsavat szintetizálni, a külsőleg adagolt putreszcin nem védett a hideg ellen, csak ha a növény abszcizinsavat is kapott. Ebből arra

következtetnek, hogy a putreszcin az abszcizinsav szintéziséhez szükséges egyik jelátvivő molekula lehet (Cuevas és mtsai, 2008).

Ha hidegérzékeny növényeket alacsony, de fagypont feletti hőmérsékletnek teszünk ki, akkor etiléntermelést indukálhatunk. A stressz-indukált etilénszintézist számos növényfajban vizsgálták (Wang, 1989; Field, 1990). A legtöbb tanulmány arra utal, hogy a metionin $\rightarrow$ SAM $\rightarrow$ ACC $\rightarrow$ etilén szintézisút a fő, de nem egyetlen forrása a chilling-stressz indukálta etilénnek. A chilling-stressz hatására bekövetkező etiléntermelődés kinetikája és időbeli eloszlása az egyes hidegérzékeny növényekben különböző lehet. Egyes növényekben (pl. körte) az ACC felhalmozódás és az etiléntermelődés már alacsony hőmérsékleten megtörténik, míg másokban (pl. uborka) csak az alacsony hőmérsékletet követő felmelegedés során megy végbe (Wang és Adams, 1982; Wang és mtsai, 1985). Ebben az esetben a hideg csak beindítja a folyamatokat, de ahhoz, hogy végbe is menjenek, magasabb hőmérséklet szükséges. A hideghez való alkalmazkodásban a különböző növényekben az etilénnek más-más hatása lehet. Ha a dinnyét etilénnel kezelték a hideghatást megelőzően, akkor az szignifikánsan csökkentette a hidegkárosodási tünetek kifejlődését (Lipton és Aharoni, 1979). Más növényeknél, mint például a citrom és az avokádó, az etilénkezelés fokozta a hideg okozta károsodást (Lee és Young, 1984; McDonald 1986). A fentiek alapján úgy tűnik, hogy az alacsony hőmérséklethez való adaptálódás folyamatában az etilén szerepe fajonként eltérő lehet. Az sem tisztázott még, hogy a chilling-stressz hatására termelődő etilén csak kísérő jelensége-e a stresszfolyamatnak, vagy szerepet játszik a stresszhez való alkalmazkodásban. Az is előfordulhat, hogy a nagyobb mennyiségű etiléntermelődés a fokozottabb chilling-érzékenység jele. Két különböző chilling-érzékenységű kukoricát összehasonlítva azt találták, hogy a chilling-érzékenyben 5 °C-on 65%-os relatív páratartalom mellett több ACC szintetizálódott (Janowiak és Dörffling, 1995). A chilling-toleráns genotípusban az akklimatizáció során ez az ACC akkumuláció megszűnt, míg az érzékenyben nem. Azonban, ha az alacsony hőmérsékleti kezelés 100 %-os relatív páratartalom mellett történt, akkor nem következett be ACC felhalmozódás, ami arra utal, hogy a levelek vízhiánya okozhatta az ACC felhalmozódást. Az ACC felhalmozódásnak alacsony hőmérsékleten több oka is lehet. Egyrészt az alacsony hőmérséklet hatására az ACC-szintáz aktivitása, mely a SAM-ACC átalakulást katalizálja, megnőhet (Janowiak és Dörffling, 1995), másrészt gátlódhat az ACC-oxidáz enzim aktivitása, mely az ACC-etilén konverzióért felelős, az alacsony hőmérséklet okozta membránkárosodás miatt (Etani és Yoshida, 1987). A PA-szintézis egyik prekursora az S-metil-metionin gátolta az etilén szintézist stressz körülmények között (Ko és mtsai, 2004).

2.1.2. Szárazságstressz

Világszerte talán a szárazság az a tényező, mely a gabonatermesztést legjobban korlátozza (Boyer, 1982). Hazánkban is az év több szakaszában, főleg nyáron, de időnként már tavasszal is számolni kell szárazsággal. A gazdasági növények szárazságtűrése nagyban múlik nemcsak az adott növényfajon, hanem azon belül az adott fajtán is. A nem szárazságtűrő fajtákban a szárazságstressz jobban gátolja a növekedést és a fotoszintézist, mint a szárazságtűrőkben (Bagci és mtsai, 2007). A legjobban ismert hatása a szárazságnak, hogy ozmotikus stresszt okoz, mely a víz kémiai aktivitásának megváltozásához és a turgornyomás csökkenéséhez vezet (Serrano és mtsai, 1999). A turgornyomás csökkenésének következtében a növényen hervadás figyelhető meg, s mivel a turgornyomás a sejtnövekedéshez is szükséges, ezért csökkent növekedést is okoz. A vízmennyiség csökkenése nemcsak a turgort csökkenti, hanem a víz már nem tudja megfelelően hidratálni a fehérjemolekulákat, ezért azok kicsapódhatnak, ezzel strukurális és funkcionális zavarokat okozhatnak. Az ionok hidrátburka is csökkenhet, ez is megzavarhatja a sejt működését.

A korlátozott vízmennyiség általában együtt jár a tápanyagfelvétel korlátozásával is, és így a tápanyagszint csökkenéssel a növények szöveteiben, de ez növényfajonként változhat. Általában együttjár a megnövekedett N és a csökkent P felvétellel (Garg, 2003). A korlátozott tápanyagfelvételt a csökkent transpiráció, az aktív transzport és a membránpermeabilitás zavarai okozhatják (Tanguilig és mtsai, 1987).

Általánosan elfogadott, hogy a membránstabilitás és integritás megőrzése szárazságstressz során a szárazságtűrés egyik fő komponense (Bajji és mtsai, 2002). Kimutatták, hogy a levélszegmentumok membránstabilitása volt a szárazságtűrés egyik legfontosabb paramétere (Dhanda és mtsai, 2004). Mások azt találták, hogy kukoricában a K elősegítette a szárazságtűrést a megnövekedett membránstabilitás miatt (Gnanasiri és mtsai, 1991). A membránkárosodás oka még nem teljesen ismert. Többek között oka lehet, hogy a csökkent sejttérfogat miatt nő a citoplazma viszkozitása, mely megnöveli a molekulák interakciójának esélyét, ami fehérje denaturációt és membránfúziót eredményezhet (Farooq és mtsai, 2009). Számos olyan vegyületet találtak, melyek ezt megakadályozhatják. Ilyenek pl. a prolin, glicin-betain, PA, különböző cukrok és oligoszaharidok (Folkert és mtsai, 2001). A növényi hormonok közül az auxinok, gibberellinek és citokininek mennyisége csökken, míg az abszcizinsavé (ABA) és etiléné nő (Nilsen és Orcutte, 1996).

Egész növény szinten nézve az első válasz a szárazságstresszre a sztóma bezáródása. A gyökér-levél kommunikáció részben az abszcizinsav-etilén-citokinin jelátviteli úton történik a

növényben, mely az ABA és reaktív oxigénformák által is szabályozott (Lake és mtsai, 2002). Egyes kutatások szerint az ABA transzportja a gyökér xilémbe környezeti tényezők által szabályozott, mint pl. a xilém pH-ja vagy a nappalhosszúság (Wilkinson és Davies, 2002). Vízhány esetén a xilémnedv pH-ja megnő, ezzel indukálja az ABA bejutását a gyökér-xilémbe és transzportját a hajtásba (Hartung és mtsai, 2002). Azok a környezeti tényezők is, melyek megnövelik a transpirációt, szintén a pH növekedését eredményezik, amely ABA akkumulációhoz és ezáltal csökkent sztómakonduktivitáshoz vezet (Davies és mtsai, 2002). A citokininek koncentrációjának a növekedése a xilémnedvben a sztómák nyitását eredményezi, és csökkenti ABA érzékenységüket (Wilkinson és Davies, 2002).

A sztómák záródása miatt a levélben CO₂ hiány lép fel, és a fotoszintézis csökkenésének ez az elsődleges oka, mely helyreállítható, ha a növényt CO₂ gazdag környezetbe tesszük (Meyer és Genty, 1998). A csökkent intercelluláris CO₂ szint miatt az fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei telítődhetnek, mely reaktív oxigénformák (ROS) képződéséhez vezethet. Ezek károsíthatják a növényt, ezért megfelelő szinten tartásukhoz különböző antioxidáns védekezőrendszerek vannak. A ROS azonban másodlagos hírvivőként is funkcionálhat a redox-szignáltranszdukciós útban és hormonális szabályozás alatt is állhatnak (Foyer és Noctor, 2003). A hidrogén-peroxid szignálmolekulaként működik a sztómazáródáshoz, a levél akklimációjánál a magas fényintenzitáshoz, és hősokk proteineket is indukálhat (Karpinska és mtsai, 2000). *Arabidopsis* növényeknél ha ABA-t adtak a zárósejtekhez, akkor az H₂O₂ felhalmozódáshoz vezetett, mely a sztómák záródását eredményezte (Desikan és mtsai, 2004). Az ABA számos szárazságstresszel kapcsolatos gén expresszióját is indukálja (Bray, 1997; Zhang és mtsai, 2005).

Az auxinok új gyökerek képződését indukálják, megtörve a citokininek által szabályozott apikális dominanciát. Ez a kiterjedtebb gyökérrendszer nagyban elősegítheti a növény túlélését (Farooq és mtsai, 2009). Az etilén szabályozza a szárazság által indukált öregedést, elősegítve az idősebb levelek leválását, mellyel a növény a transpirációt, s ezáltal a vízvesztést is csökkentheti (Young és mtsai, 2004). A PA közül lucerna leveleiben a spermidinszint csökkent a szárazságstressz során, de a gyökerekben, melyek *Rhizobium*-baktériumokat tartalmaztak, nem változott a szintje (Goicoechea és mtsai, 1997). Rizsben a szabad spermidin és spermin, valamint a putreszcin oldhatatlan kötött formájának mennyisége növekedett meg levélben a szárazságstressz nagyon korai szakaszában (Yang és mtsai, 2007), emiatt a megemelkedett PA-szintet a szárazságtűrés egyik fontos élettani paraméterének tartják rizsben.

Az ozmotikus helyreállítás talán az egyik legfontosabb folyamat szárazságstressz folyamán. Csicsriborsóban megfigyelték, hogy az ozmotikus adaptáció és a termésmennyiség között korreláció volt, amikor különböző vízellátottsági körülmények között nevelték a növényeket (Moinuddin és Khannu-Chopra, 2004). Ezt általában a növény olyan kis molekulatömegű, jól oldódó molekulák szintézisével éri el, melyek nagy koncentrációban sem toxikusak. Ezek a molekulák az oldható cukrok, cukoralkoholok, prolin, glicin-betain, szerves savak, stb. A növény különböző ionokat is akkumulál, mint pl. kalcium, kálium, klorid. Ezek a molekulák/ionok csökkentik a sejt ozmotikus potenciálját, ezzel elősegítve a víz beáramlását a sejtekbe, így segítve a sejtorganellumok és a citoplazma normális működését és a növényt a jobb növekedésben és asszimilátumok előállításában, mely a magtöltődéshez szükséges (Subbarao és mtsai, 2000). A fentebb említett molekulák közül a prolin mennyisége nagymértékben megnő alacsony vízpotenciál hatására. (Alexieva és mtsai, 2001; Yamada és mtsai, 2005). A megemelkedett prolinszint egyrészt a fokozott szintézis, másrészt a mitokondriumokban történő lassabb oxidáció következménye. Számos élettani szerepe van: makromolekulák stabilizálása, szén és nitrogén forrás szárazság utáni helyreállító folyamatokhoz (Zhu, 2002).

2.1.3. Sóstressz

A sóstressz, ezen belül is a NaCl által okozott stressz, világszerte az egyik legjelentősebb stresszféleség, mely csökkenti a gabonafélék termésmennyiségét (Tester és Davenport, 2003). A növények rezisztenciáját általában a túlélési százalékkal és/vagy a sóstressz körülmények közötti növekedéssel jellemzik, habár ez komplex folyamat, mely magába foglal élettani és biokémiai folyamatokat, valamint morfológiai és fejlődési változásokat is (Greenway és Munns, 1980; Yildiz és Kasap, 2007). A sóstressz túlélési százalékkal való jellemzésének inkább évelő növényeknél van jelentősége, míg a növekedéssel és terméshozammal az egyéves növényeket és ezen belül is a gazdasági növényeket, gabonaféléket érdemes jellemezni. A kukorica (*Zea mays* L.) mérsékelten sótűrő növény (Maas és Hoffmann, 1977). A növényi válasz összetettsége a sóstresszre magyarázható azzal, hogy a sóstressz ion- és ozmotikus stressz is egyben, mely membrán destrukciót és anyagcserezavarokat okozhat, valamint ROS képződéséhez vezet, mely oxidatív stresszt okoz (Chaparzadeh és mtsai, 2004). A Na⁺ és a Cl⁻ ionok általában együtt jutnak a növénybe, mégis gabonafélék esetében általában a Na⁺ toleranciát nézik, mivel a

gabonafélék inkább Na^+ -ot akkumulálnak a levelekben, ellentétben pl. a szójával, citrusfélékkel, szőlőkkel, fás évelőkkel, melyek inkább érzékenyek a klorid-ionra.

A növényekben három tolerancia típust különböztetünk meg, melyek a stresszhatás erősségétől és a növényi résztől függően egy növényen belül is működhetnek. Az első típus az ozmotikus tolerancia, melyet a szárazságstressz során már részletesen ismertettünk. A második típus a Na^+ kiválasztás, mely azt jelenti, hogy a Na^+ nem akkumulálódik káros mennyiségben a szövetekben/sejtekben, mert a növény a felesleges mennyiséget eltávolítja. A harmadik típus a szöveti tolerancia, amikor az ionok felhalmozódnak a szövetekben. Árpával végzett kísérletekben azt kapták, hogy a Cl^- nagyobb mennyiségben halmozódott fel az epidermális, mint a mezofill sejtekben (Fricke és mtsai, 1996; Huang és van Steveninck, 1989; James és mtsai, 2006; Leigh és Storey, 1993). A K^+ esetében pont az ellenkezőjét tapasztalták, mivel az inkább a mezofill sejtekben akkumulálódott (Cuin és mtsai, 2003; Fricke és mtsai, 1996; James és mtsai, 2006). A Na^+ esetében nincs bizonyíték a különböző sejtípusok közötti különböző megoszlásra (James és mtsai, 2006). Az enzimműködést kb. 100 mM-tól gátolja a Na^+ , de a citoszólban általában NaCl stressz alatt sem mértek 10-30 mM-nál nagyobb koncentrációt. A növény a felesleges Na^+ -ot ideális esetben a vakuólumaiba választja ki. Volt olyan, hogy a vakuólumban a koncentrációja meghaladta a 200 mM-t, mely már mindenféle enzimaktivitást gátol, ha a citoszólba jut, a levél viszont teljesen normálisan működött (Munns és Tester, 2008). Tehát a halofita növények enzimeit sem sótűrőbbek az átlagnál, hanem a növények a normális működést a sejten belüli kompartmentalizációval érik el. A kompartmentalizáción kívül is léteznek egyéb tolerancia mechanizmusok, mint pl. az ozmotikus tolerancia vagy a K^+ akkumuláció.

2.1.4. Kadmium-stressz

A nehézfém-szennyezés komoly környezeti probléma, mely nemcsak a növények termesztésében okoz gondokat, hanem akár az emberre is veszélyes lehet. A Cd az egyik legtoxikusabb nehézfém, mely a talajban és a vizekben is előfordulhat, és már relatíve kis mennyiségben is komoly problémát okozhat bármely élő szervezetnek (Benavides és mtsai, 2005). A talaj Cd szennyeződése eredhet pl. mezőgazdasági művelésből (pl. foszfor műtrágya), bányászat vagy valamely ipari tevékenység melléktermékeként (Radotic és mtsai, 2000). A nem szennyezett talajok kb. 0,5 mg/kg Cd-ot tartalmaznak, de a talajtól függően, akár 3 mg/kg is lehet a Cd mennyisége. Magasabbrendű növényeknél a Cd-ot a gyökér veszi fel és főleg ott akkumulálódik, a hajtásban már kevesebb található (Breckle, 1991). A Cd nem

esszenciális elem, mégis könnyen bejut a növénybe, s ott különböző zavarokat okoz az anyagcsere folyamatokban. A kadmium gátolja a produkció szempontjából az egyik legfontosabb metabolikus folyamatot, a fotoszintézist. A kadmium károsítja a kloroplasztiszokat (Rascio és mtsai, 1993; Ghoshroy és Nadakavukaren, 1990). A kadmium indukálta dezorganizáció a gránum- és a tilakoidmembránokat is érinti (Souza és mtsai, 2005). A kadmium gátolja a klorofill bioszintézisét (Parekh és mtsai, 1990), és csökkenti a teljes klorofill és karotenoid tartalmat, bár ez utóbbit kevésbé, ezáltal csökken a klorofill/karotenoid arány (Ferretti és mtsai, 1993). Izolált kukorica kloroplasztiszokkal végzett kísérletekben azt tapasztalták, a kadmium a második fotokémiai rendszer (PSII) oxidáló oldalán, a vízbontó komplex szintjén fejt ki gátló hatását. A PSII körüli elektrontranszportot a tilakoidmembrán- és polipeptid-összetétel megváltoztatásával, és zsírsavak felszabadításával gátolhatja (Bazzaz és Govindjee, 1974). Arra vonatkozóan is vannak tanulmányok, hogy a Cd az akceptor oldalon a Q_A - Q_B elektronátmenetet gátolja (Sigfridsson és mtsai, 2004). Az első fotokémiai rendszert (PSI) sokáig rezisztensnek vélték, de közvetett módon itt is kifejzheti gátló hatását. Mivel a Cd-koncentráció emelkedésével a vastartalom csökken, feltételezve, hogy a vashiány csökkenti a ferredoxin koncentrációt, nem meglepő, hogy a kadmiumkezelt kukoricanövényekben csökken a ferredoxin-függő $NADP^+$ fotoredukció (Siedlecka és Baszynski, 1993). A fotoszintézisen kívül a kadmium a nitrogén- és kénanyagcserét is befolyásolja azáltal, hogy megnöveli az ATP-szulfuriláznak és az adenozin 5'-foszfoszulfát reduktáznak és az o-acetilszerin-tiol-liáznak aktivitását (Nussbaum és mtsai, 1988; Ferretti és mtsai, 1993), valamint a nitrát- és ammónia-asszimiláció kulcsenzimeinek, a nitrát-reduktáznak és a glutamin-szintáznak aktivitását is serkenti (Ferretti és mtsai, 1993). Ellenben Boussama és mtsai, (1999) azt találták, hogy a kadmiumkezelés a nitrogén anyagcsereben direkt és indirekt módon szerepet játszó enzimek, úgymint nitrát reduktáz, nitrit reduktáz, glutamin szintetáz, ferredoxin-glutamát szintáz, NADH-glutamát szintáz aktivitását gátolja, míg a glutamát dehidrogenáz aktivitást serkentette kukoricában.

Nehézfémstressz során megnő a reaktív oxigénszármazékok koncentrációja a sejtekben (Dat és mtsai, 2000). A divalens kadmium kation (Cd^{2+}) más fémekkel (Cu, Fe) ellentétben nem képes részt venni a Fenton-reakcióban, ennek ellenére reaktív oxigénformák megjelenését, oxidatív stresszt és lipidperoxidációt indukál (Shah és mtsai, 2001).

A nehézfémtoleranciát is hasonló mechanizmusok eredményezik, mint a sótoleranciát: egyik csoportját az elkerülési-stratégiát, a másikat a tolerancia-stratégiát alkalmazó növények alkotják (Hall, 2002). Az elkerülési mechanizmust a nehézfém felvételének korlátozásával – így azok kizárásával a szövetekből – valósítják meg a növények.

A tolerancia mechanizmust alkalmazók a nehézfémek aminosavak, fehérjék, peptidek általi lekötésével képesek a nehézfémeket akkumulálni, tárolni és immobilizálni. Ilyen peptidek a fitokelatinok. Növényekben először Grill és mtsai (1985) izolálták *Silene cucubalis* sejtszuspenziós kultúrából. A fitokelatinok struktúrája: $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, ahol az n a $\gamma\text{Glu-Cys}$ (γEC) egységek ismétlődésének a száma, mely általában 2-11. A szintézisükért felelős enzim a γ -glutamil-cisztein-dipeptidil-transzpeptidáz (fitokelatin-szintáz: PCS), melynek szubsztrátja a glutation (Grill és mtsai, 1989). A PC szintézis első lépése, a γEC dipeptid létrehozása a GSH-ból fémion jelenlététől független, míg a második lépés fémion-függő transzpeptidáció (Clemens, 2006). Az enzim nehézfémstressztől függetlenül expresszálódik, de elsődlegesen a nehézfém jelenléte aktiválja (Cobbett, 2000). A PCS expressziójáról, és a PC bioszintézis szövetspecifitásáról keveset tudunk. Paradicsomnövényekben PCS aktivitást mértek a gyökérben és a szárban, de a levelekben és a termésben nem (Chen és mtsai, 1997), más szerzők azt tapasztalták, hogy paradicsomnövények levelében a PCS enzim csak nehézfém jelenlétében szintetizálódik (Reese és mtsai, 1992). A PC-ok bioszintézise autoregulációs kontroll alatt áll, azaz miután a reakciótermék kelátot képez a nehézfém ionnal, az enzim aktiváló ion hiányában inaktívvá válik (Loeffler és mtsai, 1989). Napjainkig ellentmondások tapasztalhatók az irodalomban a nehézfém-tolerancia és a fitokelatin szintézis közötti kapcsolatot illetően (de Knecht és mtsai, 1994; Delhaize és mtsai, 1989; Arisi és mtsai, 2000). Szenzitív növényekben a fitokelatinok a Cd detoxifikáció fő elemei (Cobbett és Goldsbrough, 2002), míg hiperakkumuláló növényekben, mint pl. a *Thlaspi caerulescens* vagy az *Arabidopsis halleri* azt találták, hogy a fitokelatinok ebben a rendkívül nagy toleranciában nem játszanak meghatározó szerepet (Verbruggen és mtsai, 2009). Tehát megállapíthatjuk, hogy a fitokelatinok a nehézfém detoxifikáció fő komponensei, de önmagukban valószínűleg nem felelősek a kadmiumtoleranciáért, habár a nehézfémstressz hasznos, korai figyelmeztető jelei. A fitokelatin-szintáz konstitutív jelenléte felveti a kérdést, hogy a növény miért fordít annyi energiát rá, ha csak nehézfémstressz során van szerepük. Feltételezhetjük, hogy a fitokelatinok nemcsak egy nehézfém detoxifikációs rendszert képviselnek, hanem alacsony koncentráció esetén a celluláris homeosztázis kulcsmolekulái, szükségesek a fémek megfelelő apoenzimeikhez szállításában (Thumann és mtsai, 1991), valamint az ionok szállításában a különböző növényi részek között és a sejten belüli kompartmentizációban. Kísérleti adatok vannak arra, hogy részt vehetnek a növényi immunválasz kialakulásában is fertőzés során peptidázként működve (Clemens, 2009). Egy harmadik feltételezett funkciójuk, hogy a Cd és az As esszenciálisak a növények számára és a

fitokelatin-út az összeköttetés ezekhez az elemekhez (Clemens, 2006). Erre kevés kísérletes adat van, habár *Thalassiosira weissflogii*-ban leírtak egy olyan karboanhidráz enzimet, ami kevés CO₂-ot tartalmazó Zn-hiányos környezetben aktiválódott és ez az enzim Zn helyett Cd-ot használt (Xu és mtsai, 2008).

2.1.5. Oxidatív stressz

A növényeknek, mint minden aerob élőlénynek, oxigénre van szükségük az energiatermeléshez. A molekuláris oxigénből számos módon képződhetnek részlegesen redukált reaktív oxigénformák (ROS), melyek reakciókészsége igen nagy, ezért féléletidejük rövid. A reaktív oxigénformák különböző mértékben minden növényben jelen vannak az aerob anyagcsere eredményeként. Számos abiotikus stressz, mint pl. alacsony hőmérséklet, szárazság, só- illetve nehézfémstressz, során megnő a ROS koncentrációja (Dat és mtsai, 2000). Végső soron minden abiotikus stresszfolyamat együtt jár oxidatív stresszel is.

A ROS képződés három fő módját különíthetjük el a növényi sejtekben: 1) a fotoszintetikus, illetve a légzési elektron transzportlánc túlterheltsége során bekövetkező elektron kiáramlás következtében, 2) a gerjesztett, tripllett állapotú klorofillmolekulák és oxigénmolekulák reakciója során, 3) különböző oxidázok és peroxidázok reakciótermékeként, mint pl.: a peroxiszómákban, a fotorespirációban szerepet játszó glikolát-oxidáz, vagy a membránkötött NADPH-oxidáz, és sejtfalhoz kötött peroxidázok katalizálta reakciókban képződhetnek redukált reaktív oxigénformák (Mittler, 2002; Edreva, 2005).

Egy elektron felvételével a molekuláris oxigénből szuperoxid-aniongyök ($O_2^{\cdot-}$) keletkezik. Ez közepesen reakcióképes, rövid féléletidejű (2–4 μ s) ROS, mely nem jut át a sejtmembránon. A szuperoxid-gyök további elektronfelvétellel hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakulhat, illetve kinonokat vagy átmeneti fémkomplexekeket redukálhat, így befolyásolva egyes fémtartalmú enzimek aktivitását. Vizes oldatban egy proton felvételével hidroperoxil-gyökké ($HO_2^{\cdot}$) alakul, mely már át tud jutni a sejtmembránon, és hidrogén atomok elvonásával lipid autooxidációt indíthat el (Edreva, 2005).

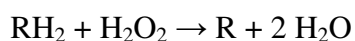
Gerjesztési energia hatására a molekuláris oxigénből szinglet oxigén (1O_2) keletkezik. Ez vizes közegben körülbelül 4 μ s ideig van jelen, majd átadja gerjesztési energiáját, illetve reakcióba lép egyes vegyületekkel és endoperoxidokat, vagy hidroperoxidokat hoz létre (Knox és Dodge, 1985).

A hidrogén-peroxid közepes reakcióképességű, viszonylag hosszú (1 ms) féléletidejű molekula, amely bizonyos távolságra membránokon keresztül is képes diffundálni. Tiol-csoportjuk oxidációja által enzimeket is inaktiválhat (Dat és mtsai, 2000).

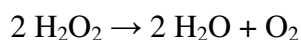
A legreaktívabb oxigénforma a hidroxil-gyök, mely hidrogén-peroxidból keletkezik a Haber-Weiss ciklus elemeként ismert Fenton-reakció során fém katalizátor jelenlétében. A fémionok általában oxidált formában fordulnak elő a sejtekben. Szuperoxid-gyök jelenlétében azonban redukálódnak és így képessé válnak arra, hogy a H_2O_2 átalakulását katalizálják hidroxil-gyökké. A hidroxil-gyök bármely biológiai molekulával képes reakcióba lépni, túlzott termelődése sejthalálhoz vezet. A sejtek nem rendelkeznek olyan enzimmal, mely képes lenne eliminálni a hidroxil-gyököt, ezért fontos, hogy szigorú szabályozás alatt álljon a H_2O_2 és a $\text{O}_2^{\cdot-}$ mennyisége a sejtekben (Grant és Loake, 2000).

A ROS semlegesítésére különböző védekező rendszerek alakultak ki a növényekben. Az antioxidáns védekezőrendszert enzimatikus és nem-enzimatikus komponensekre különíthetjük el. A nem-enzimatikus rendszert antioxidáns tulajdonságú vegyületek alkotják, melyek lehetnek vízoldhatók, ezek között kiemelt fontosságú a glutation és az aszkorbinsav, illetve lipidoldhatók, mint például az α -tokoferol, vagy a β -karotin. Az enzimatikus elemek közül az aszkorbát-peroxidáz (APX) és a glutation-reduktáz (GR) az előbbi vegyületek reakcióit, regenerációját katalizálva vesz részt a reaktív oxigénformák eliminálásában. A szuperoxid-dizmutáz közvetlenül a szuperoxid-aniongyök, míg a kataláz (CAT) hidrogén-peroxid semlegesítésében vesz részt (Dat és mtsai, 2000).

A katalázok a peroxiszómákban és a mitokondriumokban fordulnak elő, és a H_2O_2 -t közömbösítik. Bár a hidrogén-peroxid nagy koncentrációban mérgező, kis koncentrációban szerepet játszhat a jelátviteli folyamatokban mind növényi, mind állati szervezetek esetében (Devary és mtsai, 1991; Schreck és mtsai, 1991; Prasad és mtsai, 1994b). A H_2O_2 sokkal kevésbé reaktív, mint az oxigéngyökök, de egyrészt azért veszélyes, mert ellentétben az oxigén gyökökkel, át tud diffundálni a membránokon, és így a kialakulásától távolabbi helyeken is tud károsítani, másrészt pedig könnyen átalakul hidroxil gyökké, amely az egyik legaktívabb és ezáltal az egyik legveszélyesebb gyökfajta. Attól függően, hogy mekkora a H_2O_2 koncentrációja, a kataláz enzimnek kétféle lehetséges működése van (Deisseroth és Dounce 1970). Ha alacsony a hidrogén-peroxid koncentrációja ($\leq 10^{-6}$ M), akkor az ún. "peroxidációs" út működik, ahol különböző vegyületek (etanol, aszkorbát, stb.) tölthetik be a hidrogén-donor H_2O_2 szerepét az alábbi reakció szerint:

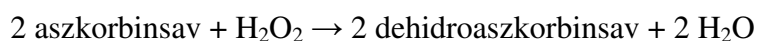


Ha magas a H_2O_2 koncentráció, akkor egy gyorsabb, az ún. katalitikus módon hatástalanítja, ahol mind a donor, mind pedig az akceptor szerepét a hidrogén-peroxid molekula tölti be, így egyszerre két molekula H_2O_2 -t képes közömbösíteni.



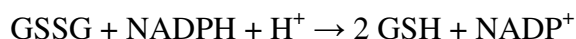
Kukorica esetében három, egymástól független gént (Cat1, Cat2 és Cat3) találtak, melyek biokémiaiilag különböző kataláz enzimek (CAT1, CAT2 és CAT3) szintéziséért felelősek. A CAT1 és CAT2 izoenzimek a citoszolban és/vagy a glioxiszómákban vagy peroxiszómákban, míg a CAT3 fehérjék a mitokondriumokban találhatók. Ezen kataláz gének expressziója függ egyrészt a növény fejlettségi fokától, valamint több környezeti tényezőtől, mint pl. a fény és a hőmérséklet.

Mivel a kloroplasztiszokban nincs katalázaktivitás, az ott különféle utakon termelődött H_2O_2 -ot az ún. aszkorbát-glutation ciklus semlegesíti. Ezen rendszer enzimei és szubsztrátjai azonban nem-fotoszintetikus szövetekben is megtalálhatóak, tehát más sejtkompartmentekben is működik a ciklus (Dalton és mtsai 1986, Klapheck és mtsai 1990). A ciklus két legtöbbet tanulmányozott enzime az APX és a GR. Az APX egy vastartalmú protein, mely erősen specifikus az aszkorbinsavra mint elektrondonorra, míg más peroxidáz enzimek, mint pl. a guajakol-peroxidázok (POD), többféle vegyületet is használhatnak elektrondonorként. Az APX a következő reakciót katalizálja:



Az enzimnek két izoenzimjét tudták kimutatni teában (Chen és Asada, 1989), spenótban (Nakano és Asada, 1987; Tanaka és mtsai, 1991) és borsóban (Mittler és Zilinskas 1991).

Növényekben a GR aktivitás nagy része a kloroplasztiszokban mutatható ki (Bielawska és Joy 1986). Fontos szerepe van a dehidroaszkorbinsav-aszkorbinsav átalakulásban. A következő reakciót katalizálja (GSH: redukált glutation, GSSG: oxidált glutation):



Borsólevélben több izoenzimet is kimutattak, de még nem tisztázott, hogy ezek különböző gének termékei-e, vagy csak a poszttranszkripció és poszttranszlációs módosulások következményei (Edwards és mtsai, 1990).

Növényekben a GR aktivitás nagy része a kloroplasztiszokban mutatható ki (Bielawska és Joy, 1986), de azonosították a mitokondriumban, és a citoszólban is (Foyer és mtsai, 1991). Kukoricában a GR enzim, az APX-zal szemben, szinte kizárólag csak a mezofill sejtekben lokalizálódik (Doulis és mtsai, 1997). Stresszhatásra általában növekedés tapasztalható az enzim aktivitásában, melynek szerepe lehet a tolerancia kialakulásában (Foyer és mtsai, 1991, 1997; Kocsy és mtsai, 2001). A GR-nak fontos szerepe van a dehidroaszkorbinsav-

aszorbinsav átalakulásban és szerepe nem egyszerűen a hidrogén-peroxid detoxifikációjában rejlik, hanem a redukált és oxidált glutation (GSH:GSSG) arányának finom szabályozásával részt vesz a sejt redox állapotának kialakításában, a védekezőfolyamatok beindításában (Foyer és mtsai, 1991; Szalai és mtsai, 2009).

A reaktív oxigénformák sejtkárosító hatásuk mellett, alacsony koncentrációban, szerepet játszhatnak a védekező mechanizmusok jelátviteli folyamataiban (Grant és Loake, 2000; Shao és mtsai, 2008). Számos jelátviteli útban mutatták ki reaktív oxigénformák szerepét (Van Breusegem és mtsai, 2001; Neill és mtsai, 2002). A hidrogén-peroxid különböző stresszhatások következtében aktiválódó jelátviteli utak közös komponense, így szerepe lehet a kereszttolerancia kialakulásában (Pastori és Foyer, 2002). A sejtekben a reaktív oxigénformák mennyiségét összetett antioxidáns védekező mechanizmusok szabályozzák. Ezek egyrészt megakadályozzák a reaktív oxigénformák nagy mennyiségű felhalmozódását, másrészt lehetővé teszik kis koncentrációváltozások finom szabályozását, érzékelését.

2.2. Szalicilsav

A szalicilsav (SA) (*o*-hidroxi-benzoésav) növényekben általában kb. 1 µg/g friss tömeg töménységben fordul elő. Legnagyobb mennyiségben hőtermelő növények virágzásakor, ill. patogén fertőzés után mutatható ki (Raskin, 1992).

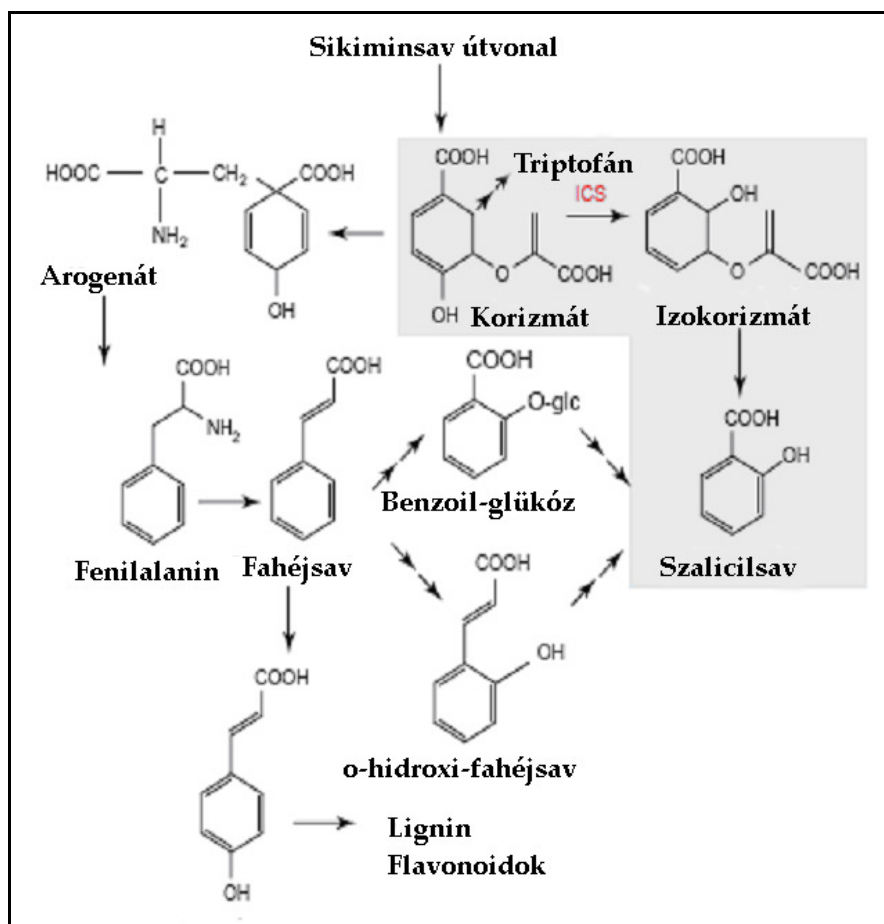
A SA szerepét bizonyították a biotikus stressztolerancia jelátviteli folyamatában, a hiperszenzitív reakció (HR) kialakításában. Dohány mozaik vírussal fertőzött dohánylevelekben a nekrotikus lézióban és annak környékén lokálisan megnő az endogén SA szint (Enyedi és mtsai, 1992). Exogén SA hatására dohányban (Malamy és mtsai, 1990; Yalpani és mtsai, 1991), és rizsben (Rakwal és mtsai, 2001) a patogenezissel kapcsolatba hozható (pathogenesis related, PR) fehérjék szintetizálódnak. Számos bizonyíték szól amellett, hogy SA szükséges a szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) kialakításához is. Legújabb eredmények szerint a SA felhalmozódása az adott szövetben feltétele a SAR kialakulásának, de nem a SA az a transzportált szignálmolekula, amely a fertőzés helyéről a távolabbi szövetekbe szállítódik, hanem a metil-SA (Me-SA). Kimutatták ugyanis, hogy a SA-at Me-SA-vá alakító SA metil-transzferáz enzim működése az elsődlegesen fertőzött levelekben, illetve a Me-SA-t SA-vá alakító metil-szalicilsav-észteráz enzim aktivitásának megléte az elsődleges fertőzési helytől távolabbi szövetekben elengedhetetlen feltétele a SAR kialakulásának (Park és mtsai, 2007). Ezzel összhangban van az is, hogy patogén fertőzést követően a növényekben normál körülmények között hiányzó Me-SA mennyisége, melyet a

SA-karboxil-metil-transzferáz enzim szintetizál, drasztikusan megemelkedik (Huang és mtsai, 2003).

A SA másik jól ismert hatása, hogy egyes, ún. termogén növények esetében képes a növény hőmérsékletét megnövelni (Lamarck, 1778; Meeuse és Raskin, 1988). Egyes virágzó *Arum* fajok esetében a hőtermelés legmagasabb intenzitása során az oxigénfelvétel mértéke elérheti egy repülő kolibri esetében fellépő oxigénfogyasztás mértékét (Lance, 1972). Ezen fajok esetében a hőtermelés elsősorban az illatanyagok könnyebb kibocsátását teszi lehetővé. A virágzás egyes periódusaiban a virág hőmérséklete 12 °C-kal is megemelkedhet. *Sauromatum guttatum* S. fajban kimutatták, hogy a hőtermelés indukciójáért felelős ún. kalorigén anyag a SA-val azonos (Raskin és mtsai, 1987). A hőtermelés valószínűleg az ún. cianidrezisztens, alternatív légzési lánc fokozódásából ered, továbbá a glikolízis és Szent-Györgyi-Krebs ciklus enzimeinek fokozott működése figyelhető meg (Ordentlich és mtsai, 1991). SA-ról kimutatták, hogy bizonyos növényekben nagymértékben képes a mitokondriumban működő alternatív oxidáz mennyiségét fokozni (Rhoads és McIntosh, 1992). A cianid-rezisztens légzési útról viszont már korábban kimutatták, hogy szerepe lehet pl. fiatal kukoricanövények hidegtűrésében is (van de Venter, 1985). Feltételezések szerint az alternatív oxidáz stresszvédő funkciója abban áll, hogy csökkenti a káros aktív oxigénformák kialakulásának lehetőségét (Purvis és Shewfelt, 1993) és korrelációban van a kukorica hidegtűrésével (Szalai és mtsai, 2005).

2.2.1 A szalicilsav bioszintézise

A SA bioszintézise a sikiminsav-fenilpropanoid útvonalból indul ki. A fenilalanin először fahéjsavvá alakul a fenilalanin-ammonia-liáz katalizálta reakcióban. Majd a fahéjsavból két úton szintetizálódhat a SA. A két út az aromás gyűrű hidroxilációs és az oldallánc oxidációs reakciójának sorrendjében különbözik. Az egyik útvonalon a fahéjsav *orto*-hidroxi-fahéjsavvá (oHCA, *o*-kumársav) alakul egy hidroxilációs lépés során, majd az oHCA az oldalláncon tovább oxidálódik. A másik lehetőség, hogy a fahéjsav először benzoessavvá (BA) alakul az oldallánc oxidációja során és a hidroxiláció ezután következik (Métraux, 2002) (2. ábra).



2. ábra A SA bioszintézise. ICS – izokorismát szintáz. (Métraux, 2002 alapján).

Az izotópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a *Primula acaulis* és a *Gaultheria procumbens* fajokban a ^{14}C -jelölt fenilalaninos vagy fahéjsavas kezelést követően a radioaktív SA oHCA-n keresztül szintetizálódott (El-Basyouni és mtsai, 1964). Ugyanezen fajokban, a radioaktív jelölés megjelent a SA-ban ^{14}C -benzoosavas kezelést követően is (El-Basyouni és mtsai, 1964; Ellis és Amrhein, 1971), ami azt sugallja mindkét útvonal jelen van a növényekben. Chadha és Brown (1974) azt tapasztalta, hogy egészséges dohánynövényekben a SA a benzoosavon keresztül szintetizálódik, míg *Agrobacterium tumefaciens* fertőzést követően ^{14}C -trans-fahéjsav orto-kumársavvá alakul.

Yalpani és mtsai (1993) dohány mozaik vírussal fertőzött dohány levelében azt tapasztalták, hogy ^{14}C -fahéjsavas kezelést követően ^{14}C -jelölt oHCA nem jelent meg, azaz a SA a fenilalaninból a benzoosavon keresztül szintetizálódik. Szintén dohányban mutatták ki, hogy a SA a benzoosavból szintetizálódik, de közvetlen prekursora nem a szabad benzoosav, sokkal inkább annak konjugált, glikozidos formája (Chong és mtsai, 2001). Uborkában, paradicsomban és rizsben is igazolást nyert, hogy a SA a fahéjsavból a benzoosavon keresztül

szintetizálódik (Sticher és mtsai, 1997). Nem szabad figyelmen kívül hagynunk azonban azt a tényt, hogy e tanulmányok a patogén-indukált SA-szintézist vizsgálták.

A legújabb kutatási eredmények szerint a SA abiotikus stresszek során is a benzoésavból szintetizálódik a benzoésav-2-hidroxiláz enzim katalizálta reakcióban. Így borsóban hőaklimatizáció során a szabad SA-szint pozitív korrelációban van a megnövekedett benzoésav-2-hidroxiláz aktivitással (Pan és mtsai, 2006). Kukoricában Cd-stressz során a kötött benzoésav akkumulációját mutattuk ki, melyet SA-növekedés követett (Pál és mtsai, 2005). Rizsben sóstressz, alacsony hőmérséklet és H₂O₂ kezelés hatására is indukálódott a benzoésav-2-hidroxiláz és megemelkedett a SA-tartalom. Ugyanakkor a NaCl-dal nem kezelt rizsnövényekben a SA-tartalmat nem befolyásolta a benzoésav-2-hidroxiláz gátló unikonazol, ami azt feltételezi, hogy stresszmentes állapotban a SA nem a benzoésav-2-hidroxiláz segítségével szintetizálódik (Sawada és mtsai, 2006).

Baktériumokban mutatták ki először a SA-szintézis egy harmadik módját, majd *Arabidopsis* kloroplasztisban is azonosították a szintézisért felelős izokorizmat-szintáz kódoló gént (*ICS1*). Az is bizonyítást nyert, hogy az *ICS1* patogén fertőzés után lokálisan és szisztémásan is aktiválódik, és az ICS által szintetizált SA szükséges a SAR kialakulásához (Wildermuth és mtsai, 2001). Felmerül a kérdés, ha a fahéjsavból, illetve az izokorizmatból kiinduló SA-szintézis egy adott növényfajban fordul elő, mindkét útvonal specifikusan stimulálódik, vagy a fahéjsavas útvonal csak egy alap SA-szintet produkál a nem fertőzött növényben. Ez utóbbi feltevést támasztja alá, hogy *Nicotiana benthamiana* növényekben az *ICS* gén expressziójának gátlása erőteljesen csökkentette a SA-akkumulációt ózon, illetve patogén stresszt követően. A fennmaradó SA-szint valószínűleg a fenilalanin-benzoésav útvonalon keresztül szintetizálódik és nem képes kompenzálni a génszupresszióból adódó SA-hiányt (Catinot és mtsai, 2008).

2.2.2. A szalicilsav hatásai abiotikus stresszfolyamatok során

A SA abiotikus stresszfolyamatokban betöltött szerepét számos stressz során több növényfajban is tanulmányozták, és nemcsak a külsőleg adott SA hatását vizsgálva, hanem SA felhalmozására képtelen NahG transzgenikus növényeket előállítva is (Gaffney és mtsai, 1993).

Csoportunk volt az első, aki kimutatta, hogy a tápoldathoz adagolt 0,5 mM SA növelte a fiatal kukorica növények hidegtűrését (Janda és mtsai, 1999). Később azt is bizonyítottuk, hogy a SA prekursorai és származékai, úgymint a benzoésav, fahéjsav, acetyl-SA, is

hatékonyak a hideg elleni védelemben (Janda és mtsai, 2000; Horváth és mtsai, 2002). Ez fokozott GR és gvajakol-peroxidáz (POD) aktivitással, valamint csökkent CAT aktivitással járt együtt. Mások kimutatták, hogy tápoldatban nevelt kukorica, rizs és uborka növények SA-kezelése a hajtás hidegtűrését fokozta, a gyökereket nem (Kang és Saltveit, 2002), s ők is GR és POD aktivitás növekedést találtak a hajtásokban. Banán (*Musa acuminata*) hajtások hidegtűrése is fokozódott 0,5 mM hatására, mind a talajra locsolva, mind pedig a levelekre porlasztva (Kang és mtsai, 2003). Normál hőmérsékleten az SA-kezelés megemelte a banán növények hidrogén-peroxid szintjét, míg 5°C-on csökkentette és aktiválta a SOD, CAT és POD enzimeket. Kimutatták azt is, hogy nemcsak a növény, hanem a termés kezelése is fokozhatja az alacsony hőmérséklettel szembeni ellenállóságot. Paradicsomot kezelve 0,01 mM metil-szaliciláttal, illetve metil-jázmonáttal megnőtt a termés hidegtűrése és PR-proteinek jelentek meg (Ding és mtsai, 2002). Magasabb koncentrációban alkalmazva a SA-t azonban már károsító hatású volt. Hasonló megfigyeléseket tettek őszibarack esetében is (Wang és mtsai, 2006).

Só- és ozmotikus stressz során a SA szerepe ellentmondásos. *Arabidopsis* növényekben azt találták, hogy a fotoszintetikus szövetekben fokozta a ROS képződést és ezzel elősegítette a stressz tünetek jelentkezését (Borsani és mtsai, 2001). Mások azt tapasztalták, hogy 0,05 mM SA alkalmazása elősegítette a sóstressz utáni növekedést, valamint ABA és prolin felhalmozódást okozott (Shakirova és mtsai, 2003). A talajhoz adott SA elősegítette kukoricanövények túlélését sóstressz alatt, és csökkentette a Na⁺ és Cl⁻ akkumulációt (Gunes és mtsai, 2007). A SA-kezelt növényekben alacsonyabb volt az MDA szint és az ionkiáramlás, mint a kezeletlen növényekben, viszont megemelkedett a hidrogén-peroxid szintje. Paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) növények gyökerét 0,1 mM SA-ba áztatva a kezelés védelmet nyújtott 200 mM NaCl stressz ellen (Stevens és mtsai, 2006), megnövelte a növények növekedését, fotoszintézisét, a transpirációt, sztómakonduktivitást és csökkentette az ionkiáramlást.

Mérsékelt szárazságstressznél kimutatták, hogy búza leveleket 1 mM SA-val permetezve megnövekedett az antioxidáns enzimek aktivitása, a klorofill és a relatív víztartalom, a membránstabilitás, valamint csökkent a hidrogén-peroxid és a lipidperoxidáció (Agarwal és mtsai, 2005). SA-val előkezelt árpa levelekben kevésbé jelentkeztek a vízhiány okozta tünetek a sejtmembránokon, és megnőtt az ABA tartalom (Bandurska és Stroinski, 2005).

