

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A szalicilsav által szabályozott növényi védekezési válaszok és az intracelluláris oxidatív stressz vizsgálata

Poór Péter

**Növénybiológiai Tanszék
Szegedi Tudományegyetem**

2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. A növények mikrobiális kórokozókkal szembeni védekezésének alapjai	10
2.2. A napszak- és fény szerepe a növények védekezési válaszaiban	12
2.3. A szalicilsav (SA) bioszintézise, jelátvittele és élettani hatásai	16
2.4. Az SA és a reaktív oxigénformák (ROS) metabolizmusa	19
2.5. Az SA hatása a kloroplasztiszokra és a fotoszintézisre	22
2.6. Az SA hatása a mitokondriumokra és a mitokondriális elektrontranszportlánc működésére	25
2.7. Az SA hatása az endoplazmatikus retikulumra (ER) és az SA szerepe az ER stressz során	28
3. Célkitűzések	31
4. Anyagok és módszerek	33
4.1. Növénynevelési körülmények	33
4.2. Alkalmazott kezelések	33
4.2.1. A kitozán (CHT) kezelések	33
4.2.2. Az SA és a hormonkezelések	34
4.2.3. Az ER stressz indukciója és az UPR modulálása	34
4.3. RNS izolálás, DNáz kezelés, cDNS írás, qRT-PCR	34
4.4. A sztómaapertúra vizsgálata	37
4.5. A szuperoxid-gyökkanion ($O_2^{\cdot-}$) produkciójának meghatározása	37
4.6. A hidrogén-peroxid (H_2O_2) szintjének meghatározása	38
4.7. A BiP fehérje kimutatása és mennyiségének meghatározása	38
4.8. Az SA tartalom meghatározása	39
4.9. Az ionkieresztés vizsgálata	39
4.10. A malondialdehid (MDA) tartalom meghatározása	40
4.11. A NADPH-oxidáz enzimaktivitás meghatározása	40
4.12. Az antioxidáns enzimek aktivitásának mérése	41
4.13. A fotoszintetikus aktivitás meghatározása	42
4.14. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségének mérése	43
4.15. A keményítőtartalom és az oldható cukrok mennyiségének meghatározása	44

4.16. Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM).....	44
4.17. A hexokináz (HXK) enzim aktivitásának mérése.....	45
4.18. A glükóztartalom meghatározása	46
4.19. Mitokondriumok izolálása és integritásuk vizsgálata.....	46
4.20. A mitokondriális ROS és nitrogén-monoxid (NO) produkció mérése	47
4.21. A glutation szintek meghatározása	47
4.22. A glutation metabolizmusával kapcsolatos enzimek aktivitásának mérése.....	48
4.23. A kloroplasztiszok izolálása.....	49
4.24. A kloroplasztisz ROS produkciójának detekciója <i>in vitro</i>	49
4.25. A kloroplasztisz H ₂ O ₂ produkciójának detekciója <i>in vivo</i>	50
4.26. Statisztikai analízis	50
4. Eredmények	51
4.1. A különböző időpontokban alkalmazott gomba elicitor, kitozán kezelés hatása az SA jelátvitelére és a növények védekezésére	51
4.2. Az SA kezelések fényfüggő hatása a ROS metabolizmusra	55
4.3. Az SA kezelések fényfüggő hatása a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra	65
4.4. A hexokinázok és szerepük az SA-indukálta mitokondriális ROS produkcióban	73
4.5. Az SA szerepe a ROS metabolizmusban ER stressz során.....	81
6. Eredmények értékelése	97
6.1. A különböző időpontban alkalmazott gomba elicitor, kitozán kezelés hatása az SA jelátvitelére és a növények védekezésére	97
6.2. Az SA kezelések fényfüggő hatása a ROS metabolizmusára	100
6.3. Az SA kezelések fényfüggő hatása a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra	105
6.4. A hexokinázok és szerepük az SA-indukálta mitokondriális ROS produkcióban	109
6.5. Az SA szerepe a ROS metabolizmusban ER stressz során.....	112
7. Összefoglalás	121
8. Tézisek	126
9. Irodalomjegyzék	130
10. Köszönetnyilvánítás	150