Két rizsfajta esetében (*Oryza sativa* L. cvs Ratna és IR 36) nehézfémstressz (Pb és Hg 10 µM koncentrációban) során, 100 és 200 µM koncentrációban alkalmazva, a SA javította a

növények csírázási képességét és a növekedését, csökkentette az elektrolitkiáramlást és az MDA tartalmat, továbbá a nehézfémek antioxidáns enzimekre gyakorolt hatását is visszafordította (Mishra és Choudhuri, 1997, 1999). Árpamagok áztatása, illetve a növények 500 μM SA-val történő előkezelése megakadályozta a 25 μM kadmium által kiváltott lipidperoxidációt, és megnövelte a hajtás és gyökér frisstömeget. Ez a védőhatás azonban nem az antioxidáns kapacitás növekedésének köszönhető. Az antioxidáns enzimek aktivitása a kadmiumstressz során megnőtt, míg a SA-val előkezelt növényekben ez a növekedés elmaradt. A SA-kezelés pozitív hatására két hipotetikus magyarázatot találtak: a SA-előkezelés a gyökérben megemeli a fitokelatin koncentrációt, illetve a SA ABC-transzporterek expresszióját stimulálja (Metwally és mtsai, 2003). 20 μM alumíniumot tartalmazó tápközegben *Cassia tora* L. gyökerében, 5 μM SA-kezelés megemelte a citrát-effluxot, habár magasabb koncentrációban (20 μM felett) gátolta azt. Emellett a SA csökkentette az alumínium gyökérnövekedést gátló hatását és a gyökér alumíniumtartalmát (Yang és mtsai, 2003). Szójában ugyancsak a SA (0,1 - 100 μM koncentrációban) védőhatásáról számoltak be kadmiumstressz során (Drazic és Mihailovic, 2005). A 10 μM SA-kezelés a csírázás kezdetén stimulálta a kadmium akkumulációt *Medicago sativa* növényekben, és nem volt képes csökkenteni a kadmiumkezelés okozta hajtás- és gyökérnövekedés gátlást (Drazic és mtsai, 2006).

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a külsőleg adott SA-nak különböző abiotikus stresszek ellen védőhatása van, viszont ez általában egy szűk SA-koncentráció tartományban érvényesül. A túl alacsony koncentrációnak nincs hatása, a magasabb pedig még fokozhatja is a stressz okozta károsodást. Az optimális koncentráció növényfajonként, s még stressztípusonként is különböző lehet.

Míg a külsőleg adagolt SA hatásairól számos tanulmány jelent meg, az endogén SA változásairól már jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Hidegtűrő *Arabidopsis* növényekben kimutatták, hogy SA halmozódott fel 5 °C-on (Scott és mtsai, 2004). A növények csökkent növekedést mutattak ezen a hőmérsékleten és valószínűleg a SA okozta ezt a növekedésgátlást, mivel a SA-hiányos NahG növényeknél ez nem volt megfigyelhető. Rizs növényekben is megnőtt az endogén SA-szint és az SA-bioszintézis egyik enzimének, a benzoészav-2-hidroxiláznak az aktivitása sóstressz alatt (Sawada és mtsai, 2006). Szintén sóstressz során vizsgálták a hormonok változását *Iris hexagona*-ban és azt tapasztalták, hogy az ABA és a jázmonsav mennyisége megnőtt, míg a SA-é csökkent (Wang és mtsai, 2001b). Szárazságstressz során az endogén SA-tartalom kb. ötszörösére emelkedett, majd a stressz hatás megszűntével csökkent *Phillyrea angustifolia* növények levelében, de még mindig

magasabb volt, mint a stressz előtt (Munné-Bosch és Penuelas, 2003). A vízhiány hatására megnőtt a SA-tartalom árpa gyökerében, de a hajtásban nem változott (Bandurska és Stroinski, 2005). Árpában kadmiumkezelés (Metwally és mtsai, 2003), *Cassia tora* L. gyökerében alumíniumkezelés (Yang és mtsai, 2003), borsó gyökérben kadmiumkezelés (Rodriguez-Serrano és mtsai, 2006) hatására is SA-felhalmozódásról számoltak be. *Arabidopsis thaliana* esetében 500 μ M-os kadmiumkezelés több mint háromszorosára emelte endogén SA-tartalmat, de NahG transzformáns *Arabidopsis* vonalakkal összehasonlítva megállapították, hogy a vad típusú vonalakban a felhalmozódott SA felerősítette a kadmium-indukálta oxidatív stressz tüneteit (Zawoznik és mtsai, 2007).

2.2.3. A szalicilsav feltételezett hatásmechanizmusa

A hidrogén-peroxid szint növekedés valószínűleg a SA antioxidáns enzimekre gyakorolt hatásából ered (Klessig és mtsai, 2000; Ganesan és Thomas 2001). A legtöbb antioxidáns enzimről kimutatták, hogy a SA befolyásolja aktivitásukat. A Cu,Zn-SOD enzim aktivitását serkenti a SA, mely hozzájárulhat a hidrogén-peroxid szint emelkedéséhez (Rao és mtsai, 1997). Ugyanakkor a POD és a GR működését is fokozza a SA *in vivo*, mely viszont a hidrogén-peroxid felhalmozódás ellen hat (Dat és mtsai, 1998a; Janda és mtsai, 1999). Hosszantartó SA-kezelés *Arabidopsis*-ban csökkentette a CAT és az APX aktivitását, és hiperszenzitív reakcióhoz hasonló sejtelhaláshoz vezetett (Rao és mtsai, 1997). Szintén csökkentette a CAT és az APX aktivitását a SA *Astragalus adsurgens* Pall. kalluszkultúrában, megnövelve ezáltal a hidrogén-peroxid szintet (Luo és mtsai, 2001).

A SA-ról bebizonyosodott, hogy képes közvetlenül a dohányból izolált kataláz enzimhez kötődni és gátolni annak működését (Chen és mtsai, 1993b; Conrath és mtsai, 1995). Számos más növényfajban (pl. *Arabidopsis*, paradicsom, uborka) is kimutatták a SA *in vitro* katalázgátló hatását (Sánchez-Casas és Klessig, 1994). A SA katalázgátló hatásáról feltételezik, hogy magyarázhatja a megnövekedett hidrogén-peroxid szintet, és így szerepet játszik a SAR kialakulásában (Chen és mtsai, 1993a). Ennek ellenére még mindig kétséges a katalázgátlás jelentősége a rezisztencia indukciójában. Egyrészt, mert a SA katalázkötése nem specifikus, más vastartalmú fehérjéhez is kötődik, pl. akonitázhoz (Rüffer és mtsai, 1995). Másrészt, mivel nem minden növény esetében figyeltek meg egyértelmű gátlást és későbbi munkák különbséget találtak a kataláz izoenzimek között SA iránti érzékenységükben is. A kukorica CAT1 izoenzimének aktivitásában 2 mM SA jelentős mértékű (kb. 60%) nem-kompetitív gátlást eredményezett, míg a CAT2 esetében a gátlás kompetitív volt és gyenge

(20%) (Horváth és mtsai, 2002). Továbbá a különböző kataláz izoenzimek szövetspecifikus expressziója különbséget eredményezhet a SA adott szövetben kifejtett hatásában, amennyiben a kataláz valóban szerepet játszik a SA hatásának közvetítésében.

A katalázgátlás mechanizmusát illetően feltételezik, hogy a SA mint elektrondonor a katalázt lassabb, peroxidatív útra tereli. Alacsonyabb hidrogén-peroxid szint mellett ez gátlásként jelentkezik, míg káros szintű hidrogén-peroxid ellen védi az enzimet (Durner és Klessig, 1996). A katalázgátlás során azonban a SA szabadgyökké alakul, amely a továbbiakban lipidperoxidációt okozhat. Mind a katalázgátlás nyomán megemelkedett hidrogén-peroxid szintről, mind a gátlás során keletkező lipidperoxidokról feltételezik, hogy részt vesznek a SA-függő rezisztencia kialakulásának jelátviteli folyamatában (Anderson és mtsai, 1998).

Astragalus adsurgens Pall. kalluszkultúrában 0,2 mM SA megnövelte az endogén hidrogén-peroxid szintet. Külsőleg adott hidrogén-peroxid azonban nem helyettesítette teljes mértékben a SA hatását. Dimetil-tiourea mérsékelte viszont a SA hatását a hidrogén-peroxid szint csökkentése által (Luo és mtsai, 2001). Tehát a SA hatásnak csak részben a hidrogén-peroxid a közvetítője. A hidrogén-peroxid mellett szerepet játszhat a kataláz gátlásakor keletkező SA-szabadgyök és az általa okozott lipidperoxidáció is (Klessig és mtsai, 2000).

Nemcsak a SA hatására nő meg a reaktív oxigénformák mennyisége a sejtben, hanem bizonyítékok szólnak amellett is, hogy a reaktív oxigénformák SA-felhalmozódást okoznak (León és mtsai, 1995a; Enyedi, 1999). Ez a megfigyelés vezetett egy öngerjesztő SA-hidrogén-peroxid ciklus hipotéziséhez, amely ciklus a reaktív oxigénformák felhalmozódását és a sejt halálát eredményezi (van Camp és mtsai, 1998). A nekrotikus léziók kialakulását és terjedését magyarázó modellben központi szerepet játszik ez az öngerjesztő ciklus, mely által megnő a reaktív oxigénformák mennyisége, és programozott sejthalál indukálódik (Overmyer és mtsai, 2003).

2.3. A stressztolerancia növelésének lehetőségei

A mezőgazdasági termelés szempontjából fontos, hogy növeljük a gazdasági növények ellenállóságát abiotikus stresszekkel szemben. Ez többféleképpen történhet: egyrészt a hagyományos nemesítés valamint a molekuláris biológiai és géntechnológiai módszerekkel ellenállóbb fajták előállítására, másrészt olyan anyagok használata, melyek a növények ellenállóságát fokozzák. Mindkét esetben fontos, hogy minél jobban ismerjük a gazdasági

növényekben stressz körülmények közt lejátszódó élettani folyamatokat, védekezőmechanizmusokat.

2.3.1. Ozmoprotektáns anyagok alkalmazása

Korábban már szó volt arról, hogy bizonyos abiotikus stresszfolyamatokhoz másodlagos stresszként ozmotikus stressz társul, mely ozmoprotektáns anyagok (pl. prolin, glicin-betain, fruktánok, stb.) szintézisével jár együtt. Ezeknek szerepük van az ozmotikus egyensúly fenntartásában, valamint a szubcelluláris sejtstruktúrák védelmében a stressz során, azonban nem minden növény szintetizálja őket megfelelő mennyiségben, hogy kellően kivédje a stressz okozta károsodásokat (Penna, 2003). Három lehetőséget körvonalaztak, ahogyan növelni lehetne ezen anyagok mennyiségét stressz körülmények között: 1) hagyományos genetikai módszerekkel és nemesítéssel olyan fajták létrehozása, melyek nagyobb mennyiségben állítják elő ezeket a vegyületeket. 2) géntechnológiai módszerekkel olyan növényeket állítani elő, melyek stressz körülmények közt nagyobb mennyiségben termelik ezeket az anyagokat 3) és végül, mint egy gyors alkalmazási mód: külsőleg alkalmazva ezeket az anyagokat megnövelni a növények stressztoleranciáját (Ashraf és Foolad, 2007).

Egyik ilyen anyag a glicin-betain, mely természetes úton nem halmozódik fel akkora mennyiségben növényekben, hogy kivédje a dehidratáció károsító hatásait (Subbarao és mtsai, 2000). Kukoricában azt találták, ha a leveleket glicin-betainnal permetezték, akkor ez megnövelte a növényben az ozmoprotektív anyagok mennyiségét (prolin, glicin-betain, oldható cukrok és K^+) szárazságstressz során, míg a jól öntözött kontrollban csak a glicin-betain mennyisége nőtt. Továbbá növelte a szárazanyag tartalmat és a termésmennyiséget is (Zhang és mtsai, 2009). Napraforgóban is kimutatták a glicin-betain permetezés védőhatását szárazságstressz ellen (Hussain és mtsai, 2008). Mások azt találták, hogy a levelek glicin-betainos kezelése növelte a fotoszintézist stressz körülmények között a nagyobb sztómakonduktivitáson és a Rubisco nagyobb karboxilációs hatékonyságán keresztül (Sakamoto és Murata, 2002), valamint fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását is vízhiányos állapotban (Ma és mtsai, 2007). Alacsony hőmérséklet ellen is védelmet nyújtott a külsőleg alkalmazott glicin-betain kukoricában és csökkentette a lipidperoxidációt (Chen és mtsai, 2000). Mások kukorica magvakat 100 mg/l glicin-betainnal kezelve azt tapasztalták, hogy alacsony hőmérsékleten a kezelt növények jobban csíráztak, nagyobb volt a friss- és

száraztömegük és az antioxidáns enzimek aktivitása is a kezeletlen növényekhez képest (Farooq és mtsai, 2008b).

Paprikában azt találták, hogy a magvak glicin-betainos kezelése csökkentette a sóstressz károsító hatásait (Khafagi és mtsai, 2009).

A külsőleg alkalmazott prolin növelte a szabad prolin szintet és fokozta a szárazságtűrést petúniában (Yamada és mtsai, 2005).

A poliamin szintézis enzimeinek gátlásával csökkent a búzanövények stressztoleranciája, de ez a hatás külsőleg adagolt PA-kal kivédhető volt (Liu és mtsai, 2004). Spermidinnel való előkezelés szignifikánsan megnövelte az árpa szárazságtűrését (Kubis, 2003), valamint elősegítette a rövid távú sőtoleranciát uborkában (Duan és mtsai, 2008). Yang és mtsai (2007) szerint a jó szárazságtűréshez rizsben általában magasabb szabad spermidin/spermin szint és oldhatatlan kötött putreszcin szint társul. Kukoricamagvakat 0,45-0,6 mM putreszcinbe áztatva 12-18 órán át a növények hidegtűrése fokozódott, megnövelte a gyökér és a hajtás száraztömegét, a hajtásnövekedést a kezeletlen növényekhez képest, valamint az elektrolit kiáramlás is kisebb volt a kezelt növényekben (Cao és mtsai, 2008).

2.3.2. Antioxidánsok és hidrogén-peroxid használata

Különböző módokon külsőleg alkalmazott aszkorbinsav (100 mg/ml) hatását vizsgálták búza növényeken sóstressz során. Azt tapasztalták, hogy a leghatásosabb a gyökéren át felvetetett aszkorbinsav volt, mely növelte a levélben a CAT, SOD, POD aktivitást, az aszkorbinsav szintet, fokozta a fotoszintézist, a kezelt növények jobban növekedtek és kevesebb Na^+ -ot halmoztak fel. Ugyan kevésbé, de hatásos volt az is, ha az aszkorbinsavat a levelekre permetezték vagy a magokat kezelték vele. Azonban azt is megfigyelték, hogy az aszkorbinsav kezelés az eleve sőtoleráns fajtában hatékonyabb volt (Athar és mtsai, 2009). Paradicsom magvakat természetes antioxidánsokkal (aszkorbinsav, β -karotin, lutein, licopin) kezelve azt tapasztalták, hogy vízhiányos körülmények között a kezelt növényeknek nagyobb volt a száraztömege, levélfelülete és jobb volt a fotoszintézise és a vízhasznosítása a kezeletlen növényekhez képest, valamint a β -karotin esetében új fehérjék szintézisét is kimutatták a kezelt növényekben (MacDonald és mtsai, 2009). Aszkorbinsavas áztatás elősegítette a rizs egyenletesebb és gyorsabb csírázását is (Basra és mtsai, 2006). Búza magvak tiolos kezelése (ditiotreitol, tiourea) védelmet nyújtott az 1. és 2. fotokémiai rendszernek szárazságstressz folyamán, valamint fokozta az antioxidáns enzimek működését (Nathawat és mtsai, 2007).

Kukoricanövények hidrogén-peroxidos kezelését követően a lipidperoxidáció és az endogén hidrogén-peroxid szintje megnőtt, míg az ozmotikus stressznek kitett növényekben nem változott vagy csökkent. A glutation és a cisztein mennyisége is nagyobb volt, s az antioxidáns enzimek (GR, CAT, GST, APX) aktivitása is fokozódott (Kellős és mtsai, 2008). Borsó növényekben a hidrogén-peroxidos permetezés csökkentette a paraquat okozta oxidatív stresszt, nem nőtt a lipidperoxidáció szintje és az antioxidáns enzimek gátlása is kisebb volt (Moskova és mtsai, 2009). Hidrogén-peroxiddal előkezelt búza magvak 150 mM NaCl-ot tartalmazó közegen csíráztatva rövidebb idő alatt csíráztak, mint a csak vizes közegen csíráztatott kezeletlen magvak. Ezeknek a növénykének jobb volt a fotoszintetikus kapacitása és a sztómakonduktivitása is. Habár a hajtásokban Na^+ és Cl^- ionok akkumulálódtak, az előkezelt növények szövetei több K^+ -ot, Ca_2^+ -ot, nitrátot és foszfátot tartalmaztak és a K^+/Na^+ arány is nagyobb volt. A kezelés jobb membránstabilitást eredményezett és csökkentette az ionkiáramlást, valamint új stresszproteinek szintézisét is észlelték. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a hidrogén-peroxid aktiválja az antioxidáns enzimeket a magban, melyek a hajtásban is megjelennek és védik a növényt a sóstressz során fellépő oxidatív károsodás ellen. Az új stresszfehérjék megjelenése pedig olyan fiziológiai folyamatokat indíthat be, melyek segítik a növények túlélését stresszkörülmények között (Wahid és mtsai, 2007).

2.3.3. Növekedésszabályozó anyagok használata

Számos növényi hormont vagy hormonszerű anyagot alkalmaztak a stressztolerancia növelésére. Exogén ACC alkalmazása az öregedés késleltetésével megnövelte kukorica növények szárazságtűrését (Todd és mtsai, 2004). ABA hatására nőtt a szója termésmennyisége jó és rossz vízellátottság mellett is. Vízhányos körülmények közt szignifikánsan emelkedett a kezelt növények vízpotenciálja és klorofill tartalma (Zhang és mtsai, 2004). *Cynodon dactylon*-ban az ABA-kezelés növelte a növények relatív víztartalmát és csökkentette az ionkiáramlást és a lipidperoxidációt, valamint növelte a túlélési százalékot. A SOD és CAT aktivitás magasabb volt az ABA-kezelt növényekben stresszkörülmények között, de ez a megemelkedett aktivitás H_2O_2 és NO képződésének gátlására elmaradt (Lu és mtsai, 2009). Alacsony hőmérsékleten uborkában a szénhidrátok mennyisége nagyobb növekedést mutatott 50 és 150 μM ABA kezelés hatására, és a sztahióz-szintáz aktivitás is jobban fokozódott, mint a kezeletlen növényekben (Meng és mtsai, 2008).

A SA kezelés növelte őszi búza szárazságtűrését, s ez megnövekedett kataláz-aktivitással járt együtt (Horváth és mtsai, 2007b). *Cucumis melo*-nál azt tapasztalták, hogy mind SA, mind acetyl-SA fokozta a növények stressztoleranciáját vízhiányos körülmények közt. Ezt a hatást mind a hajtás permetezésével, mind pedig a magvak előkezelésével érték, de a hajtások permetezése hatékonyabb volt (Korkmaz és mtsai, 2007). Búzában NaCl stressz során azt tapasztalták, hogy a magvak SA-as előkezelése növelte a csírázási százalékot, az ozmotikus potenciált, a száraztömeget, a K^+/Na^+ arányt és a fotoszintetikus pigmentek (klorofill-a,b és karotenoidok) mennyiségét (Kaydan és mtsai, 2007). Árpa magok 1 mM SA-előkezelése védelmet nyújtott sóstressz ellen (El-Tayeb, 2005).

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy a gazdasági növények stressztűrőképessége ozmoprotektánsokkal, antioxidáns vegyületekkel, valamint növényi hormonokkal vagy hormonszerű anyagokkal is fokozható, mely a növénytermesztés szempontjából is fontos lehet.

3. Kutatási cél

Csoportunk volt az első, aki kimutatta, hogy a tápoldathoz adagolt 0,5 mM SA védelmet nyújtott fiatal kukoricanövényeknek a hideg ellen, megnövelve néhány antioxidáns enzim aktivitását, valamint gátolva az etilénprodukción (Janda és mtsai, 1999). A SA hatásának mechanizmusa még messze nem tisztázott. Az ehhez kapcsolódó kutatások közül dolgozatomban az alábbi vizsgálatokat ismertetem.

- ❖ Először a tápoldathoz adagolt SA hatásait tanulmányoztuk különféle abiotikus (hideg, szárazság, nehézfém) stresszhatások alatt. Vizsgáltuk a poliaminok, mint stresszvédő anyagok, szintjében bekövetkező változásokat, valamint az etilén prekursorának, az ACC-nek illetve malonil-konjugátumának, a MACC-nek a változásait alacsony hőmérsékleten. A szárazságstresszre bekövetkező hatásokat fotoszintetikus paraméterek és a membránok állapotát jellemző ionkiáramlás mérésével követtük nyomon. A Cd-stressz alatti hatások tanulmányozására vizsgáltuk a Cd felhalmozódását és megoszlását a növényben, az antioxidáns enzimekre gyakorolt hatását, valamint a nehézfém elleni védelemben szerepet játszó fitokelatin-szintáz enzim aktivitásának és a PC₂ szintjének alakulását.
- ❖ A következő lépésben az endogén SA-szint változásait tanulmányoztuk abiotikus stresszhatások alatt fiatal kukoricanövényekben. Mértük a SA és az egyik lehetséges prekuzora, az oHCA mennyiségét egyrészt alacsony hőmérsékleten, másrészt ABA kezelés után. Vizsgáltuk még az endogén SA- és oHCA-szintek alakulását szárazság, só és nehézfém hatására is.
- ❖ A harmadik részben a gyakorlati alkalmazás szempontjából is szóba jöhető szalicilsavas magáztatás és védőhatásának élettani hátterét vizsgáltuk. Ehhez borsó-, illetve kukoricanövényeket használtunk. Mértük, hogyan alakul a magáztatás hatására az endogén SA-szint a fiatal növényekben, nyomon követtük az antioxidáns enzimek működésében, valamint a poliaminok mennyiségében bekövetkező változásokat a különböző növényi részekben nevelési körülmények között, hogy tisztázzuk, milyen folyamatok lehetnek felelősek a megnövekedett stressztoleranciáért. Továbbá néztük a változásokat hideg hatására is kukoricanövényekben, valamint a nehézfémstressz hatásait borsóban és kukoricában is.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A növénynevelés körülményei, növényi anyagok

4.1.1. Tápoldatos kukoricanövények nevelése

A kísérletek nagy részében (exogén SA hatása valamint az endogén SA változása különböző abiotikus stresszek során) tápoldatban, azonos körülmények közt nevelt, azonos korú növényeket használtunk, majd különböző kezeléseket alkalmaztunk. Az előnevelés körülményei a következők voltak:

A kukoricaszemeket (*Zea mays* L., Norma hibrid) 30 percig 0,5%-os Neomagnol oldatban fertőtlenítettük, majd desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírrban csíráztattuk 3 napig 26°C-on. A növényeket főzőpohárban (7/pohár), a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézet fitotronjában neveltük 22/20°C-on 16/8 órás fény-sötét periódus mellett Conviron PGR-15 típusú növénynevelő kamrában (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Canada) 10 napos korig 250 ml módosított Hoagland-tápoldatban, melynek összetétele az 1. táblázatban látható.

1. táblázat. Módosított Hoagland-tápoldat összetétele.

Makroelem összetétel:	Mikroelem összetétel:
0,3125 mM KNO ₃	11,92 μM HBO ₃
0,45 mM Ca(NO ₃) ₂	4,57 μM MnCl ₂ · 4H ₂ O
0,0625 mM KH ₂ PO ₄	0,191 μM ZnSO ₄ · 7H ₂ O
0,125 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,08 μM CuSO ₄ · 5H ₂ O
	0,024 μM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
	15,02 μM FeSO ₄ · 7H ₂ O
	23,04 μM Na ₂ EDTA · 5H ₂ O

A megvilágítás mértéke 340 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD, a relatív páratartalom 75% volt. A tápoldatot kétnaponta cseréltük.

4.1.1.1. Exogén SA hatása hidegstressz során

A kukoricák felét 0,5 mM SA oldattal kezeltük 24 órán keresztül, majd a tápoldatot SA mentesre cseréltük. A SA-kezelt és kezeletlen (kontroll) növények felét 3 napig hidegkezeltek 5 °C-on, majd mintát gyűjtöttünk az analízisekhez és mértük az ionkiáramlást.

4.1.1.2. Exogén SA és a hidegedzés hatása az ACC- és MAC- tartalomra hidegstressz során

A kukoricák felét 0,5 mM SA oldattal kezeltük 24 órán keresztül, majd a tápoldatot SA mentesre cseréltük. A SA-kezelt és kezeletlen (kontroll) növények felét 4 napig 13/11 °C-on hidegedzettük, majd 4 napra 5 °C-ra helyeztük. Naponta szedtünk mintát az analízisekhez.

4.1.1.3. Exogén SA hatása szárazságstressz során

A növények felét 0,5 mM SA oldattal kezeltük 24 órán keresztül, majd tápoldatot cseréltünk. A SA-kezelt és kezeletlen (kontroll) növények felét 15 %-os (w/v) PEG6000-rel kezeltük 3 napig, mellyel szárazságstresszt idéztünk elő. Három napon át naponta mértük a fotoszintézisben bekövetkező változásokat, a 3. napon pedig az ionkiáramlást is.

4.1.1.4. A fitokelatin szintézis enzimeinek vizsgálata

A növények egy részét 0,1 mM kadmium-nitráttal kezeltük, majd 1, 24 és 48 óra múlva mintát szedtünk az enzimaktivitás mérésekhez valamint a Cd-tartalom meghatározásához.

4.1.1.5. Exogén SA hatása kadmiumstressz során

A növények egy részét a Cd kezelést megelőzően 1 napig 0,5 mM SA-val kezeltük (utána SA mentes tápoldatot használtunk), míg a növények egy része a Cd-mal egyidejűleg kapta a SA-t. A kezelést 0,5 mM koncentrációjú Cd-mal végeztük. A 24 órás Cd kezelést követően gyűjtöttünk mintát az analízisekhez illetve a Cd-tartalom meghatározáshoz.

4.1.1.6. In vivo SA-szint változása abszizinsav és hidegkezelés hatására

A növényeket 0,05 illetve 0,1 mM ABA-val kezeltük 1, 2 illetve 3 napig. A növények egy részét a 2. napot követően 1 napra 5 °C-os növénynevelő kamrába helyeztük. A 3 napos kezelés során naponta gyűjtöttünk mintát az analízisekhez, valamint mértük a klorofill tartalmat. A növények egy részét hosszabb ideig 5 °C-on hagytuk, hogy tanulmányozzuk az ABA hatását. Ezekből a növényekből ionkiáramlást mértünk 6 napos hidegkezelést követően.

4.1.1.7. In vivo SA-szint változása szárazság- és sóstressz során

A növények egy részét 11 illetve 21 %-os (w/v) PEG6000-rel valamint 50 és 100 mM NaCl-dal kezeltük két napig, majd visszahelyeztük őket normál tápoldatba 1 hétre, hogy vizsgáljuk a helyreállást. Az analízisekhez a 2 napos kezelés során naponta, valamint az 1 hetes helyreállítás után gyűjtöttünk mintát.

4.1.1.8. In vivo SA-szint változása kadmiumstressz során

A kadmium-kezelés hatásának vizsgálatához a 10 napos növények tápoldatát 0, 10, 25 és 50 μM koncentrációkban $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot tartalmazóra cseréltük. A kezelés 7 napig tartott, mialatt a kontroll és kadmium kezelt növények tápoldatát kétnaponta cseréltük.

4.1.2. SA-magáztatás hatása borsó élettani folyamataira kontroll körülmények között

A vizsgálatokhoz borsót (*Pisum sativum* L. 'Kelvedon') használtunk. A szemeket (100db/100 ml) oldat 1 napig áztattuk, desztillált vízben, 0,1 mM illetve 0,5 mM SA oldatban. Ezt követően a magokat kerti föld, Vegasca és homok 3:1:1 arányú keverékébe ültettük. Az így elültetett borsót 1 hétig neveltük Conviron PGR-15 típusú növény nevelőkamrában (Controlled Environment Ltd. Winnipeg, Canada), 22/20 °C-on 16/8 órás világos/sötét periódus mellett. A megvilágítás mértéke $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, a páratartalom 75 % volt. Egy hét után szedtünk mintát az analízisekhez. A radioaktív kísérletekhez gyűrűben ^3H -mal jelölt SA-t használtunk a magáztatás során (296 kBq/100 ml). A növények egy részét természetes neveltük, majd mértük a növényenkénti magtömeget, illetve magszámot.

4.1.3. SA-magáztatás hatása kukorica élettani folyamataira hidegstressz során

A vizsgálatokhoz kukoricanövényeket (*Zea mays* L., Norma hibrid) használtunk. A szemeket (100db/100 ml) oldat egy napig áztattuk, desztillált vízben, 0,1 mM illetve 0,5 mM SA oldatban. Ezt követően a magokat kerti föld, Vegasca és homok 3:1:1 arányú keverékébe ültettük. Az így elültetett kukoricát egy hétig neveltük Conviron PGR-15 típusú növény nevelőkamrában (Controlled Environment Ltd. Winnipeg, Canada), 22/20 °C-on 16/8 órás világos/sötét periódus mellett. A megvilágítás mértéke $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, a páratartalom 75 % volt. Egy hét után a növények egy részét 5 °C-ra helyeztük, majd 5 nap után szedtünk mintát az analízisekhez.

4.1.4. SA-magáztatás hatása borsó és kukorica élettani folyamataira nehézfémstressz során

A vizsgálatokhoz borsót (*Pisum sativum* L. 'Ran') és kukoricát (*Zea mays* L. 'Norma' hibrid) használtunk. A szemeket 6 órán át áztattuk desztillált vízben illetve 0,5 mM SA oldatban, majd desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírrban csíráztattuk 3 napig 26°C-on. A növényeket főzőpohárban neveltük 22/18°C-on 16/8 órás fény-sötét periódus mellett Conviron PGR-15 típusú növénynevelő kamrában (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Canada) 12 napos korig a 4.1.1 pontban ismertetett módosított Hoagland-tápoldatban. A borsó növények egy része már a nevelés kezdetétől 1, 2 illetve 5 μM Cd-on, míg a kukorica 10, 15 illetve 25 μM Cd-on nőtt. A megvilágítás mértéke $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, a relatív páratartalom 60% volt. A tápoldatokat kétnaponta cseréltük.

4.2. Életképesség mérések

4.2.1. Ionkiáramlás mérése

Kukorica levélből 3 db 5 mm átmérőjű levélkorongot 1,5 ml ultratiszta vizet tartalmazó fiolába helyeztük és 1 órán át ráztuk. Ezután egy Automatic Seed Analyzer berendezéssel (ASA610, Agro Science Inc. USA) mértük az oldat konduktivitását, majd a vizet visszapiptettáztuk a fiolába a levélkorongokra és -80 °C-on fagyasztottuk egy éjszakán át, majd visszaolvastva szobahőmérsékleten újra lemértük a konduktivitását (100 %-osan

roncsolt membrán). A méréshez használt ultratiszta vizet desztillált vízből állítottuk elő Milli-Q 50 (Millipore, USA) típusú berendezés segítségével.

4.2.2. Gyökér életképesség vizsgálat TTC-vel

A TTC, mint redukált tetrazóliumsó, színtelen, vízdékony vegyületéből redukció során vörös színű, lipoidoldékony csapadék (formazán) képződik. Erre a redukcióra csak élő sejtek képesek, így a kialakult vörös szín intenzitásából következtetni lehet a vizsgált növényi rész életképességére.

Az átmosott gyökerekből 0,1 g mintát mértünk ki, melyeket 3 ml 0,6 vegyes %-os TTC oldatba (50 mM foszfát-puffer, pH 7,5) helyeztünk. A mintákat 24 óra elteltével desztillált vízzel leöblítettük, majd 5 ml etanolban 60 °C-on, 30 perc alatt kiextraháltuk a gyökerekből a keletkezett piros színű vegyületet, és ezt követően 485 nm-en fotometráltuk.

4.3. Lipidperoxidáció meghatározása

A lipidperoxidáció meghatározása az MDA-tartalom mérésén alapszik. Az előkészítés során 0,2 g növényi mintát dörzsmozsárban 600 µl 0,1 %-os (w/v) TCA-val eldörzsöltünk, majd 12000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszó 300 µl-éhez 2 ml 0,5 % (w/v) TBA-t tartalmazó 20 %-os (w/v) TCA-t adtunk és az elegyet 90 °C-on 30 percig inkubáltuk. Az MDA-tartalom meghatározása spektrofotometriásan, 532 nm-en történt, a 600 nm-en mért nem specifikus abszorpció figyelembevételével.

A lipidperoxidok koncentrációját az MDA-tartalomból a $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével számoltuk ki, és pmol g⁻¹ friss tömeg adtuk meg (Thomas és mtsai, 2004). A kukorica növények harmadik levél illetve gyökér MDA tartalmának mérését a kadmium stressz első, negyedik és hetedik napján végeztük.

4.4. Klorofilltartalom mérése

A teljes klorofilltartalom meghatározásához SPAD-502 klorofill mérő (Minolta Camera Co., Ltd, Tokyo, Japan) berendezést használtunk.

4.5. Klorofill-fluoreszcencia indukció mérése

A $\Delta F/F_m'$ klorofill-fluoreszcencia indukciós paraméter ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$, ahol az F_m' a maximális, míg az F_s a steady state klorofill-fluoreszcencia szinteket jelölik fény adaptált állapotban) Janda és mtsai (1994) által leírtak szerint PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Németország) fluorométerrel 22°C-on, a növénynevelő kamrában mértük. A mérések a harmadik teljesen kifejlett levélen történtek.

4.6. A fotoszintetikus aktivitás mérése

A fotoszintetikus aktivitás mérése a növények legfiatalabb teljesen kifejlett levelein, nyitott rendszerű LI-6400 típusú infravörös gázanalizátorral (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) történt. Megvilágító fényforrásként a mérőfejhez csatlakoztatható 6400-02 LED lámpát (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA), a hőmérséklet szabályozására a beépített Peltier elemet használtuk. A méréseket szobahőmérsékleten (22 °C) végeztük. A mért víz- és széndioxidmennyiség változásának értékei segítségével a különböző gázcsere paraméterek nettó fotoszintetikus aktivitás (A), gázcserenyílások vezetőképessége (g_s), intercelluláris széndioxid-koncentráció (C_i), transpiráció (E) meghatározása von Caemmerer és Farquhar (1981) módszere szerint történt.

4.7. Antioxidáns enzimek kivonása és aktivitás mérése

Az izolálás során 0,5 g növényi anyagot kvarchomokkal dörzsöltünk el 2,5 ml jéghideg 0,5 mM TRIS pufferben (pH 7,4), 3 mM $MgCl_2$ és 1 mM EDTA jelenlétében dörzsmozsárban. A homogenátumot hűtött centrifugában 20 percig centrifugáltuk 15000 g-vel. A felülúszót Eppendorf csövekbe osztottuk szét.

A glutation-reduktáz aktivitását a friss, míg a további enzimeket a -20°C-on tárolt fagyasztott felülúszóból mértük. Az enzimaktivitásokat fotometriásan határoztuk meg (Shimadzu UV-VIS 160A). Mérésig a mintákat jégen tartottuk, a méréseket pedig szobahőmérsékleten végeztük. Az enzim aktivitásokat 1 g enzim fehérje által 1 perc alatt okozott abszorbancia változásban ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fehérje) adtuk meg.

4.7.1. Kataláz (EC 1.11.1.6)

A kataláz aktivitását 240 nm-en mértük, a hidrogénperoxid fogyását nyomon követve. A reakcióelegy összterfogata 3 ml volt, és 0,44 mM TRIS puffert (pH 7,4) 0,0375% H₂O₂-t és 50 µl növényi mintát tartalmazott (Janda és mtsai, 1999). A reakciót a H₂O₂ hozzáadásával indítottuk el.

4.7.2. Gvajakol-peroxidáz (EC 1. 11.1.7)

A gvajakol oxidációja nyomán bekövetkező abszorbancia növekedést 470 nm-en spektrofotométerrel nyomon követve mértük (Ádám és mtsai, 1995), hidrogén-peroxid oldattal indítva a reakciót. A 3 ml reakcióelegy összetétele a következő volt: 88 mM Na-acetát puffer (pH 5,5), 0,88 mM gvajakol, 0,0375% H₂O₂ és 50 µl növényi minta.

4.7.3. Aszkorbát-peroxidáz (EC 1.11.1.11)

Az aszkorbát-peroxidáz aktivitását a következő összetételű reakcióelegyben mértük: 0,2 M TRIS puffer (pH 7,8), 5,625 mM aszkorbinsav és 0,042% H₂O₂. A reakcióelegy 2,25 ml volt, mely 50 µl mintát tartalmazott, és a reakciót H₂O₂ hozzáadásával indítottuk. Az aszkorbinsav fogyását 290 nm-en követtük nyomon (Janda és mtsai, 1999).

4.7.4. Glutation-reduktáz (EC 1.6.4.2)

A glutation-reduktáz aktivitásának meghatározásakor a 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitro-benzoésav) (DTNB) redukcióját mértük 412 nm-en a Smith és mtsai (1988) által leírtak szerint. A reakcióelegy 1 ml összterfogata 75 mM Na-foszfát puffert (pH 7,5), 0,15 mM dietiléntriamin-pentaecetsavat, 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG. A reakciót 50 µl minta hozzáadásával indítottuk.

4.7.5. Glutation-S-transzferáz (EC 2.5.1.18)

A glutation-S-transzferáz aktivitásának meghatározása 340 nm-en spektrofotometriásan Mannervik és Guthenberg (1981) módszere szerint történt S-2,4-dinitrofenil-glutation képződését nyomon követve. A 2,75 ml reakcióelegy 72,5 mM Na-foszfát puffert (pH 6,5), 2,6 mM GSH-t, 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzént tartalmazott és a reakciót a 100 µl mintával indítottuk.

4.8. Prolintartalom meghatározása

A prolintartalmat Bates és mtsai (1973) módszere alapján határoztuk meg 0,5 g növényi anyagot extraháltunk 10 ml desztillált vízben, majd ebből 2,5 ml-t reagáltattunk 3,4 ml ecetsavas ninhidrin reagenssel (12,5 mg/ml). 5 ml toluollal kiextraháltuk majd 518 nm-en mértük spektrofotometriásan.

4.9. Kadmiumtartalom meghatározása

A kadmiumtartalmat Hegedűs és mtsai (2001) módszere alapján határoztuk meg. 0,1 g száraz elporított növényi részt 2 ml 30%-os hidrogén-peroxid és 2 ml 65 %-os salétromsav elegyével roncsoltuk (1 napig 25 °C-on, majd 20 percig 120 °C-on túlnyomáson forraltuk). A minták fémtartalmát ICAP-61E típusú atomabszorpciós készülékkel határoztuk meg.

4.10. ACC- és MACC-tartalom meghatározása

Az ACC és MACC meghatározását Tari és Nagy (1994) szerint végeztük, melyhez 2 g növényi anyagot dörzsöltünk el 10 ml 80 %-os etanolban, centrifugáltuk 20 percig 12 000 g-vel, majd a felülúszót fiolába öntöttük, a csapadékot pedig újra extraháltuk és centrifugáltuk a fent leírtak szerint. A felülúszót az előzőhöz öntöttük, majd vákuumbepárlóban szárazra pároltuk. Az ACC meghatározása Lizada és Yang (1979) szerint történt etilénné való átalakítás után. Az átalakítás hatékonysága 85 % volt. A reakciót a SA 10^{-10} - 10^{-3} M koncentráció tartományban

nem befolyásolta. A MACC-t sósavas hidrolízist követően mértük. Az MACC-tartalmat a hidrolízis előtt és után mért ACC-tartalom különbsége adja.

Az ACC-ből keletkező etilént gázkromatográfiásan mértük, a mérés paraméterei a következők voltak:

Gázkromatográf típusa: Hewlett-Packard 5890 Series II.

Oszlop típusa: 305 x 0,3 cm rozsdamentes acél, töltet típusa: Alumina F-1 80/100 mesh (Supelco Inc. Bellefonte, Pennsylvania, USA)

Termosztát hőmérséklete: 100 °C

Injektor hőmérséklete: 120 °C

Vivőgáz: He, sebessége: 35 ml/perc

Detektor: lángionizációs (FID)

hőmérséklete: 160 °C

FID H₂ sebessége: 30 ml/perc

FID levegő sebessége: 300 ml/perc

4.11. Poliamintartalom meghatározása

Mintaelőkészítés: 200 mg kukoricalevelet folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 1 ml 0,2 M jéghideg perklórsavval extraháltuk és 20 percig állni hagytuk jégben. Ezt követően 20 percig centrifugáltuk 10000 g-vel és a felülúszó 100 µl-éből származékot képeztünk danzil-kloriddal Smith és Davies (1985) módszerével az alábbiak szerint.

Származékképzés: 100 µl mintához 200 µl telített nátrium-karbonátot és 400 µl acetonban oldott danzil-kloridot (5 mg/ml) adtunk. Összerázás után 60 °C-on sötétben 60 percig inkubáltuk, majd 100 µl 100 mg/ml töménységű prolin oldatot adtunk hozzá, és további 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten sötétben. Ez követően a danzil-származékokat 500 µl toluollal 30 másodpercig extraháltuk, és a szerves fázist vákuum alatt bepároltuk. A maradékot 1 ml 100 % metanolban felvettük 0,2 µm pórusméretű teflon membránszűrőn átszűrtük és analizáltuk.

A folyadékkromatográfiás méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekegységekből állt: W 2690 rendszer, mely tartalmaz egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert; és ehhez egy W474 típusú scanning fluoreszcens detektort csatlakoztattunk. A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA)

segítségével történt. A fent leírt módon származékképzett mintából 4 µl-t injektáltunk a 18 µm szemcseméretű Supelcosil C₁₈ töltettel töltött 20x2,1 mm-es előtét kolonnára, mely után egy 100x2,1 mm analitikai oszlop volt kötve, amelyben Hypersil ODS 5 µm szemcseméretű töltet volt. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk:

A: víz; B: ACN; C: MeOH

Az elválasztás a 2. táblázatban található gradiens programmal történt. Az áramlási sebesség az analízis során 0,5 ml/perc, az oszlophőmérséklet 40 °C volt. A danzil-kloriddal származékképzett poliaminok detektálása fluoreszcens detektorral 340 nm-es gerjesztési és 515 nm-es kisugárzási hullámhosszon történt.

2. táblázat. Poliaminok elválasztásához használt gradiens program.

Idő (perc)	A %	B %	C %
0	56	44	0
13	3	68,5	28,5
17	0	70	30
21	0	70	30
22	56	44	0
34	56	44	0

4.12. Szalicilsav extrakció és mennyiségi analízis

A SA HPLC-s analízisét Meuwly és Métraux (1993) által leírt módszer szerint végeztük, mellyel az alábbi vegyületeket lehet kimutatni: benzoésav, fahéjsav, *orto*-hidroxi-fahéjsav és SA. A 1,5 g növényi mintát folyékony nitrogénben, 0,75 g kvarchomok hozzáadásával dörzsmozsárban eldörzsöltük. A homogenátumot centrifugacsövekbe öntöttük és 2 ml 70 %-os metanolt adtunk hozzá, mely 250 ng *orto*-anizinsavat (*o*-ANI: belső standerként használva) és 25 µg *para*-hidroxi-benzoésavat (*p*-HBA: extrakciós karriereként használva) tartalmazott. Az extraktumot 10000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót félretettük, 2 ml 90%-os metanollal a csapadékot újra extraháltuk, majd utána 10000 g-vel 20 percig cetrifugáltuk. Az így képződött felülúszót az előzőekben félretetthez öntöttük. Ezzel az eljárással a növényben lévő szabad vegyületeket, illetve a kötöttek közül a metanolban oldódókat lehet kinyerni. Az

összegyűjtött felúszókat vákuumbepárlóban vizes fázisig bepároltunk, majd 1 ml 5%-os (w/v) TCA-t mértünk hozzájuk. Vortexelést követően 13000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszókat kétszer 2,5 ml ciklohexán: etilacetát = 1:1 (v/v) elegyével particionáltuk. A felső szerves fázis a szabad fenolos vegyületeket, míg az alsó vizes fázis a metanolban oldódó kötött fenolos vegyületeket tartalmazta. A felső szerves fázist Pasteur-pipettával üvegfialákba helyeztük át és mérésig -20°C -on tároltuk. A kötött fenolos vegyületek savas hidrolízise a következőképpen történt. Az alsó vizes fázishoz 250 μl 0,1 mg/ml *p*-HBA-t, 5 μl 0,05 mg/ml *o*-ANI-t és 1,3 ml 8N HCl-t adtunk és 80°C -on 60 percig inkubáltuk. Majd a fent leírt módon kétszer particionáltuk, és a felső szerves fázisokat felhasználásig -20°C -on tároltuk.

A HPLC analízis előtt a képződött mintákat vákuumbepárlóban szárazra pároltuk, majd az „A” szolvens 900 μl -ében visszaoldottuk. A folyadékkromatográfiás méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekből állt: W2690 pumpa rendszer, (mely tartalmazott egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert) UV/VIS diódasoros detektor (W996) és egy W474 scanning fluoreszcens detektor. A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A mintából 40 μl -t injektáltunk az 5 μm szemcseméretű, 150x4,6 mm méretű Supelcosil ABZ-Plus analitikai oszlopra. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk: A: 25 mM Na-acetát (pH 2,6), 15% ACN; B: 100% ACN. Az elválasztás a 3. táblázatban található gradiens programmal történt. Az oszlophőmérséklet az analízis során 40°C volt.

Detektáláshoz a diódasoros UV/VIS detektorral 230 és 300 nm között teljes spektrumot vettünk fel, melynek egyik célja az, hogy minden vegyületet a maximális abszorbanciánál tudjunk kiértékelni, másrészt a jellemző UV spektrum alapján is lehet azonosítani a csúcsot a retenció idő mellett (benzoesav, *orto*-hidroxi-fahéjsav, SA és *transz*-fahéjsav). A vizsgált vegyületek közül az *orto*-hidroxi-fahéjsav és a SA fluoreszkál is. Detektálásuk 317 nm gerjesztési és 436 nm kisugárzási (oHCA), illetve 305 nm gerjesztési és 407 nm kisugárzási hullámhosszon (SA) történt. Az izotóppal jelölt kísérletekben a radioaktív csúcsokat a HPLC rendszerhez csatlakoztatott 150TR típusú folyadék szcintillációs detektorral (Canberra Packard, Meriden, CT, USA) detektáltuk.

3. táblázat. SA és oHCA elválasztásához használt gradiens program.

	Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A %	B %
1	0	1	100	0
2	1	1	100	0
3	3	1	95	5
4	5	1	95	5
5	18	1	45	55
6	20	1	0	100
7	20,1	1,4	0	100
8	25	1	0	100
9	27	1	100	0
10	31	1	100	0

4.12. γ -Glutamil-cisztein-szintáz enzim aktivitásának mérése

0,3 g levelet, illetve 0,5 g gyökeret 1,5 ml 0,1 M TRIS-HCl pufferben (pH 8,0), mely 5 mM EDTA-t és 10 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazott eldörzsöltünk, majd 10 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszó 650 μ l-ét 5 ml Sephadex G-25 gélen sótalanítottuk. Az enzimaktivitás méréséhez a következő reakcióelegyet mértük össze: 50 μ l 1000 mM HEPES-NaOH puffer (pH 8,0), mely 400 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazott, 50 μ l 300 mM Na-glutamát, 50 μ l 16 mM cisztein és 8 mM DTE 1:1 arányú keveréke, 50 μ l 70 mM ATP és 50 μ l víz. A reakcióelegyet 45 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakcióelegy 50 μ l-ét származékképeztük monobromo-bimánnal (10 μ l 15 mM monobromo-bimán, 200 μ l 50 mM CHES (pH 9,0), 50 μ l reakcióelegy, 15 perc szobahőmérsékleten sötétben). A reakciót 700 μ l 5 %-os ecetsav hozzáadásával állítottuk le. A 0 perces mintához az inkubálás előtt kivettünk 50 μ l-t a reakcióelegyből és származékképeztük. A kiindulási és keletkezett γ -glutamil-cisztein mennyiségét a 4.14. pontban ismertetett HPLC-s módszerrel határoztuk meg. Az enzimaktivitást a kiindulási és a keletkezett γ -glutamil-cisztein mennyiségének különbsége alapján számoltuk.

4.13. Glutation-szintáz enzim aktivitásának mérése

0,3 g levelet illetve 0,5 g gyökeret 1,5 ml 0,1 M TRIS-HCl pufferben (pH 8.0), mely 5 mM EDTÁ-t és 10 mM MgCl₂-ot tartalmazott eldörzsöltünk, majd 10 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszó 650 µl-ét 5 ml Sephadex G-25 gélen sótalanítottuk.

Az enzimaktivitás méréséhez a következő reakcióelegyet mértük össze: A reakcióelegyet 60 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakcióelegy 25 µl-ét származékképeztük monobromo-bimánnal (20 µl 15 mM monobromo-bimán, 200 µl 50 mM CHES (pH 9,0), 25 µl reakcióelegy, 15 perc szobahőmérsékleten sötétben). A reakciót 1000 µl 5 %-os ecetsav hozzáadásával állítottuk le. A 0 perces mintához az inkubálás előtt kivettünk 25 µl-t a reakcióelegyből és származékképeztük. A kiindulási és keletkezett glutation mennyiségét a 4.14. pontban ismertetett HPLC-s módszerrel határoztuk meg. Az enzimaktivitást a kiindulási és a keletkezett glutation mennyiségének különbsége alapján számoltuk.

4.14. Glutation és γ-glutamil-cisztein tartalom HPLC-s mérése

A tiol vegyületek meghatározása Kocsy és mtsai (2004) módszere alapján történt. A folyadékkromatográfiás méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekből állt: W2690 pumparendszer, (mely tartalmazott egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert) és egy W474 scanning fluoreszcens detektor. A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt.

A mintákból 20 µl-t injektáltunk a 10 µm szemcseméretű, 250x4 mm méretű BST Rutin 10 C18 BD oszlopra. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk:

A: 90 % víz, 10 % MeOH, 0,25 % ecetsav (pH 3,9)

B: 90 % MeOH, 10 % víz, 0,25 % ecetsav.

Az elválasztás a táblázatban található gradiens programmal történt. Az áramlási sebesség az analízis során 1,5 ml/perc, az oszlophőmérséklet 30°C volt.

A származékképzett minták detektálása fluoreszcens detektorral 380 nm-es gerjesztési és 480 nm-es kisugárzási hullámhosszon történt.

4. táblázat. Tiolok elválasztásához használt gradiens program.

	Idő (perc)	A %	B %
1	0	100	0
2	10	92	8
3	15	86	14
4	17,5	0	100
5	25,5	0	100
6	26,5	100	0
7	31	100	0

4.15. Fitokelatin-szintáz enzim aktivitásának mérése és fitokelatinok mennyiségi meghatározása

A 750 mg növényi mintát kvarchomokkal dörzsmozsárban 750 µl 50 mM TRIS (pH 8,0) pufferrel, mely 10 mM β-merkaptóetanolt és 14% (v/v) glicerolt tartalmazott, eldörzsöltük. Eppendorf centrifugában 13000 g-vel 10 percig centrifugáltuk a homogenizátumot, az aktivitásméréshez a felülúszót használtuk. A fitokelatin-szintáz enzim aktivitását Chen és mtsai (1997) által leírt módszerrel végeztük. A 300 µl végtérfogatú reakcióelegy összetétele a következő volt: 200 mM TRIS (pH 8,0), 10 mM β-merkaptóetanolt, 10 mM GSH, 0,5 mM Cd(NO₃)₂ és 200 µl növényi minta. A reakciót a növényi minta hozzáadásával indítottuk és 60 percig 35°C-on inkubáltuk. A reakció leállításához 30µl 50%-os 5-szulfosalicilsavat használtunk, majd 10 percig jégen inkubáltuk. A kicsapódott fehérjéket 13000 g-vel történt 5 perc centrifugálással távolítottuk el, és a felülúszót használtuk a HPLC analízishez.

A folyadékkromatográfiás méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekből állt: W2690 pumparendszer, (mely tartalmazott egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert), egy W 501 pumpa (a származékképzéshez) és egy diódasoros UV/VIS detektor (W996). A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A mintából 100 µl-t injektáltunk a fordított fázisú, 5 µm szemcseméretű, 100x2,1 mm méretű Hypersil ODS analitikai oszlopra. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk: A: víz + 0,1% TFA; B: víz, 20% ACN + 0,1% TFA

Az elválasztás az 5. táblázatban található gradiens programmal történt.

5. táblázat. Fitokelatinok elválasztásához használt gradiens program.

	Idő (perc)	A %	B %
1	0	100	0
2	2,5	75	25
3	17,5	0	100
4	18	0	100
5	19	100	0
6	25	100	0

Az áramlási sebesség az analízis során 0,5 ml/perc, az oszlophőmérséklet 25°C, a mintatér hőmérséklete 6°C volt.

A fitokelatinok mennyiségi meghatározása „post-column” származékképzéssel történt, a következő összetételű Ellman-reagenssel: 50 mM Na-foszfát puffer (pH 8,0), 10% ACN és 74,5 µM DTNB. A reagens áramlási sebessége 1,5 ml/perc volt. A reagens és a minta egy 20 cm hosszú és 1 mm átmérőjű tefloncsőben keveredett. A származékképzés után az elegy abszorbanciáját 410 nm-en mértük UV/VIS detektorral. A fitokelatinok (PC₂) koncentrációját a GSH-ra felvett kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

4.16. Statisztikai analízis

Az eredmények 10 ismétlés átlagai a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós mérések és a klorofilltartalom esetében, 5 ismétlés átlagai az MDA-tartalom meghatározása, és a HPLC-s analízisek során, 3–5 mérés átlagai az enzimaktivitási adatok, illetve a GC analízis eredményei. Mivel az általunk vizsgált paramétereket az öregedési folyamatok is befolyásolhatják (Prochazkova és mtsai, 2001), a paraméterek változásait az azonos napos kontroll növényekben mért értékekhez hasonlítottuk. A szignifikancia vizsgálatához Student-féle kétmintás t-próbát használtunk.

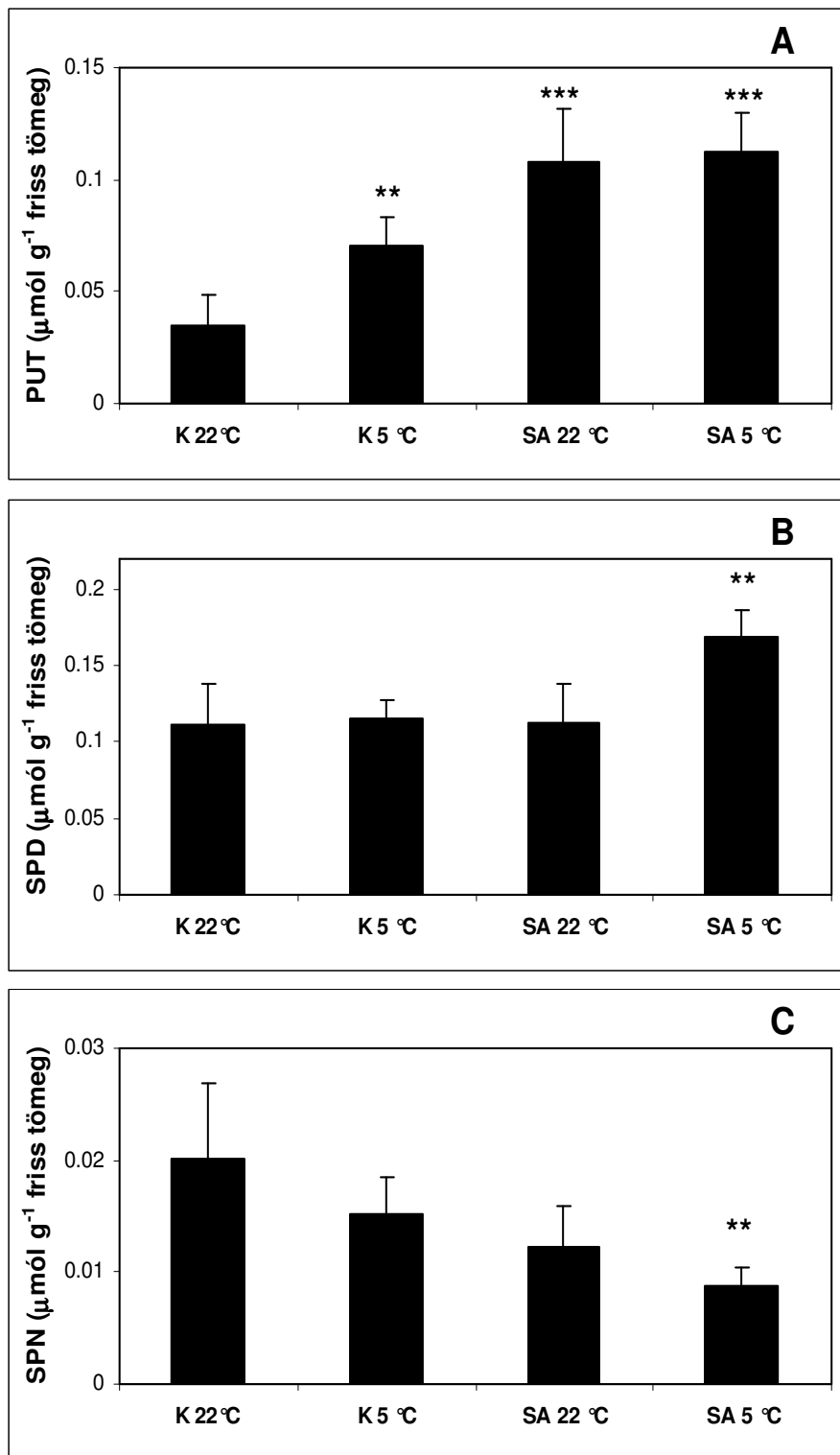
5. Eredmények

5.1. Exogén szalicilsav hatása különböző abiotikus stresszhatások során

A szalicilsav szerepét először a biotikus stressztolerancia jelátviteli folyamatában bizonyították, de az abiotikus stresszfolyamatokban is jelentős szerepet játszik. Elsőként mutattuk ki, hogy 0,5 mM SA védelmet nyújt fiatal kukorica növényeknek a hideg károsító hatásával szemben (Janda és mtsai, 1999), s ezek után kíváncsiak voltunk rá, hogy egyrészt ennek a hatásnak milyen élettani folyamatok vannak a hátterében, másrészt, hogy egyéb abiotikus stresszek ellen is véd-e.

5.1.1. Poliaminok mennyiségének változása szalicilsav előkezelés hatására hidegstressz folyamán

A növénynevelés és a kezelések leírása a 4.1.1.1. pontban található. Az 1 napos 0,5 mM-os SA-kezelés után, majd az ezt követő 3 napos hidegkezelés után mintát gyűjtöttünk a kezelt és kezeletlen kukorica növények leveleiből az analízishez. Az eredmények a 3. ábrán találhatóak. A putreszcinszint 1 napos szalicilsav kezelés hatására 22/20 °C-on kb. háromszorosára nőtt, amely ezen a szinten maradt a 3 napig tartó 5 °C-os hidegkezelés után is. A hidegkezelést követően a szalicilsavval nem kezelt növényeknél kb. kétszeres növekedést tapasztaltunk. A spermidintartalom szalicilsavkezelés hatására nem változott a növényekben a kontrollhoz viszonyítva 22/20 °C-on. A 3 napig tartó, 5 °C-os hidegkezelés során viszont 50 %-kal növekedett a spermidinszint kukoricában. A spermintartalom a putreszcinhez és a spermidinhez képest jóval alacsonyabb a növényekben. A spermin tartalmában a szalicilsav kezelés jelentős változást nem idézett elő a kontrollhoz képest. Viszont hidegkezelést követően a sperminszint felére csökkent a kontrollhoz viszonyítva. De, ha az 5 °C-on lévő spermintartalmat a 24 órás SA-kezelés során kialakult spermintartalommal hasonlítjuk össze, akkor ez esetben szignifikáns különbséget nem tapasztalhatunk. A kontroll növényeket ért hidegstresszt követően sem volt változás a sperminszint tekintetében.



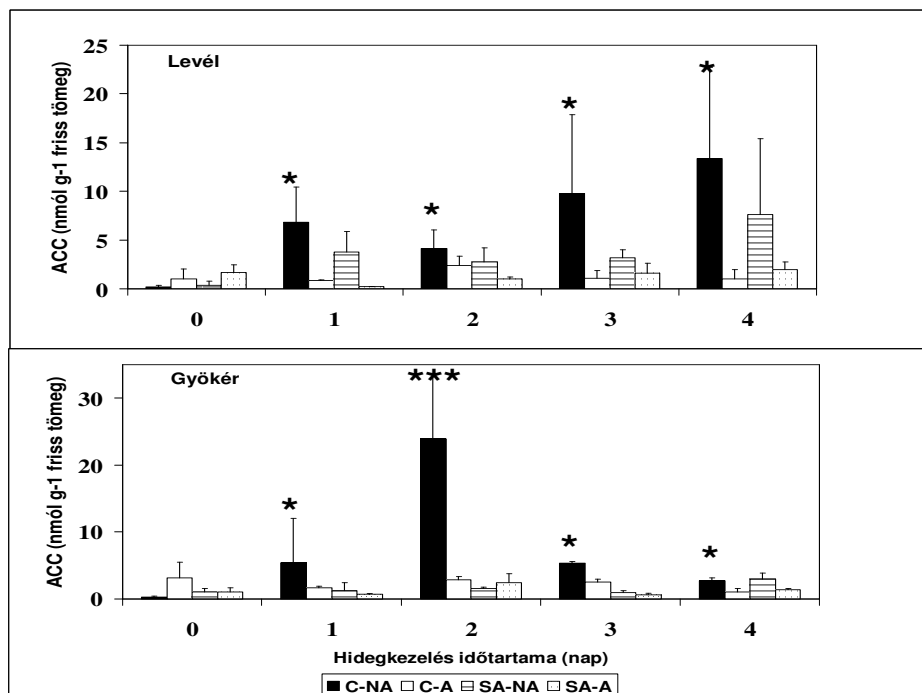
3. ábra. Szalicilsavval kezelt (SA) és kontroll (K) kukoricanövények levelének putreszcin (A), spermidin (B) és spermin (C) tartalma 1 napos szalicilsav kezelés (22°C), majd az ezt követő 3 napos hidegkezelés (5°C) után. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.2. ACC és MACC mennyiségének változása szalicilsav előkezelés hatására hidegstressz során

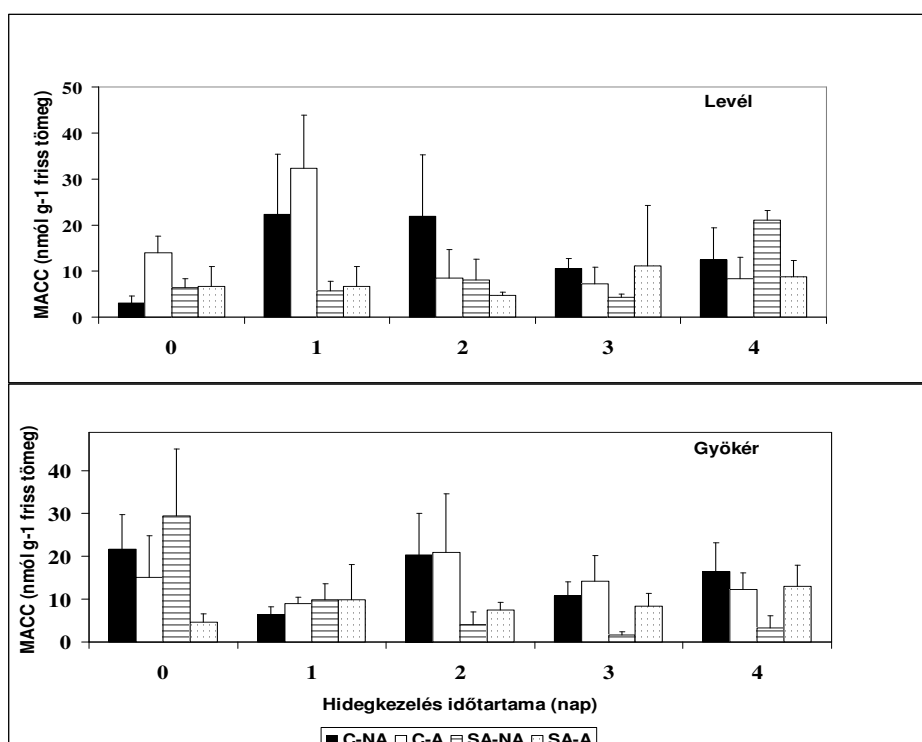
A növénynevelés és a kezelések leírása a 4.1.1.2. pontban található. Az edzetlen kontroll növények leveleiben az ACC koncentráció nagymértékben emelkedett hidegstressz alatt (4. ábra). Ez az emelkedés kevésbé volt megfigyelhető a szalicilsavval előkezelt növényekben. Átlagban (1-4 napig hidegkezelt növények) a szalicilsav előkezelt növények ACC-tartalma 53%-a volt a kontroll növényekének. A 4 napig 11/13°C-on edzett növények levelének ACC-tartalmában nem volt szignifikáns változás a 4 napos 5 °C-os hidegkezelés folyamán sem a kontroll, sem a szalicilsav-előkezelt kukoricákban.

A gyökerek ACC-tartalmát mind az edzés, mind a szalicilsav előkezelés kismértékben megnövelte (4. ábra). A kontroll növények ACC-szintje az 5°C-os hidegkezelés első két napján nagyfokú emelkedést mutatott, majd ezt követően csökkent, de még mindig magasabb szinten maradt, mint a hideghatás előtt. Az edzett vagy szalicilsavval előkezelt növények gyökerében az 5°C-os hideg négy napja alatt nem változott szignifikánsan az ACC mennyisége. Látható, hogy a szalicilsav megakadályozta az ACC-felhalmozódást alacsony hőmérsékleten az edzetlen növényekben. Mivel a gyökérmegnyúlás nagyon érzékeny etilénre, ezért az ACC-szint csökkentése egy fontos tényező a gyökerek hideghatás utáni növekedésének szempontjából.

A levelek MACC-tartalma a hidegkezelés során megemelkedett (5. ábra), de a hidegedzés hatására is ugyanezt tapasztaltuk. SA hatására csak a nem edzett növények levelében mértünk emelkedést, de azt is csak 4 nap hideg után. A levelekkel ellentétben a gyökérben csökkent az MACC-tartalom a hidegstressz során. Ez a SA-val kezelt és nem edzett növényekben még kifejezettebben mutatkozott meg.



4. ábra. Az ACC-tartalom változása fiatal kukoricanövények levelében és gyökerében hidegkezelés (5°C) során hidegedzést és szalicilsav kezelést követően (C-NA: kontroll, nem edzett; C-A: kontroll, edzett; SA-NA: 0,5 mM szalicilsavval kezelt (1 nap az 5°C-os hideget megelőzően) nem edzett; SA-A: 0,5 mM szalicilsavval kezelt, edzett). *: szignifikáns $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

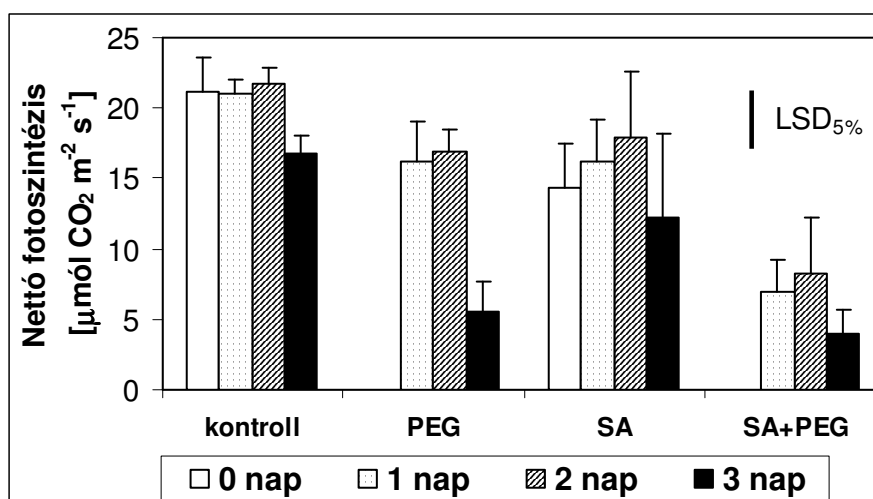


5. ábra. Az MACC-tartalom változása fiatal kukoricanövények levelében és gyökerében hidegkezelés (5°C) során hidegedzést és szalicilsav kezelést követően (C-NA: kontroll, nem edzett; C-A: kontroll, edzett; SA-NA: 0,5 mM szalicilsavval kezelt (1 nap az 5°C-os hideget megelőzően) nem edzett; SA-A: 0,5 mM szalicilsavval kezelt, edzett).

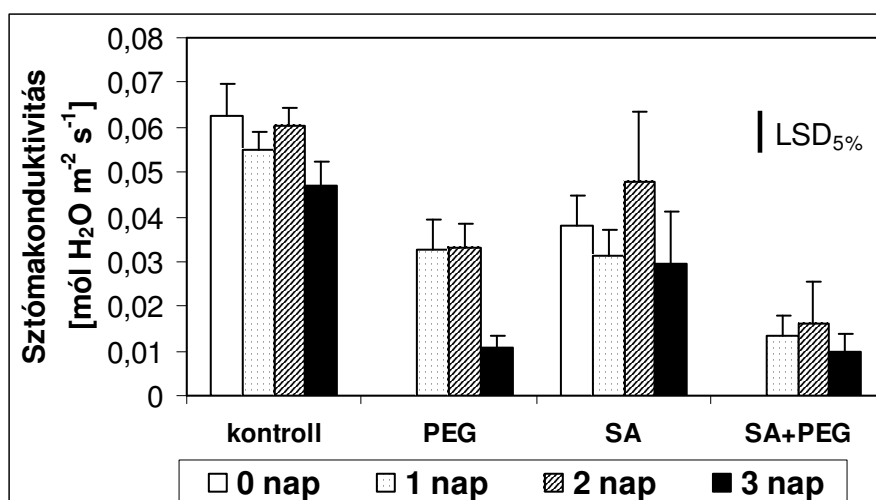
5.1.3. Exogén SA hatása ozmotikusstressz folyamán

A hideg után áttértünk a szárazságstressz vizsgálatára, melyhez szintén tápoldatban nevelt fiatal kukoricanövényeket használtunk. A szárazságstresszt a tápoldathoz adagolt PEG-gel idéztük elő. A növénynevelés és a kezelések leírása a 4.1.1.3. pontban található.

Fotoszintézis: A nettó fotoszintézis aktivitását és a sztóma konduktivitását a három napos PEG-kezelés alatt minden nap mértük. A szalicilsav és a PEG külön-külön kis mértékű csökkenést okozott a nettó fotoszintézisben és a sztómakonduktivitásban, de együtt való alkalmazásuk drasztikus hatást eredményezett (6. és 7. ábra). A kukorica külső morfológiai jegyeit tekintve a szalicilsavval és PEG-gel külön-külön kezelt növényeknél és a kontrollnál – a PEG-kezeléstől eltelt 24 órát figyelembe véve – a növények levelein még változás nem volt megfigyelhető, ugyanakkor a fotoszintézisükben és a sztóma konduktivitásukban már volt különbség. A szalicilsavval és PEG-gel egyaránt kezelt kukoricák leveleinek a széle már besodródott kétoldalt. A PEG-es kezelést követő második napon ez utóbbi növények első három levelének a vége sárgulni kezdett. PEG-gel, illetve a csak szalicilsavval kezelt növények továbbra sem változtak morfológiájukat tekintve a kontrollhoz képest, csak növekedésük lassult le. A kukoricánál alkalmazott 0,5 mM szalicilsav-oldattal való kezelés nem védett a 15 % PEG-gel előidézett szárazságstressz ellen (22/20 °C).

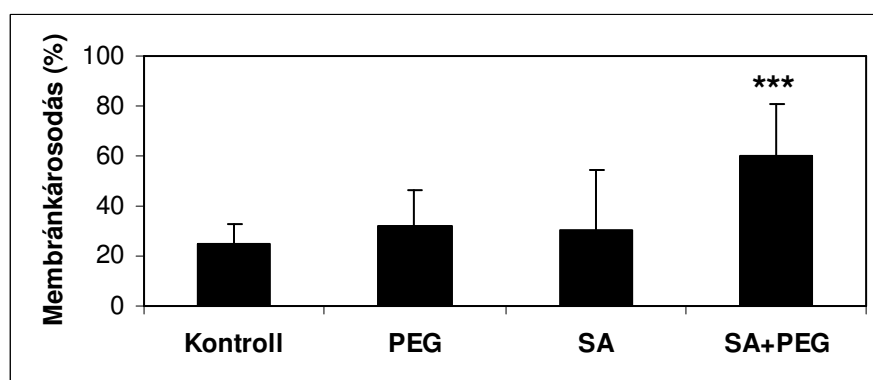


6. ábra. Tápoldatban nevelt, 2 hetes kukorica nettó fotoszintézise 1 napig tartó 0,5 mM szalicilsavval kezelt (SA) és kezeletlen (K) növényeknél 22/20 °C-on, 16/8 h fény/sötét periódussal, és az ezt követő 3 napos szárazságstressz során. Az adatok 5 mérés átlagát mutatják. (PEG: polietilén-glikol, 0. nap: PEG-kezelést megelőző, 24 órás szalicilsav oldattal való kezelés.)



7. ábra. Tápoldatban nevelt, 2 hetes kukorica sztómakonduktivitása 1 napig tartó 0,5 mM szalicilsavval kezelt (SA) és kezeletlen (K) növényeknél 22/20 °C-on, 16/8 h fény/sötét periódussal, és az ezt követő 3 napos szárazságstressz során. Az adatok öt mérés átlagát mutatják. (PEG: polietilén-glikol, 0. nap: PEG-kezelést megelőző, 24 órás szalicilsav oldattal való kezelés.)

Ionkiáramlás. Három napos PEG-kezelés után mértük az ionkiáramlást frissen szedett növényi mintákból. Az ionkiáramlás mértéke a szalicilsavval, illetve PEG-gel kezelt kukoricáknál szignifikánsan nem volt nagyobb a kontrollhoz viszonyítva (8. ábra), viszont a SA-val és PEG-gel párhuzamosan kezelt növényeknél nagyobb mértékű membránkárosodás volt megfigyelhető.



8. ábra. Membránkárosodás mértéke kukoricanövények esetében szárazságstressz után frissen szedett növényi mintából, és -80 °C-os fagyasztást követően. (K: kontroll, SA: szalicilsav, PEG: polietilén-glikol). ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest (n=5).

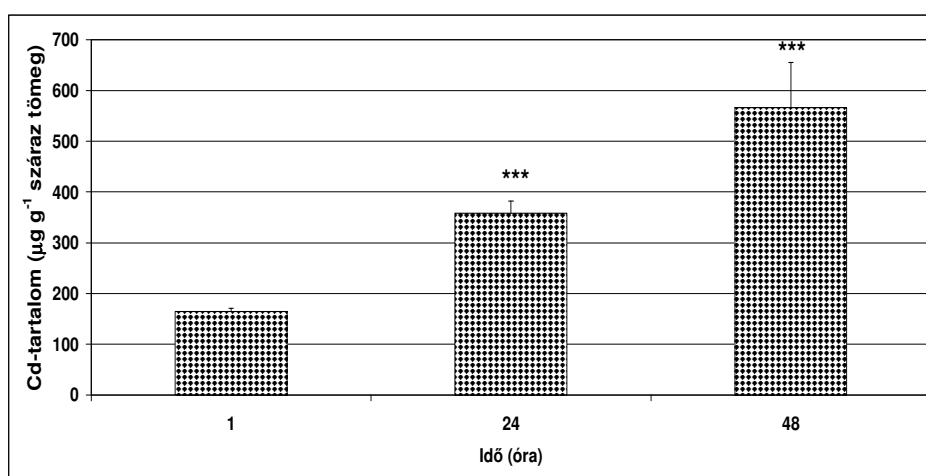
A kontrollhoz képest a szalicilsavas, illetve a PEG-es kezelés nem okozott változást a membránok szerkezetében. A membránkárosodás csak azoknál a növényeknél volt kiemelkedő, amelyeket szalicilsavval és PEG-gel egyaránt kezeltünk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szalicilsav nemcsak, hogy nem védett, hanem szinergista gátló hatást fejtett ki a PEG-gel együtt.

5.1.4. Szalicilsav előkezelés hatása Cd-stressz folyamán

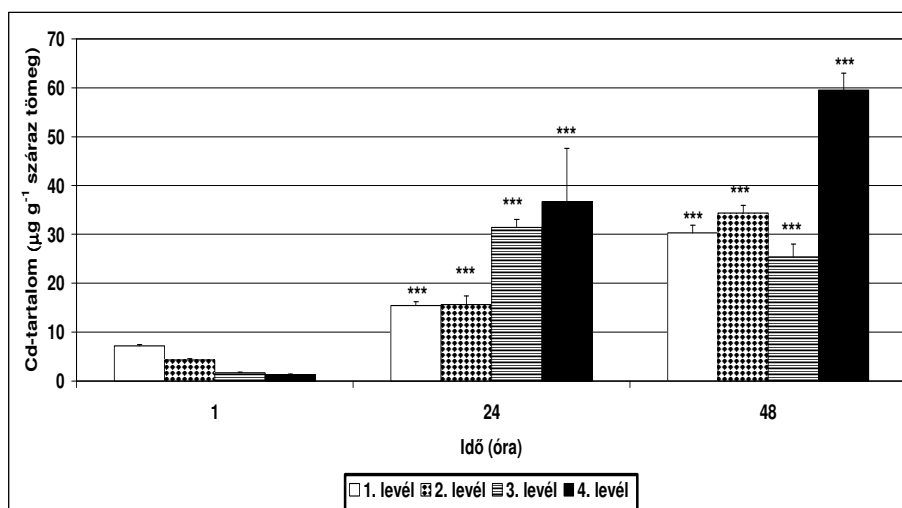
Miután azt tapasztaltuk, hogy ugyan hideg ellen a tápoldathoz adagolt SA védett, de szárazságstressz alatt fokozta inkább annak károsító hatását, kíváncsiak voltunk, hogy Cd-stressz során milyen hatást fejt ki. Első lépésben a fitokelatinok, mint a védekezésben szerepet játszó molekulák, szintézisét néztük 0,1 mM Cd hatására.

5.1.4.1. Fitokelatin-szintáz enzim vizsgálata

A kísérletekhez kéthetes, tápoldatban nevelt kukoricanövényeket használtunk (nevelési körülmények 4.1.1.4. rész). A Cd-ot a tápoldathoz adtuk, majd a kezelés kezdetét követően 1, 24, illetve 48 óra múlva szedtünk mintát az analízisekhez. A Cd mennyisége folyamatosan emelkedett a 2 nap során a gyökerekben (9. ábra). A levelekben is már kimutatható volt 1 óra múltán (10. ábra), de ekkor még főleg az idősebb levelekben akkumulálódott. 24, illetve 48 óra elteltével azonban főleg a fiatalabb levelek Cd-tartalma emelkedett meg jelentősen.



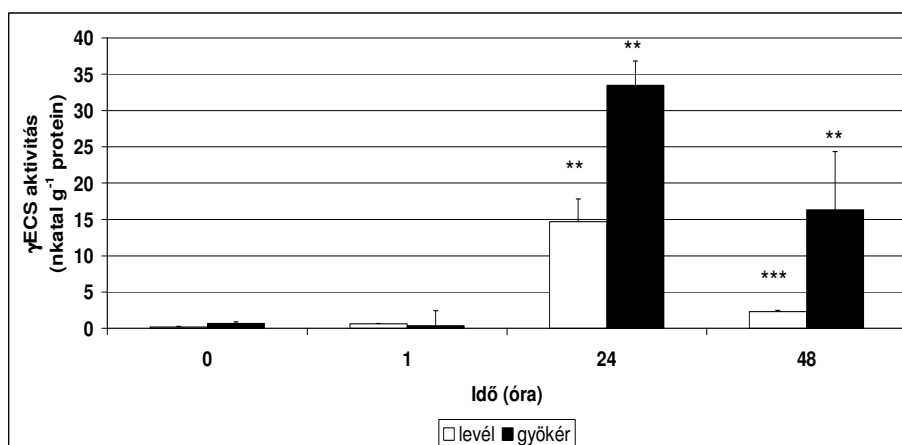
9. ábra. 0,1 mM Cd felvétele 2 hetes tápoldatban nevelt kukoricanövények gyökerében. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).



10. ábra. 0,1 mM Cd felvétele 2 hetes tápoldatban nevelt kukoricanövények levelében. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

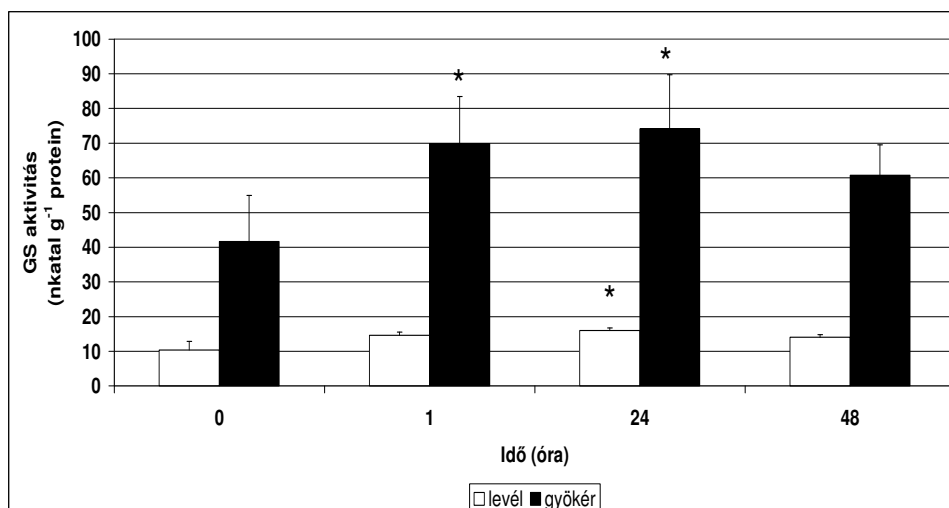
A továbbiakban a 3. és 4. levelet használtuk a PC szintézisében szerepet játszó enzimek, a γ -glutamil-cisztein-szintáz (γ ECS), a glutation-szintáz (GS) és a fitokelatin-szintáz (PCS) aktivitásának és az *in vivo* PC2-szint meghatározásához.

A Cd-kezelést megelőzően a γ ECS aktivitása kicsi volt mind a levelekben, mind a gyökerekben és ez az 1 órás Cd-kezelés után sem változott (11. ábra). 24 óra után azonban a levelekben kb. tizenötszörösére, míg a gyökerekben kb. harmincszorosára emelkedett az enzim aktivitása, de 48 óra után a levelekben az 1 napos értékhez képest kb. az ötödére, míg gyökerekben kb. a felére esett vissza.



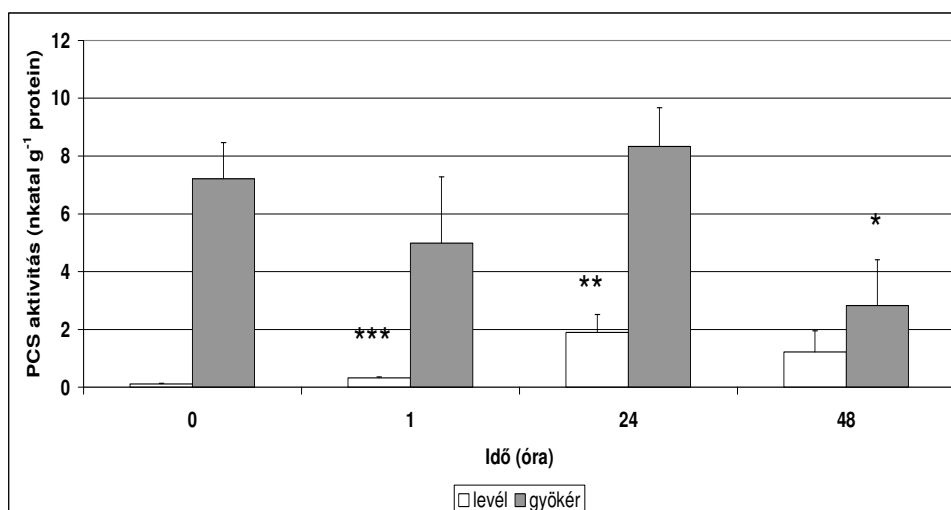
11. ábra. γ -glutamil-cisztein-szintáz aktivitásának változása kukoricanövényekben 0,1 mM Cd kezelést követően. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A GS aktivitása levelekben nem változott a Cd hatására, míg a gyökerekben már 1 óra után kismértékben megemelkedett (12. ábra) és ezen a szinten is maradt a 2 nap folyamán. Összehasonlítva a γ ECS enzimmel, a GS aktivitása már a kontroll növényekben sokkal magasabb volt, így ez a kismértékű emelkedés is sokkal nagyobb aktivitást eredményezett, mint a γ ECS-ben bekövetkező nagy változás.

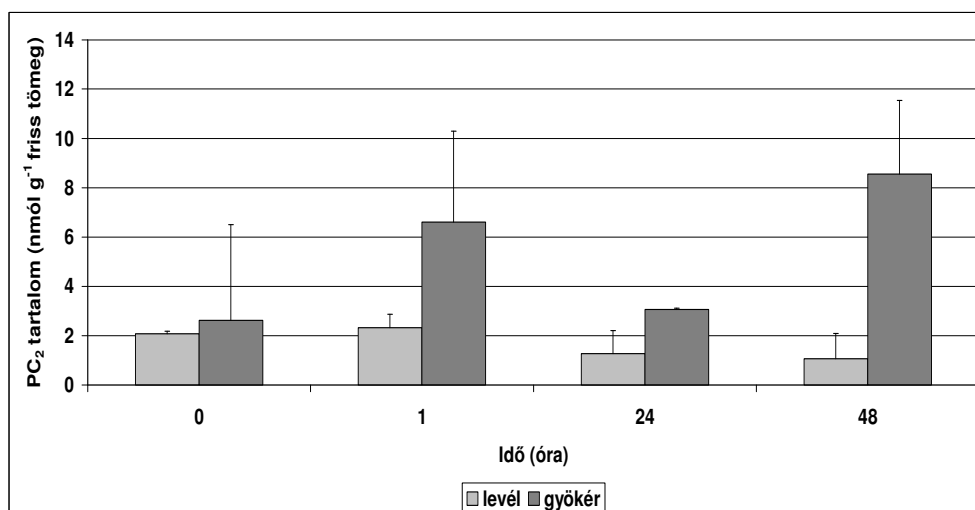


12. ábra. Glutation-szintáz aktivitásának változása kukoricanövényekben 0,1 mM Cd kezelést követően. *: szignifikáns $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A PCS aktivitása a gyökerekben gyakorlatilag nem változott a Cd-kezelés 24 órája alatt, de 48 óra elteltével kismértékű csökkenést tapasztaltunk (13. ábra). A levelekben gyakorlatilag nem volt mérhető aktivitás a Cd-kezelést megelőzően, de már 1 óra elteltével megnőtt az enzim aktivitása és ez 24 óra után még kifejezettebb volt (13. ábra). 48 óra után itt is csökkenést tapasztaltunk. Az *in vivo* PC₂-szint a levélben nem változott, és a gyökerekben sem volt szignifikáns az emelkedés (14. ábra).



13. ábra. Fitokelatin-szintáz aktivitásának változása kukoricanövényekben 0,1 mM Cd-kezelést követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten a kontrollhoz képest (n=5).

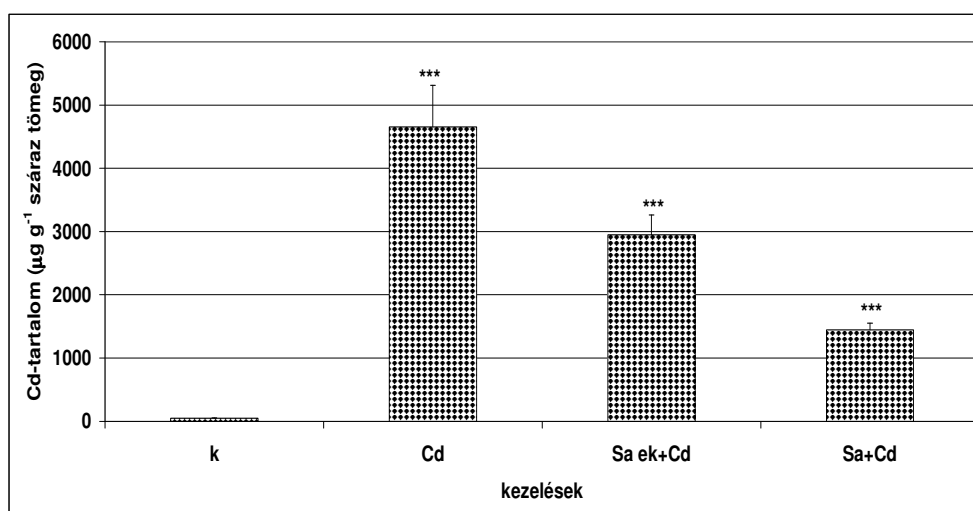


14. ábra. Fitokelatinok mennyiségének változása kukoricanövényekben 0,1 mM Cd-kezelést követően.

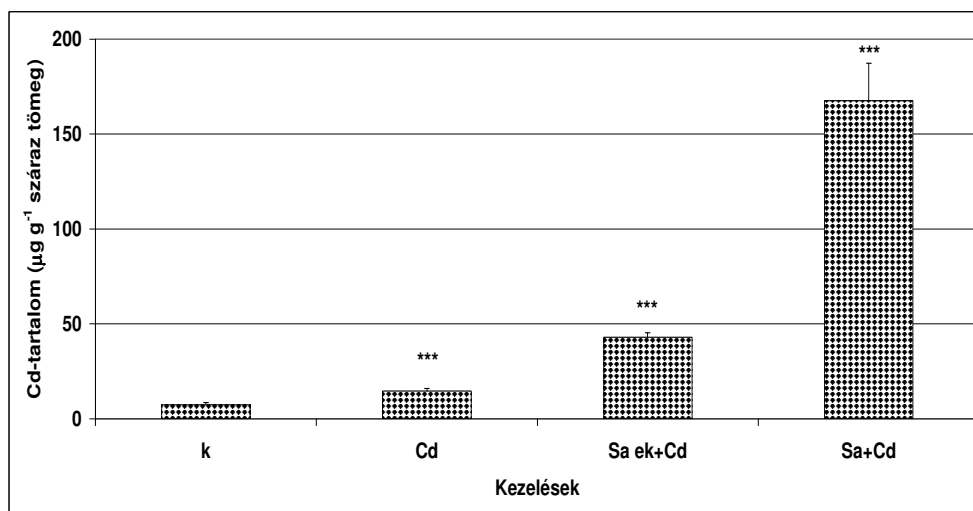
5.1.4.2. Exogén SA hatása kadmiumstressz során

Mindezek után a SA hatását vizsgáltuk Cd-kezelés alatt. A kísérletekhez továbbra is kéthetes, tápoldatban nevelt kukoricanövényeket használtunk. A növények egy részét a Cd-kezelést megelőzően 1 napig 0,5 mM SA-val kezeltük (SA ek), míg a növények egy része a Cd-mal egyidejűleg kapta a SA-t (SA). A kezelést 0,5 mM Cd-mal végeztük (ld.: 4.1.1.5. pont). Első lépésben a Cd-felvételt vizsgáltuk 24 órát követően. A csak Cd-mal kezelt növények esetében nagymértékű Cd felhalmozódást tapasztaltunk a gyökerekben, az SA-előkezelés ezt mérsékelte és ha a növény a Cd-mal együtt kapta a SA-t, akkor még kevesebb

Cd jutott a gyökérbe (15. ábra). A levelekben azonban pont fordított volt a helyzet: a SA előkezelt növényekben már több Cd halmozódott fel, mint a csak Cd-mal kezeltben, de a legnagyobb mennyiséget a SA-val és Cd-mal együtt kezelt növények levelei halmozták fel (16. ábra). A gyökerekben felhalmozott Cd mennyisége azonban jóval nagyobb volt (kb. 25-szörös), mint a levélben.

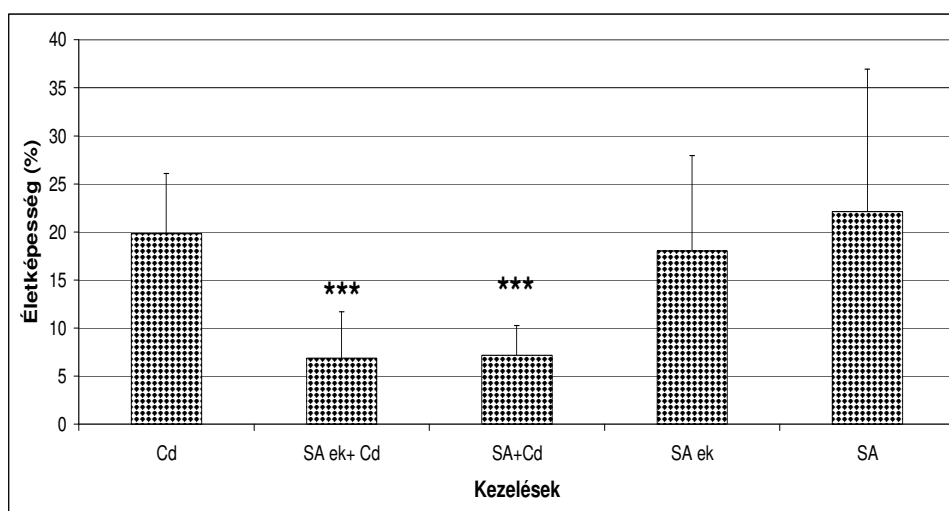


15. ábra. Szalicilsavval kezelt kukoricanövények gyökerének Cd tartalma 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest (n=10).



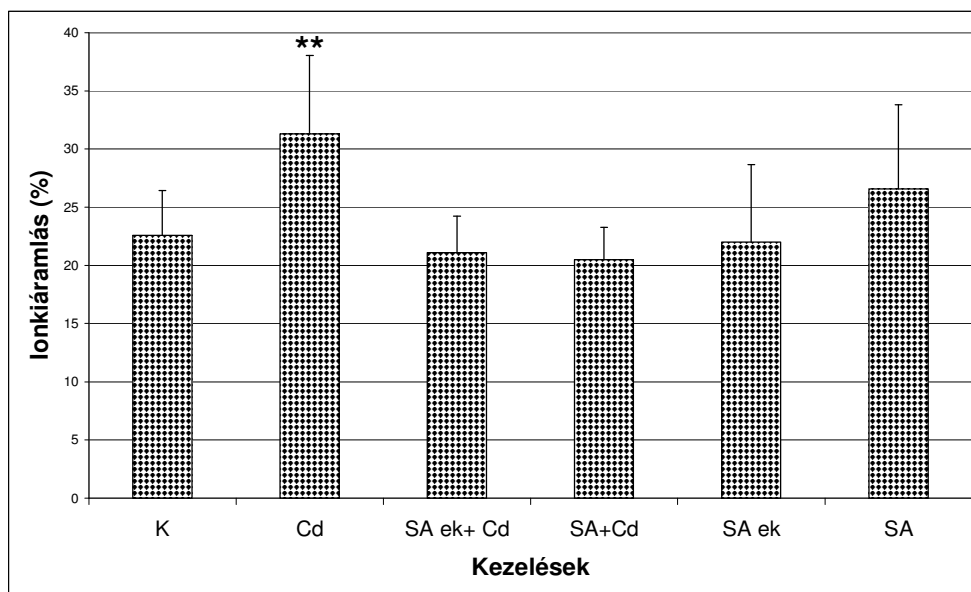
16. ábra. Szalicilsavval kezelt kukoricanövények levelének Cd tartalma 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest (n=10).

Ezek után vizsgáltuk, hogy a SA-kezelés hogyan hat a gyökerek, illetve a levelek életképességére. A gyökerek életképességének vizsgálatához a TTC reakciót használtuk, mivel a gyökerekből azonos felületű mennyiség kimérése az ionkiáramlásos módszerhez nehézkes volt és nagyok voltak a szórások, de ezzel a módszerrel jó eredményeket kaptunk. Maga a Cd-kezelés 20%-ra csökkentette a gyökerek életképességét, és kb. ugyanezt az arányt tapasztaltuk a csak SA-val kezelt növények esetében is (17. ábra). A SA ek+Cd és a SA+Cd kezelések viszont 10% alá csökkentették a gyökerek életképességét, tehát a SA-nak itt inkább károsító, mint védőhatása volt.