Rövidítések jegyzéke

AA	Nátrium-acetát puffer (Acetic Acid, sodium salt buffer)
ABA	Abszcizinsav (Abscisic Acid)
ABC	ATP-Binding Cassette transzporter
ACC	1-Aminociklopropán-1-karbonsav (1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic acid)
ANT	Adenin nukleotid transzporter (Adenine Nucleotide Translocator)
AOX	Alternatív oxidáz (EC 1.10.3.11)
APX	Aszkorbát-peroxidáz (EC 1.11.1.11)
AQP	Akvaporin
AR	Amplex™ Red
AsA	Aszkorbát (redukált)
βCC	β-ciklocitrál
BHT	Butilhidroxi-toluén
BI-1	Bax Inhibitor-1
BiP	Endoplazmatikus retikulum chaperon (Binding Protein)
BSA	Borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
bZIP	Bázikus leucin-cipzár (Basic Leucine Zipper) transzkripció faktor
CCA1	Circadian Clock-Associated 1 gén
CDNB	1-klór-2,4-dinitrobenzol
CDPK	Kalcium-függő protein kináz (Calcium-Dependent Protein Kinase)
CEF	Ciklikus elektronáramlás (Cyclic Electron Flow)
CERK1	Kitin elicitor receptor kináz 1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1)
CHE	CCA1 HIKING EXPEDITION transzkripció faktor
CHT	Kitozán (Chitosan)
CM	Korizrát-mutáz
CNX	Calnexin
COX	Citokróm <i>c</i> -oxidáz (EC 1.9.3.1)
<i>CPR5</i>	Constitutive expresser of pathogenesis-related genes-5
CRT	Kalretikulin (Calreticulin)
CRY	Kriptokróm (Cryptochrome)
Cu/ZnSOD	Réz/cink-szuperoxid-dizmutáz
CUL3	Cullin3 E3 ligáz
DAB	3,3-diamino-benzidin
DAF-FM DA	4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluoro-fluoreszcein diacetát
DEF	Defenzin
DHA	Dehidroaszorbát
DHAR	Dehidroaszorbát reduktáz (EC 1.8.5.1)
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoészav
DTT	Dithiothreitol
EDS	Enhanced Disease Susceptibility
EF	Elongációs faktor
EL	Ionkieresztés (Electrolyte Leakage)
ER	Endoplazmatikus retikulum
ERAD	ER-asszociált degradáció
ERF1	ET-válasz faktor 1 (Ethylene Response Factor 1)
ERO1	ER oxidoreduktáz 1 (EC 1.8.4)
ERQC	ER Quality Control
ERSE	ER stressz válaszelem (ER Stress Responsive Element)

ET	Etilén
ETC	Elektrontranszportlánc (Electron Transport Chain)
ETI	Effektor-indukálta immunitás (Effector-Triggered Immunity)
Fd	Ferredoxin
FeSOD	Vas-szuperoxid-dizmutáz
Flg22	Flagellin 22 aminosavas epitóp
FLS2	Flagellin-érzékelő receptor 2 (Flagellin Sensing 2)
FNR	Fd-NADP ⁺ oxidoreduktáz
FT	Friss tömeg
F _v /F _m	A második fotokémiai rendszer maximális kvantumhatásfoka
Glc	Glükóz
GPX	Glutation peroxidáz (EC 1.11.1.9)
GR	Glutation reduktáz (EC 1.8.1.7)
GSH	Redukált glutation
GSSG	Glutation diszulfid (oxidált glutation)
GST	Glutation transzferáz (EC 2.5.1.18)
H ₂ DCF-DA	2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát
HO ₂ [•]	Hidroperoxil gyök
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)
HR	Hiperszenzitív válasz (Hypersensitive Response)
HRP	Torma-peroxidáz (Horseradish Peroxidase)
HXK	Hexokináz
ICS1	Izokorizmát-szintáz 1 (Isochorismate Synthase 1)
IRE1	Inozitigénylő enzim 1 (Inositol-requiring enzyme 1)
ISR	Indukált szisztémikus rezisztencia (Induced Systemic Resistance)
JA	Jázmonsav (Jasmonic Acid)
KAT	Kataláz (EC 1.11.1.6)
LAR	Lokális szerzett rezisztencia (Local Acquired Resistance)
LRR	Leucin-gazdag ismétlődés (Leucin Rich Repeat)
LysM	Lizin motívum
MAMP	Mikróba-kapcsolt molekuláris mintázat (Microbe-Associated Molecular Pattern)
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MDA	Malondialdehid
MDHAR	Monodehidroaszorbát reduktáz (EC 1.6.5.4)
MES/KCl	2-(N-morfolin)-etánszulfonsav/kálium-klorid
MeSA	Metil-szalicilsav (Methyl-Salicylic Acid)
MnSOD	Mangán-szuperoxid-dizmutáz
NADPH-oxidáz	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidáz (EC 1.6.3.1)
NAG	N-acetil-D-glükózamin
NahG	Szalicilát-hidroxiláz
NB-LRR	Nukleotid-kötő LRR-gazdag receptor
NBT	Nitrotetrazólium-kék
NHP	N-hidroxi-pipekolinsav
NLR	Nukleotid-kötő leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptorok
NO	Nitrogén-monoxid
NPQ	A fényindukált energia disszipáció kvantumhatásfoka a második fotokémiai rendszerben (Non-Photochemical Quenching)
NPR1	Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1
Nr	<i>Never ripe</i> (ET receptor) paradicsom mutáns