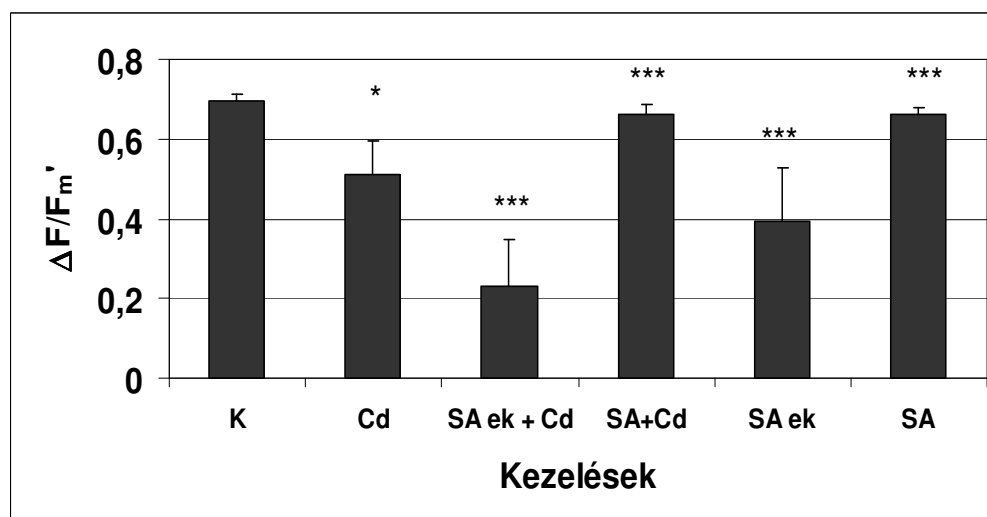
17. ábra. Szalicilsavval kezelt kukoricanövények gyökerének életképessége 24 órás 0,5 mM Cd-kezelést követően a kontroll százalékában (100% A_{530} érték: 0,24). ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

A leveleknél az életképesség méréséhez az ionkiáramlást választottuk, mivel a TTC-s mérésnél a keletkező piros szín jelzi az életképességet, és ennek mérésénél a levelek klorofill tartalma zavaró volt, másrészt a levelekből azonos felületű levélkorongokat vágva a mérés szórása is elfogadhatónak bizonyult. A levelekben azt tapasztaltuk, hogy a SA-val kezelt növényekben hasonló ionkiáramlási értékeket mértünk, mint a kontrollban, és ezek Cd kezelés hatására sem változtak, míg a csak Cd-mal kezelt növényekben megnőtt az ionkiáramlás, ami membránkárosodásra utal (18. ábra).



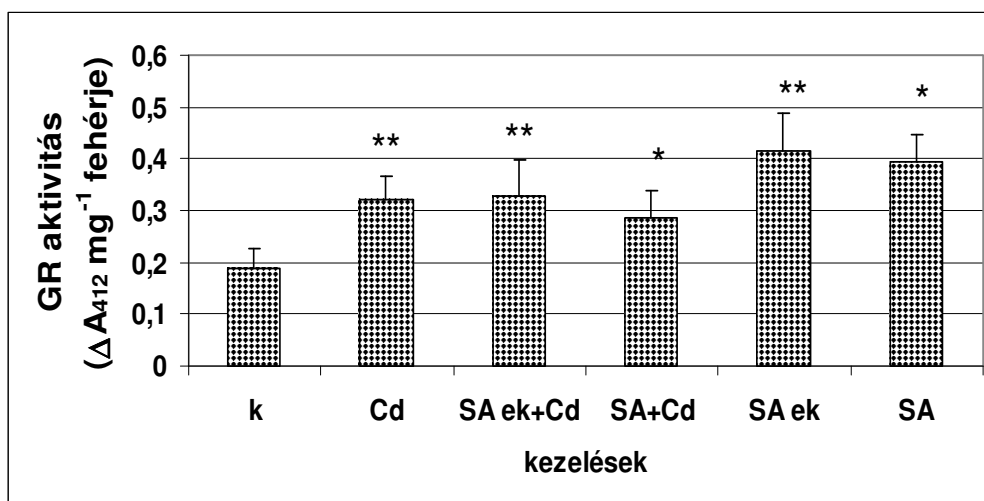
18. ábra. Szalicilsavval kezelt kukoricanövények levelének életképessége 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. **: szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

Mértük a 2. fotokémiai rendszer kvantumhatásfokát is ($\Delta F/F_m'$ paraméter) a stressz mértékének detektálására. Láthatjuk, hogy a legnagyobb csökkenést a SA ek +Cd okozta (19. ábra), és még magában a SA ek-nél is kisebb értékeket mértünk, mint csak a Cd-kezelés után. Az SA+Cd és SA-kezelés kismértékű csökkenést okozott.



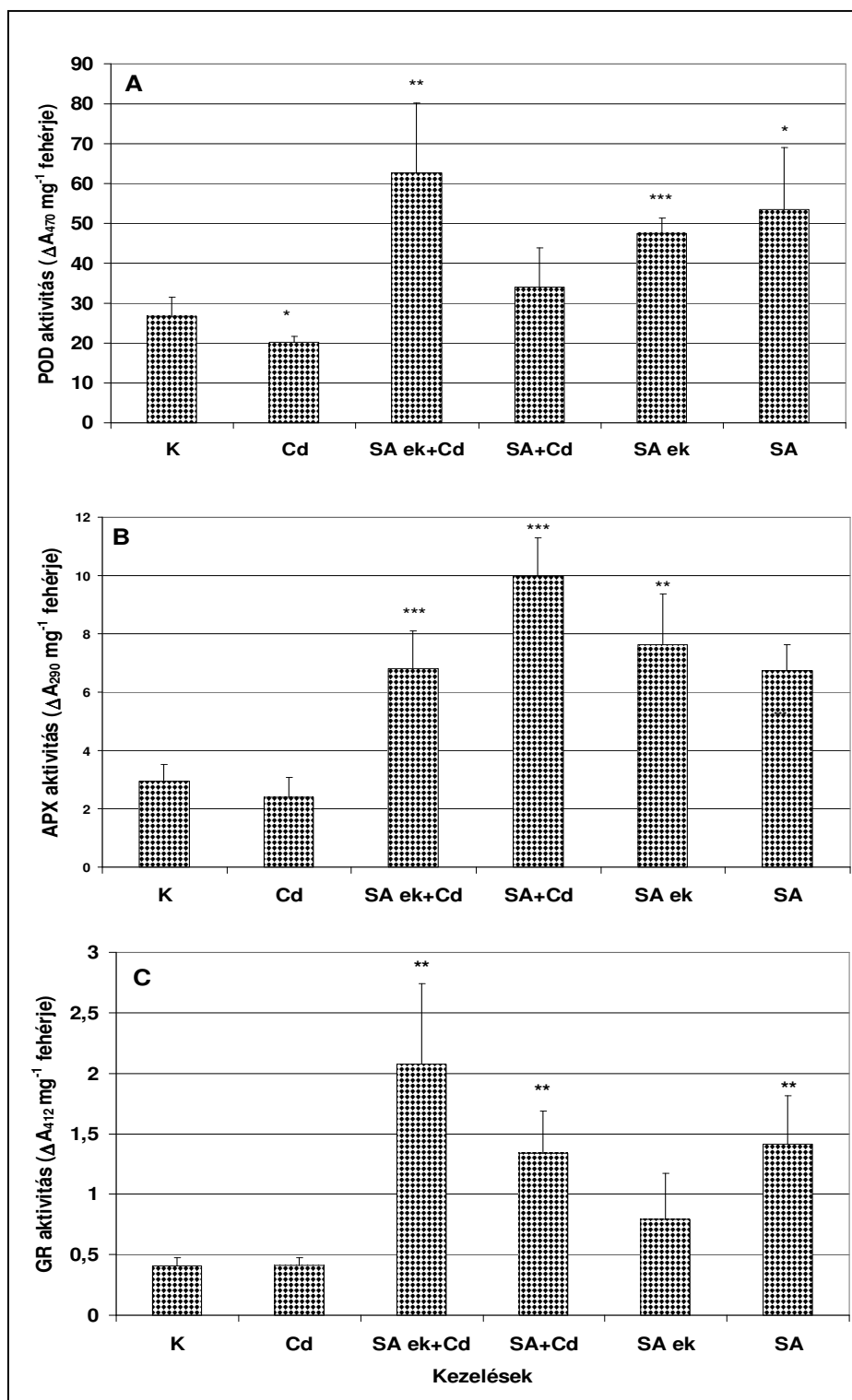
19. ábra. A kvantumhatásfok változása szalicilsavval kezelt kukoricanövények levelében 24 órás 0,5 mM Cd-kezelést követően. *,***: szignifikáns $P \leq 0,05$ és 0,001 szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

Antioxidáns enzimek: Ismert, hogy a Cd oxidatív stresszt okoz a növényekben, ezért mértük az antioxidáns enzimek változását is a kezelések hatására. A levélben csak a GR aktivitása nőtt meg kb. egyenlő mértékben a kezelések hatására (21. ábra), míg a többi enzim aktivitása nem változott.



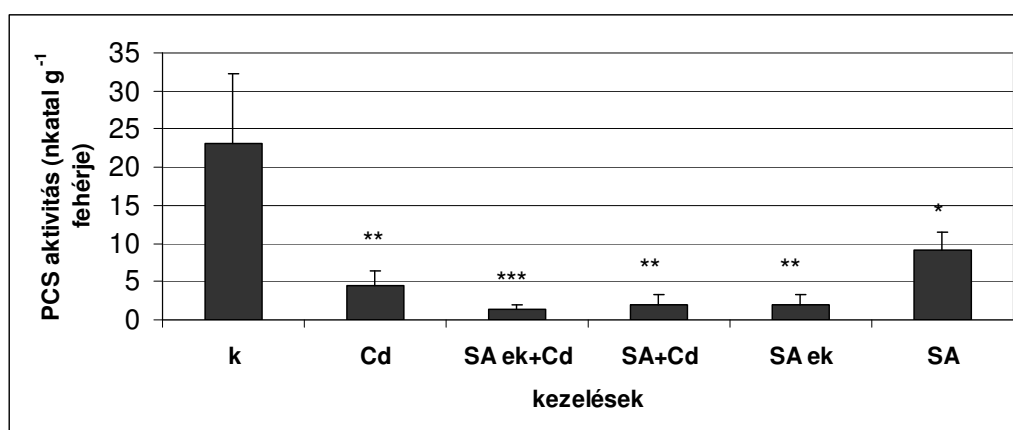
20. ábra. GR változása szalicilsavval kezelt kukoricanövények levelében 24 órás 0,5 mM Cd-kezelést követően. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A gyökérben a POD aktivitása Cd-kezelés hatására kismértékben csökkent (21A. ábra), míg a SA-kezelt növényekben megnőtt, kivéve, amikor a SA-t és a Cd-ot egyszerre kaptak a növények, mert ekkor nem láttunk változást a kontrollhoz viszonyítva. Az APX aktivitása Cd-kezelés hatására nem változott, míg a SA-kezelt növényekben megemelkedett (21B. ábra). A legnagyobb mértékű növekedést akkor tapasztaltuk, amikor a SA-t a Cd-mal egyidőben adtuk a növényekhez. A GR aktivitás a Cd-kezelés hatására nem változott, míg a SA-kezeléseknél, a fentebb említett enzimekhez hasonlóan, megnőtt (21C. ábra). A legnagyobb változás a Cd-kezelést megelőzően SA-val kezelt növényekben volt, míg önmagában a SA-előkezelés nem okozott enzimaktivitás változást a kontrollhoz viszonyítva. A kataláz enzim aktivitása nem változott.



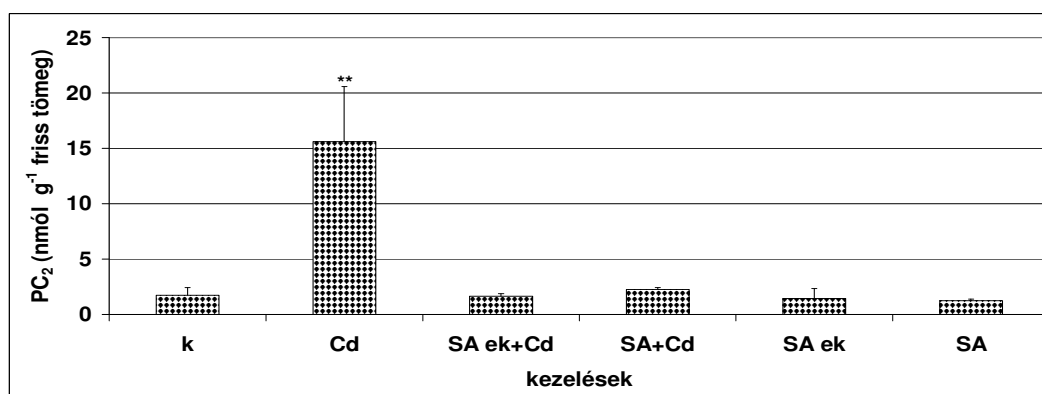
21. ábra. POD (A), APX (B) és GR (C) változása szalicilsavval kezelt kukoricánövények gyökerében 24 órás 0,5 mM Cd-kezelést követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten a kontrollhoz képest (n=5).

Fitokelatin-szintáz és fitokelatinok: A Cd elleni védekezés egyik fontos komponense a fitokelatinok szintézise, melyet a fitokelatin-szintáz enzim szintetizál glutationból. Tehát néztük a fitokelatin-szintáz aktivitásának változását SA-kezelés hatására és a fitokelatin szintben bekövetkezett változásokat. A gyökérben a kezelések hatására lecsökkent az enzim aktivitása (22. ábra), de a csak Cd-mal kezelt növényekben.



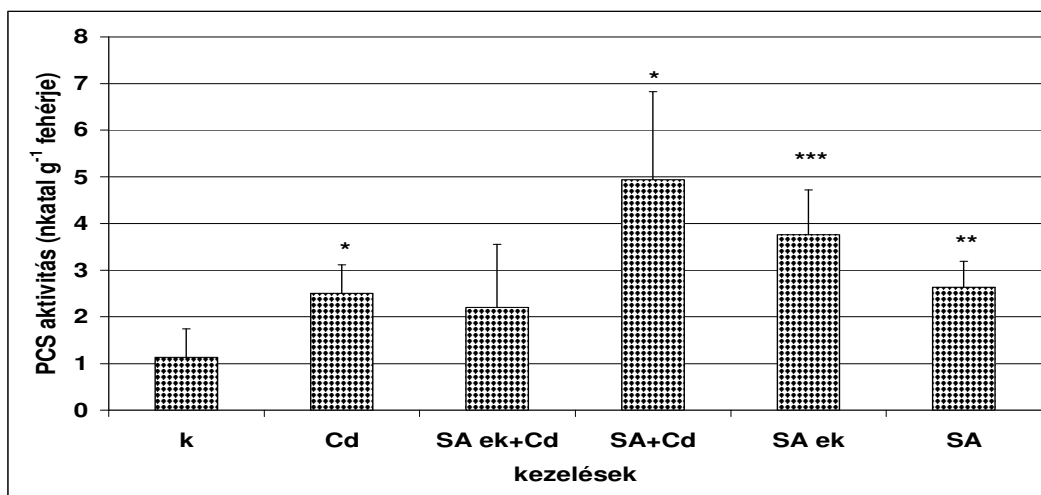
22. ábra. Fitokelatin-szintáz aktivitásának változása szalicilsavval kezelt kukoricánövények gyökerében 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten a kontrollhoz képest (n=5).

A PC₂-szint nagymértékben megemelkedett a lecsökkent aktivitás ellenére is (23. ábra), így itt valószínűleg a keletkezett termék gyakorolt feed-back gátlóhatást az enzimre. A SA-kezelt növényekben viszont a csökkent enzimaktivitás nem járt megemelkedett fitokelatinszinttel, így itt valószínűleg a SA-kezelés okozta változások miatt nem működött az enzim.



23. ábra. Fitokelatinok mennyiségének változása szalicilsavval kezelt kukoricánövények gyökerében 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. **: szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten a kontrollhoz képest (n=5).

A levélben a gyökérhez viszonyítva a kontrollban nagyon kicsi enzimaktivitást mértünk, viszont Cd kezelés hatására ez megemelkedett. A legnagyobb változást akkor figyelhettük meg, amikor a SA-t a Cd-mal egyidőben adtuk, míg a csak SA-előkezelés is kismértékű enzimaktivitás növekedést eredményezett (24. ábra). A többi esetben nem tapasztaltunk szignifikáns változást, valamint a fitokelatinok szintje sem emelkedett meg (adatok nincsenek feltüntetve).



24. ábra. Fitokelatin-szintáz aktivitásának változása szalicilsavval kezelt kukoricánövények levelében 24 órás 0,5 mM Cd kezelést követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten a kontrollhoz képest (n=5).

5.2. Az endogén SA változásai abiotikus stresszfaktorok hatására

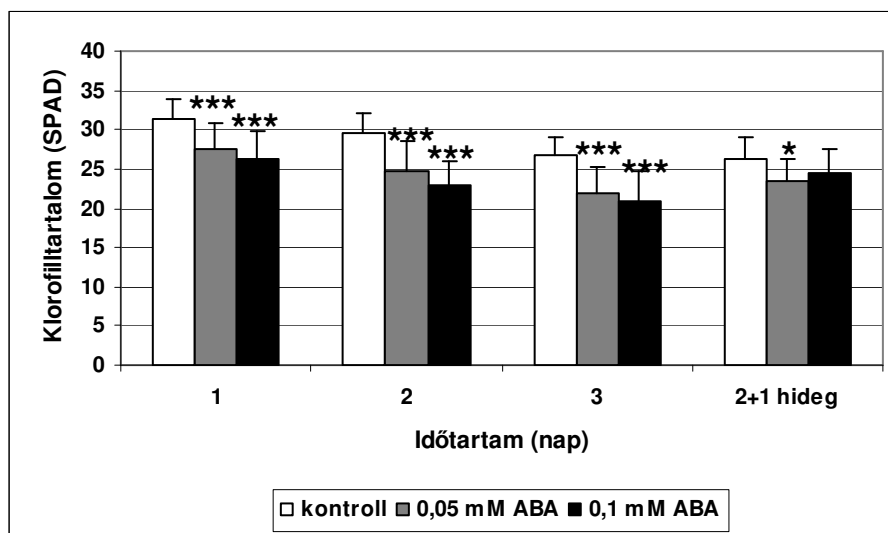
Az eddigiekben azt vizsgáltuk, hogy különböző abiotikus stresszek során (hideg, szárazság, Cd) milyen élettani változásokat okoz a Cd, és ez mennyire védi, illetve károsítja a növényt. Mivel a szalicilsavat a növények is szintetizálják és ismert volt, hogy biotikus stressz hatására megnő az endogén SA-szint, kíváncsiak voltunk, hogy a különféle abiotikus stresszfaktorok milyen hatást gyakorolnak az *in vivo* SA mennyiségére.

5.2.1. ABA kezelés hatása hidegstressz során

Ismert, hogy a külsőleg adagolt ABA védelmet nyújthat hidegstressz ellen. Azt vizsgáltuk, hogy az endogén SA-szintre milyen hatással van ez a kezelés. A növénynevelés paramétereit a 4.1.1.6. pontban ismerttettem. Kísérleteinket 2 hetes, tápoldatban nevelt

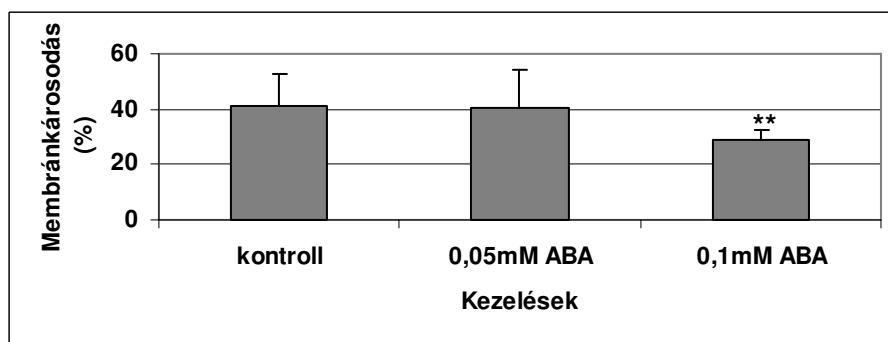
kukoricanövényekkel végeztük, a tápoldathoz 0,05, illetve 0,1 mM ABA-t adtunk 1, 2 és 3 napig. A növények egy részét a 2. napot követően 1 napra 5 °C-os növénynevelő kamrába helyeztük. A növények állapotának általános jellemzésére mértük a növények klorofilltartalmát valamint az ionkiáramlást.

Az ABA-kezelt növények klorofilltartalma kismértékben csökkent a kontrollhoz viszonyítva normál hőmérsékleten (25. ábra), míg a hidegkezelt növényekben a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk.



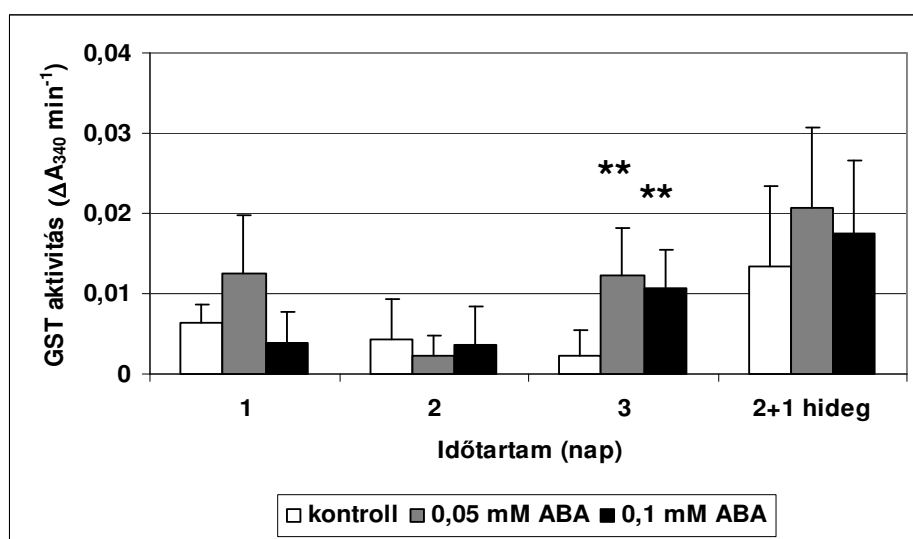
25. ábra. ABA-kezelt kukoricanövények klorofilltartalma hidegstressz során. *,***: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

Az ionkiáramlásban 1 nap után nem tapasztaltunk változást, ezért a növényeket hosszabb ideig 5 °C-on tartottuk, és a 6. nap után újra megmértük az ionkiáramlásukat. Az alacsonyabb koncentrációjú ABA-kezelt növények a kontrollhoz hasonló értékeket mutattak (26. ábra), míg a magasabb koncentrációnál kisebb értéket mértünk, tehát itt védőhatást tapasztaltunk.



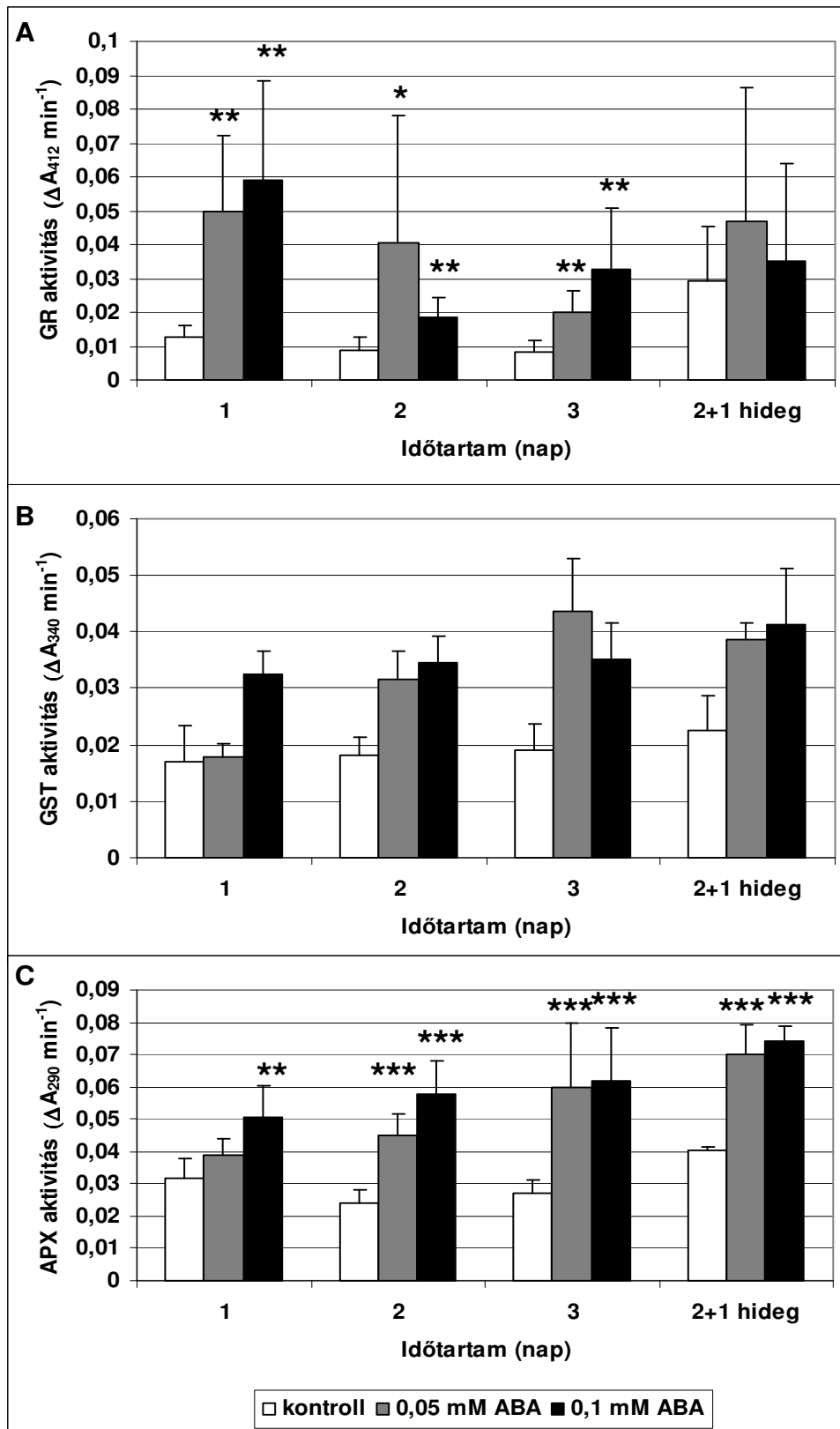
26. ábra. ABA-kezelt kukoricanövények ionkiáramlása 6 napig tartó 5 °C-os kezelés után. **: szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=10$).

Antioxidáns enzimek: A levélben csak a GST aktivitása változott meg a kezelések hatására és itt is csak a 3 napos 20°C-on ABA-kezelt növényekben tapasztaltunk növekedést a kontrollhoz képest. A hideg hatására is kismértékben megemelkedett az enzim aktivitása, de itt az ABA-kezelt és kezeletlen növények közt nem volt különbség (27. ábra).



27. ábra. GST aktivitásának változása ABA-kezelt kukoricanövények levelében. **: szignifikáns $P \leq 0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Az antioxidáns enzimek aktivitása főleg a gyökérben változott. A GR aktivitás ABA kezelés hatására már az első nap után megnövekedett, majd folyamatosan csökkent, de a kontrollnál magasabb maradt (28A. ábra). Hideg hatására a kezeletlen növényekben kismértékű emelkedést mértünk és ehhez hasonló értékek voltak az ABA-kezelt növényekben is. Ez a 3 napig 20 °C-on ABA-kezelt növényekben talált értékekhez volt hasonló. A GST aktivitása az ABA-kezelt növényekben minden esetben magasabb volt a kontrollhoz képest (28B. ábra), és ehhez hasonló tendenciát tapasztaltunk az APX esetében is (28C. ábra). A CAT és POD aktivitása nem változott szignifikánsan a kezelések hatására.



28. ábra. GR (A), GST (B) és APX (C) aktivitásának változása ABA-kezelt kukoricanövények gyökerében. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

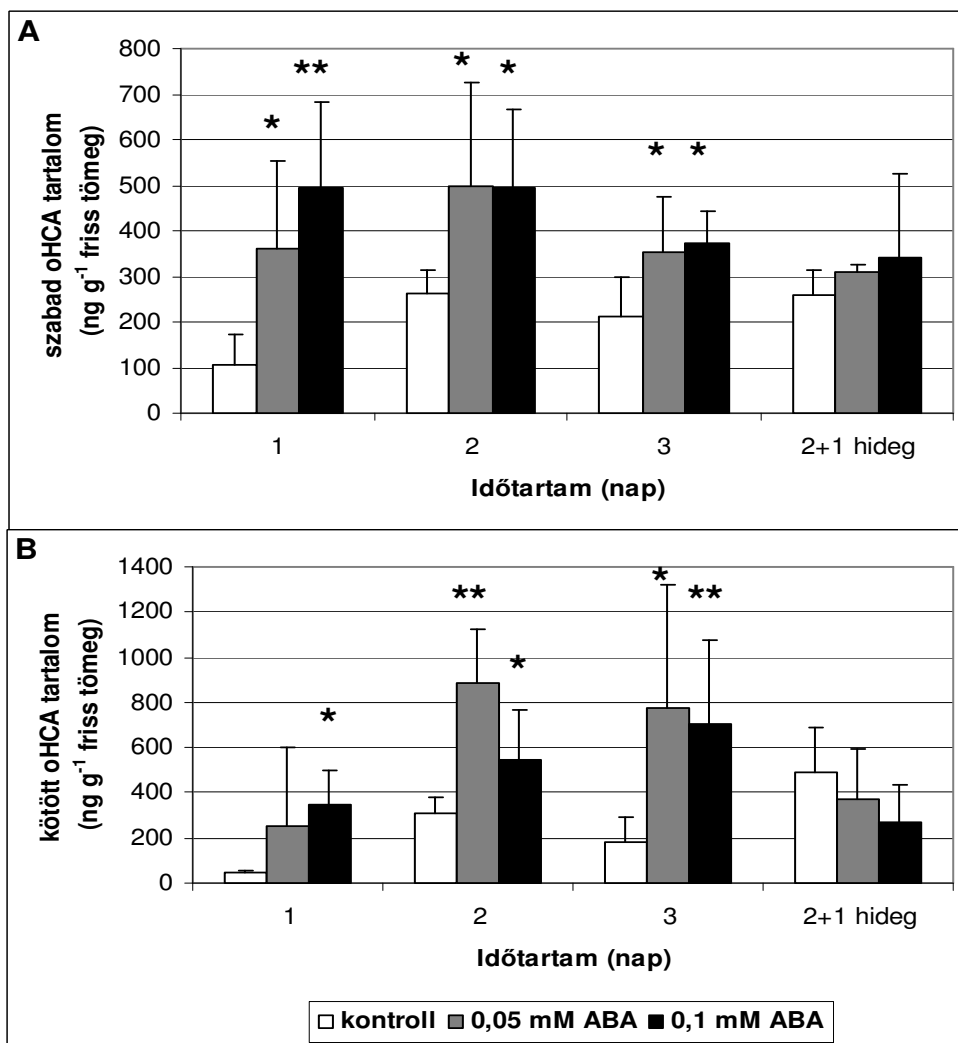
Szalicilsav és oHCA: Mivel az egyik fő kérdés az volt, hogy a különböző abiotikus stresszek hogyan hatnak az endogén szalicilsav szintre, ezért mértük a SA és az egyik feltételezett prekursora, az oHCA mennyiségét hidegkezelést követően. Az eredmények a 6. táblázatban találhatóak.

6. táblázat. oHCA és SA mennyiségének változása levélben, illetve gyökérben 1 napos hidegstresszt (5°C) követően. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

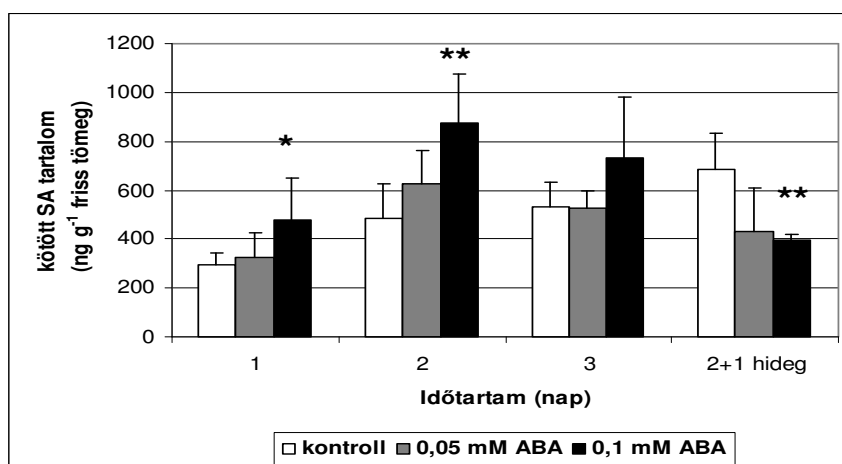
(ng g ⁻¹ friss tömeg)	Levél		Gyökér	
	Kontroll	Hideg	Kontroll	hideg
Szabad oHCA	305±201	397±344	211±89	260±52
Kötött oHCA	7774±1548	10330±828**	180±110	488±204**
Szabad SA	56±31	116±46*	73±22	64±20
Kötött SA	533±97	683±153	102±49	141±90

A kötött oHCA mennyisége a levélben 1,3-szorosára, míg a gyökérben 2,7-szeresére nőtt. A levélben ugyan kisebb mértékben emelkedett az oHCA, de mivel a kiindulási szintje is jóval magasabb volt, ezért ez a növekedés abszolút értékben nagyobb mennyiségű oHCA-felhalmozódást (2556 ng/g friss tömeg) jelentett, míg a gyökérben a nagyobb mértékű változás is csak 300 ng/g friss tömeg volt. A hideg hatására a szabad SA-szintje a levélben kb. kétszeresére emelkedett, míg a gyökérben nem történt változás. A kötött oHCA-ban, valamint a szabad SA-ban kapott emelkedés nem volt szignifikáns.

Párhuzamosan azt is néztük, hogy az ABA-kezelés milyen változást okoz a növényben kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között. Gyökérben nevelési hőmérsékleten a szabad és a kötött oHCA-tartalom is megnőtt az ABA-kezelés hatására (29. ábra), míg hidegben nem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva. Levélben nem változott szignifikánsan a szintje az ABA-kezelés hatására. A szabad SA-szint nem változott sem a gyökérben, sem a levélben, és a kötött SA-szintben is csak a levélben találtunk kismértékű emelkedést nevelési hőmérsékleten, hidegben pedig lecsökkent a szintje (30. ábra).



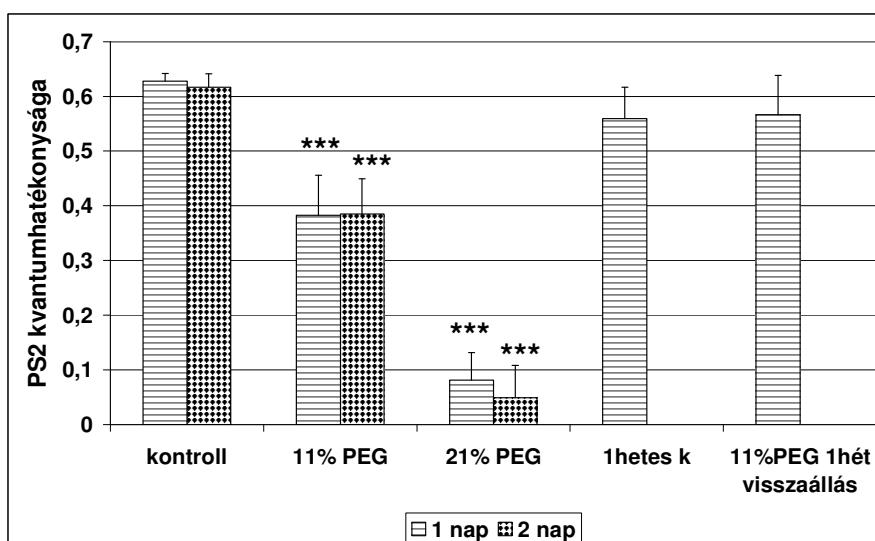
29. ábra. Szabad (A) és kötött (B) oHCA mennyiségének változása ABA-kezelt kukoricanövények gyökerében. *,**: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



30. ábra. Kötött SA mennyiségének változása ABA-kezelt kukoricanövények levelében. *,**: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

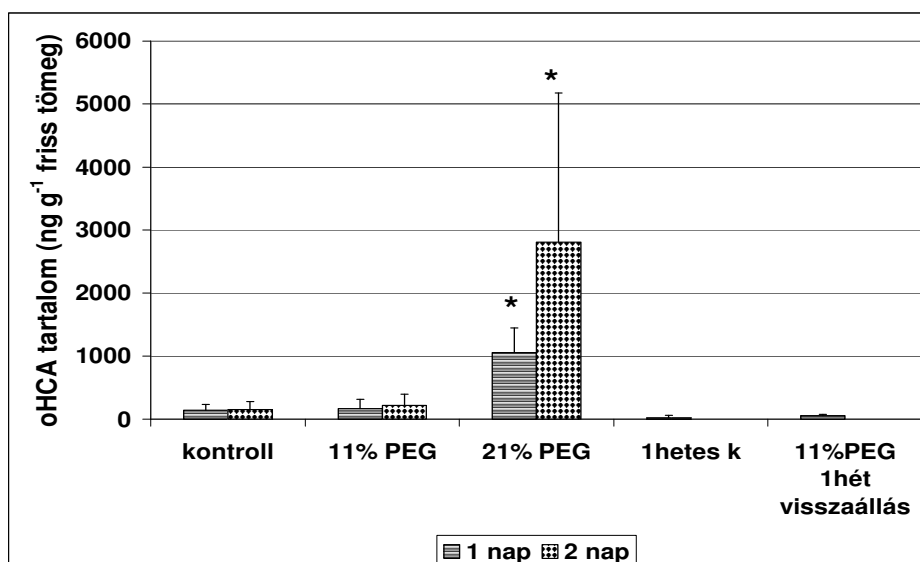
5.2.2. Endogén SA változása szárazságstressz folyamán

Ezek után a szárazságstressz alatti endogén SA- illetve oHCA-szintre voltunk kíváncsiak. A növénynevelés körülményei a 4.1.1.7. fejezetben találhatók. Hogy detektáljuk a stressz mértékét, mértük a 2. fotokémiai rendszer kvantumhatásfokát. A 31. ábrán látható, hogy az 1 és 2 napos 11%-os PEG-kezelés már csökkenést okozott ebben a paraméterben a kontrollhoz viszonyítva, de az 1 és 2 napos értékek közt nem volt különbség. Viszont a 21% PEG-kezelt növényekben a PS2 kvantumhatásfoka drasztikusan lecsökkent. A 2. nap után a növényeket normál tápoldatba helyeztük és 1 hét múlva néztük a helyreállást. A 11%-os PEG-gel kezelt növények esetében a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk (31. ábra), míg a 21%-os PEG-gel kezelt növények nem éltek túl az 1 hetet.



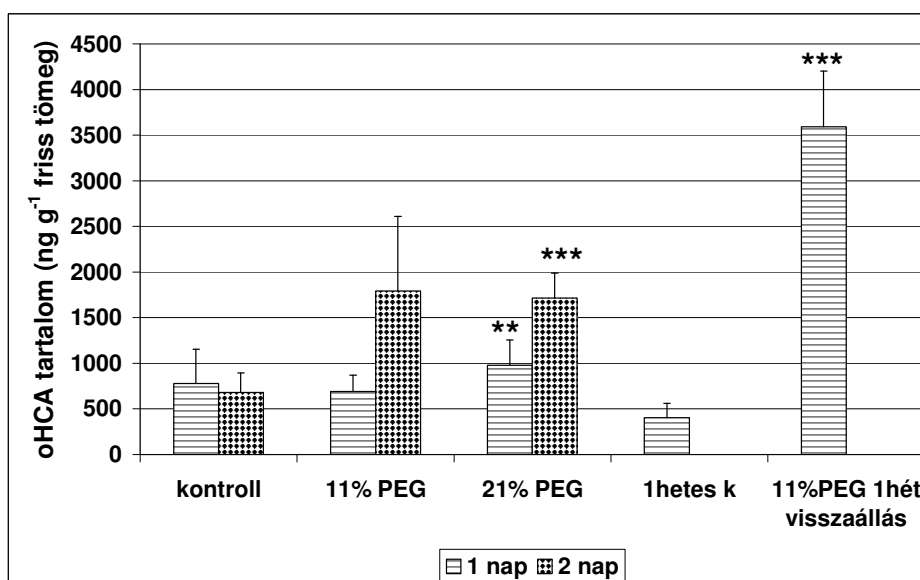
31. ábra. A PS2 kvantumhatékonyságának változása PEG-kezelés hatására. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

SA és oHCA: A szabad oHCA-szint a 21%-os PEG-gel kezelt növényekben jelentősen megnőtt és a 2. nap után még nagyobb mértékben (32. ábra). A többi kezelés esetében nem tapasztaltunk változást.



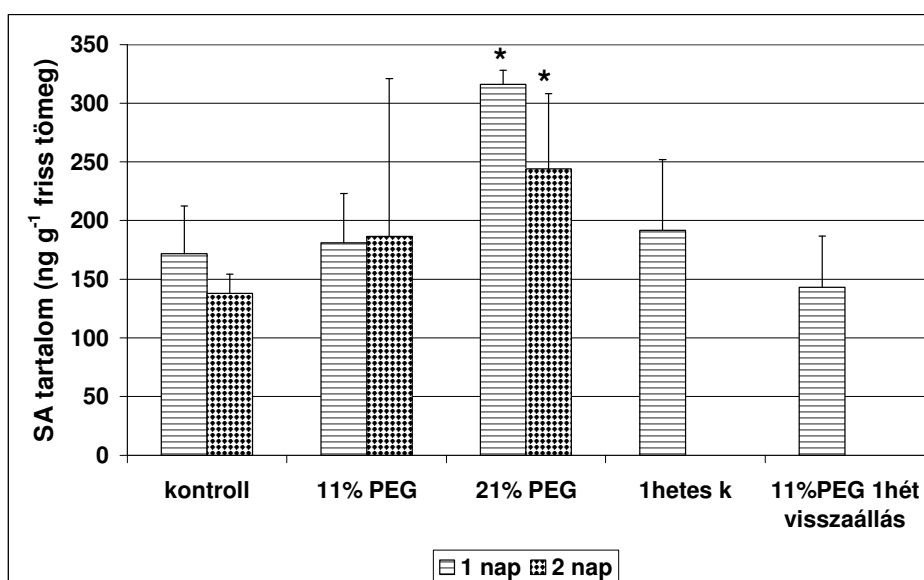
32. ábra. A szabad oHCA mennyiségének változása PEG-kezelés hatására levélben. *: szignifikáns $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A kötött oHCA már a 11%-os PEG-gel kezelt növényekben is megnőtt a második napon (33. ábra), míg a 21%-kal kezeltéknél már az 1. nap után is volt kismértékű emelkedés, ami a 2. napon még kifejezettebb volt. A legnagyobb arányú emelkedés, közel hétszeres, azonban a 11%-os PEG-gel kezelt növényekben következett be az 1 hetes visszaállítás során.

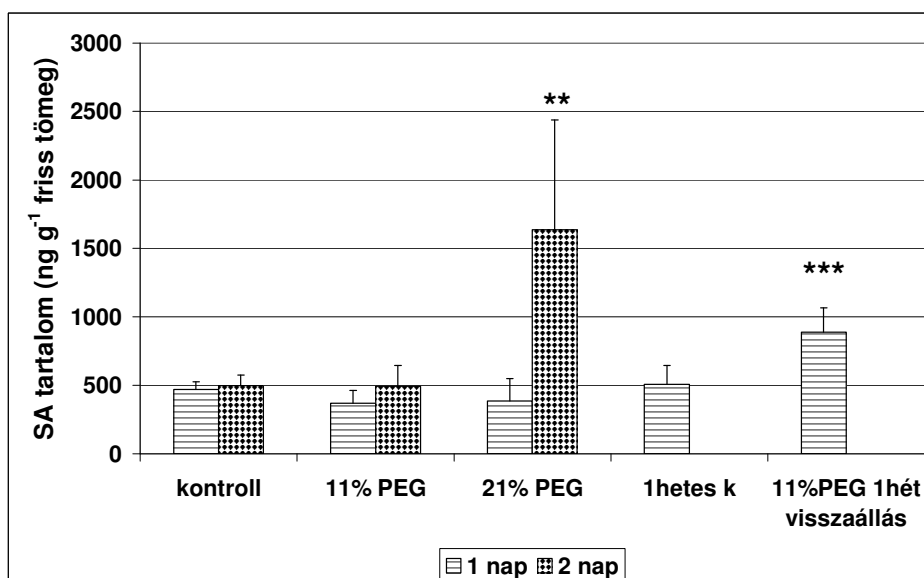


33. ábra. A kötött oHCA mennyiségének változása PEG-kezelés hatására levélben. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A szabad SA-szint csak a 21%-os PEG-gel kezelt növényekben nőtt meg szignifikánsan (34. ábra). A kötött SA mennyisége 2 nap után a 21%-os PEG-gel kezelt növényekben háromszorosára nőtt, és egy kisebb mértékű, kb. kétszeres, növekedés volt a 11%-os PEG-kezelt növényekben az 1 hetes visszaállás után (35. ábra). A gyökerekben nem változott az SA és oHCA mennyisége a kezelések hatására.



34. ábra. A szabad SA mennyiségének változása PEG-kezelés hatására levélben. *: szignifikáns $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



35. ábra. A kötött SA mennyiségének változása PEG kezelés hatására levélben. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.2.3. Endogén SA változása sóstressz folyamán

Mindezek után vizsgálni kívántuk, hogy van-e különbség, ha az ozmotikus stresszhez ionstressz is társul, ezért NaCl-stressznek tettük ki a növényeket. A nevelési körülmények a 4.1.1.7. fejezetben találhatóak. A kísérleteinkben alkalmazott koncentrációjú (50, illetve 100 mM) NaCl közepes stresszt okoz. Korábban 150 és 200 mM oldatokkal is folytattunk előkísérleteket, de a növények pár nap után elpusztultak. Az 50 és 100 mM NaCl-stressz szignifikánsan csökkentette mind a gyökér, mind pedig a hajtás friss- és száraztömegét (7. táblázat). A csökkenés a gyökereknél a száraztömegben csak a visszaállás után látszott, mely a poszt-stressz szindrómának tudható be. A hajtáshossz is szignifikánsan csökkent mindkét sókoncentrációnál, míg a PS2 kvantumhatékonyságát csak a magasabb koncentráció csökkentette (8. táblázat).

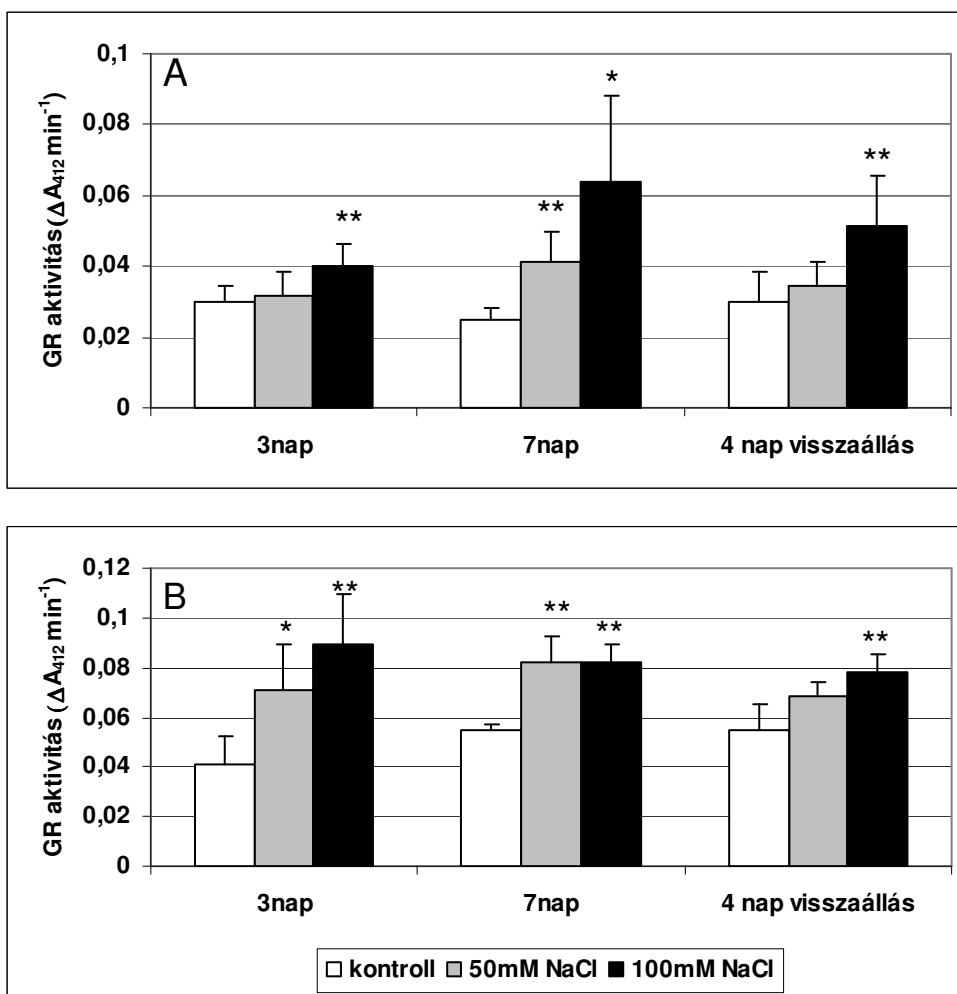
7. táblázat. Kukoricanövények friss- és száraztömegének változása sóstressz, majd az azt követő visszaállás során. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

	Hajtás		Gyökér	
	7nap	4nap visszaállás	7nap	4nap visszaállás
Friss tömeg (g)				
kontroll	5,29±1,91	6,90±3,02	3,29±0,48	4,14±1,26
50 mM NaCl	4,34±1,32	4,68±2,72*	2,13±0,32	2,15±0,04*
100 mM NaCl	3,67±1,29*	4,52±1,38*	1,40±0,15*	1,99±0,25**
Száraz tömeg (g)				
kontroll	0,69±0,25	0,95±0,45	0,22±0,005	0,31±0,05
50 mM NaCl	0,59±0,20	0,63±0,37**	0,16±0,042	0,13±0,001*
100 mM NaCl	0,53±0,21**	0,62±0,18**	0,12±0,007	0,13±0,01**

8. táblázat. Kukoricanövények hajtáshosszának valamint a PS2 kvantumhatékonyságának változása sóstressz, majd az azt követő visszaállás során. **, ***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

	Hajtás	
	7nap	4nap visszaállás
Hossz (cm)		
kontroll	46,83±6,96	50,61±6,85
50 mM NaCl	41,64±7,64**	42,53±8,44**
100 mM NaCl	38,96±4,52***	41,68±3,98***
PS2 kvantumhatásfoka		
kontroll	0,666±0,014	0,641±0,028
50 mM NaCl	0,657±0,022	0,657±0,017
100 mM NaCl	0,580±0,046***	0,61±0,035*

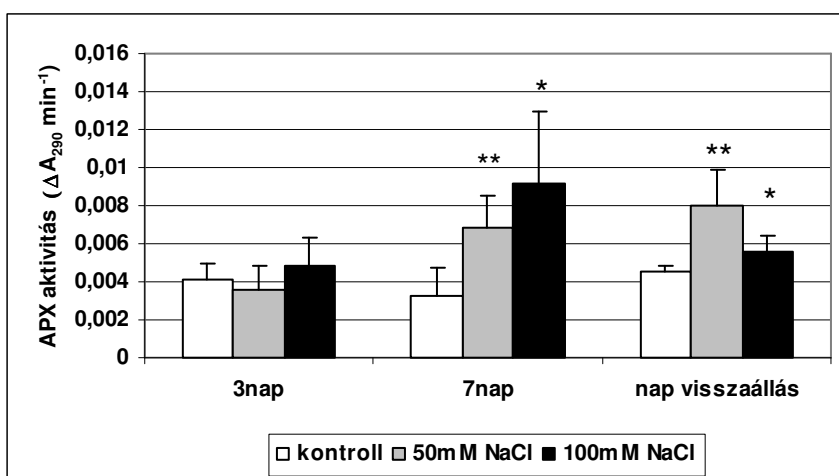
A CAT és GST enzimek aktivitása nem változott a stressz, illetve a visszaállás során (az adatok nincsenek feltüntetve). Az antioxidáns enzimek közül a GR aktivitása mind a levélben, mind a gyökérben megnőtt (35. ábra). A levélben a 100 mM kezelés esetében már 3 nap után látható volt a növekedés, míg 7 nap után már az 50 mM sókoncentrációnál is. A visszaállás folyamán az enzim aktivitása csökkent, de a 100 mM kezelés esetében még mindig magasabb volt a kontroll növényekben mértéknél. A gyökerekben már az 50 mM kezelésnél is látható volt a növekedés 3 nap után és az aktivitás értékek hasonló szinten maradtak még a visszaállás alatt is.



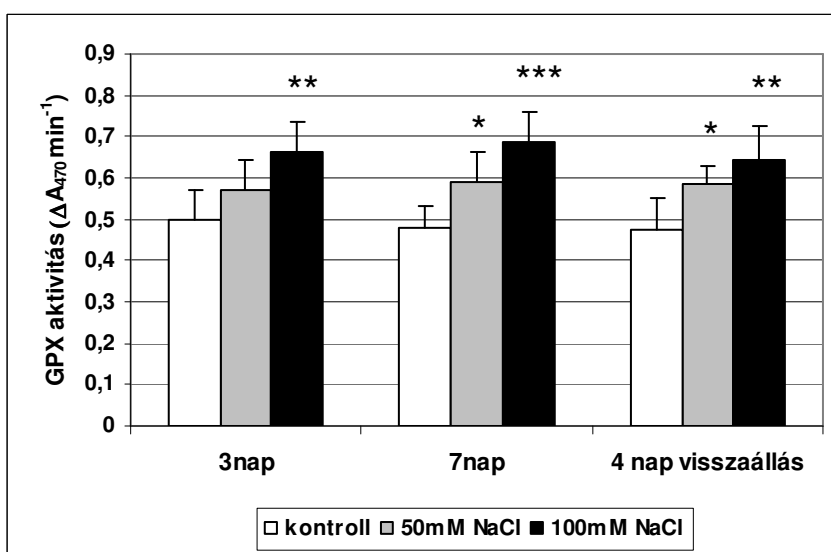
35. ábra. A GR aktivitásának változása sókezelés hatására levélben (A) és gyökérben (B). *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Az APX aktivitása csak a 7. napon nőtt meg a levelekben (36. ábra), és hasonló szinten maradt a visszaállás során is. A gyökerekben APX esetében nem tapasztaltunk szignifikáns

változást. A GPX esetében viszont csak a gyökerekben növekedett meg az aktivitás, de már a 3. naptól és a visszaállás végéig ugyanazon a szinten maradt (37. ábra).

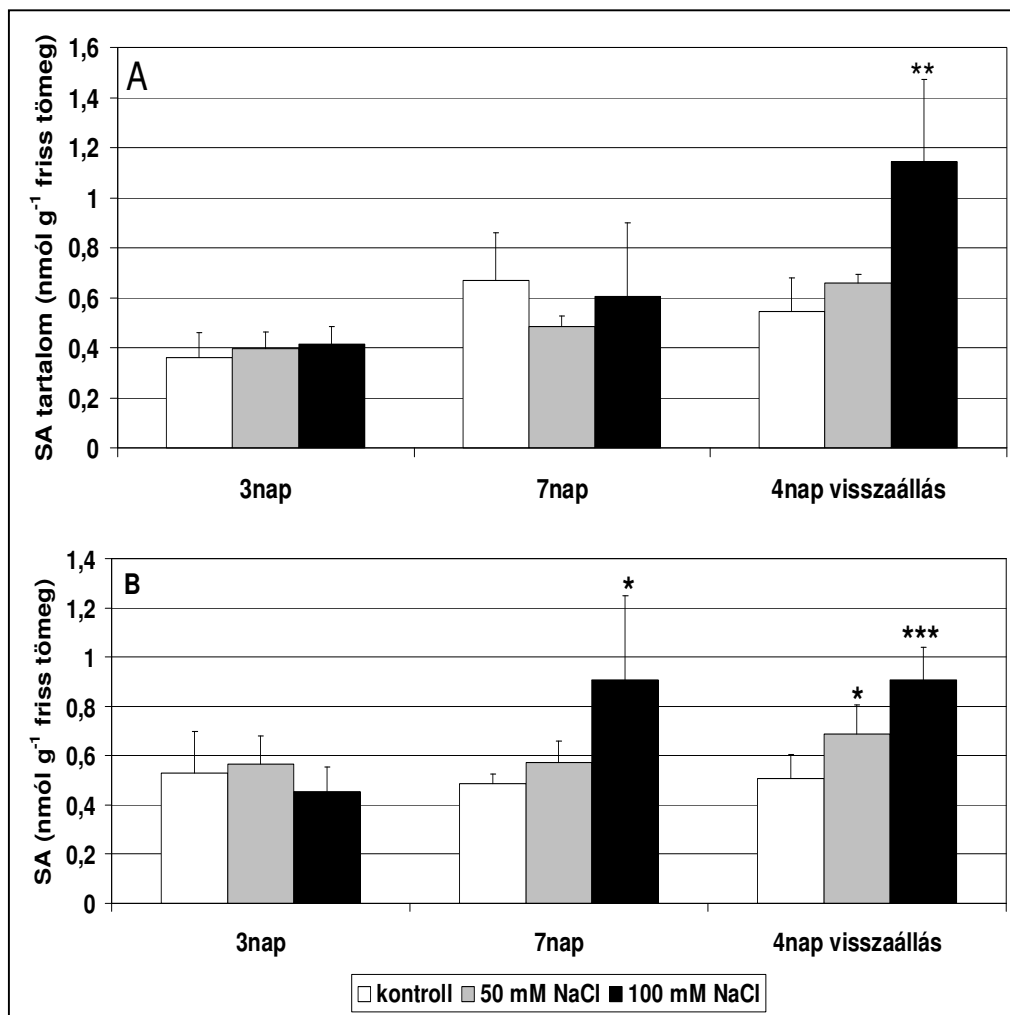


36. ábra. APX aktivitásának változása sókezelés hatására levélben. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



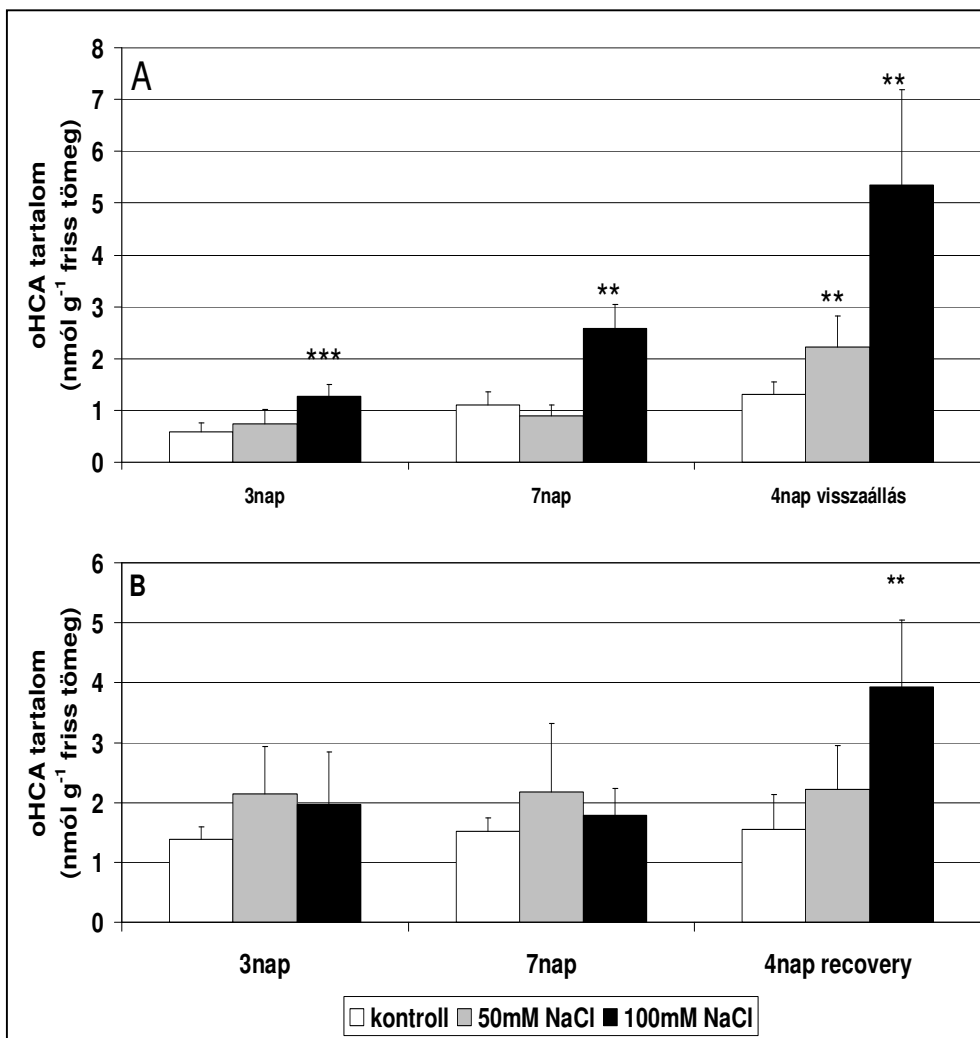
37. ábra. GPX aktivitásának változása sókezelés hatására gyökérben. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A szabad SA-szint a levelekben csak a 100 mM sókezelés hatására emelkedett meg (38. ábra) és csak a visszaállás alatt. A gyökerekben hasonló koncentrációjú NaCl-nál már a 7. napon tapasztaltunk növekedést és a visszaállás folyamán mind az 50, mind pedig a 100 mM-lal kezelt növényeknél magasabb volt a SA-szint a kontrollhoz képest.



38. ábra. A szabad SA mennyiségének változása sókezelés hatására levélben (A) és gyökérben (B). *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A szabad oHCA-szint már a 3 naptól emelkedett a 100 mM sóval kezelt növények leveleiben (39. ábra) és ez az emelkedés a visszaállást követően jóval nagyobb volt. A gyökerekben csak a visszaálláskor tapasztaltunk kisebb mértékű emelkedést.



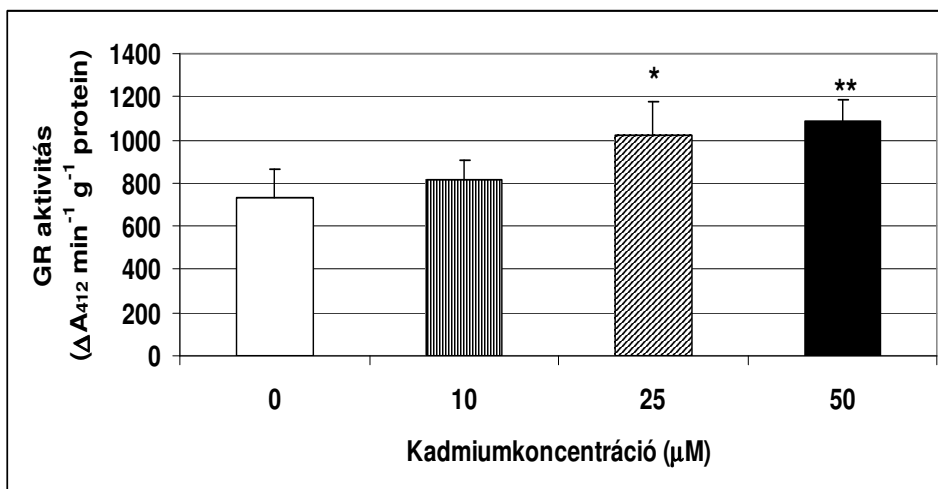
39. ábra. A szabad oHCA mennyiségének változása sókezelés hatására levélben (A) és gyökérben (B). **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.2.4. Endogén SA változása Cd-stressz folyamán

Miután vizsgáltuk az ozmotikus- és ionstressz hatását az endogén SA-szintre, tanulmányoztuk, hogy milyen hatást gyakorol rá egy toxikus nehézfém, a kadmium (ez a fejezet (5.2.4.), volt doktoranduszom, dr. Pál Magda disszertációjának is részét képezi). A növénynevelés a 4.1.1.8. pontban leírtak szerint történt.

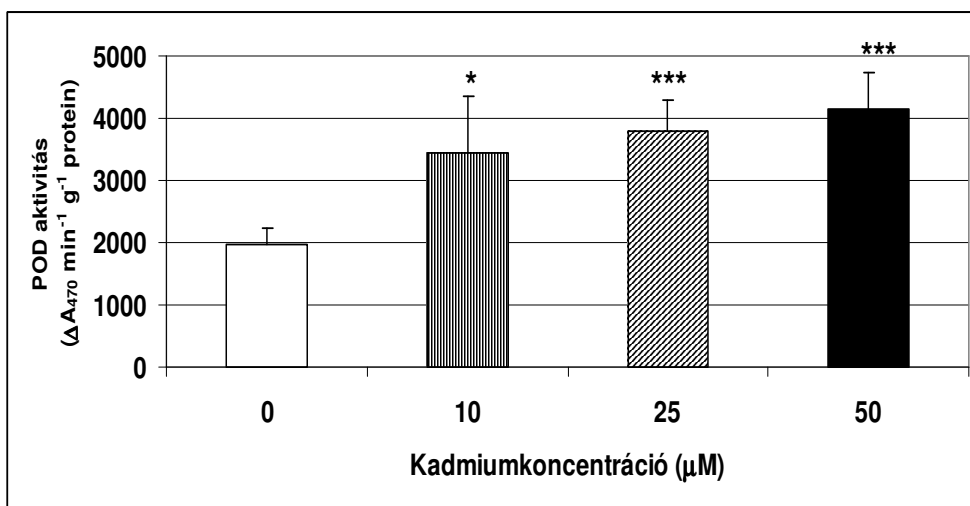
Antioxidáns enzimek aktivitása: A kadmiummal kezelt növények levelében a GR aktivitása koncentrációfüggő módon növekedést mutatott, 11, 39 és 47%-os növekedést

tapasztaltunk a 7. napon 25 és 50 μM Cd jelenlétében a kontroll növények levelében mért értékekhez képest (40. ábra).



40. ábra Kadmiumkezelés hatása a glutation-reduktáz enzim aktivitására kukoricanövény levelében. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontroll (0 μM Cd) aktivitáshoz képest ($n=5$).

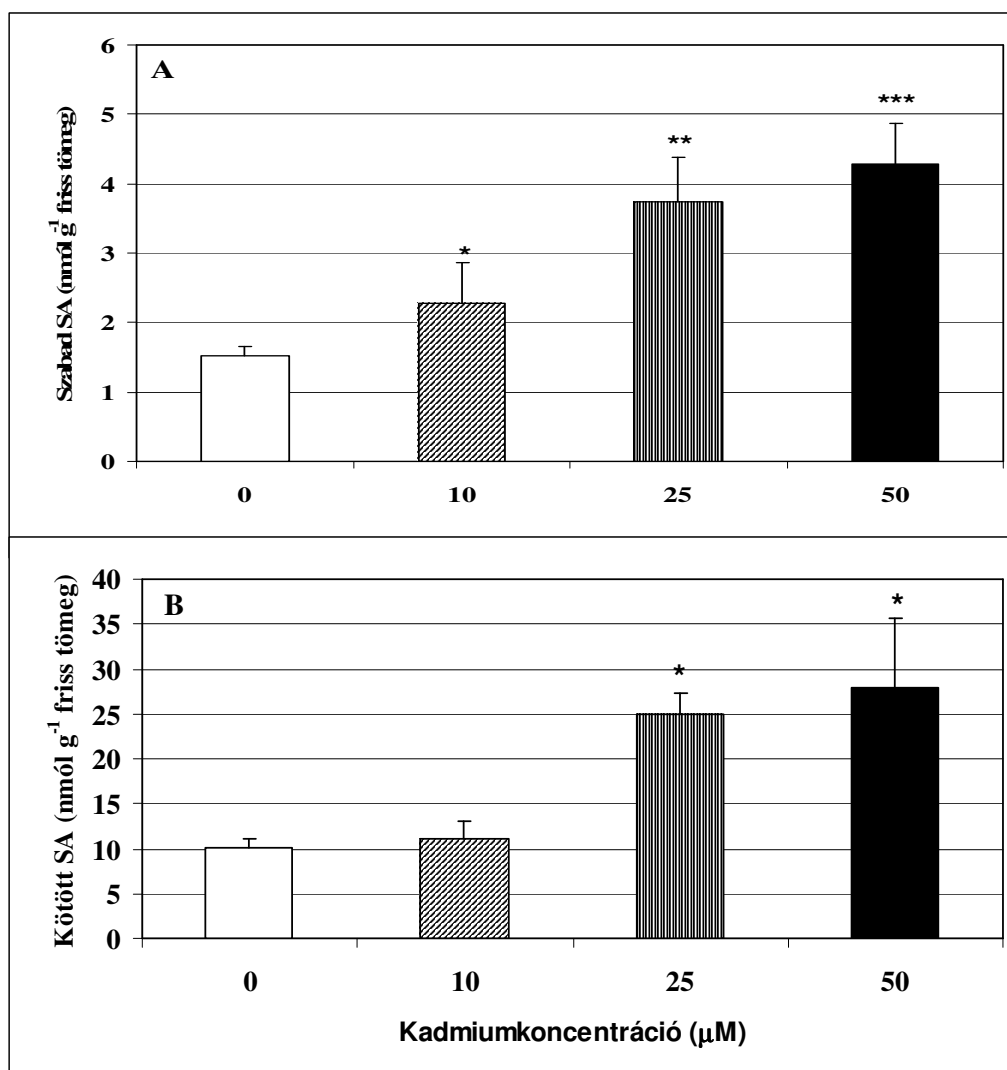
A GPX aktivitása a Cd-kezelés hatására a növények levelében a GR aktivitás változásához hasonlóan megemelkedett, a kontroll levélben mért értékekhez képest a növekedés 10, 25 és 50 μM Cd jelenlétében 74, 92 illetve 110%-os volt (41. ábra).



41. ábra Kadmiumkezelés hatása a gvajakol-peroxidáz enzim aktivitására kukoricanövény levelében. *, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,001$ szinten a kontroll (0 μM Cd) aktivitáshoz képest ($n=5$).

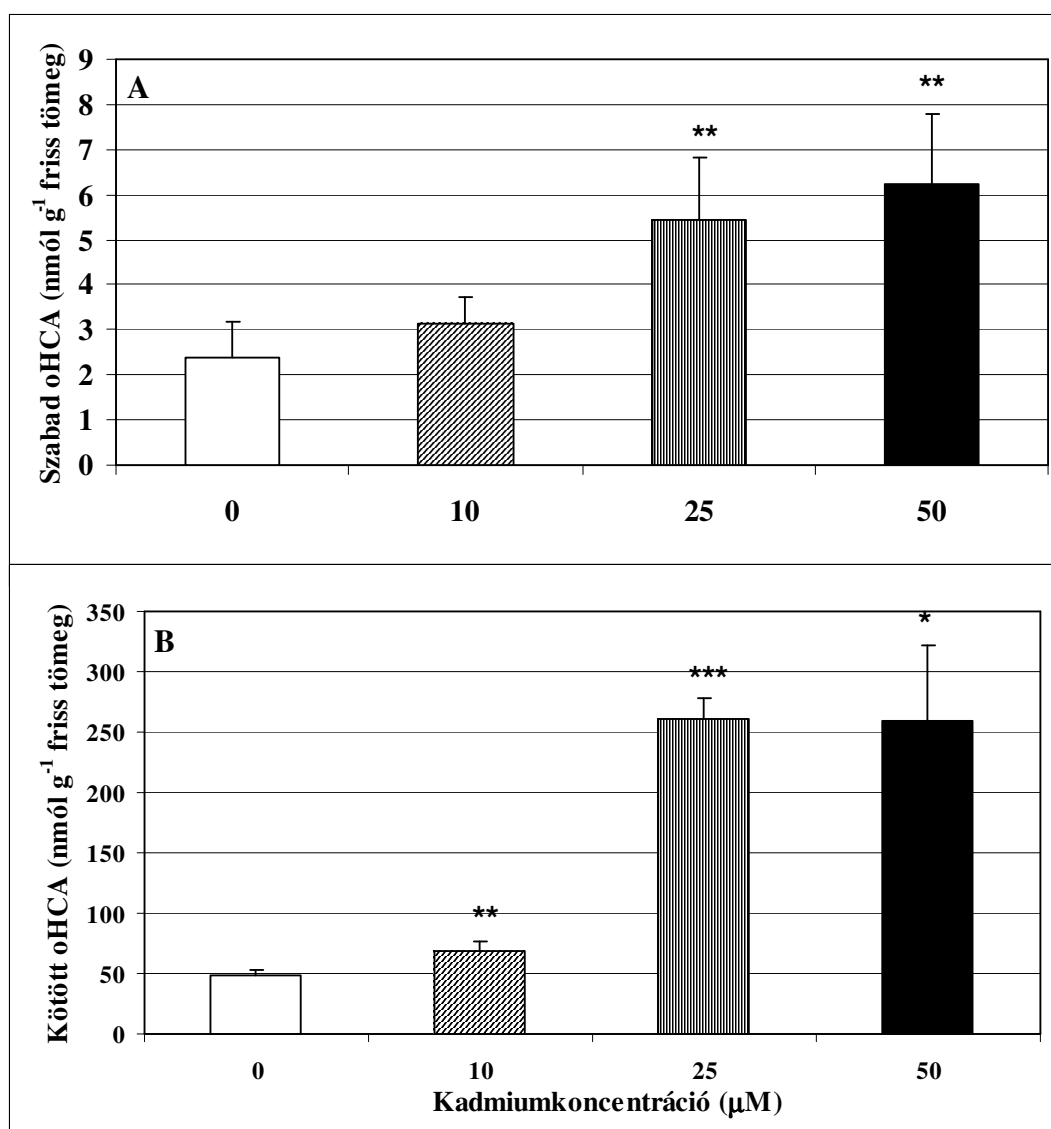
A kadmiumkezelés a levélben csak a GR illetve GPX aktivitását volt képes befolyásolni az általunk alkalmazott körülmények között, a gyökérben viszont a Cd nem befolyásolta az antioxidáns enzimek aktivitását számottevően.

A szalicilsav és más fenolos vegyületek: Mivel számos adat azt bizonyítja, hogy egyrészt a külsőleg adott SA-nak különböző abiotikus stresszek ellen védő hatása van, másrészt számos abiotikus stressz SA felhalmozódást okozott. Kíváncsiak voltunk, vajon a Cd kezelés hogyan befolyásolja a SA és más fenol vegyületek (oHCA) mennyiségét a kukoricanövényben.



42. ábra 7 napos kadmiumkezelés hatása a szabad (A) és kötött (B) szalicilsav-tartalomra a kukoricanövény levelében. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontroll koncentrációjához képest ($n=5$).

A Cd-koncentráció növekedésével arányos módon, a Cd-mal kezelt növényekben szignifikánsan megemelkedett a SA és oHCA mind a szabad, mind a kötött formában. A szabad SA-szintje 50, 146 és 182%-os (42A. ábra), míg a kötött SA mennyisége 9, 146 és 176%-os növekedést mutatott 10, 25 és 50 µM Cd jelenlétében a kontrollhoz képest (42B. ábra).



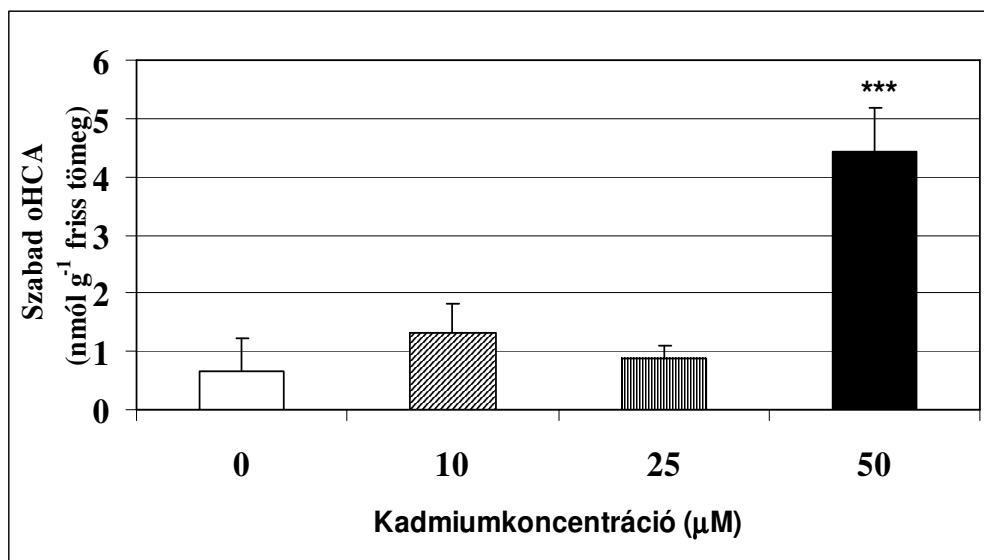
43. ábra 7 napos kadmiumkezelés hatása a szabad (A) és kötött (B) *orto*-hidroxi-fahéjsav-tartalomra a kukoricanövény levelében. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontroll koncentrációjához képest ($n=5$).

A szabad oHCA tartalom 31, 127 és 161%-kal (43A. ábra), a kötött oHCA pedig 41, 439 és 436%-kal emelkedett meg a 10, 25 és 50 μM Cd-mal kezelt növények levelében a kontrollhoz hasonlítva (43B. ábra).

Megállapíthatjuk, hogy a Cd kezelés a vizsgált fenolos vegyületek kötött és szabad formáinak felhalmozódását indukálta a levélben, mely hatása döntően a magasabb (25 és 50 μM) koncentrációknál vált kifejezetté.

A kezeletlen növények gyökerében a SA szabad és kötött formájának mennyisége azonos nagyságrendben volt, és mennyiségüket a Cd kezelés nem befolyásolta jelentősen (az

adatok nincsenek feltüntetve), és a levéllel ellentétben csak a legmagasabb koncentrációban (50 μM) volt hatással a szabad oHCA-tartalomra és több, mint ötszörösére emelkedett(44.ábra). A kötött oHCA mennyisége a kimutathatósági határ alatt volt.



44. ábra Kadmiumkezelés hatása a szabad oHCA-tartalomra a kukoricánövény gyökerében. Az adatok átlag értékek ($n=5$). ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest.

5.3 A szalicilsavas magáztatás élettani hatásainak vizsgálata

Számos publikáció jelent meg arról, ha a magokat ültetés előtt kis koncentrációjú szalicilsav oldatba áztatják, akkor az fokozza az abiotikus stresszrezisztenciát. Ennek a folyamatnak azonban az élettani háttere nem ismert. A munka ezen részében erre kerestünk választ. A kísérletekhez borsó és kukorica növényeket használtunk.

5.3.1. A szalicilsavas magáztatás hatásai kontroll körülmények között borsó növényben

Csírázási százalék és termés: A kísérletekhez borsónövényeket használtunk (nevelési körülmények: 4.1.2. fejezet), melyek magvait előzetesen 0,1 mM, 0,5 mM SA-ban, illetve desztillált vízben áztattuk 24 órán át. A csírázási százalék vizsgálatához 200-200 előkezelt borsószemet csíráztattunk szűrőpapírban, míg a termésmennyiség megállapításához 20-20 növényt neveltünk fel. Az eredmények a 9. táblázatban láthatóak.

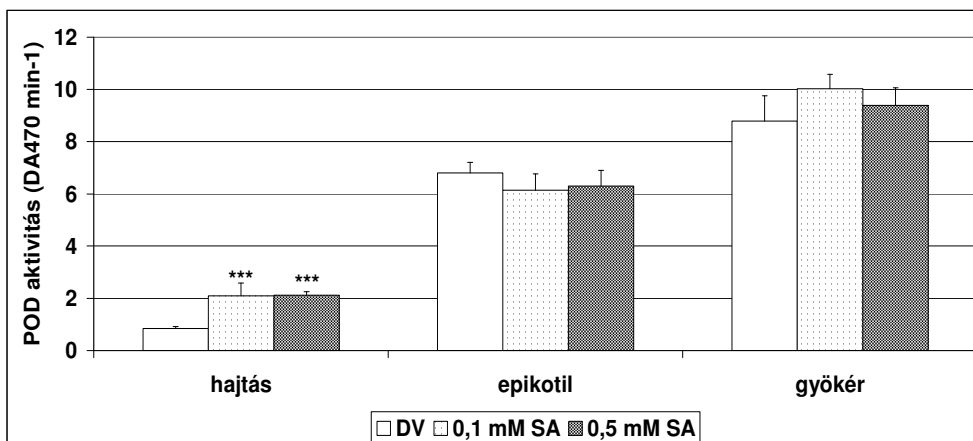
9. táblázat. Borsó magvak csírázása, a szemszám, illetve a szemtömeg alakulása szalicilsavas áztatást követően (A csíráztatáshoz 200 magot, a szemszám és szemtömeg meghatározáshoz 20-20 növényt használtunk). *: $p \leq 0,05$ illetve **: $p \leq 0,01$ szinten szignifikáns.

	Kezelések		
	kontroll	0,1mM SA	0,5mM SA
Csírázás (%)	73,7 $\pm$ 5,3	85,8 $\pm$ 3,9*	87,8 $\pm$ 1,8**
Szemszám (db/növény)	10,8 $\pm$ 2,3	12,5 $\pm$ 2,5*	11,8 $\pm$ 2,3
Szettömeg (g/növény)	20,6 $\pm$ 4,1	24,6 $\pm$ 4,9**	23,9 $\pm$ 4,8*

A szalicilsavas kezelés hatására a magvak 12, illetve 14 %-kal jobban csíráztak. Szemszám esetében szignifikáns növekedést csak a 0,1 mM koncentrációnál tapasztaltunk, de minimális növekedés a 0,5 mM koncentrációnál is történt. A szettömeg mindkét koncentrációnál megnőtt.

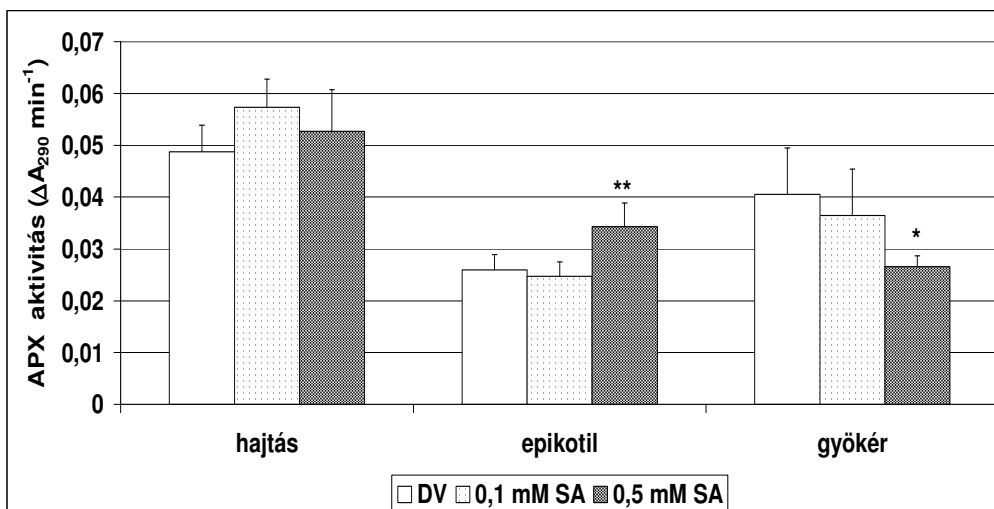
Antioxidáns enzimek: Ezek után azt vizsgáltuk, hogy milyen változások következnek be a növényekben a magáztatást követően. A kísérletekhez 1 hetes borsó növényeket használtunk, az ültetés utáni 7. napon gyűjtöttünk magokat, levelet, epikotilt és gyökeret az analízisekhez. Először az antioxidáns enzimek aktivitását mértük, hisz a SA oxidatív stresszt okozhat. Az enzimaktivitásokat hajtásban, gyökérben és epikotilban határoztuk meg. A kataláz és a glutation-reduktáz aktivitása egyik növényi részben sem változott a SA-kezelés hatására. Mind a kataláz, mind a glutation reduktáz aktivitása a hajtásban kb. négyszer magasabb volt, mint a gyökérben és az epikotilban

A kezelés hatására a POD aktivitása (45. ábra) körülbelül kétszeresére növekedett a hajtásban mindkét esetben, a szalicilsav oldat koncentrációjától függetlenül. A többi növényi részben nem figyelhető meg szignifikáns eltérés, de az epikotilban kb. hatszoros, míg a gyökérben kb. kilencszeres volt az enzim aktivitása.



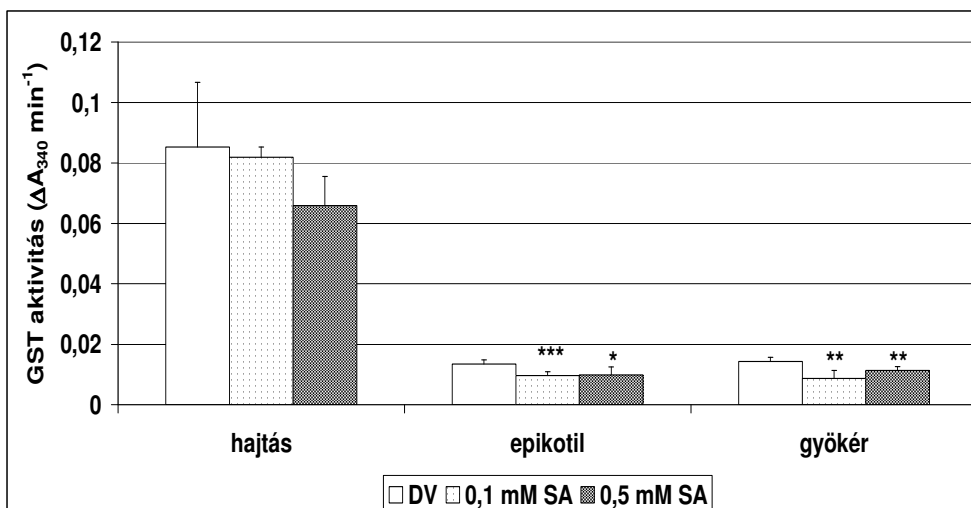
45. ábra. Szalicilsavas áztatás hatása a guaiacol-peroxidáz enzim aktivitására borsóban. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Az APX esetében a hajtásmintákban magasabb az enzim aktivitása (kb. másfél-kétszeres), mint a gyökérben illetve az epikotilban, viszont a kezelés hatására nem változott szignifikánsan az érték (46. ábra). Az epikotilban a 0,5 mM SA-kezelés hatására emelkedett az aktivitás, a gyökérben pedig csökkenés figyelhető meg.



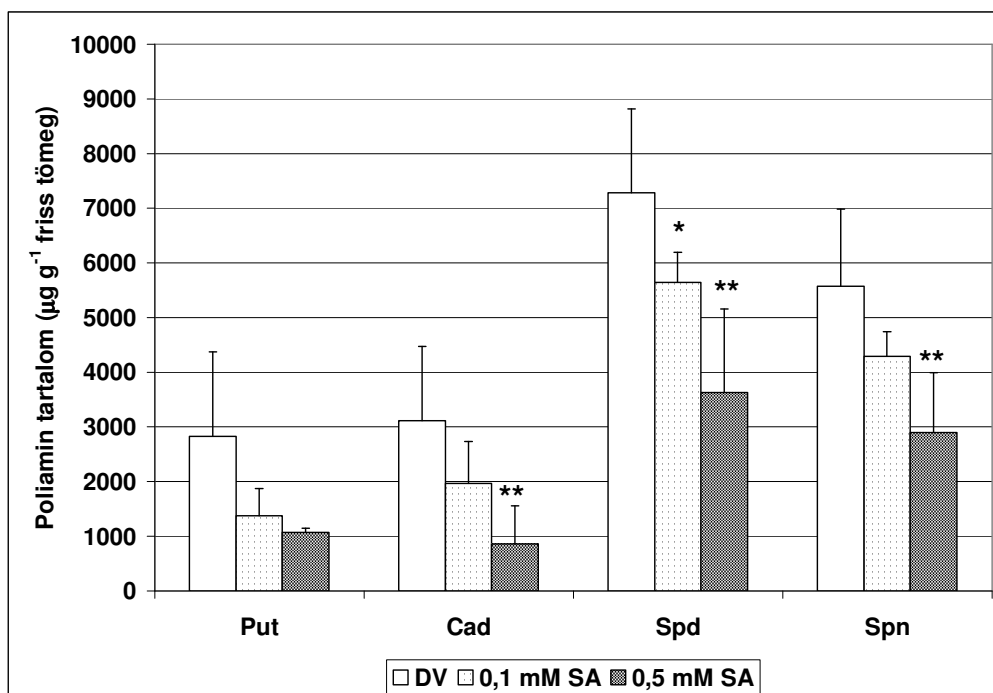
46. ábra. APX aktivitásának változása 1 hetes borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A GST-aktivitás a hajtásban volt a legmagasabb, kb. nyolcszorosa az epikotilban és a gyökérben mért értékeknek, viszont a hajtásban mért aktivitások nem mutattak szignifikáns eltérést a SA-kezelés hatására. Az epikotil illetve a gyökér minták eredményein azonban statisztikailag szignifikáns az enzim aktivitásának a csökkenése (47. ábra). A különböző SA koncentrációk nem befolyásolták a csökkenés mértékét, nagyjából azonos mértékűek voltak.

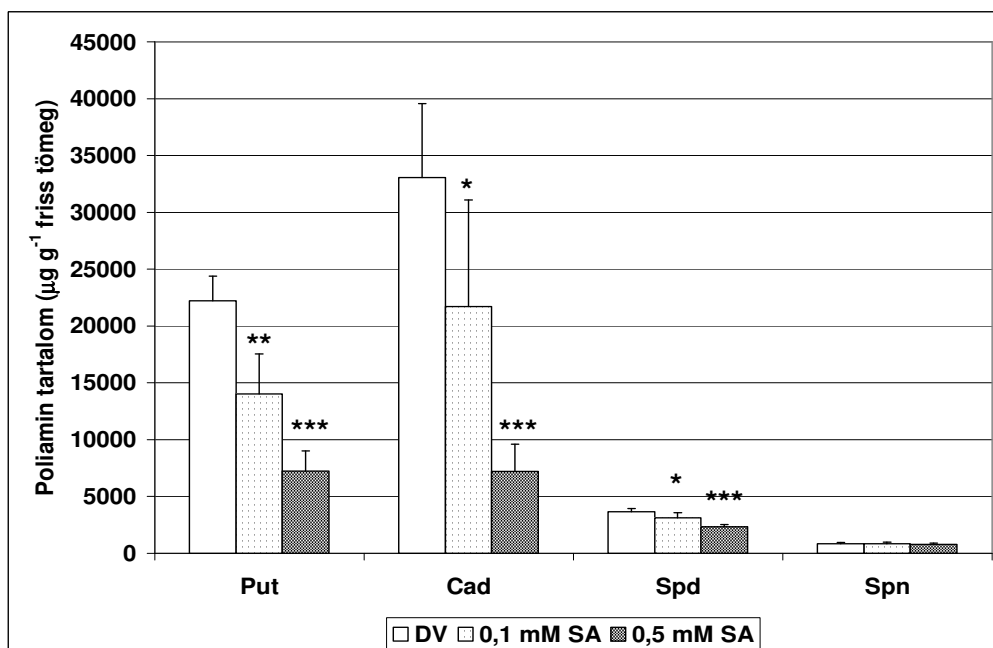


47. ábra. GST aktivitásának változása 1 hetes borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *,**,***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

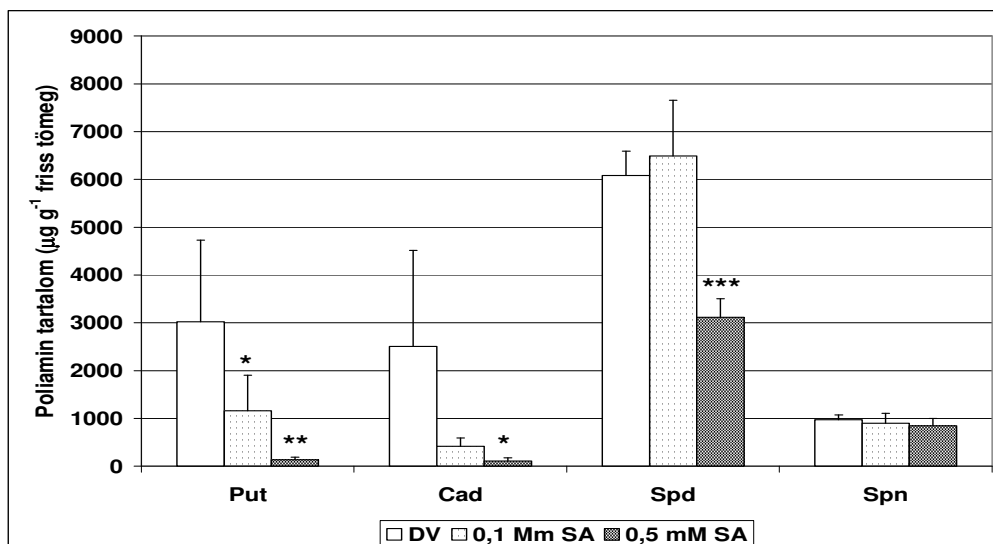
Poliaminok: Az antioxidáns enzimek után mértük a poliaminok szintjét, mivel ezek makromolekulákhoz kapcsolódva stabilizálhatják azok szerkezetét, ezáltal védve őket stressz során. Az analízisekhez hajtást, epikotilt, gyökeret, illetve magvakat használtunk, a vizsgált poliaminok a putreszcein, a kadaverin, a spermidin és a spermin voltak. A hajtásban mindegyik poliamin szintje csökkent az áztatás hatására (48. ábra), bár a putreszcein értékek nem voltak statisztikailag szignifikánsak. A legnagyobb mennyiségben a spermidin volt jelen. Az epikotilban a putreszcein, cadaverin, spermidin szintjében csökkenés figyelhető meg az áztatás hatására (49. ábra), míg a sperminszint nem változott. Legjelentősebb eltérés a 0,5 mM SA-kezelt mintákban figyelhető meg. A legnagyobb mennyiségben a cadaverin van jelen. A gyökérben a poliaminok mennyisége csökkent, csak a spermin szintjében nem figyelhettünk meg szignifikáns eltérést (50. ábra). Ebben a növényi részben is a 0,5 mM SA-kezelés hatására történt a legjelentősebb csökkenés. A spermidin volt jelen a legnagyobb mennyiségben. A magban a spermidin és a spermin esetében jól látható a csökkenés, míg a putreszcein és cadaverin szintjében nincs szignifikáns eltérés (51. ábra). Itt is szintén a 0,5 mM SA-val kezelt mintákban volt nagyobb mértékű a változás.



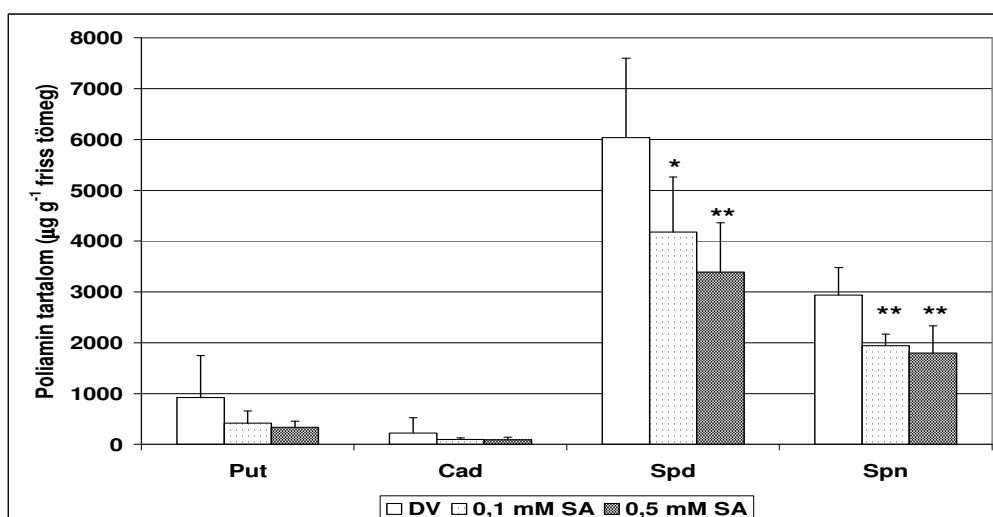
48. ábra. Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes borsónövények hajtásában a magvak szalicilsavas áztatását követően. *,**: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



49. ábra. Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes borsónövények epikotiljában a magvak szalicilsavas áztatását követően. *,**,***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

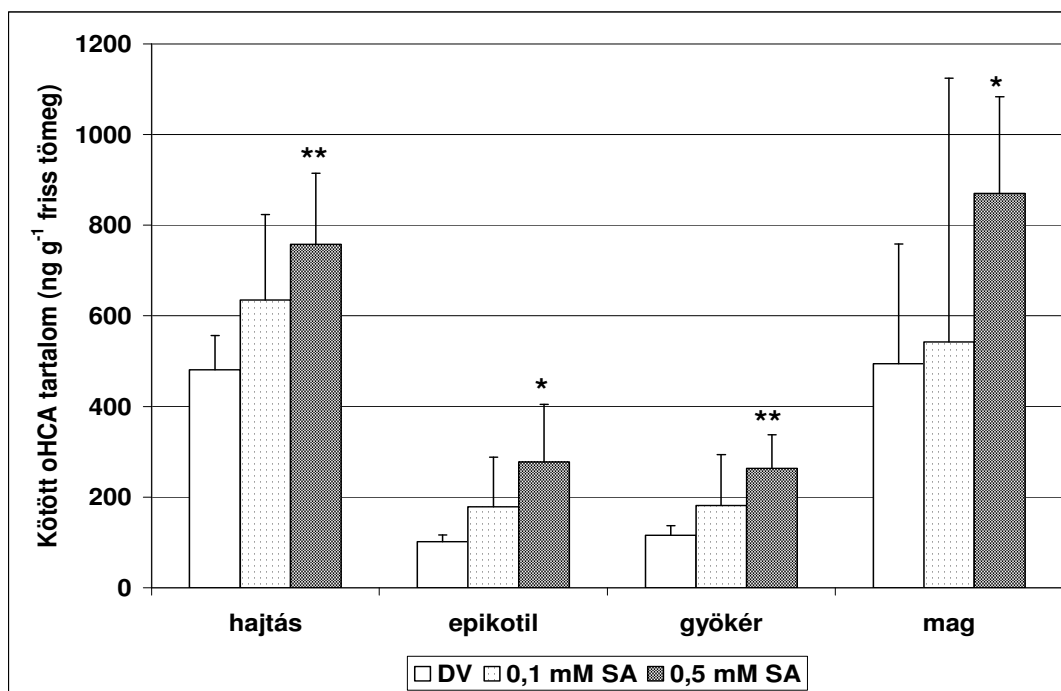


50. ábra. Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes borsónövények gyökerében a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



51. ábra. Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes borsónövények magvaiban a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

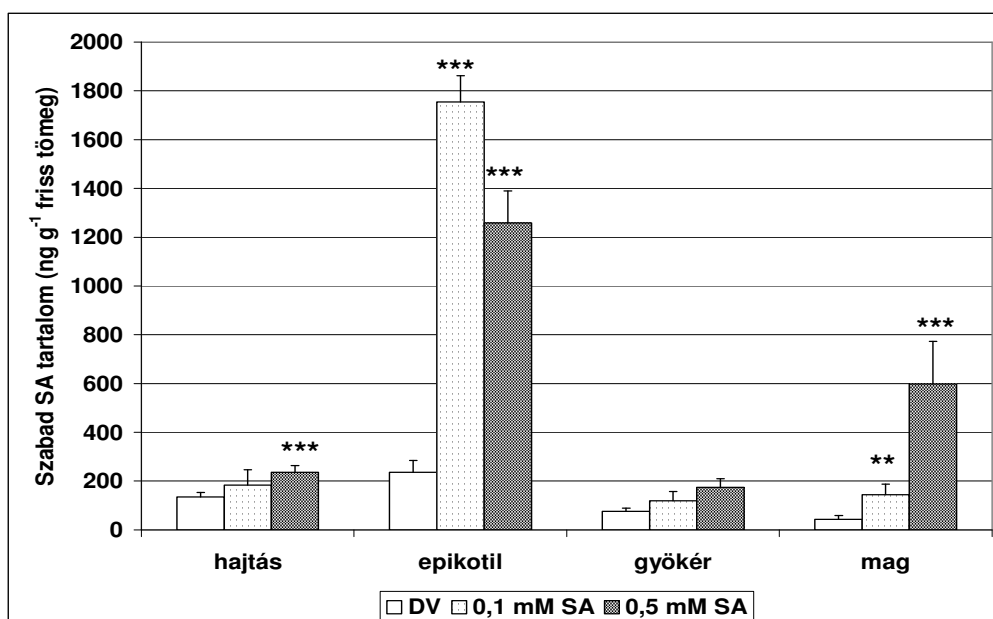
oHCA és szalicilsav: Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy a szalicilsavas áztatás hogyan befolyásolja az endogén oHCA- és SA-szintet a különböző növényi részekben. A szabad oHCA-szintje csak az epikotilban volt a kimutathatósági határ felett, de a kezelést követően nem változott szignifikánsan a mennyisége. A kötött oHCA mennyisége a gyökérben és a magban nőtt meg jelentős mértékben a szalicilsavas áztatás hatására (52. ábra), az epikotilban és a gyökérben kis mértékben emelkedett a mennyisége, a 0,5 mM SA-kezelést követően.



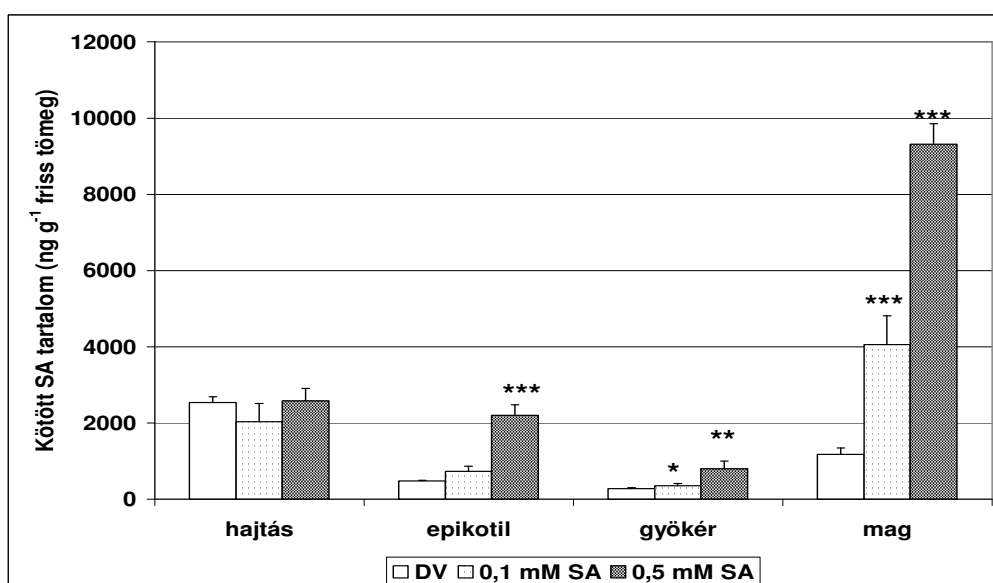
52. ábra. Kötött oHCA mennyiségének változása 1 hetes borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A hajtásban a szabad SA-tartalom $0,5 \text{ mM}$ SA-kezelés hatására kismértékben megnövekedett (53. ábra), míg a gyökérben nem változott szignifikánsan a mennyisége. Az epikotilban jelentős volt a növekedés mindkét koncentráció esetében, $0,1 \text{ mM}$ kezelést követően kilencszeres, míg $0,5 \text{ mM}$ -nál hatszorosa. A magban $0,1 \text{ mM}$ előkezelésnél kismértékű emelkedést tapasztaltunk a szabad szalicilsav szintben, míg a $0,5 \text{ mM}$ koncentrációnál ez jelentősebb mértékű volt, habár még így is harmada, fele volt az epikotilban mért értékeknek.

A kötött SA mennyisége a hajtásban nem változott szignifikánsan (54. ábra). A gyökerekben kismértékű emelkedés volt megfigyelhető, de még így is alacsonyabb volt a szintje, mint a hajtásban. Az epikotilban a $0,5 \text{ mM}$ SA-kezelésnél már kifejezettebb növekedést tapasztaltunk, de legnagyobb változás a mag esetében volt megfigyelhető. A kontrollhoz viszonyítva $0,1 \text{ mM}$ koncentrációnál kb. négyszeres, míg a $0,5 \text{ mM}$ -nál kb. kilencszeres volt a kötött szalicilsav szintje.



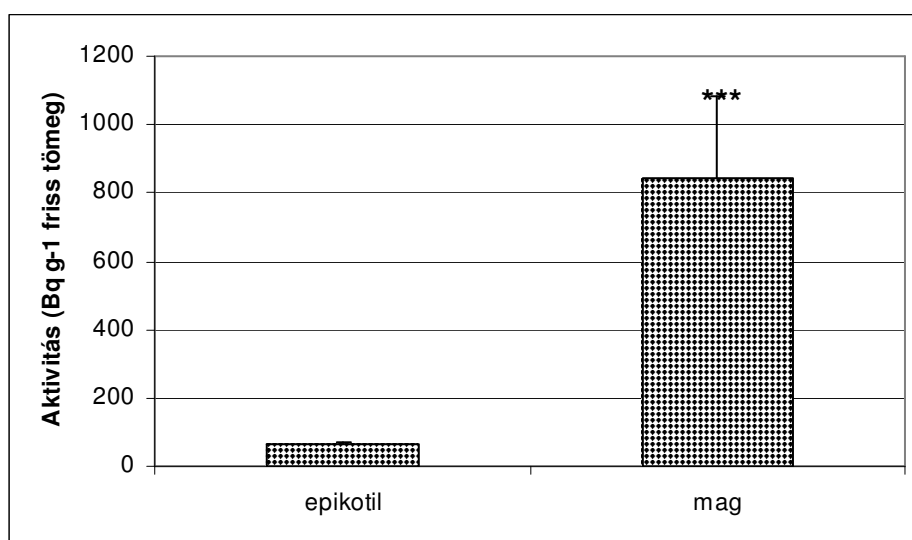
53. ábra. Szabad SA mennyiségének változása 1 hetes borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



54. ábra. Kötött SA mennyiségének változása 1 hetes borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően *,**,***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Mivel tudni szerettük volna, hogy ez a változás a szabad illetve a kötött SA-szintben a szalicilsavas magáztatás során felvett SA-ból származik-e, vagy a növény által szintetizált SA, ezért tríciummal jelölt radioaktív SA-t adtunk a 0,5 mM SA oldathoz, melyben a magvakat áztattuk 24 órán át. Az 1 hetes növényekben néztük, hogy mely növényi részben és milyen arányban jelenik meg a jelölt SA. Az eredmények a 55. ábrán láthatóak. A gyökérben és a

levélben a radioaktív SA mennyisége mind a szabad, mind a kötött forma esetében kimutathatósági határ alatt volt. Habár az epikotilban a SA-előkezelés hatására nagymértékű emelkedést tapasztaltunk a szabad SA-szintben, radioaktivitást itt sem találtunk. A kötött SA esetében viszont már megjelent a jelölés. A magvaknál is csak a kötött formánál találtunk radioaktív jelölést, de itt jelentős mértékben halmozódott fel a jelölt SA. Ha a 0,5 mM SA-előkezelésnél nézzük a kötött SA arányát az epikotil és a mag esetében, akkor a magban kb. ötszörös a kötött SA mennyisége, viszont a radioaktivitás mértéke a magban kb. 13-szorosa az epikotilban levőnek. Tehát az előkezelés során felvett SA-t a borsónövény a növekedés kezdeti szakaszában a magban kötött formává alakítja és az endogén szalicilsav az egyéb növényi részekben nagyrészt *in vivo* szintézisből származik.



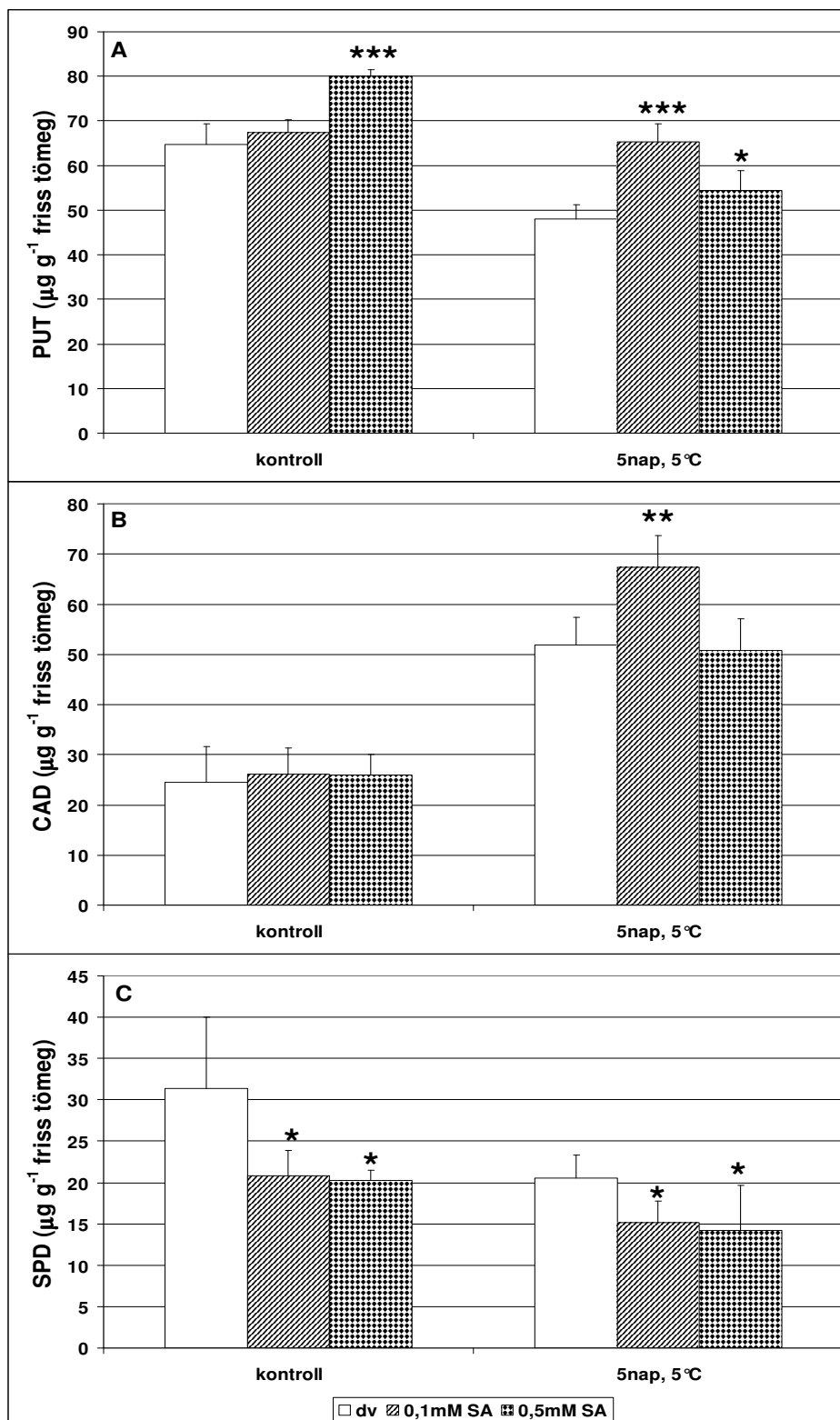
55. ábra. Kötött SA mennyiségének változása 1 hetes borsó növényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően (***:szignifikáns $p \leq 0,001$ szinten).

5.3.2. A szalicilsavas magáztatás hatásai alacsony hőmérsékleten kukoricában

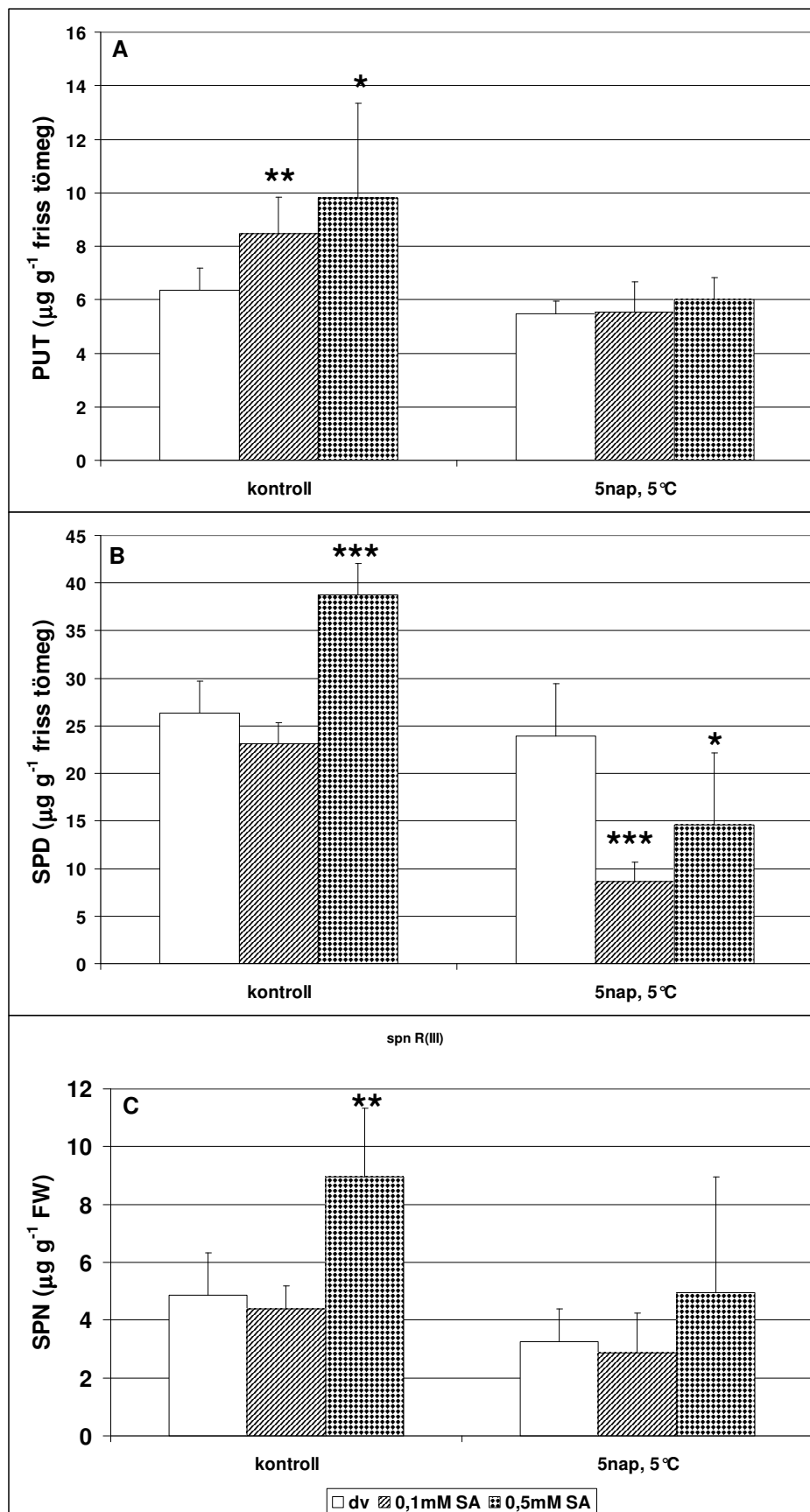
A kísérletekhez 1 hetes kukoricanövényeket használtunk, a nevelési körülmények a 4.1.3. fejezetben találhatóak. A SA-kezelés hatására sem a friss, sem pedig a száraztömeg nem változott (az adatok nincsenek feltüntetve). A növényeket az 1 hetet követően 5 napra 5 °C-ra helyeztük, hogy lássuk, stresszkörülmények között milyen változások történnek a SA magáztatás hatására.

Poliaminok: A poliaminok közül levélben a CAD mennyisége emelkedett meg jelentősen hideg hatására és a SA-kezelt növényekben ez még kifejezettebb volt (55B. ábra). A Put mennyiség 0,5 mM SA-kezelés hatására megemelkedett a kontrollhoz viszonyítva (55A. ábra), de a hideghatást követően mennyisége csökkent, igaz, a SA-kezelt növényekben magasabb maradt, mint a kezeletlenekben. A Spd mennyisége lecsökkent SA-kezelés hatására (55C. ábra), és az 5 °C-ot követően további csökkenés volt megfigyelhető. A Spn mennyisége nem változott a kezelések hatására. A gyökérben a Put-szintje megemelkedett mindkét koncentrációjú SA-kezelés hatására (56A. ábra), 5 °C-on viszont lecsökkent. A Spd (56B. ábra) és a Spn (56C. ábra) mennyisége 20 °C-on megemelkedett 0,5 mM SA hatására, míg hidegben a Spd jóval a kontroll szintje alá míg a Spn a kontroll szintjére csökkent. A Cad mennyisége nem változott a kezelések hatására.

Antioxidáns enzimek: A membránok védelmében szerepet játszó poliaminok után az antioxidáns rendszerre kifejtett hatást vizsgáltuk. A borsóval ellentétben az antioxidáns enzimek aktivitása nem változott 20 °C-on a SA-kezelt növényekben és a hideg hatására (5 nap 5 °C) sem volt különbség a kezelések között.

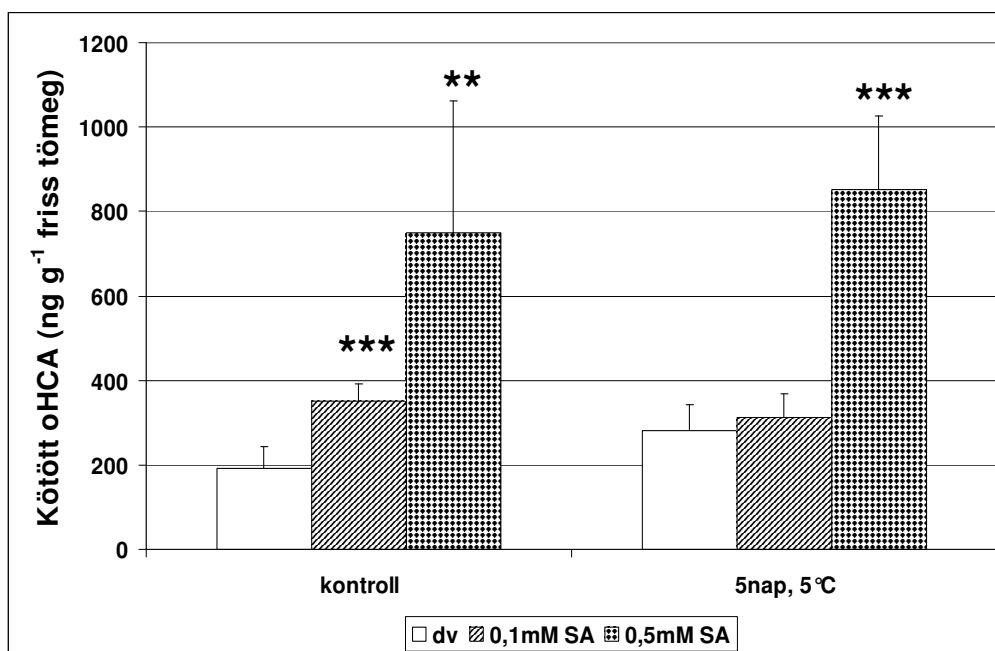


55. ábra Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes kukoricanövények levelében kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően *,**,***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



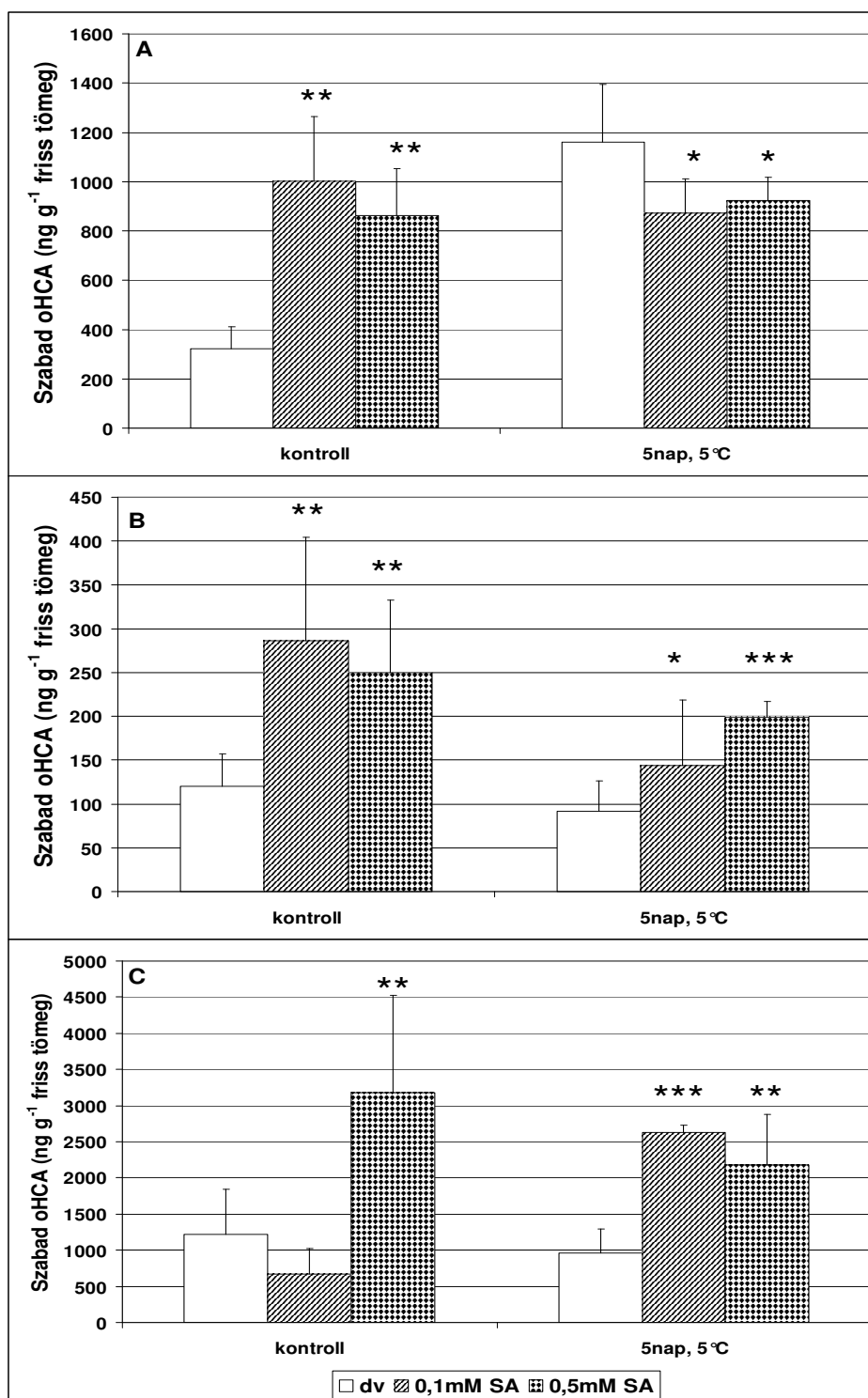
56. ábra Poliaminok mennyiségének változása 1 hetes kukoricanövények gyökerében kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Szalicilsav és oHCA: A kötött oHCA mennyisége csak a magban változott a SA-kezelést követően, 0,1 mM koncentrációnál kb. kétszeresére, 0,5 mM-nál kb. négyszeresére nőtt (57. ábra), a hidegkezelés során viszont már nem változott. A kezeletlen növényekben 5 °C-on viszont kb. kétszeresére nőtt, ezzel elérte a 0,1 mM SA-val kezelt növényekben mért szintet.



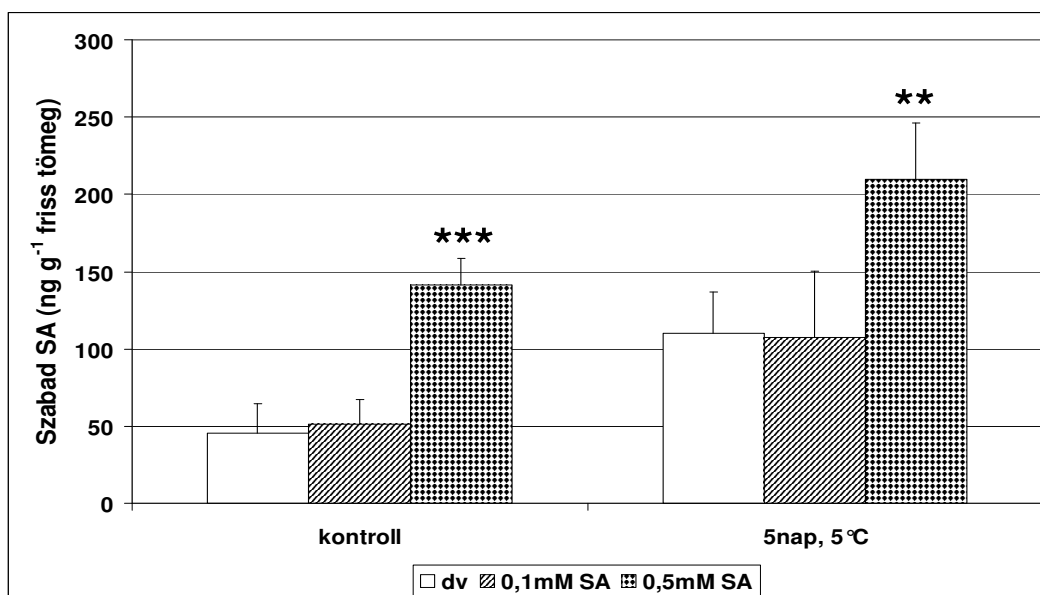
57. ábra. Kötött oHCA mennyiségének változása 1 hetes kukoricánövények magvaiban kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A szabad oHCA-szintje minden növényi részben megemelkedett a SA-kezelés hatására, a levélben (58A. ábra) és a magban (58C. ábra) kb. háromszorosára, míg a gyökérben (58B. ábra) 2,5-szeresére. A magban halmozódott fel legnagyobb mennyiségben (kb. 3 $\mu\text{g/g}$ friss tömeg), míg a gyökérben csak kb. 250 ng/g volt SA-kezelést követően. Hideg hatására a levélben kezeletlen növényekben nagymértékű növekedést tapasztaltunk, elérte a SA-val kezelt növények szintjét, mely már a hideg hatására nem változott. A gyökérben és magban a kezeletlen növényekben nem változott a mennyisége 5°C-on 5 nap után sem, viszont az SA-val kezelt növényekben csökkent, bár még így is jóval több volt, mint a kezeletlen növényekben.

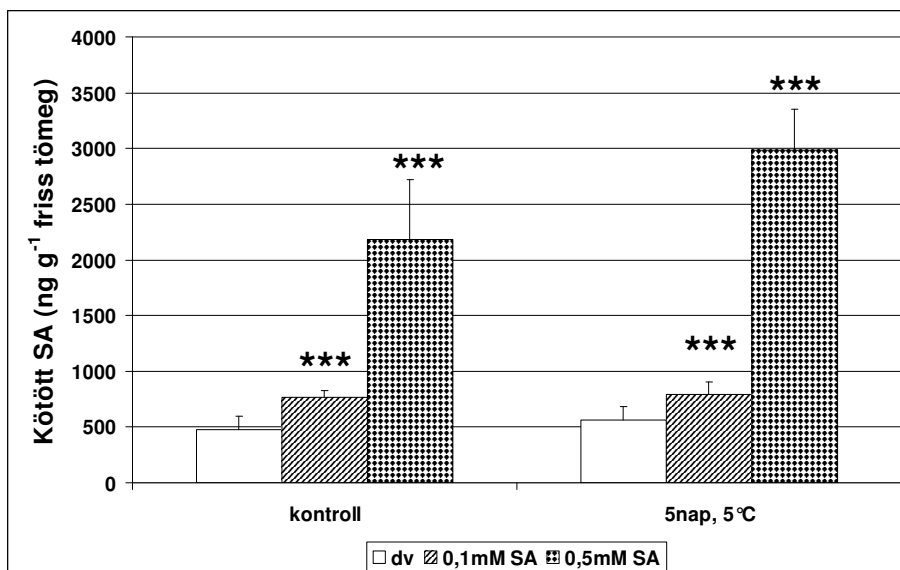


58. ábra. Szabad oHCA mennyiségének változása 1 hetes kukoricanövényekben kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$). A: levél, B: gyökér, C: mag.

A szabad és kötött SA-szintje csak a magban változott a kezelések hatására. A szabad SA mennyisége csak a 0,5 mM SA-val kezelt növényekben emelkedett meg 20 °C-on kb. háromszorosára és hideg hatására ez még fokozódott (59. ábra). A kezeletlen növényekben és a 0,1 mM SA-val kezeltékben 5 nap 5 °C után kb. kétszeresére nőtt a mennyisége, de még így is csak fele volt a 0,5 mM-mal kezeltékhez képest. A kötött SA mennyisége már 0,1 mM SA-kezelés után is kismértékben megemelkedett (60. ábra), de hideghatásra ugyanezen a szinten maradt. A kezeletlen növényekben sem tapasztaltunk változást a kötött SA-szintben hideg hatására. A 0,5 mM kezelésnél viszont azt tapasztaltuk, hogy a kötött SA mennyisége kb. négyszeresére emelkedett a kontrollhoz képest és hideghatására még tovább nőtt, mintegy hatszorosa volt a kontrollnak.



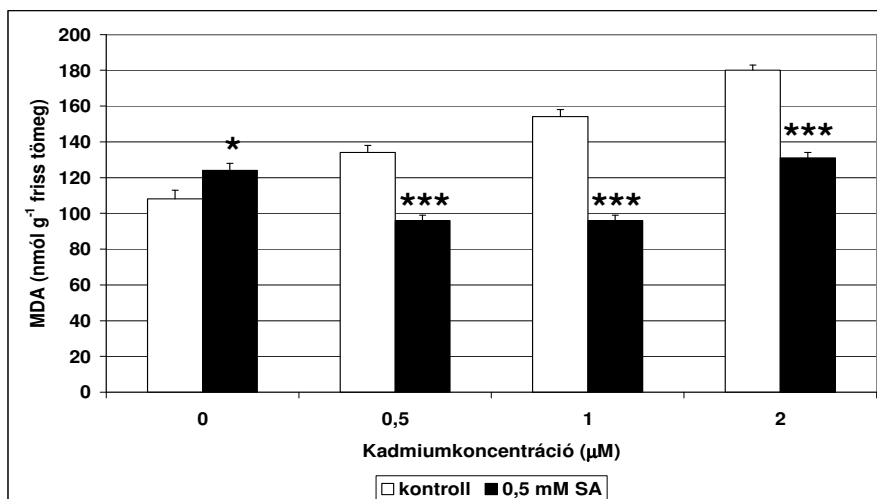
59. ábra. Szabad SA mennyiségének változása 1 hetes kukoricanövények magvaiban kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően. **,***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



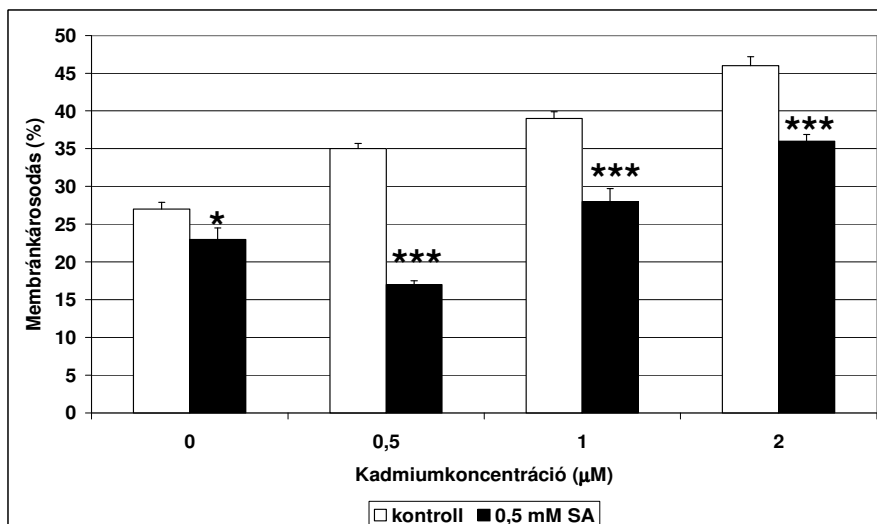
60. ábra. Kötött SA mennyiségének változása 1 hetes kukoricanövények magvaiban kontroll és alacsony hőmérsékleti körülmények között a magvak szalicilsavas áztatását követően. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.3.3. A szalicilsavas magáztatás hatásai Cd-stressz során borsóban és kukoricában

A hideg után Cd-kezelést követően néztük a szalicilsavas magáztatás hatásait. Kísérleteinket borsóval végeztük, a növénynevelés és a Cd-kezelés körülményei a 4.1.4. fejezetben találhatóak. Először a lipidperoxidációt mértük az oxidatív stressz jellemzésére. A SA hatására a Cd-mal nem kezelt növények levelében kismértékű emelkedést tapasztaltunk az MDA-szintben, a Cd kezelés során viszont az SA előkezelt növényekben jóval kisebb volt (61. ábra). Párhuzamosan mértük az elektrolit kiáramlást is a membránsérülések jellemzésére, s azt tapasztaltuk, hogy az SA-val kezelt növényekben ezek az értékek alacsonyabbak voltak (62. ábra). Tehát az SA-előkezelés mérsékelte a Cd okozta oxidatív stresszt és a membránkárosodást is.

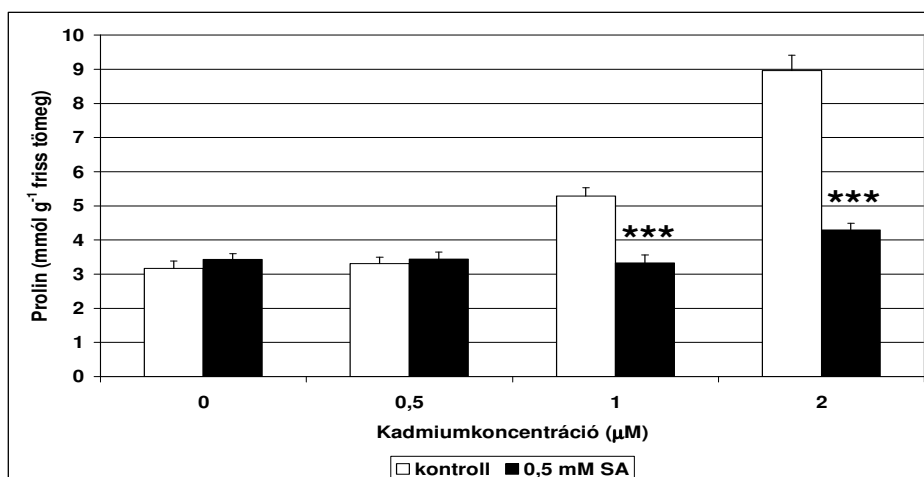


60. ábra. A MDA mennyiségének változása 12 napos Cd-on nőtt borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően *,***: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



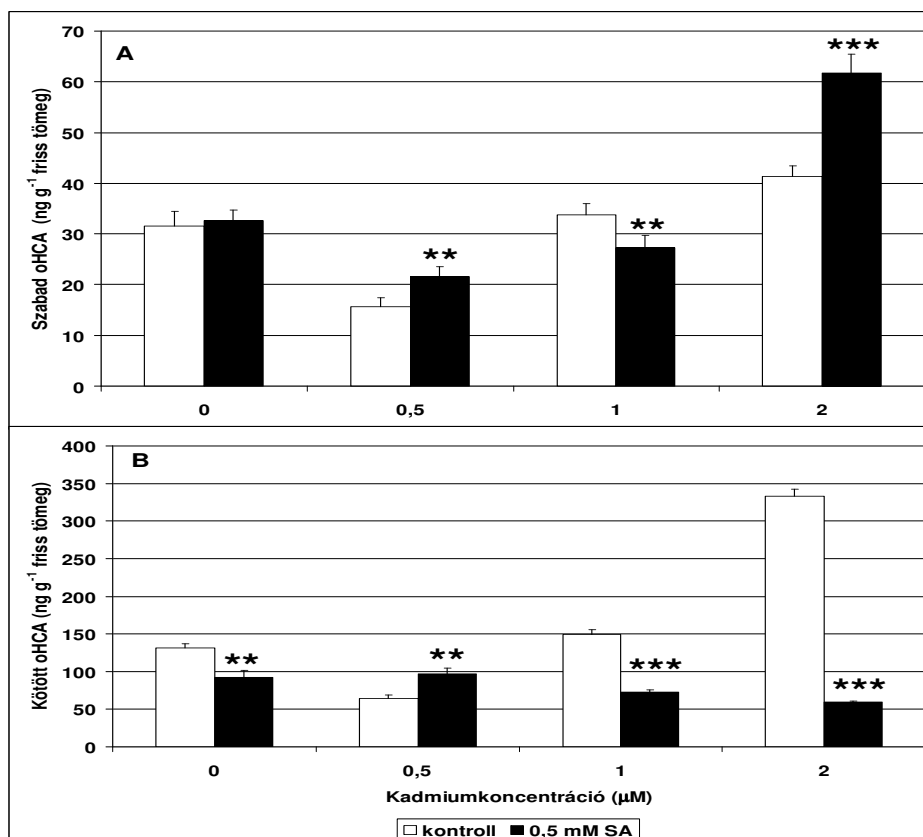
61. ábra. A membránkárosodás változása 12 napos Cd-on nőtt borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *,***: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Ismert, hogy a prolin védelmet nyújthat különböző abiotikus stresszhatások folyamán. Az SA előkezelt növényekben csak a legmagasabb Cd koncentrációnál tapasztaltunk kisebb mértékű felhalmozódást a Cd-mal nem kezelt növényekhez képest (62 ábra), míg az SA-val nem előkezelt növények esetében már $1 \mu\text{M}$ Cd koncentrációtól megnőtt a mennyisége a növények leveleiben.



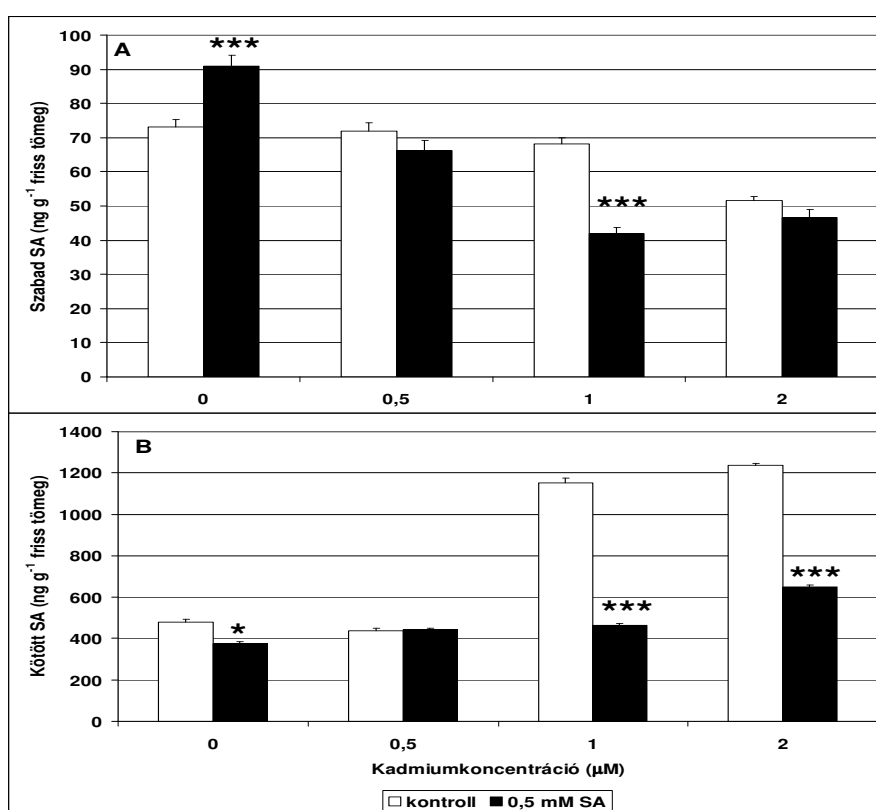
62. ábra. A prolin mennyiségének változása 12 napos Cd-on nőtt borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Szalicilsav és oHCA: Mind a szabad, mind a kötött oHCA mennyisége csak a legmagasabb Cd koncentrációnál nőtt meg jelentősen, de míg a szabad oHCA a SA előkezelt növények leveleiben (63A. ábra), addig a kötött a kezeletlenekében mutatott jelentős növekedést (63B. ábra).



63. ábra. A szabad (A) és kötött (B) oHCA mennyiségének változása 12 napos Cd-on nőtt borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A szabad SA-szint a SA-előkezelés hatására kismértékben megemelkedett, de a Cd koncentráció növekedésével csökkent (64A. ábra), míg az SA-val nem előkezelt növényekben csak később kezdett el csökkenni, de a legmagasabb Cd koncentrációnál már azonos mennyiséget mértünk az SA előkezelttel. A kötött SA mennyisége alacsonyabb koncentrációknál nem változott az SA-előkezelés hatására, a legmagasabb koncentrációnál is csak kismértékű emelkedést tudtunk kimutatni (64B. ábra). A SA-val nem előkezelt növényeknél viszont a magasabb koncentrációknál jelentős, kb. háromszoros növekedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest.



64. ábra. A szabad (A) és kötött (B) SA mennyiségének változása 12 napos Cd-on nőtt borsónövényekben a magvak szalicilsavas áztatását követően. *, **, ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Fitokelatinok és fitokelatin-szintáz aktivitás: A levelekben nem találtunk változást sem a magáztatásos SA-előkezelés, sem a hosszútávú Cd-kezelés hatására a PC₂ mennyiségében, míg a gyökerekben Cd-kezelés hatására megnőtt a mennyiségük, de az SA előkezelt és kezeletlen növények közt nem volt különbség. A fitokelatin-szintáz aktivitása nem változott sem a Cd, sem az SA-előkezelés hatására.

A kísérleteket elvégeztük kukoricával is, és nagyon hasonló eredményeket kaptunk (adatok nincsenek feltüntetve). A SA-előkezelés itt is csökkentette a lipidperoxidációt és a membránkárosodás mértékét, valamint az SA-val előkezelt növények prolintartalma nem változott, míg a kezeletleneké megnőtt Cd hatására. Itt sem találtunk változást a levelekben sem a SA-előkezelés, sem a Cd-kezelés hatására a PC_2 mennyiségében, míg a gyökerekben Cd-kezelés hatására megnőtt a mennyiségük, de itt sem volt különbség az SA előkezelt és kezeletlen növények közt. A fitokelatin-szintáz aktivitása sem változott sem a Cd, sem az SA-előkezelés hatására. A szabad SA-szint a SA-előkezelés hatására itt is kismértékben megemelkedett, de a Cd koncentráció növekedésével csökkent, míg az SA-val nem előkezelt növényekben kukoricában is csak később kezdett el csökkenni. A kötött SA mennyisége viszont kb. hatszorosára nőtt 10 mM Cd hatására, de a magasabb Cd koncentrációknál csak kb. háromszoros emelkedést tapasztaltunk az SA-előkezelés hatására. A SA-val nem előkezelt növényeknél a magasabb koncentrációknál itt is jelentős, kb. tízszeres növekedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest.

6. Eredmények megvitatása

6.1. A külsőleg, tápoldathoz adagolt, szalicilsav hatásai

6.1.1. Alacsony hőmérsékleti stressz

Csoportunk volt az első, aki kimutatta, hogy a tápoldathoz adagolt 0,5 mM SA-előkezelés hatására a fiatal kukoricanövények hidegkárosodása kisebb mértékű volt. Ezen védőhatás a látható különbségek mellett klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterekben (F_v/F_m , $(F_m' - F_s)/F_m'$) is megnyilvánult, valamint a szalicilsav-kezelt növények esetében a hidegkárosodás eredményeként fellépő elektrolit kiáramlás lényegesen kisebb volt. Azt is kimutattuk, hogy a CAT aktivitása lecsökkent, mellyel párhuzamosan kismértékű emelkedést tapasztaltunk a POD enzim aktivitásában. Az APX és SOD enzimek aktivitásának változásában nem kaptunk szignifikáns eltérést (Janda és mtsai, 1999). A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy még milyen folyamatok állhatnak az SA hideg elleni védőhatásának a hátterében. Ismert, hogy a poliaminoknak szerepe van a különféle stresszhatások elleni védelemben (Bouchereau és mtsai, 1999). A háromnapos alacsony hőmérsékleti kezelés hatására a putreszcin (Put) szint megemelkedett, míg az SA előkezelt növényekben már normál hőmérsékleten nagyobb mértékű növekedést tapasztaltunk, mely a hideg hatására már nem változott (Németh és mtsai, 2002). Mások is tapasztaltak Put növekedést alacsony hőmérsékleten zöldségekben és gyümölcsökben (Kramer és Wang, 1989), valamint mi is kimutattuk korábban, hogy az alacsony hőmérsékleten fellépő fotoinhibíció hatására a Put-szint megnő kukoricában (Szalai és mtsai, 1997). A Put-ről kimutatták, hogy hidegstressz során képes antioxidáns enzimekhez (pl. szuperoxid-dizmutázhoz) kötődni, vagy antioxidáns tulajdonságú molekulákkal konjugátumokat képezni, ezáltal segítve mozgásukat sejten belül az oxidatív stressz helyéhez (Bouchereau és mtsai, 1999). A spermidin szintje nem változott sem a 3 napos 5 °C-os hőmérséklet, sem az SA-előkezelés hatására. Viszont az SA előkezelt növényekben a hideg hatására megnőtt a szintje, míg a sperminé kismértékben lecsökkent. Cukkiniben is kimutatták, hogy alacsony hőmérséklet hatására a spermidin és a spermin mennyisége megemelkedett (Kramer és Wang, 1989). Ismert, hogy a hidegstressz lipidperoxidációt okozhat, a spermidin és a spermin pedig védelmet nyújthat a membránoknak azáltal, hogy egyrészt meggátolja a foszfolipidek lipid kettősrétegen keresztüli mozgását, valamint stabilizálják a tilakoid membránok molekula komplexeit (Popovic és mtsai, 1979; Besford és mtsai, 1993). Ezekből az eredményekből megállapíthatjuk, hogy a SA előkezelt

növények alacsony hőmérsékleten megemelkedett putreszcin és spermidin szintje szerepet játszhat a hidegstressz elleni védelemben.

Számos hidegérzékeny növény esetében kimutatták, hogy hidegstresszt követően etiléntermelés indul be (Tong és Yang, 1987). Ezen etiléntermelés fiziológiai jelentősége nem ismert, pillanatnyilag úgy tűnik, hogy csupán egy stresszfolyamatokat kísérő "melléktermék", mert sem védő, sem szabályozó funkcióját nem mutatták ki hidegstresszel kapcsolatban, de nem is járult hozzá a hidegkárosodási tünetek kialakulásához. Az alacsony hőmérséklet az etilén prekursorának, az ACC-nek a mennyiségére is hat, fokozva az ACC-szintáz aktivitását. Kimutatták azt is, hogy fiatal kukoricanövényekben a magasabb ACC-tartalom nagyobb hidegkárosodással járt együtt (Janowiak és Dörffling, 1995). A magasabb ACC tartalom oka a megnövekedett ACC-szintáz aktivitás mellett az ACC-oxidáz (mely az ACC-etilén konverzióért felelős enzim) inaktíválása lehet, mely a membránkárosodás következménye (Etani és Yoshida, 1987). Szalicilsavról azt is kimutatták, hogy bizonyos rendszerekben képes az ACC etilénné való átalakulását meggátolni (Leslie és Romani, 1986). A hideg-indukált etilénszintézis jelentkezhethet akkor is, ha a növények a hidegperiódus után visszakerülnek normál hőmérsékletre (Kimmerer és Kozlowski, 1982).

A tápoldathoz adagolt SA védőhatásának további tanulmányozásához fiatal kukoricanövények egy részét 4 napig 11/13 °C-on hidegedztük, majd 4 napig 5 °C-on tartottuk. Az ACC folyamatosan emelkedett a 4 napos hidegkezelés során a nem kezelt kukoricanövények levelében. A SA előkezelt növények levelében kisebb mértékű emelkedést tapasztaltunk (Szalai és mtsai, 2000). Ezek az adatok jól korreláltak azzal, hogy a szalicilsav nem csökkentette a kontroll (nem hidegkezelt) növényekhez viszonyított etilénprodukción, viszont a hideg-indukálta etilénprodukción kisebb mértékű volt a szalicilsavval kezelt növényekben, mint a kezeletleneknél (Janda és mtsai, 1999). Ha az 1-4 napos hidegkezelt növények átlag ACC tartalmát nézzük, akkor az SA előkezelt növények ACC tartalma 53%-a volt a kontroll növényekének, habár szignifikáns különbség nem volt a normál hőmérsékleten nevelt növények között. A 4 napos 13/11 °C-os hidegedzést követő 5 °C-os hőmérséklet nem okozott ACC felhalmozódást sem a kontroll, sem a SA-előkezelt növények levelében. Ebből arra következtethetünk, hogy az ACC tartalom a hidegérzékenység egyik jó markere a kukorica hidegkárosodásának. A gyökerekben az ACC tartalom nem változott sem a hidegedzett, sem a SA előkezelt növényekben. Itt a SA-előkezelés helyettesítette a hidegedzést, ellentétben a levelekkel. A gyökerek sikeres akklimatizációja az alacsony hőmérséklethez meghatározó a növény hideg utáni növekedése, víz- és tápanyagfelvétele, valamint azoknak a hajtásba való transzportja szempontjából. A gyökerek

megnyúlása nagyon érzékeny etilénre, így az ACC tartalom csökkenése nagyon fontos lehet a hatékony gyökérnövekedés szempontjából, hogy a növény a hideghatás után maximálisan ki tudja használni a talaj erőforrásait. Mások is tapasztaltak ACC növekedést hideg hatására kukorica hibridekben és vonalakban (Janowiak és Dörffling, 1995, 1996), s ez a növekedés pozitív korrelációt mutatott a hidegérzékenységgel (Janowiak és Dörffling, 1996). Ezt alátámasztja az a megfigyelés is, hogy azokban a kukoricanövényekben, melyek toleránsabbak voltak az alacsony hőmérséklettel szemben (Janowiak és Dörffling, 1996; Janda és mtsai, 1998) kisebb mértékű ACC felhalmozódást lehetett megfigyelni hidegstressz hatására. Ehhez hasonlóan a nem hidegedzett, de szalicilsavval kezelt növényekben is kevesebb ACC halmozódott fel. A szalicilsav ACC-tartalom csökkentő hatása főleg a hidegperiódus első három napján volt különösen jól megfigyelhető a gyökerekben, viszont a hidegedzett növényekben az SA már nem okozott további ACC csökkenést.

Néztük az ACC malonil-konjugátumának (MACC) változásait is. Hidegedzés hatására az MACC tartalom megnőtt levelekben, s hideg hatására tovább növekedett kezdetekben. Nemcsak kukoricában, de búzában is megfigyelték MACC akkumulációját alacsony hőmérsékleten. Az ACC-vel ellentétben azonban az MACC tartalom nem korrelált a hidegtűréssel sem kukoricában (Janowiak és Dörffling, 1996), sem búzában (Machácková és mtsai, 1992). A nem edzett növények gyökerének MACC tartalma csökkent hidegstressz során. Búzában az edzés során MACC akkumulációt tapasztaltak (Machácková és mtsai, 1992), de kukoricában ez nem volt megfigyelhető, a hidegedzett növények gyökerének MACC tartalma sosem volt szignifikánsan nagyobb, mint az edzetleneké.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy a 0,5 mM SA-kezelés, melyről korábban kimutattuk, hogy mérsékelni tudja a hidegkárosodás tüneteit, csökkenti az ACC felhalmozódást fiatal kukoricanövényekben. Azt is megállapíthatjuk, hogy az ACC tartalom jó markere a hidegkárosodás mértékének kukoricában. Az MACC tartalomban ugyan történtek változások hideg hatására, de ez nem mutatott korrelációt a növények hidegtűrésével.

6.1.2. Szárazságstressz

Miután azt tapasztaltuk, hogy alacsony hőmérsékleti stressz alatt a SA számos olyan komponensre (antioxidáns enzimek, poliaminok, etilén, ACC) hatással van, mely védelmet nyújthat a stressz elleni védelemben, megvizsgáltuk, hogyan hat szárazságstressz alatt. A szárazságstressz tanulmányozásához tápoldatban nevelt kukoricanövényeket használtunk, PEG-gel idézve elő az ozmotikus stresszt. A SA-kezelés, hasonlóan a fentiekhez, 0,5 mM SA-

val történt 1 napig a stresszhatást megelőzően. A PEG kezelés 3 napig tartott. Mind a PEG, mind a SA-kezelés kismértékű nettó fotoszintézis csökkenést okozott. Azokban a növényekben viszont, melyek mindkét kezelést megkapták, drámai csökkenést tapasztaltunk. A sztómakonduktivitásban teljesen hasonló tendenciát tapasztaltunk. Az ionkiáramlás értékeknél is csak a mindkét kezelésen átesett növényekben tapasztaltunk emelkedést a kontrollhoz viszonyítva, mely komoly membránkárosodásra utal. Ezekből az eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a SA, mely a hidegkárosodás ellen megvédte a növényeket, a szárazságstressz során nemhogy védelmet nem nyújtott, hanem inkább felerősítette annak károsító hatását. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal, hogy a NahG transzgenikus *Arabidopsis* növények, melyek nem képesek SA felhalmozásra, jobban tolerálták a sóstresszt (mely az ionstressz mellett ozmotikus stressz is), mint a vad típus (Borsani és mtsai, 2001). Mivel búzában kimutatták, hogy az aszpirinben való magáztatás védelmet nyújtott szárazságstressz ellen és fokozta a fotoszintetikus aktivitást (Hamada, 1998), ezért a kísérleteket megismételtük búzával is, de nagyon hasonló eredményeket kaptunk, mint kukorica esetében (Németh és mtsai, 2002). Ezekből az eredményekből megállapíthatjuk, hogy az alkalmazás módja is fontos a védő- vagy károsítóhatás szempontjából. Későbbi kísérletek folyamán viszont *para*-hidroxi-benzoészav (pHBA) kezeléskor azt tapasztaltuk, hogy az megnövelte az őszi búza (Cheyenne) szárazságtűrését és fokozta a kataláz enzim aktivitását (Horváth és mtsai, 2007). Mások kimutatták, hogy a pHBA *Dactylus glomerata*-ban növelte a prolinszintet (Duran-Serantes és mtsai, 2002). Ez a megemelkedett prolin ozmotikus adaptációt eredményezhet. Korábban viszont azt találtuk, hogy különböző benzoészav származékokat vizsgálva (aszpirin, fahéjsav, benzoészav, pHBA) a pHBA volt az egyetlen, mely nem fokozta fiatal kukoricanövények hidegtűrését (Horváth és mtsai, 2002). Tehát nem csak az alkalmazás módja, hanem az alkalmazott stressz és a használt benzoészav-származék is befolyásolhatja, hogy kialakul-e védőhatás.

6.1.3. Cd-stressz

Miután azt tapasztaltuk, hogy a hideg és a szárazság elleni védelemben a tápoldathoz adagolt SA nem ugyanolyan hatást fejt ki, ezért megvizsgáltuk, hogyan hat Cd stressz során. A Cd elleni védelemben a fitokelatinoknak fontos szerepe van (Pál és mtsai, 2006a), ezért első lépésben a szintézisükhöz szükséges enzimek (γ ECS, GS, PCS) aktivitását vizsgáltuk 0,1 mM Cd-mal kezelt fiatal kukoricanövényekben. Az enzimaktivitásokat 1, 24, illetve 48 óra Cd hatás után határoztuk meg. Ezzel párhuzamosan mértük a Cd tartalmat is a gyökérben és a

különböző levélszinteken. A gyökerekben a Cd mennyisége folyamatosan nőtt a 48 óra alatt. Már a legfiatalabb levelekben is megjelent a Cd 1 óra után, de ekkor még az 1. levélben volt a legnagyobb mennyiségben. Később viszont inkább a fiatalabb levelekben akkumulálódott, de az idősebb levelekben is nőtt a Cd tartalom. Ennek ellenére az F_v/F_m paraméterben és a PS2 kvantumhatékonyságában nem tapasztaltunk változást a 48 óra alatt, tehát a 0,1 mM Cd-kezelés nem okozott elviselhetetlen stresszt a növényeknek. Nagyobb koncentrációknál (0,5, illetve 1 mM) is csak kismértékű csökkenést volt látható ezekben a paraméterekben. A γ ECS aktivitása 24 óra után mind a levélben, mind a gyökérben megnőtt, majd a 48 óra után már csökkenést mutatott, de még így is jóval magasabb volt a kontrollnál. A GS aktivitás már 1 óra elteltével megnőtt a gyökérben, de csak kismértékben, és ezen a szinten is maradt. A levélben nem tapasztaltunk változást. Korábban már kimutatták, hogy a γ ECS enzim a GSH szintézis limitáló faktora (Noctor és mtsai, 1997). Ezzel összhangban mi is azt kaptuk korábban fiatal kukoricanövények gyökerében Cd-kezelés hatására, hogy 1 nap után a γ EC-szintje lecsökkent, de a 4., illetve 7. napon megemelkedett, míg a GSH mennyisége valamennyi vizsgált napon csökkent Cd jelenlétében (Pál és mtsai, 2006b). A GSH szint csökkenésével a γ ECS felszabadulhat a GSH okozta feedback gátlás alól, és ez megmagyarázhatja a γ ECS aktivitásának késleltetett emelkedését, valamint a γ EC-szint megemelkedését (Szalai és mtsai, 2009). Ezen kívül a GS kisebb aktivitásnövekedésének lehetséges magyarázata lehet a kadmium eltérő hatása a γ ECS és a GS, mivel utóbbit a kadmium nagyobb mértékben gátolja (Hell and Bergmann 1990). Azt is kimutatták, hogy egyrészt GS túltermelő transzgenikus mustár növényekben a GSH és a PC szint megnőtt Cd hatására (Zhu és mtsai, 1999a), γ ECS-t túltermelő transzgenikus mustár növényekben a γ EC-, a GSH- és a PC-szint is megemelkedett (Zhu és mtsai, 1999b), tehát mindkét enzim limitáló faktor lehet a fitokelatinok termelése szempontjából Cd-stressz alatt. A fitokelatinok megjelenése a nehézfémstressz egyik korai figyelmeztető jele a növényekben (Keltjens és van Beusichem, 1998). Gyors akkumulációjuk feltételezi, hogy a PCS enzim folyamatosan jelen van a növények gyökerében (Grill és mtsai, 1989). Mások azt tapasztalták, hogy az enzim paradicsomnövények levelében csak a kadmiumnak kitett növényekben szintetizálódott (Reese és mtsai, 1992; Chen és mtsai, 1997). Eredményeink hasonló következtetésre vezethetnek minket, mivel a kukoricalevélben kismértékű PCS aktivitásokat mértünk, és feltételezhetően ez nem elegendő ahhoz, hogy az *in vivo* PC₂ szintet megemelje. Az általunk is tapasztalt aktivitás gátlás 48 óra után a kukorica gyökerében kadmium jelenlétében azzal magyarázható, hogy a PC-ok szintézise önszabályozó módon történik, ahogy a reakció

terméke (PC) kelátot képez a nehézfémekkel, a PCS az aktiváló nehézfém hiányában inaktívvá válik (Loeffler és mtsai, 1989). Kísérletünkben a gyökér *in vivo* PC szintje már 1 óra után megemelkedett, így feltételezhető, hogy a reakcióelegyben jelenlévő fitokelatinok kelátot képeztek a kadmiummal, és a kontrollhoz képest alacsonyabb PCS aktivitások mértünk a kadmiummal kezelt növények gyökerében (Szalai és mtsai, 2002). Hasonló eredményeket kaptunk szintén kukoricában hosszabb távú Cd-kezelés esetén is (Pál és mtsai, 2006b). Tehát megállapíthatjuk, hogy kadmiumkezelés hatására az *in vivo* PC2 szint megemelkedett a kukorica gyökerében. A megemelkedett fitokelatinszint felelős lehet a kadmium hatékony detoxifikálásában, vakuoláris kompartmentalizációjában a gyökérben. A gyökérben a kontrollhoz képest tapasztalt *in vitro* PCS aktivitás csökkenés a fitokelatinok gyors akkumulációjával magyarázható. Eredményeink megerősítik azt a feltételezést, hogy míg a gyökérben a PCS enzim jelenléte konstans, addig a levélben a kadmium jelenléte szükséges a szintézisének indukciójához (Szalai és mtsai, 2002; 2005).

Mindezek után azt vizsgáltuk, hogyan hat a SA-előkezelés Cd-stressz során. Általánosságban elmondhatjuk, hogy egy adott növényfaj érzékenysége Cd-ra a koncentráción, a kezelés hosszán, a növény korán, valamint a vizsgált növényi részen múlik. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a 0,1 mM Cd rövidtávon nem okozott túl nagy stresszt a növénynek, ezért, hogy a SA hatását jobban lássuk, 0,5 mM Cd-kezelést alkalmaztunk. A 0,5 mM SA-at egy nappal a nehézfém kezelés előtt adtuk a tápoldathoz és a Cd-kezelés előtt eltávolítottuk, vagy pedig a Cd-mal együtt kapta a növény. Azt tapasztaltuk, hogy mind a SA-előkezelés, mind a Cd-mal együtt adott SA nagymértékben csökkentette a gyökér Cd-tartalmát (Szalai és mtsai, 2005). A gyökerek kismértékű Cd-tartalom csökkenéséről kukorica magvak SA-magáztatásos előkezelését követően is beszámoltunk (Krantev és mtsai, 2008). A gyökerek életképességét a SA-kezelés a Cd-kezeléshez hasonló mértékben csökkentette, míg SA+Cd hatására még nagyobb mértékű csökkenést tapasztaltunk. *Arabidopsis* növények vizsgálatánál azt találták, hogy NahG növények, melyek bontják a SA-t, emiatt nem nő meg az endogén SA-szintjük, jobban tolerálták a Cd-stresszt, mint a vad típus (Zawoznik és mtsai, 2007). Hasonló eredményre jutottak NaCl-stressz esetében is (Borsani és mtsai, 2001). Tehát a megnövekedett SA-szint fokozta a Cd-kiváltotta oxidatív stresszt. Korábbi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a SA védőhatása elég szűk koncentrációtartományban érvényesül. Ez alatt nem hatásos, felette pedig kifejezetten káros. A védőhatást kifejtő koncentrációtartomány nemcsak az adott növényfajtól függ, hanem az alkalmazott abiotikus stressz fajtáján is (Horváth és mtsai, 2007a). Mi is azt tapasztaltuk, hogy a gyökérben a POD, az APX és a GR aktivitás jóval nagyobb volt a SA-val és Cd-mal

egyidőben kezelt növényekben, mint a csak Cd-mal kezeltékben. Maga a SA-kezelés is fokozta ezeknek az enzimeknek az aktivitását, ami szintén megnövekedett oxidatív stresszre utal. Mások azt találták, hogy árpanövények hosszabbtávú SA-kezelése (7 nap) 0,5, illetve 1 mM SA-val csökkentette azok klorofill- és fehérjetartalmát, valamint a gyökér- és hajtásnövekedést is gátolta. Viszont ha a növényeket csak 2 órán át kezelték SA-val, akkor nem tapasztalták ezt a gátlást, csak 6 órás kezelésnél jelentkeztek először ezek a tünetek (Pancheva és mtsai, 1996). A SA-kezelés szintén csökkentette a PCS aktivitását is a gyökerekben és a PC₂ akkumuláció sem következett be a SA-kezelt növények esetében, míg a csak Cd-mal kezelt növényeknél a csökkent PCS aktivitás ellenére megnövekedett PC₂ tartalmat találtunk. Az enzim aktivitáscsökkenésének oka lehet a termelődött PC₂ feed-back gátlása, mivel az enzim aktivitásához szükséges Cd-ionokat kelátolja. A SA-kezelés hatására tapasztalt csökkenés esetében ezt nem mondhatjuk el, hisz ott nem tapasztaltunk PC₂ felhalmozódást. Itt valószínűleg az alkalmazott SA-kezelés okozta a csökkent enzimműködést.

A levél esetében azonban teljesen más hatásokat tapasztaltunk. Annak ellenére, hogy a SA-kezelt növények levelébe több Cd jutott fel, mint a csak Cd-mal kezeltéknél, a membránkásodás mértéke csak a Cd-kezelés hatására nőtt meg szignifikánsan a kontrollhoz képest, míg a SA-val kezelt növényekében nem. A PS2 kvantumhatékonysága is kevésbé csökkent azokban a növényekben, melyek a Cd-mal együtt kapták a SA-at. Nagyobb arányú csökkenést csak az SA-előkezelés, illetve az azt követő Cd okozott. A SA-kezelés fotoszintézisvédő hatását tapasztaltuk kukoricában (Krantev és mtsai, 2008) illetve borsóban is (Popova és mtsai, 2008). Az antioxidáns enzimek közül, ellentétben a gyökérrel, csak a GR aktivitás nőtt meg a levelekben, s az is csak kismértékben. Mások is azt tapasztalták, hogy 6 órás 0,5 mM SA-kezelés csökkentette a paraquat okozta fotoszintézis gátlást (Ananieva és mtsai, 2002) és csökkentette a paraquat által kiváltott oxidatív stresszt (Ananieva és mtsai, 2004) árpában. A PCS aktivitás kicsit jobban emelkedett levelekben, amikor a SA-at együtt adtuk a Cd-mal, de a PC₂ szintben nem tapasztaltunk változást. A levélben viszont jóval alacsonyabb Cd-szint volt, mint a gyökérben, valószínűleg ezért nem tapasztaltunk PC₂ akkumulációt. Ezekből az eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a SA-kezelés eltérő hatást gyakorolhat a levélre és a gyökérre ugyanazon növényen belül is.

6.2. Az endogén szalicilsa- szint változásai különböző abiotikus stresszfolyamatok során

6.2.1. Alacsony hőmérsékleti stressz

Miután megvizsgáltuk a tápoldathoz adagolt SA hatását különböző abiotikus stresszfolyamatok során, áttértünk az endogén SA-szint változásainak tanulmányozására stressz körülmények között. Tápoldatban nevelt fiatal kukoricanövényekben vizsgáltuk a SA és egyik prekursora, az oHCA mennyiségében hideg hatására bekövetkező változásokat. A szabad oHCA-szint nem változott jelentősen, míg a kötött mennyisége megnőtt a hidegkezelés során mind levélben, mind gyökérben. Hasonlóan nagy mennyiségű kötött oHCA felhalmozódást tapasztaltunk őszibúza hidegedzése során (Janda és mtsai, 2007). A szabad SA mennyisége csak a levélben nőtt meg, a gyökérben nem változott. Szintén nem változott a kötött SA-szint sem. Mivel a kötött oHCA nagyságrenddel nagyobb mennyiségben volt jelen a levélben, mint az SA, nem valószínű, hogy csak az SA prekurzoraként funkcionált. Az is ismert, hogy nemcsak a SA, hanem egyéb benzooesav származékok, köztük az oHCA is képesek védelmet nyújtani fiatal kukoricanövényeknek a hideg ellen (Janda és mtsai, 2000; Horváth és mtsai, 2002). A hidroxifahéjsavaknak, köztük az oHCA-nak is, ismert az a tulajdonsága, hogy képesek közömbösíteni a szinglet oxigént (Foley és mtsai, 1999), így valószínűleg az oHCA-nak főleg az antioxidáns válaszban volt szerepe, függetlenül az SA bioszintézistől.

Kimutatták, hogy árpában szárazságstressz (Bandurska és Stroinski, 2005), valamint búzában sóstressz alatt (Shakirova és mtsai, 2003) SA-kezelés hatására megnő az ABA-szint. Mivel a SA-kezelés hatással volt az endogén ABA-szintre, megnéztük, hogy az ABA kezelés hogyan befolyásolja az endogén SA mennyiségét fiatal kukoricanövényekben. Az ABA-t a tápoldathoz adagoltuk 0,05 és 0,1 mM mennyiségben, majd néztük a hatását 1, 2 illetve 3 nap múlva, valamint a növények egy részét 2 nap után 1 napra 5°C-ra helyeztük. Az ABA kezelés a növények klorofilltartalmát kismértékben csökkentette, de az ionkiáramlásban nem tapasztaltunk változásokat. Viszont ha a növényeket 6 napig 5 °C-on tartottuk, akkor a 0,1 mM ABA-val kezelt növényekben kisebb ionkiáramlási értékeket mértünk, mint a nem kezeltékben. Csicsriborsóban kimutatták, hogy az ABA kezelés hatására nőtt a növények hidegtűrése és a membránban pedig a telítetlen zsírsavak aránya (Bakht és mtsai, 2006), s az ABA kezelés kismértékben helyettesítette az edzést, bár nem volt olyan hatékony, mint az alacsony hőmérsékleten történő edzési folyamat. Esetünkben is hasonló folyamatot indukálhatott, hiszen már normál hőmérsékleten megemelte számos antioxidáns enzim (GR,

GST, APX) aktivitását a gyökérben, valamint a GST aktivitást a levélben, mely közrejátszhatott abban, hogy a 0,1 mM kezelt növényekben kevésbé károsodtak a membránok. Eredményeinkkel összhangban mások is azt találták, hogy *Cynodon dactylon*-ban az ABA kezelés védett a szárazságstressz ellen, csökkentette az ionkiáramlást és a lipidperoxidáció szintjét, valamint fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását (Lu és mtsai, 2009). Azt is kimutatták, hogy az ABA kezelés serkenti különböző ozmotikumok szintézisét, mint pl. a glicin-betain vagy a szénhidrátok szintézisét alacsony hőmérsékleten (Jagendorf és Takabe, 2001), s mindez elősegítheti a növények fokozottabb hidegtűrését. Az ABA kezelés esetünkben viszont nem befolyásolta a szabad SA-szintet, és a kötött SA mennyisége is csak a kukoricanövények levelében emelkedett meg kismértékben nevelési hőmérsékleten, míg hidegben lecsökkent. Viszont gyökérben mind a szabad, mind a kötött oHCA-szint megemelkedett az ABA kezelés hatására normál hőmérsékleten, s mivel az SA-szint nem változott jelentősen, az oHCA-nak valószínűleg itt is inkább antioxidáns szerepe lehet, s nem a SA prekursoraként nőtt meg a mennyisége.

6.2.2. Szárazság- és sóstressz

A következő lépésben a szárazságstressznek az endogén SA-tartalomra gyakorolt hatásait tanulmányoztuk tápoldatban nevelt fiatal kukoricanövényekben 11 illetve 21 %-os PEG koncentrációknál. A növényeket 2 napig tartottuk ozmotikus stressz körülmények között, állapotuk jellemzésére mértük a PS2 kvantumhatékonyságát. Már a 11%-os PEG hatására is lecsökkent ez a paraméter, de a növényeket normál tápoldatra helyezve ez az érték 7 nap után már megegyezett a kontrolléval ismét, tehát a növények teljesen regenerálódtak. A 21 %-os PEG hatására drasztikus csökkenést tapasztaltunk már 1 nap után is és a növények elpusztultak, hiába helyeztük őket vissza két nap után normál tápoldatra. Tehát a 11 %-os PEG kezelés során adaptációs folyamatok játszódtak le a növényben. A SA és oHCA mennyisége csak a levelekben változott. A szabad SA-szintje, csak a 21 % PEG-gel kezelt növényekben nőtt meg, és ugyanezt tapasztaltuk a szabad oHCA esetében is. Tehát ez valószínűleg a stressz kísérőjelensége volt csak és nem adaptációs folyamat. A kötött oHCA viszont megnőtt mindkét koncentrációnál, viszont az 1 hetes visszaállás után jóval magasabb volt a szintje, mint a kontrollban, tehát ez már az adaptációs mechanizmus része lehet.

Hasonló kísérleteket végeztünk 50, illetve 100 mM NaCl-dal is. Előzőleg a 150 és 200 mM-os koncentrációkat is teszteltük, de az 1 hetes kezelést a növények nem éltek túl. A növények állapotának jellemzésére itt is a PS2 kvantumhatékonyságát mértük, mely 7 nap

után a magasabb sókoncentráció esetén lecsökkent, de a 4 napos visszaállítás során kezdett helyreállni, tehát ezek a sókoncentrációk mérsékelt stresszt jelentettek a növényeknek. Ismert, hogy a sóstressz oxidatív károsodást okoz (Borsani és mtsai, 2001) és ez változásokat okoz az antioxidáns enzimek aktivitásában is (Hernández és mtsai, 1993). A kísérletek során azt az eredményt kaptuk, hogy a CAT aktivitás nem változott és a POX is csak kismértékben a gyökerekben. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a CAT és POX aktivitás nem változott kevésbé sótoleráns gyapot növényekben (Meloni és mtsai, 2003). Viszont az APX és a GR aktivitása megemelkedett, mely biztosíthatja a hidrogén-peroxid bontását és szabályozhatja a redukált glutation mennyiségét (Molina és mtsai, 2002). Az is ismert, hogy a ROS mennyisége nemcsak a stressz folyamán, hanem a visszaállítás alatt is magas lehet, tehát a növénynek e periódus alatt is magasabb antioxidáns kapacitással kell rendelkeznie. Számos tanulmány van arról, hogy citológiai és biokémiai károsodások léphetnek fel az abiotikus stresszfolyamatot követő visszaállítás során (Dreesman és mtsai, 1994; Szalai és mtsai, 1996; David és mtsai, 1998). Esetünkben is az APX, a POX és a GR aktivitása magasabb volt a visszaállítás során az előzőleg stressznek kitett növényekben, mint a kontrollban. Mások is azt tapasztalták, hogy a GR aktivitás a visszaállítás során magasabb volt, mint a stressz alatt (Torres-Franklin és mtsai, 2007).

Az elmúlt időszakban számos tanulmány jelent meg az exogén SA hatásairól sóstressznek kitett növényekben. A SA-kezelés növelte a túlélési százalékot, a hajtásnövekedést és a fotoszintézist árpa és paradicsom növényekben (El-Tayeb, 2005; Stevens és mtsai, 2006). A SA erősen gátolta a Na^+ és Cl^- ionok akkumulációját is és elősegítette a N, Mg, Fe, Mn és Cu felhalmozódást sóstressz során kukoricában (Gunes és mtsai, 2007). Paradicsomban leírták a tápoldathoz adagolt SA védőhatását amagassabb Na^+ koncentráció ellenére, de ez a védőhatás koncentrációfüggő volt (Szepesi és mtsai, 2008, 2009). Kevesebb adat van viszont az *in vivo* SA változásokról. NahG transzgenikus *Arabidopsis* növények jobban növekedtek alacsony hőmérsékleten, mint a vad típus (Scott és mtsai, 2004). Azt is kimutatták, hogy az endogén SA-szint megemeli a ROS-szintet (Borsani és mtsai, 2001) és a benzoészav-2-hidroxiáz enzim gátlása, mely a SA bioszintézis egyik enzime, védelmet nyújtott rizs növényeknek NaCl-stressz alatt (Sawada és mtsai, 2006). Esetünkben az *in vivo* SA-szint nem emelkedett egyik sókoncentrációnál sem a stresszhatás alatt, s ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy sóstresszhez adaptált paradicsom sejtekben alacsonyabb volt a SA koncentráció, mint azokban a sejtekben, ahol nem történt előzetes adaptáció (Molina és mtsai, 2002), hisz már a fotoszintézis és az enzimaktivitás

eredményekből látszott, hogy ez a NaCl koncentráció adaptációs folyamatot indít be a kukoricanövényekben.

A fenolsavak erős antixodáns tulajdonsággal rendelkeznek és széleskörben előfordulnak a növényekben. A hidroxifahéjsavak, melyek a gabonafélékben is megtalálhatóak, szintén ide tartoznak és jó antixodáns hatásuk van. Ezek közé tartozik az általunk vizsgált oHCA is és egyéb benzoésav származékok (Gallardo és mtsai, 2006). A kísérletek során az oHCA-szintje már a kezdetektől folyamatosan emelkedett, s a legnagyobb mennyiségben a visszaállás során halmozódott fel. Ismert, hogy természetes körülmények között a mezőn a stressz csak átmeneti állapot és a növény túlélésében fontos szerepet játszik, hogy mennyire tud regenerálódni a stresszperiódusok után (Lutts és mtsai, 2004). Esetünkben az endogén SA-szint csak a regenerációs fázis alatt nőtt meg, amely növelhette a ROS mennyiségét, mert ugyanakkor viszonylag magas GR aktivitást és oHCA-szintet mértünk a növényekben, mely megnövekedett antioxidáns kapacitásra utal. Mint már korábban is említettem, búza hidegedzése során szintén megnőtt az oHCA mennyisége (Janda és mtsai, 2007), tehát a megemelkedett oHCA mennyiség szintén adaptációs folyamatokra utalhat.

6.2.3. Cd-stressz

A következő lépésben a Cd hatását vizsgáltuk az endogén SA és prekursorának tartalmára. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy kezdetben a kontroll növények levelei mind kötött, mind szabad formában kismennyiségű SA-t és oHCA-t tartalmaztak. A magasabb (25 és 50 μM) kadmiumkoncentrációk megközelítőleg háromszorosára emelték a szabad és kötött SA-szintjét, a kötött forma akkumulációja volt nagyobb. Ezen kívül nagy mennyiségű BA felhalmozódást (szabad és kötött formában is) tapasztaltunk, mely nagyságrenddel nagyobb volt a SA-hoz képest (Pál és mtsai, 2005). A kötött BA felhalmozódása, a szabad forma gyors konjugációját jelezheti. Dohányban kimutatták, hogy a konjugált BA sokkal valószínűbb direkt prekursora a SA-nak, mint a szabad formája (Chong és mtsai, 2001). Azonban az ilyen nagymértékű kötött BA felhalmozódás adódhat a SA bioszintézis alacsony mértékéből is. A kadmiummal kezelt növények leveleiben oHCA felhalmozódást is mértünk. A fenolos vegyületek között a kötött oHCA mennyisége emelkedett meg legnagyobb mértékben a kezelés során, és 2 nagyságrenddel nagyobb volt a szabad formájához képest.

A gyökérben a szabad oHCA mennyisége jelentősen nőtt 50 μM Cd jelenlétében. A kadmiumkezelés nem befolyásolta jelentősen a szabad és kötött SA koncentrációját, és a

menntisége mindkét formában, a levélben mért értékekhez hasonló volt. A gyökérben a kötött oHCA mennyisége a kimutathatósági határ alatt volt. Szalicilsav kezelés csökkenti a nehézfém toxicitást is több növényfajban (Yang és mtsai, 2003; Metwally és mtsai, 2003). Korábbi kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy 1 napos 500 μ M-os szalicilsavas kezelés kukoricában, 1 nappal a kadmiumkezelés előtt, illetve azzal párhuzamosan alkalmazva csökkentette annak klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterre gyakorolt hatását, valamint a kadmiumtartalmat. Azonban a szalicilsavas kezelés önmagában is, de a kadmiummal együtt alkalmazva még kifejezettebben csökkentette a gyökér életképességét. Tehát a szalicilsav gátolta ugyan a kadmiumfelvételt, de elősegítette annak károsító hatását (Pál és mtsai, 2002). Kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozólag, hogy abiotikus, illetve nehézfémstressz során a szalicilsav szintézise milyen útvonalon történik. Ezért különösen fontos a szalicilsav felhalmozódás vizsgálata mellett, a szalicilsav lehetséges prekursorainak mennyiségi meghatározása. Mivel a gyökérben csak szabad formában jelenlévő oHCA mennyisége a gyökér BA- és SA-tartalomhoz képest jóval kisebb, továbbá a szabad oHCA mennyisége a legmagasabb kadmiumkoncentráció esetében megemelkedett, míg a szalicilsav szintje nem változott, feltételezhetően az oHCA nem prekursora a szalicilsavnak kukoricában kadmiumstressz során. Eredményeink azt mutatják, hogy az oHCA levélben és gyökérben is tapasztalt akkumulációja a SA-szintézistől függetlenül indukálódik, de mivel az oHCA antioxidáns tulajdonsága az irodalomból ismert (Foley és mtsai, 1999), így felhalmozódása része lehet a növényben indukálódó antioxidáns stresszválasznak (Pál és mtsai, 2005).

Irodalomból ismert, hogy a szalicilsav hatással van az antioxidáns rendszerre, mivel gátolja a katalázt, de stimulálja peroxidázokat és serkenti a glutation produkciót (Chen és mtsai, 1993b; Rao és mtsai, 1997; Srivastava és Dwivedi, 1998). Kimutattuk, hogy kukoricában a szalicilsavas előkezelés hatására a POD az APX és a GR aktivitás megemelkedett (Janda és mtsai, 1999; Pál és mtsai, 2002). Mustárban is kimutatták a megemelkedett GR aktivitást exogén SA hatására (Dat és mtsai, 1998a). Ugyanakkor árpában az exogén szalicilsav a kadmiumtoxicitást csökkentette, de nem az antioxidáns rendszer szintjén, hanem más kadmium detoxifikáló rendszert indukálva (Metwally és mtsai, 2003). Mivel jelen kísérleti körülmények között az endogén szalicilsav-tartalom csak a kadmiumkezelés hetedik napján emelkedett meg, viszont a GR aktivitás már négy nap elteltével, nem valószínű, hogy a szalicilsav direkt szerepet játszik indukálásában, azonban ezt a POD esetében nem zárhatjuk ki.

6.3. A szalicilsavas magáztatás hatásai

A szalicilsav védőhatásáról számos tanulmány született az elmúlt időszakban, viszont gazdasági szempontból bizonyos eljárásoknak, mint pl. a tápoldathoz adagolt SA-nak, a gyakorlati felhasználása eléggé korlátozott. A magvak vetés előtti SA áztatása viszont használható módszernek tűnik, s ennek védőhatásáról is beszámoltak (El-Tayeb 2005; Hayat és mtsai, 2005; Farooq és mtsai, 2008a; Popova és mtsai, 2009), de a hatásmechanizmusa még nem ismert. Az élettani folyamatok tanulmányozására 1 hetes borsónövényeket (levél, gyökér, epikotil, mag) használtunk. A SA magáztatás az 1 hetes növényeknél a magokban koncentrációfüggő emelkedést okozott mind a szabad, mind a kötött SA mennyiségében. Valószínűleg ennek egy része az áztatáshoz használt SA-ból származott. Hogy ezt tisztázzuk, tríciummal jelölt SA-t adtunk a magáztatás során. A jelölt SA nagyrésze a magban, a kötött SA frakcióban jelent meg, melyből arra következtethetünk, hogy a magban az áztatás során bejuttatott SA nagy részét a borsónövény kötött formává alakította. Felmerül a kérdés, hogy a többi növényi részben tapasztalt SA növekedés vajon minek az eredménye lehet. A szabad SA-ban nem találtunk egyik növényi részben sem jelölést, és a kötött formában is csak az epikotilban volt kismennyiségű jelölt SA, annak ellenére, hogy a legnagyobb mértékű változást a szabad SA mennyiségében az epikotilban tapasztaltuk. Abszolút értékben is nagyobb volt a szabad SA mennyisége az epikotilban, mint a magban, valamint a kötött SA mennyisége is összemérhető volt az epikotilban a szabaddal. Mivel a kötött frakcióban kimutatható volt a jelölt SA az epikotilban is, ezért ha a szabad SA növekedés a magáztatás során bejuttatott SA transzportjából származott volna, akkor ott is kellett volna radioaktivitást tapasztalnunk. Ebből arra következtethetünk, hogy ez a mennyiségi növekedés a szabad SA frakcióban az epikotilban inkább *de novo* szintézisből származik, mint a magból való transzport eredménye. A megemelkedett SA-szint közvetlenül is antioxidánsként funkcionálhat vagy közvetett úton módosíthatja a redox egyensúlyt az antioxidáns válaszok aktiválásával (Guo és mtsai, 2007; Popova és mtsai, 2009). Szintén emelkedést tapasztaltunk a kötött oHCA mennyiségében is minden növényi részben. Az oHCA, mely maga is antioxidáns tulajdonságú, szintén a SA bioszintézis úton szintetizálódik, így a SA magáztatás indukálhatta ennek a vegyületnek a szintézisét is, habár erre közvetlen bizonyítékaink nincsenek. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a SA és egyéb benzoésav származékok hatékonyak az oxidatív stressz okozta károsodások megelőzésében. Uborka és dohány levelek Na-szalicilátos permetezése kivédte a paraquat okozta oxidatív stresszt (Strobel és Kuc, 1995). Ehhez hasonló eredményeket kaptak árpában, ahol a SA-kezelés csökkentette a

paraquat indukálta hidrogén-peroxid termelést (Ananieva és mtsai, 2002) és fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását is (Ananieva és mtsai, 2004). Számos kísérlet támasztja alá a szalicilsav közvetlen szerepét a redox egyensúly szabályozásában és rizsnövények oxidatív stresszel szembeni védelmében. A SA egyrészt képes közömbösíteni a hidroxil-gyököket, másrészt képes kelátolni a vastartalmú vegyületeket, így mind a hidroxilgyökök közvetlen károsító hatását képesek megakadályozni, mind pedig újabb keletkezésüket a Fenton-reakcióban (Dinis és mtsai, 1994). Viszont aránylag kis koncentrációban (0,05-0,5 mM) mérsékelt stresszt okoz, mely akklimatizációs folyamatokat indíthat be, mely pl. az antioxidáns enzimek aktivitásának fokozódásában is megnyilvánulhat (Prasad és mtsai, 1994b; Janda és mtsai, 1999). Magáztatás hatására a borsónövényekben csak az APX aktivitása nőtt meg kismértékben a hajtásban és az epikotilban, valamint a POX a hajtásban. Ezek a mérsékelt hatások magyarázhatóak azzal, hogy a növényeket nevelési körülmények közt vizsgáltuk és egyfajta edződési folyamatnak tekinthetők. Kukoricában is elvégeztük ezeket a kísérleteket, kiegészítve egy 5 napos 5 °C-os hidegkezeléssel. Az antioxidáns enzimek aktivitásában nem tapasztaltunk változást. A szabad oHCA tartalom viszont megemelkedett a minden növényi részben a SA-kezelés hatására és a hidegkezelés alatt is magasabb volt a szintje, mint a kezeletlen növényekben. A kötött oHCA, valamint a szabad és kötött SA mennyisége csak a magvakban emelkedett meg, tehát kukoricában a megnövekedett antioxidáns kapacitásért inkább az oHCA volt felelős, mint az antioxidáns enzimek.

További stresszválaszokat keresve megvizsgáltuk a poliaminszintet is. Számos stressz indukálja a poliamin szintézisért felelős géneket (Usadel és mtsai, 2008). A poliaminok, mint kationos komponensek képesek a nukleinsavakhoz, foszfolipidekhez, fehérjékhez és más anionos komponensekhez kötődni. Szerepüket mutatja az akklimatizációs folyamatokban, hogy poliamin felhalmozódást találtunk búzában rövid- és hosszútávú hidegdedzés folyamán (Rácz és mtsai, 1996), valamint S-metil-metionin kezelés hatására is (Rácz és mtsai, 2008). A poliaminszintézis jelátviteli útja még nem nagyon ismert. Korábban kimutattuk, hogy tápoldathoz adott 0,5 mM SA megnövelte a Put és Spd mennyiségét fiatal kukoricánövényekben (Németh és mtsai, 2002). Ehhez hasonlóan az arginin-dekarboxiláz génexpressziójának növekedését mutatták ki SA-kezelést követően dohányban (Jang és mtsai, 2009). Borsóban lecsökkent a poliaminok mennyisége minden növényi részben a SA-kezelés hatására, kukoricában viszont nevelési hőmérsékleten a levélben megnőtt a Put szintje és ez hidegben is magas szinten maradt, míg a Cad-ben alacsony hőmérsékleten tapasztaltunk nagyobb növekedést. A gyökérben nevelési hőmérsékleten a Put-, Spd- és Spn-tartalom növekedett meg a SA-kezelés hatására, mely szerepet játszhat a makromolekulák

stabilizálásában a stressz folyamán. Tehát megállapíthatjuk, hogy a SA-kezelés különböző növényekben különböző folyamatokat indukálhat, tehát a hatás fajfüggő lehet.

A továbbiakban a SA magáztatás nehézfémstresszre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kísérleti növényként itt is borsót és kukoricát használtunk. Borsó magvak 6 órás SA áztatása pozitív hatással volt a növekedésre, fotoszintézisre, a Rubisco aktivitásra, a termolumineszcenciára és a klorofilltartalomra (Popova és mtsai, 2009). Habár a SA részt vesz a stressztünetek kialakulásában, ez szükséges az adaptációs folyamatok beindulásához és a stressztolerancia kialakulásához. Ismert, hogy a prolin számos stresszhatásra (szárazság, hideg, UV, nehézfém, stb) felhalmozódik a növényekben, s emellett, hogy részt vesz a stressz elleni védelemben, jó indikátora magának a stressznek. A csökkent prolin szint esetünkben a SA magáztatott borsó- és kukoricanövényekben azt jelzi, hogy a SA valamennyire csökkentette a Cd okozta stresszt. Ezzel összhangban van az is, hogy a lipidperoxidáció és a membránkárosodás mértéke is kisebb volt a SA magáztatott növényekben, amely arra utal, hogy a SA csökkentette az oxidatív stresszt. A nagy SOD aktivitás a SA előkezelt kukoricanövényekben is arra utal, hogy ROS akkumulálódott a Cd-kezelés következtében (Kranter és mtsai, 2008). Rizsben is kimutatták, hogy a SA az antioxidáns védekezőrendszer aktiválásával védelmet nyújtott Cd ellen (Guo és mtsai, 2007). Rao és Davis (1999) a SA 2 különböző hatásmechanizmusát különítették el *Arabidopsis*-ban az oxidatívstresszt okozó ózonstressz alatt: az egyik hatás, hogy a SA aktiválja az antioxidáns védekezőrendszert, az ózon által okozott oxidatív károsodás csökkentése érdekében; a másik, hogy a magas SA-szint oxidatív „robbanást” okoz és sejthalálhoz vezet. Ez a példa azt mutatja, hogy a SA fontos alkotóeleme a stresszválaszok szabályozásának és mennyiségétől függően akár teljesen ellentétes folyamatokat is kiválthat (Yang és mtsai, 2004).

Számos elméleti magyarázat lehet a SA pozitív hatásának esetünkben a Cd-stressz kivédésében a fiatal borsó- és kukoricanövényekben:

- 1) A SA megelőzte a Cd okozta halmozódóan kialakuló károsodásokat. Ezt alátámasztja az, hogy a SA-magáztatott növények gyökerében kevesebb Cd halmozódott fel (Popova és mtsai, 2009). Hasonlót tapasztaltunk akkor is, amikor a tápoldathoz adtuk a SA-at (Szalai és mtsai, 2005). A Cd általában a gyökérben halmozódik fel, hisz ez a növényi rész van kitéve a nehézfémhatásnak a talajban, s innen továbbítódik a hajtásba. Ez azonban általában csak akkor következik be, ha a gyökér már nem képes eltávolítani/semlegesíteni a Cd-ot. Az alacsonyabb Cd-szint a SA előkezelt

növények gyökerében szerepet játszhat abban, hogy a fotoszintézis kevésbé károsodott és a növekedés is kevésbé volt gátolt.

- 2) A SA-előkezelés az oxidatív károsodást is csökkentette. A lipidperoxidáció, a membránkárosodás kisebb mértékű volt az SA-kezelt növényekben, s a stresszmarkerként használható prolin is kevésbé akkumulálódott ezekben a növényekben, jelezve, hogy kisebb mértékű volt a stressz (Kranter és mtsai, 2008; Popova és mtsai, 2009).
- 3) A SA-előkezelés a membránokat is stabilizálta, az előkezelt növények membránjainak zsírsavösszetétele még Cd stressz alatt is hasonló maradt a kontroll növényekéhez. Ez főleg a telítetlen zsírsavak (18:2, 18:3) arányánál nyilvánult meg (Popova és mtsai, 2009). SA-előkezelés nélkül nem tapasztaltunk hasonlót (Pál és mtsai, 2007)

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy a magvak SA-előkezelése pozitívan befolyásolta a növekedést, a fotoszintetikus folyamatokat, valamint aktiválta az antioxidáns védekezőrendszert a korai növekedési stádiumban Cd-nak kitett növényekben, s védelmet nyújtott a Cd hatására bekövetkező halmozódó károsodások ellen. Ezen kívül szerepet játszhat még specifikus fehérjék, illetve a védelemben szerepet játszó enzimek szintézisének szabályozásában is.

7. Összefoglalás

Jelen dolgozat keretében a különböző módon alkalmazott külsőleg adagolt SA szerepét tanulmányoztam abiotikus stresszfolyamatok során, valamint az endogén SA-szintben bekövetkezett változásokat vizsgáltam ezen stresszek hatására. A kísérletek során a következő eredményeket kaptuk:

- Mivel először a hideg elleni védelemben mutattuk ki a SA védőhatását, ezért tovább tanulmányoztuk, hogy a milyen anyagcsere-folyamatok járszódhatnak le a fiatal kukoricanövényekben, amik a megnövekedett stresstoleranciáért felelősek lehetnek. Kimutattuk, hogy a tápoldathoz adagolt SA hatására megnövekedett a növények poliamin tartalma, mely a makromolekulák védelmében szerepet játszhat. Ez a megemelkedett poliamin-mennyiség egyrészt az SA hatására megnövekedett Put-szintből származott, valamint az SA kezelést követő hideg hatására a Spd is felhalmozódott. A tápoldathoz adagolt SA a hideg hatására bekövetkező ACC akkumulációt is csökkentette hasonlóan a hidegedzéshez. Tehát elmondhatjuk, hogy ebben az esetben a SA az edzéshez hasonló folyamatokat indított be a növényekben.
- Ellentétben az alacsony hőmérséklettel ozmotikus stressz során a tápoldathoz adagolt 0,5 mM SA csökkentette a nettó fotoszintézist, a sztómaáteresztőképességet, valamint fokozta a membránkárosodást fiatal kukoricanövényekben, s mintegy felerősítette a stressz hatását.
- Ezután a SA Cd-stresszre kifejtett hatását vizsgáltuk. Első lépésben a nehézfém toxicitás kivédésében szerepet játszó enzimek aktivitásának változásait vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy Cd hatására kukoricanövények gyökerében először a GS enzim aktivitása fokozódott már 1 óra elteltével, majd 1 nap után a γ ECS aktivitása is. A PCS enzim aktivitása kezdetekben nem változott, majd 2 nap után kismértékben csökkent a PC_2 mennyiségének felhalmozódásával párhuzamosan. A levélben ugyanakkor a PCS aktivitása, párhuzamosan a Cd megjelenésével a levélben, már 1 óra elteltével megemelkedett, míg a többi enzim aktivitása csak 1 nap után nőtt meg, majd 2 nap után kismértékű csökkenést tapasztaltunk. A továbbiakban a külsőleg adagolt SA hatását tanulmányoztuk. Kisebb mértékű Cd-felhalmozódást tapasztaltunk SA-kezelés hatására a kukoricanövények gyökereiben, míg a levelekben jobban akkumulálódott a Cd a SA-kezelt növényekben. Ennek ellenére a SA-kezelés a

gyökerek életképességét csökkentette, míg a levelekben mérsékelte a membránkárosodás mértékét Cd-stressz folyamán. Gyökerekben a SA-kezelés fokozta a POD, APX és GR enzimek aktivitását, míg a levélben csak a GR enzim működésében okozott kismértékű emelkedést, valamint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működését is védte a Cd-mal együtt adagolt SA.

- Az exogén SA hatásainak vizsgálata után áttértünk az endogén SA szintben bekövetkező változások tanulmányozására abiotikus stresszhatásra Hideg hatására kukoricanövényeknek csak a levelében nőtt meg a szabad SA-szint, viszont mind a levélben, mind a gyökérben megnőtt egy lehetséges prekursorának, az oHCA kötött formájának a mennyisége. Az ABA hatását is vizsgáltuk alacsony hőmérsékleten fiatal kukoricanövényekben. 0,05 illetve 0,1 mM ABA-kezelés csökkentette kukoricanövények klorofill tartalmát, de mérsékelte a hideg okozta membránkárosodás mértékét. A gyökerekben fokozta a GR, GST és APX aktivitását, míg a levélben csak a GST aktivitása nőtt meg kismértékben. ABA-kezelés hatására mind a szabad, mind a kötött oHCA mennyisége megnőtt a növények gyökereiben, de hideg hatására lecsökkent. A levelekben nem tapasztaltunk változást. A szabad SA-szint nem változott ABA-kezelés hatására, a kötött SA mennyisége csak a levélben emelkedett meg, de hideg hatására lecsökkent a mennyisége.
- Ozmotikus stressznek kitett növényekben (11 illetve 21 % PEG) a szabad SA-szintje megemelkedett a 21 %-os PEG hatására. A kötött SA-szintjében is csak a 21 %-os koncentrációnál tapasztaltunk emelkedést a kezelés alatt, míg a visszaállás során a 11 %-os PEG-gel kezelt növényeknél is megemelkedett a szintje. A szabad oHCA mennyisége csak a 21 %-os PEG-kezelés után nőtt meg, míg a kötött mennyisége mindkét PEG-kezelésnél megemelkedett és ez még kifejezettebb volt a 11 %-os PEG-nél a visszaállás alatt.
- Sóstressz vizsgálata során kimutattuk, hogy az általunk használt 7 napos 50 illetve 100 mM NaCl-kezelés hatására valamint a visszaállás során gyökérben a POD és a GR, míg a levélben a GR és az APX aktivitása megemelkedett. A szabad SA mennyisége a 100 mM NaCl-kezelés és a visszaállás során megemelkedett a kukoricanövények gyökereiben, míg a levélben csak a visszaállás során. A kötött SA mennyisége nem változott szignifikánsan. Ezzel ellentétben a szabad oHCA szintje már a 100 mM-os NaCl-kezelés 3. napjától folyamatosan emelkedett és a visszaállás során ez még kifejezettebb volt. A

gyökérben csak a visszaállás során tapasztaltunk növekedést. A kötött oHCA szintje nem változott. Ebből megállapíthatjuk, hogy itt az oHCA valószínűleg inkább antioxidánsként funkcionált, nem pedig a SA prekursoraként.

- Cd-stressz során is vizsgáltuk az endogán SA, valamint oHCA változásait. 25, illetve 50 μM Cd hatására kukoricanövények levelében megnőtt a szabad és a kötött SA és oHCA szint, míg a gyökérben csak a szabad oHCA szint emelkedett az 50 μM Cd-kezelést követően.
- Ezek után áttértünk a gyakorlat számára jobban használható SA-magáztatásos kísérletekre. Kísérleteinket először borsó növényen végeztük. Kimutattuk, hogy borsómagvak 0,1, illetve 0,5 mM SA-áztatása növelte a csírázási százalékot, valamint a szemszámot és a szemtömeget, továbbá fokozta a POD aktivitást 1 hetes növények hajtásaiban, illetve az APX aktivitását az epikotilban. A kötött oHCA mennyisége minden növényi részben megnőtt a 0,5 mM SA-magáztatás hatására, míg a szabad oHCA csak az epikotilban volt kimutathatósági határ felett és a mennyisége nem változott a kezelés hatására. A szabad SA tartalom nagymértékben megemelkedett az epikotilban, míg a magban kisebb mértékű akkumulációt találtunk a SA-magáztatás hatására. A kötött SA főleg a magvakban halmozódott fel, de kismértékű növekedést az epikotilban és a gyökérben is tapasztaltunk. Hogy nyomonkövessük a magáztatás során használt SA-at tríciummal jelölt SA-t használtunk. Ennek alkalmazásával kimutattuk, hogy a magáztatáshoz használt SA főleg a magban található kötött frakcióban jelenik meg, és csak kismértékben az epikotilban. Az epikotilban található jelölt SA a növekedés mértékéhez képest kisebb arányú, tehát valószínűleg főleg a *de novo* szintézisből származik a borsó epikotilban felhalmozódott szabad SA.
- A továbbiakban kukoricanövényekben vizsgáltuk a SA-magáztatás hatásait. Kimutattuk, hogy hatására megnőtt a Put mennyisége kukoricanövények levelében, valamint hideghatásra az SA magáztatott növények levelének cadaverin tartalma. A gyökérben a magáztatás hatására a Put, Spd és Spn mennyisége megemelkedett, de hideg hatására a kontroll szintjére esett vissza. A szabad oHCA mennyisége a SA-magáztatás hatására megemelkedett a kukoricanövények, levelében, gyökérben és a magban is. A gyökérben és a magban a hideghatás alatt is magasabb volt a szintje a kontrollhoz képest, míg a levélben kicsit alacsonyabb, de ez nem az oHCA-szint csökkenésből adódott, hanem a kontroll növényekben hideghatásra történt oHCA akkumuláció miatt. A

kötött oHCA csak a mavakban emelkedett meg a kezelés hatására és a hidegkezelés alatt is magasabb volt a szintje. A szabad és kötött SA mennyiségében hasonló változásokat tapasztaltunk, mint a kötött oHCA esetében.

- Cd-stressz során is tanulmányoztuk a SA-magáztatás kiváltotta folyamatokat mind borsóban, mind kukoricában. Kimutattuk, hogy mindkét növényben csökkentette a lipidperoxidáció mértékét, mérsékelte a membránkárosodást, valamint gátolta a prolin akkumulációt. A szabad SA-szint a SA előkezelés hatására kismértékben megemelkedett, de a Cd koncentráció növekedésével csökkent, míg az SA-val nem előkezelt növényekben mind borsóban, mind kukoricában is csak később kezdett el csökkenni. A kötött SA mennyisége magasabb Cd-koncentrációknál mindkét növényben jelentősen megemelkedett, míg a SA-magáztatott növények esetében csak kismértékű növekedést tapasztaltunk.

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy a SA-előkezelés védelmet nyújthat a növényeknek abiotikus stresszfolyamatok során, viszont a kezelés módja, időtartama, a kezelt növényi rész, a növény kora és állapota, valamint az adott abiotikus stressz fajtája és foka nagyban befolyásolja a SA által kiváltott hatást, mely akár káros is lehet a növényre, felfokozva a stresszszimptomákat.

8. Új tudományos eredmények

- ❖ Kimutattuk, hogy a tápoldathoz adagolt SA hidegstressz során poliaminok szintézisét indukálja, valamint, az edzéshez hasonlóan, csökkentette a hideg hatására bekövetkező ACC-felhalmozódást kukoricanövényekben, mely a stressztűrőképesség fokozódására utal.
- ❖ Kimutattuk, hogy a tápoldathoz adagolt SA ozmotikus stressz során fokozta a membránkárosodást fiatal kukoricanövényekben, s mintegy felerősítette az ozmotikus stressz hatását.
- ❖ Kisebb mértékű Cd-felhalmozódást tapasztaltunk SA-kezelés hatására a kukoricanövények gyökereiben, azonban a gyökerek életképességét a SA-kezelés csökkentette, míg a levelekben mérsékelte a membránkárosodás mértékét.
- ❖ Kimutattuk, hogy mérsékelt NaCl-stressz hatására a szabad oHCA szintje folyamatosan emelkedett a levélben és a visszaállás során ez még kifejezettebb volt, míg a gyökérben csak a visszaállás során tapasztaltunk növekedést. Ezek a változások adaptációs folyamatokra és az oHCA antioxidáns szerepére utalnak.
- ❖ Tríciummal jelölt SA alkalmazásával igazoltuk, hogy a borsó magáztatáshoz használt SA főleg a magban található kötött SA frakcióban marad, és csak kismértékben jelenik meg az epikotilban. Az epikotilban található jelölt SA a SA-szint növekedésének mértékéhez képest kisebb arányú, tehát valószínűleg főleg *de novo* szintézisből származik a borsó epikotilban felhalmozódott szabad SA.
- ❖ Igazoltuk a SA magáztatás védőhatását Cd-stresszel szemben fiatal kukorica- és borsónövényekben. Ez a védőhatás kisebb mértékű lipidperoxidációban és membránkárosodásban, a fotoszintetikus és antioxidáns rendszer jobb működésében nyilvánult meg.

9. Felhasznált irodalom

- Agarwal S., Sairam R.K., Srivastava G.C., Meena R.C. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biol Plant* 49:541-550.
- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24: 1337-1344.
- Ananieva E.A., Alexieva V.S., Popova L.P. (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J Plant Physiol* 159: 685-93.
- Ananieva E.A., Christov K.N., Popova L.P. (2004) Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *J Plant Physiol* 161: 319-28.
- Anderson, M.D., Chen, Z., Klessig, D.F. (1998): Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochem* 47: 555-566.
- Arisi, A.C.M., Mocquot, B., Lagriffoul, A., Mench, M., Foyer, C.H., Jouanin, L. (2000) Responses to cadmium in leaves of transformed poplars overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Physiol Plant* 109: 143-149.
- Ashraf M., Foolad M.R. (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59: 206-216.
- Athar, HUR, Khan, A, Ashraf, M (2009) Inducing salt tolerance in wheat by exogenously applied ascorbic acid through different modes. *J Plant Nutr*, 32: 1799-1817.
- Ádám, A., Bestwick, C.S., Barna, B., Mansfield, J.W. (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolica. *Planta* 197: 240-249.
- Bagci, S.A., Ekiz, H., Yilaz, A., Cakmak, I. (2007) Effects of zinc deficiency and drought on grain yield of field-grown wheat cultivars in central Anatolia. *J Agron Crop Sci* 193: 198-206.
- Bajji M., Kinet J., Lutts S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul* 36: 61-70.
- Bakht, J., Bano, A., Dominy, P. (2006) The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J Exp Bot* 57: 3707-3715.
- Bandurska H., Stroinski A. (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* 27: 379-386.
- Basra, S.M.A., Farooq, M., Wahid, A., Khan, M.B. (2006) Rice seed invigoration by hormonal and vitamin priming. *Seed Sci Technol* 34: 753-758.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.B. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bazzaz, F.A., Rolfe, G.L., Carlson, R.W. (1974) Effect of Cd on photosynthesis of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol Plant* 32: 373-376.
- Benavides M., Gallego M.S., Tomaro M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 21-34.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., Tiburcio, A.F. (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes of thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 189: 201-206.
- Bielawski, W., Joy, K.W. (1986) Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochem* 25: 2261-2265.

- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 126: 1024-1030.
- Bouchereau A., Aziz A., Lahrer F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140: 103-125
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A., Ghorbal, M.H. (1999): Cd-stress on nitrogen assimilation. *J Plant Physiol* 155: 310-317.
- Boyer J.S. ((1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54.
- Breckle SW. Growth under stress: heavy metals. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi X, editors. *Plant roots: the hidden half*. New York: Marcel Dekker; 1991. pp. 351-373.
- Cao, D.D., Hu, J., Gao, C.A., Guan, Y.J., Zhang, S., Xiao, J.F. (2008) Chilling tolerance of maize (*Zea mays* L.) can be improved by seed soaking in putrescine. *Seed Sci Tech* 36: 191-197.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., Métraux, J.P. (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582: 473-478.
- Capell, B., Dörffling, K. (1993) Genotype-specific differences in chilling tolerance of maize in relation to chilling-induced changes in water status and abscisic acid accumulation. *Physiol. Plant.* 88: 638-647.
- Chadha, K.C., Brown, S.A. (1974) Biosynthesis of phenolic acids in tomato plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Can J Bot* 52: 2041-2047.
- Chaparzadeh, N., D'Amico, M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R., Navarri-Izzo, F. (2004) Antioxidative response of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol Biochem* 42: 695-701.
- Chapman, D.J., Millner, P.A., Barber, J. (1983) The influence of plant growth temperature on the lipid/protein ratio of chloroplast thylakoid membranes. *Biochem Soc Trans* 11: 387-388.
- Chen, G.X., Asada, K. (1989): Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* 30: 987-993.
- Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant* 101: 165-172.
- Chen W.P., Li P.H., Chen T.H.H. (2000) Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ* 23: 609-618.
- Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. (1993a) Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9533-9537.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993b): Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Chong, J., Pierrel, M.A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B., Saindrenan, P. (2001) Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defence responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol* 125: 318-328.
- Clemens, S. (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163: 319-332.
- Clemens, S. (2009) Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Sci* 177: 266-271.
- Cobbett, C.S. Goldsbrough, P.B. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 53: 159-182.

- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. (1995): Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7143-7147.
- Cuevas J.C., Lopez-Cobollo R., Alcazar R., Zarza X., Koncz C., Altabella T., Salinas J., Tiburcio A.F., Ferrando A. (2008) Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol* 148: 1094-1105.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., Leigh, R.A. (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J Exp Bot* 42: 1417-1426.
- Dalton, D.A., Russel S.A., Hanus F.J., Pascoe G.A., Evans H.J. (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 3811.
- Dat, J.F., Foyer, C.H., Scott, I.M. (1998a) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol* 118: 1455-1461.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M. (2000) Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J Plant Physiol* 156: 659-665.
- David, M.M., Coleho, D., Barrote, I., Correia, M.J. (1998) Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Aust J Plant Physiol* 25: 299-306.
- Davies, W.J., Wilkinson, S., Loveys, B. (2002) Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytol* 153: 449-460.
- Deisseroth, A., Dounce, A. (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319-326.
- de Knecht, J.A., van Dillen, M., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O. (1994): Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol* 104: 255-261.
- Delhaize, E., Jackson, P.J., Lujan, L.D., Robinson, N.J. (1989) Poly (γ -glutamyl-cysteinyl) glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. *Plant Physiol* 89: 700-706.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J., Neill, S. (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* 55: 205-212.
- Devary, Y., Gottlieb, R.A., Lau, L.F., Karin, M. (1991) Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* 11: 2804-2811.
- Dhanda S.S., Sethi G.S., Behl, R.K. (2004) Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *J Agron Crop Sci* 190: 6-12.
- Ding C.K., Wang C.Y., Gross K.C., Smith D.L. (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895-901
- Dinis, T.C., Maderia, V.M., Almeida, L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315: 161-169.
- Doulis, A.G., Debian, N., Kingston-Smith, A.H., Foyer, C.H. (1997) Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiol* 114: 1031-1037.
- Drazic, G., Mihailovic, N. (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci* 168: 511-517.
- Drazic, G., Mihailovic, N., Lojic, M. (2006): Cadmium accumulation in *Medicago sativa* seedlings treated with salicylic acid. *Biol. Plant* 50: 239-244.

- Dreesmann, D.C., Harn, C., Daie, J. (1994) Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiol* 35: 645-653.
- Duan, J., Li, J., Guo, S., Kang, Y. (2008) Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *J Plant Physiol* 165: 1620-1635.
- Duncan, D.R., Widholm, J.M. (1987). Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiol* 83: 703-708.
- Duran-Serantes, B., Gonzalez, L., Reigosa, M.J. (2002) Comparative physiological effects of three allelochemicals and two herbicides on *Dactylis glomerata*. *Acta Physiol Plant* 24: 385-392.
- Durner, J., Klessig, D.F. (1996): Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J Biol Chem* 271: 28492-28501.
- Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agr Ecosyst Environ* 106: 119-133.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. (1990) Subcellular distribution of multiple isoforms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278.
- El-Basyouni, S.Z., Chen, D., Ibrahim, R.K., Neish, A.C., Towers, G.H.N. (1964): The biosynthesis of hydroxybenzoic acid in higher plants. *Phytochem* 3: 485-492.
- Ellis, B.E., Amrhein, N. (1971): The 'NIH-Shift' during aromatic *ortho*-hydroxylation in higher plants. *Phytochem* 10: 3069-3072.
- El-Tayeb, M. A. (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regul* 45: 215-224.
- Enyedi, A.J. (1999) Induction of salicylic acid biosynthesis and systemic acquired resistance using the active oxygen species generator rose bengal. *J Plant Physiol* 154: 106-112.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2480-2484.
- Etani S., Yoshida S. (1987) Reversible and irreversible reduction of ACC-dependent ethylene formation in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) hypocotyls caused by chilling. *Plant Cell Physiol* 28: 83-91.
- Evans, P.T., Malmberg, R.L. (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 235-269.
- Farooq, M., T. Aziz, S.M.A. Basra, M.A. Cheema, Rehman, H. (2008a) Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J Agron Crop Sci* 194: 161-168.
- Farooq, M., Aziz, T., Hussain, M., Rehman, H., Jabran, K., Khan, M.B. (2008b) Glycinebetaine improves chilling tolerance in hybrid maize. *J Agr Crop Sci* 194: 152-160.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Develop* 29: 185-212.
- Ferretti, M., Ghisi, R., Merlo, L., Dalla Vecchia, F., Passera, C. (1993): Effect of cadmium on photosynthesis and enzymes of photosynthetic sulphate and nitrate assimilation pathways in maize (*Zea mays* L.). *Photosynthetica*, 29: 49-54.
- Field, R.J. (1990) Influence of chilling stress on ethylene production. In Wang CY.(ed.): *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Boca Raton, Fla., Chap. 15.
- Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D.J., Land, E.J., Truscott, G., Rice-Evans, C.A. (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Bio Med* 26: 1202-1208.

- Folkert A.H., Elena A.G., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 431-438.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Galap, C., Kunert, K.J. (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* 97: 863-872.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 100: 241-254.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plantarum* 119: 355-364.
- Fracheboud, Y., Stamp, P. (1993) Cold induced ABA in the xylem sap of maize. -In *Crop Adaptation to Cool, Wet, Climates* (D. Wilson, H. Thomas and K. Pithan, eds.) pp. 141-146. E. GUYOT SA, Brussels.
- Fricke, W., Leigh, R.A., Tomos, A.D. (1996) The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response. *J Exp Bot* 47: 1413-1416.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gallardo, C., Jiménez, L., García-Conesa, M.-T. (2006) Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem* 99: 455-463.
- Ganesan, V., Thomas, G. (2001): Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Sci* 160: 1095-1106.
- Gao, C., Hu, J., Zhang, S., Zheng, Y., Knapp, A. (2009) Association of polyamines in governing the chilling sensitivity of maize genotypes. *Plant Growth Regul* 57: 31-38.
- Garg, B.K. (2003) Nutrient uptake and management under drought: nutrient-moisture interaction. *Curr Agric* 27: 1-8.
- Gnanasiri, S.P., Saneoka, H., Ogata, S. (1991) Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of waterstressed maize: *J Exp Bot* 42: 739-745.
- Goicoechea, N., Szalai, G., Antolin, M.C., Sanchez-Diaz, M., Páldi, E. (1998) Influence of arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* on free polyamines and proline levels in water-stressed alfalfa. *J Plant Physiol* 153: 706-711.
- Ghoshroy, S., Nadakavukaren, M.J. (1990) Influence of cadmium on the ultrastructure of developing chloroplasts in soybean and corn. *Environ Exp Bot* 30: 187-192.
- Grant, J.J., Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124: 21-29.
- Greenway, H., Munns, R., (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6838-6842.
- Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1985): Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230:674-676.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri Bagci, E., Cicek, N. (2007): Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J Plant Physiol* 164: 728-736.

- Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J. (2007) Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oriza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environ Pollut* 147: 743-749.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1-11.
- Hamada, A.M. (1998) Effects of exogenously added ascorbic acid, thiamin or aspirin on photosynthesis and some related activities of drought-stressed wheat plants, in: G. Garab (Ed.), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. 4, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1998, pp. 2581-2584.
- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E. (2002) Absciscic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 53: 27-37.
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., Ahmad, A. (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron Hung* 53: 433-437.
- Hegedűs, A., Erdei, S., Horváth, G. (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160: 1085-1093.
- Hell R., Bergmann L. (1990) γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localisation. *Planta* 180: 603-612.
- Hernández, J.A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sevilla, F. (1993) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* 89: 103-110.
- Horváth, E., Janda, T., Szalai, G., Páldi, E. (2002) In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci* 163:1129–1135.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. (2007a) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signalling. *J Plant Growth Regul* 26: 290-300.
- Horváth, E., Pál, M., Szalai, G., Páldi, E., Janda, T. (2007b) Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of shortterm drought and freezing stress on wheat plants, *Biol Plant* 51: 480–487.
- Huang, J., Cardoza, Y.J., Schmelz, E.A., Raina, R., Engelberth, J., Tumlinson, J.H. (2003) Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217: 767-775.
- Huang, C.X., van Steveninck, R.F.M. (1989) Maintenance of low Cl⁻ concentrations in mesophyll cells of leaf blades of barley seedlings exposed to salt stress. *Plant Physiol* 90: 1440-1443.
- Hussain M., Malik M.A., Farooq M., Ashraf M.Y., Cheema M.A. (2008) Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *J Agron Crop Sci* 194: 193-199.
- Jagendorf, A.T, Takabe, T. (2001) Inducers of glycinebetaine synthesis in barley. *Plant Physiol* 127:1827-1835.
- James, R.A., Munns, R., von Cammerer, S., Trejo, C., Miller, C., Condon, A.G. (2006) Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in salt affected barley and durum wheat: *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol* 142: 1537-1547.
- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Zs., Horváth, E., Páldi, E. (2000) Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 45:29-33.
- Janda, T., Szalai, G., Ducruet, J.-M., Páldi, E. (1998) Changes in photosynthesis in inbred maize lines with different degrees of chilling tolerance grown at optimum and suboptimum temperatures. *Photosynthetica* 35: 205-212.

- Janda, T., Szalai, G., Kissimon, J., Páldi, E. Marton, C., Szigeti, Z. (1994) Role of light intensity in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynthetica* 30: 293-299.
- Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S., Popova, L. (2007) Factors contributing to the enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry* 68: 1674-1682.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175-180.
- Jang, E.-K., Min, K.-H., Kim, S.-H., Nam, S.-H., Zhang, S., Kim, Y.C., Cho, B.H., Yang, K.-Y. (2009) Mitogen-activated protein kinase cascade in the signalling for polyamine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell Physiol* 50:658-664
- Janowiak, F., Dörrfling, K. (1995) Chilling-induced changes in the contents of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and its N-malonyl conjugate (MACC) in seedlings of two maize inbreds differing in chilling tolerance. *J Plant Physiol* 147: 257-262.
- Janowiak, F., Dörrfling, K. (1996) Chilling of maize seedlings: Changes in water status and abscisic acid content in ten genotypes differing in chilling tolerance. *J Plant Physiol* 147: 582-588.
- Kang, G.Z., Wang, C.H., Sun, G.C., Wang, Z.X. (2003) Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environ Exp Bot* 50: 9-15.
- Kang, H.M., Saltveit, M.E. (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plant* 115:571-576.
- Kaniuga, Z. (2008) Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biol* 10: 171-184.
- Karpinska, B., Wingsle, G., Karpinski, S. (2000) Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life* 50: 21-26.
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., Tachibana, S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45: 712-722.
- Kaydan, D., Yagmur, M., Okut, N. (2007) Effects of Salicylic Acid on the Growth and Some Physiological Characters in Salt Stressed Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi-Journal Of Agricultural Sciences* 13: 114-119.
- Kellös, T., Tímár, I., Szilágyi, V., Szalai, G., Galiba, G., Kocsy, G. (2008) Various stress hormones and abiotic stresses differentially affect antioxidants in maize lines depending on their sensitivity. *Plant Biol* 10: 563-572.
- Keltjens, W.G., van Beusichem, M.L.(1998): Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium. *Plant Soil* 203: 119-126.
- Khafagi, M.A., Arafa, A.A., El-Banna, M.F. (2009) Glycinebetaine and ascorbic acid can alleviate the harmful effects of NaCl salinity in sweet pepper. *Aust J Crop Sci* 3: 257-267.
- Kimmerer, T.W., Kozlowski, T.T. (1982) Ethylene, ethan, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol* 69: 840-847.
- Klapheck, S., Yimmer, I., Cosse, H. (1990) Scavenging of hydrogen proxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol* 31: 1005.

- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000): Nitric oxid and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8849-8855.
- Knox, J.P., Dodge, A.D. (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochem* 24: 889-896.
- Ko, S., Eliot, A.C., Kirsch, I.F. (2004) S-methylmethionine is both a substrate and an inactivator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Arch Biochem Biophys* 421: 85–90.
- Kocsy, G., Szalai, G. Sutka, J., Páldi, E., Galiba, G. (2004): Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Sci* 166: 451-458.
- Kocsy, G., von Ballmoos, P., Rügsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. (2001) Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol* 127: 1147-1156.
- Koetje, D.S., Kononowicz, H., Hodges, T.K. (1993) Polyamines metabolism associated with growth and embryogenic potential of rice. *J Plant Physiol* 141: 215-221.
- Korkmaz, A., Uzunlu, M., Demirkiran, A.R. (2007) Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress *Acta Physiol Plant* 29: 503–508.
- Kramer, F.G., Wang, C.Y. (1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash, *Physiol Plant* 76: 479-484.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol* 165: 920-931.
- Kubis, J. (2003) Polyamines and "scavenging system": influence of exogenous spermidine on catalase and guaiacol peroxidase activities, and free polyamine level in barley leaves under water deficit. *Acta Physiol Plant* 25: 337-343.
- Lake, J.A., Woodward, F.I., Quick, W.P. (2002) Long-distance CO₂ signalling in plants. *J Exp Bot* 53: 183-193.
- Lamarck, J.B. (1778): In: *Flore Francaise* 3. L'Emprimerie Royale, Paris, pp. 537-539.
- Lance, C. (1972) La respiration de l'*Arum maculatum* au cours du developpement de l'inflorescence. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg Ser* 12 13: 477-495.
- Lee, S.K., Young, R.E. (1984) Temperature sensitivity of avocado fruit in relation to C₂H₄ treatment. *J Am Soc Hort Sci* 109: 689-692.
- Leigh, R.A., Storey, R. (1993) Intercellular compartmentation of ions in barley leaves in relation to potassium nutrition and salinity. *J Exp Bot* 44: 755-762.
- León, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1995): Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 108: 1673-1678.
- Leslie, C.A., Romani, R.J. (1986) Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep* 5: 144-146.
- Lipton, W.J., Aharoni, Y. (1979) Chilling injury and ripening of 'honey dew' muskmelons stored at 2.5 ° and 5 °C after ethylene treatment at 20 °C. *J Am Soc Hort Sci* 104: 327-330.
- Lizada, M.C.C., Yang, S.F. (1979) A simple and sensitive assay for 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* 100: 140-146.
- Liu, H.P., Dong, B.H., Zhang, Y.Y., Liu, Z.P., Liu, Y.L. (2004) Relationship between osmotic stress and the levels of free, soluble conjugated and insoluble-conjugated polyamines in leaves of wheat seedlings. *Plant Sci* 166: 1261–1267.
- Loeffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett* 258: 42-46.

- Lu, S., Su, W., Li, H., Guo, Z. (2009) Absciscic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Biochem* 47: 132-138.
- Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J. (2001) Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci* 161: 125-132.
- Lutts, S., Almansouri, M., Kinet, J.-M. (2004) Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Sci* 167: 9-18.
- Ma X.L., Wang Y.J., Xie S.L., Wang C., Wang W. (2007) Glycinebetaine application ameliorates negative effects of drought stress in tobacco. *Russ J Plant Physiol* 54: 472-479.
- Maas, E.V., Hoffmann, G.J., (1977) Crop salt - current assessment. *ASCE, Irrig Drain Div ASCE* 103: 115-134.
- MacDonald, M.T., Lada, R.R., Robinson, A.R., Hoyle, J. (2009) Seed preconditioning with natural and synthetic antioxidants induces drought tolerance in tomato seedlings. *Hort Sci* 44: 1323-1329.
- Machácková, I., Hanisová, A., Krekule, J. (1992) Changes in the level of MACC during cold hardening and dehardening in winter wheat. *Physiol Plant* 84: 399-402.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I. (1990): Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Mannervik, B., Guthenberg, C. (1981): Glutathione transferase (Human placenta). *Methods Enzymol.*, 77: 231-235.
- McDonald, R.E. (1986) Effects of vegetable oils, CO₂, and film wrapping on chilling injury and decay of lemons. *Hortscience* 21: 476-477.
- McDonald, R.E., Kushad, M.M. (1986) Accumulation of putrescine during chilling injury of fruits. *Plant Physiol* 82: 324-326.
- Meeuse, B.J.D., Raskin, I. (1988) Sexual reproduction in the arum lily family with emphasis on thermogenicity. *Sex Plant Reprod* 1: 3-15.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. (2003) Photosynthesis and the activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp Bot* 49: 69-76.
- Meng, F.Z., Hu, L.P., Wang, S.H., Sui, X.L., Wei, L., Wei, Y.X., Sun, J.L., Zhang, Z.X. (2008) Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on cucumber seedling leaf carbohydrate metabolism under low temperature. *Plant Growth Regul* 56: 233-244.
- Métraux, J.P. (2002): Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 7: 332-334.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dietz, K.J. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* 132: 272-281
- Meuwly, P., Métraux, J. P. (1993): *Ortho*-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* 214: 500-505.
- Meyer, S. Genty, B. (1998) Mapping intercellular CO₂ mole fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging: significance of C_i estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiol* 116: 947-957.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A. (1997): Ameliorating effects of salicylic acid on lead and mercury - induced inhibition of germination and early seedling growth of two rice cultivars. *Seed Sci Technol* 25: 263-270.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A. (1999): Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol Plant* 42: 409-415.

- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.
- Mittler, R., Zilinskas, B.A. (1991) Purification and characterisation of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* 97: 962.
- Moinuddin K.H.M., Khannu-Chopra R. (2004) Osmotic adjustment in chickpea in relation to seed yield and yield parameters. *Crop Sci* 44: 449–455.
- Molina, A., Bueno, P., Marín, M.C., Rodríguez-Rosales, M.P., Belver, A., Venema, K., Donaire, J.P. (2002) Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytol* 156: 409-415.
- Moskova, I., Todorova, D., Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I. (2009) Effect of exogenous hydrogen peroxide on enzymatic and nonenzymatic antioxidants in leaves of young pea plants treated with paraquat. *Plant Growth Regul* 57: 193-202.
- Munné-Bosch, S., Penuelas, J. (2003): Photo- and antioxidative protection, and role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217: 758-766.
- Munns, R., Tester, M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-681.
- Murata, N., Takahashi, M.A., Hamazaki, Y. (1982) Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol* 23: 1071-1079.
- Nakano, Y., Asada, Y. (1987) Purification of ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28: 371.
- Nathawat, N.S., Nair, J.S., Kumawat, S.M., Yadava, N.S., Singh, G., Ramaswami, N.K., Sahu, M.P., D'Souza, S.F. (2007) Effect of seed soaking with thiols on the antioxidant enzymes and photosystem activities in wheat subjected to water stress. *Biol Plantarum* 51: 93-97.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002): Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388–395.
- Németh, M., Janda, T., Horváth, E., Páldi, E., Szalai, G. (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci* 162: 569-574.
- Nilsen E.T., Orcutte D.M. (1996) Phytohormones and plant responses to stress, in: Nilsen E.T., Orcutte D.M. (Eds.), *Physiology of Plant under Stress: Abiotic Factors*, John Wiley and Sons, New York, pp. 183–198.
- Nishida, I., Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 541-568.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K.-J., Foyer, C.H., Rennenberg, H. (1997) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* 112: 1071-1078.
- Nussbaum, S., Schmutz, D., Brunold, C. (1988): Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiol* 88: 1407-1410.
- Ordentlich, A., Linzer, R.A., Raskin, I. (1991) Alternative respiration and heat evolution in plants. *Plant Physiol* 97: 1545-1550.
- Overmyer, K., Brosché, M., Kangasjarvi, J. (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 8: 335-342.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2005): Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants. *Physiol Plant* 125: 356-364.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2006a): Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J Plant Nutr Soil Sci* 169: 239-246.

- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2006b): The effect of cadmium stress on phytochelatin, thiol and polyamine content in maize. *Cereal Res Commun* 34: 65-68.
- Pál, M., Leskó, N., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2007): Cadmium-induced changes in the membrane lipid composition of maize plants. *Cereal Res Commun* 35: 1631-1642.
- Pál, M., Szalai, G., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. (2002): Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol Szegediensis* 46: 119-120.
- Pan, Q., Zhan, J., Liu, H., Zhang, J., Chen, J., Wen, P., Huang, W. (2006): Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci* 171: 226-233.
- Pancheva, T.V., Popova, L.P., Uzunova, A.N. (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *J Plant Physiol* 149: 57-63.
- Pardossi, A., Vernieri, P., Tognoni, F. (1992) Involvement of abscisic acid in regulating water status in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling. *Plant Physiol* 100: 1243-1250.
- Parekh, D., Puranik, R.M., Srivastava, H.S. (1990): Inhibition of chlorophyll biosynthesis by cadmium in greening maize leaf segments. *Biochem Physiol Pflanzen* 186: 239-242.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. (2007): Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116.
- Pastori, G., Foyer, C.H. (2002): Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol* 129: 460-468.
- Penna S. (2003) Building stress tolerance through overproducing trehalose in transgenic plants, *Trends Plant Sci* 8, 355-357.
- Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Krantev, A., Szalai, G., Janda, T. (2008) Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. *Gen Appl Plant Physiol* 34: 133-148.
- Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Ivanova, A., Krantev, A., Szalai, G., Janda, T. (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem* 47: 224-231.
- Popovic, R.K., Kyle, D.J., Cohen, A.S., Zalik, S. (1979), Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol* 64 721-726.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Stewart, C.R. (1994a) Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol* 105: 619-627.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994b) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74.
- Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Singh, D.V (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci* 161: 765-771.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol Plant* 88: 712-718.
- Quinn, P.J. (1988) Effects of temperature on cell membranes. -In *Plants and temperature*. Symp. Soc. Exp. Biol. Vol. 42, 1988 (S.P. Long and F.I. Woodward, eds.) pp.237-258. The Company of Biologists Limited, Cambridge.
- Rácz, I., Kovács, M., Lásztity, D., Veisz, O., Szalai, G., Páldi, E. (1996) Effect of short-term and long-term low temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *J Plant Physiol* 148: 368-373.
- Rácz, I., Páldi, E., Szalai, G., Janda, T., Pál, M., Lásztity, D. (2008) Effect of S-methylmethionine on membrane integrity in higher plants exposed to low temperature stress. *J Plant Physiol* 165:1483-1490.

- Radotic, K., Ducic, T., Mutavdzic, D. (2000) Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot* 44: 105–113.
- Rakwal, R., Agrawal, G.K., Agrawal, V.P. (2001) Jasmonate, salicylate, protein phosphatase 2A inhibitors and kinetin up-regulate OsPR5 expression in cut-responsive rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol* 158: 1357-1362.
- Rao, M.V., Davis, K.R. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J* 17: 603-614.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂–metabolizing enzymes. *Plant Physiol* 115: 137-149.
- Rascio, N., Dalla Vecchia, F., Ferretti, M., Merlo, L., Ghisi, R. (1993) Some effects of cadmium on maize plants. *Arch Environ Con Tox* 25: 244-249.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 439-463.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R., Meeuse, B.J.D. (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601-1602.
- Rhoads, D.M., McIntosh, L. (1992) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell* 4: 1131-1139.
- Reese, R.N., White, C.A., Winge, D.R. (1992) Cadmium-sulfide crystallites in Cd-(γ -EC)_nG peptide complexes from tomato. *Plant Physiol* 98: 225-229.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas M.C., Zabalza, A., Corpas F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A., Sandalio L.M. (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ* 29: 1532-1544.
- Rüffer, M., Steipe, B., Zenk, M.H. (1995) Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters*, 377: 175-180.
- Sánchez-Casas, P., Klessig, D.F. (1994): A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol* 106: 1675-1679.
- Sakamoto A., Murata N. (2002) The role of glycinebetaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ* 25: 163–171.
- Sawada, H., Shim, I.S., Usui, K. (2006) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis - Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Sci* 171: 263-270
- Schreck, R., Rieber, P., Bauerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10: 2247-2258.
- Scott, I.M., Clarke, S.M., Wood, J.E., Mur, L.A.J. (2004) Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:1040-1049
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50: 1023–1036.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R.S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161: 1135–1144.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Jaleel, C.A., Mi, H.M. (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *CR Biol* 331: 433–441.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A., Fatkhutdinova, D.R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci* 164: 317–322.

- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S. (2000) Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiol* 124: 431-440.
- Siedlecka, A., Baszynski, T. (1993) Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol Plant* 87: 199-202.
- Sigfridsson, K.G.V., Bernat, G., Mamedov, F., Styring, S. (2004) Molecular interference of Cd^{2+} with photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1659: 19-31.
- Smirnov, N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech* 9: 214-219.
- Smith, M.A., Davies, P.J. (1985) Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol* 78: 89-91.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem* 175: 408-413.
- Souza, J., Dolder, H., Cortelazzo, A. (2005) Effect of excess cadmium and zinc ions on roots and shoots of maize seedlings. *J Plant Nutr* 28: 1923-1931.
- Srivastava, M.K., Dwivedi, U.N. (1998) Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *J Plant Physiol* 153: 409-414.
- Stevens, J., Senaratna, T., Sivasithamparan, K. (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regul* 49: 77-83.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol* 35: 235-270.
- Strobel, N.E., Kuc, A. (1995) Chemical and biological inducers of systemic acquired resistance to pathogens protect cucumber and tobacco from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathol* 85: 1306-1310.
- Subbarao G.V., Nam N.H., Chauhan Y.S., Johansen C. (2000) Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits, *J Plant Physiol* 157: 651-659.
- Szalai, G., Janda, T., Bartók, T. and Páldi, E. (1997) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* 101: 434-438.
- Szalai, G., Janda, T., Golan-Goldhirsh, A., Páldi, E. (2002) Effect of Cd treatment on phytochelatin synthesis in maize. *Acta Biol Szegediensis* 46: 121-122.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., Dubacq, J.-P. (2001) Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance. *J Plant Physiol* 158: 663-666.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., Szigeti, Z. (1996) Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *J Plant Physiol* 148: 378-383.
- Szalai, G., Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. (2005) Investigations on the adaptability of maize lines and hybrids to low temperature and cadmium. *Acta Agron Hung* 53: 183-196.
- Szalai, G., Kellös, T., Galiba, G., Kocsy, G. (2009) Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions *J Plant Growth Regul* 28: 66-80.
- Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenác, A., Páldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. *Biol Plant* 43: 637-640.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gallé, Á., Gémes, K., Poór P., Tari I. (2008) Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) salt stress

- tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. – *Acta Agronomica Hungarica* 58: 129-138.
- Szepesi Á, Csiszár J., Gémes K., Horváth E., Horváth F., Simon L.M., Tari I (2009) Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J Plant Physiol* 166: 914-925.
- Tachibana S (2000) Physiology of polyamines and their involvement in abiotic stress tolerance of plants. *Regul Plant Growth Dev* 35: 56–66.
- Tanaka, K., Takeuchi, E., Kubo, A., Sakaki, T., Haraguch, K., Kawamura, Y. (1991) Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Arch Biochem. Biophys* 286: 371.
- Tanguilig, V.C., Yambao, E.B., O'Toole, J.C., De Datta, S.K. (1987) Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. *Plant Soil* 103: 155-168.
- Tari I., Nagy M. (1994) Enhancement of extractable ethylene at light/dark transition in primary leaves of paclobutrazol-treated *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Physiol Plant* 90: 353-357.
- Tester, M., Davenport, R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 90: 503-507.
- Thomas, J.C., Perron, M., Davies, E.C. (2004) Genetic responsiveness to copper in the ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Sci* 167: 259-266.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1991) Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett* 284: 66-69.
- Todd E.Y., Robert B.M., Daniel R.G. (2004) ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant J* 40: 813–825.
- Tong, C.B.S., Yang, S.F. (1987) Chilling-induced ethylene production by beans and peas. *J Plant Growth Regul* 6: 201-208.
- Torres-Franklin, M.L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T. (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol Plantarum* 131: 201-210.
- Usadel, B., Blaesing, O.E., Gibon, Y., Poree, F., Hoehne, M., Guenter, M., Trethewey, R., Kamlage, B., Poorter, H., Stitt, M. (2008) Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant Cell Environ* 31: 518-547
- van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., Inzé, D. (2001): The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161: 405-414.
- van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. (1998): H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 3: 330-334.
- van de Venter, H.A. (1985) Cyanide-resistant respiration and cold resistance in seedlings of maize (*Zea mays* L.) *Annals of Bot.* 56: 561-563.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H.H. (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181: 759–776.
- Vernieri, P., Pardossi, A., Tognoni, F. (1991) Influence of chilling and drought on water relations and abscisic acid accumulation in bean. *Aust J Plant Physiol* 18: 25-35.
- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- Wahid, A., Perveen, M., Gelani, S., Basra, S.M.A. (2007) Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins *J Plant Physiol* 164: 283-294.

- Wang, C.Y. (1989) Relation of chilling stress to ethylene production. -In Low temperature stress physiology in crops (P.H. Li, ed.) pp. 177-189. CRC press, Boca Raton.
- Wang, C.Y., Adams, D.O. (1982) Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus*). *Plant Physiol* 69: 424-427.
- Wang, C.Y., Sams, C.E., Gross, K.C. (1985) Ethylene, ACC, soluble polyuronide, and cell wall noncellulosic neutral sugar content in 'Eldorado' pears during cold storage and ripening. *J Am Hort Sci* 110: 687-691.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., Archbold, D.D. (2006) Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol Technol* 41:244-251.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2001a) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 560: 285-292.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wang, Y.Y., Mopper, S., Hasenstein, K.H. (2001b) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *J Chem Ecol* 27: 327-342.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001): *Arabidopsis* defence against pathogens requires salicylic acid synthesized isochorismate synthase. *Nature* 414: 562-565.
- Wilkinson, S. Davies, W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25: 195-210.
- Xin, Z., Li, P.H. (1992) Absciscic acid induced chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 99: 707-711.
- Xin, Z., Li, P.H. (1993) Alternation of gene expression associated with abscisic acid-induced chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 102: 277-284.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y.G., Morel, F.F.M. (2008) Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* 452: 56-61.
- Yalpani, N., Léon, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol* 103: 315-321.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A., Raskin I. (1991): Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3: 809-818.
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Yoshida Y. (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J Exp Bot* 56: 1975-1981.
- Yang J., Zhang J., Liu K., Wang Z., Liu L. (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J Exp Bot* 58: 1545-1555.
- Yang Y, Qi M, Mei C. (2004) Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J* 40: 909-919.
- Yang, Z.M., Wang, J., Wang, S.H., Xu, L.L. (2003) Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta* 217: 168-174.
- Yildiz, M., Kasap, E. (2007) Comparison of germination responses of cultivated wheat (*Triticum*) and its wild relative (*Aegilops*) species under salinity, temperature and light. *Acta Agron Hung* 55: 407-415.
- Young T.E., Meeley R.B., Gallie D.R. (2004) ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant J* 40: 813-825.
- Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P. (2007): Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 173: 190-197.

- Zhang, L.X., Li, S.X., Liang, Z.S. (2009) Differential plant growth and osmotic effects of two maize (*Zea mays* L.) cultivars to exogenous glycinebetaine application under drought stress. *Plant Growth Regul* 58: 297-305.
- Zhang, M., Duan, L., Zhai, Z., Li, J., Tian, X., Wang, B., He, Z., Li, Z. (2004) Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia.
- Zhang, X., Zhang, Z., Chen, J., Chen, Q., Wang, X., Huang, R. (2005) Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta* 222: 494-501.
- Zhu, J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., Terry, T. (1999a) Overexpression of glutathione synthetase in *Brassica juncea* enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol* 119: 73-79.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry, N. (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* 121: 1169-1177.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete vezetését, hogy lehetővé tették a munka elvégzését.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Janda Tibornak és Dr. Páldi Emilnek a munka során nyújtott segítségükért, tanácsaikért, támogatásukért, valamint az értekezés alapos átnézéséért.

Köszönöm volt doktoranduszom, Dr. Pál Magda segítségét a kísérletes munkák egy részében.

Külön köszönet illeti Kövesdi Ferencné és Kóti Gyulánét, akikre mindig számíthattam és segítségük nélkül ez a munka talán el sem készülhetett volna.

Köszönöm volt szakdolgozóimnak, Németh Mónikának és Horgosi Szabinának szorgalmas munkájukat egy-egy részfeladat kidolgozásában.

Köszönöm Dr. Horváth Eszter segítségét a kísérletes munka egyes szakaszaiban.

Köszönettel tartozom Avi Golan professzor úrnak, akinél a fitokelatin-szintáz és ezzel együtt a Cd-stressz témát elkezdtem.

Szeretném megköszönni Dr. Tari Irmának az ACC/MACC, Dr. Hegedűs Attilának a Cd tartalom meghatározásban nyújtott segítségét.

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak a kollégáknak, akik bármilyen formában segítettek a munkámat.

Köszönet illeti Tölgyesné Kovács Katalint, gimnáziumi biológia tanárnőmet, aki nélkül valószínűleg nem lett volna belőlem kutató, valamint Halmi Lászlót, gimnáziumi kémia tanáromat és Dr. Bartók Tibort, akik nélkül talán sosem foglalkoztam volna analitikai kémiával.

S végül köszönöm Katának, hogy jutott időm a kísérletekre és a disszertáció elkészítésére.