O ₂ ^{•-}	Szuperoxid-gyökkanion
OEC	Oxigénfejlesztő komplex (Oxygen-Evolving Complex)
OH•	Hidroxil gyök
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PAL	Fenilalanin-ammónia-liáz (Phenylalanine Ammonia Lyase)
PAMP	Patogén-kapcsolt molekuláris mintázat (Pathogen-Associated Molecular Pattern)
PAO	Poliamin-oxidáz (EC 1.5.3.11)
PBA	4-fenilvajsav (4-Phenylbutyric acid)
PC	Plasztocianin
PCD	Programozott sejthalál (Programmed Cell Death)
PDI	Protein diszulfid izomeráz
PEP	Foszfoenol-piruvát
PERK	Protein kináz-szerű ER kináz
Pfr	Távoli vörös fényt abszorbeáló fitokróm forma
<i>p</i> -HBA	Para-hidroxi-benzoésav (<i>p</i> -HydroxyBenzoic Acid)
Phe	Fenilalanin
PHOT	Fototropin (Phototropin)
PHY	Fitokróm (Phytochrome)
PIF	Fitokróm interakciós faktor (Phytochrome-Interacting Factor)
Pip	Pipekolinsav
PM	Plazmamembrán
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
POD	Gvajakol-peroxidáz (EC 1.111.7)
PQ	Plasztokinon
PR	Patogenezishez kapcsolódó (Pathogenesis-Related) gén/fehérje
Pr	Vörös fényt abszorbeáló fitokróm forma
PRR	Mintázatfelismerő receptor (Pattern Recognition Receptor)
PSI	Az első fotokémiai rendszer (Photosystem I)
PSII	A második fotokémiai rendszer (Photosystem II)
PTI	PAMP-indukálta immunitás (PAMP-Triggered Immunity)
PTP	Mitochondriális permeabilitási tranzíciós pórus
PVPP	Polivinil-polipirrolidon
qP	Fotokémiai kioltási együttható
qRT-PCR	Kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
R	Rezisztencia gén
RBOH	NADPH-oxidáz (Respiratory Burst Oxidase Homolog)
RIDD	Regulated IRE1-dependent decay
RLCK	Receptor-szerű citoplazmatikus kináz (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase)
RLK	Receptor-szerű kináz (Receptor-Like Kinase)
ROS	Reaktív oxigénformák (Reactive Oxygen Species)
RT	Reverz transzkriptáz
S1P	Site 1 proteáz
SA	Szalicilsav (Salicylic Acid)
SABP2	SA-kötő protein 2 (Salicylic Acid-Binding Protein 2)
SAG	Szenescencia-asszociált gének
SAM	S-adenozin-L-metionin
SAMT	SA metiltranszferáz

SAR	Szisztemikus szerzett rezisztencia (Systemic Acquired Resistance)
SDH	Szukcinát-dehidrogenáz (EC 1.3.5.1)
SE	Standard hiba (Standard Error)
SGE	SA-glükóz-észter
SOD	Szuperoxid-dizmutáz (EC 1.15.1.1)
TCA	Triklórecetsav (Trichloroacetic Acid)
TCV	Tarlórépa göndörödés vírus (Turnip Crinkle Virus)
TEM	Transzmissziós elektron mikroszkópia
TEMED	Tetrametil-etilén-diamin
TF	Transzkripció faktor
TGA	TGACG-kötő transzkripció faktor
TIC	Time for Coffee transzkripció faktor
Tm	Tunikamicin
TMV	Dohány mozaik vírus (Tobacco Mosaic Virus)
TRIS	Trisz-hidroximetil-amino-metán
UPLC	Ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Ultra Performance Liquid Chromatography)
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	UPR válaszelem
UVR	UV receptor
VDAC	Feszültségfüggő anioncsatorna (Voltage-Dependent Anion Channels)
VPE	Vakuoláris processzáló enzim (Vacuolar Processing Enzyme)
VT	Vad típus
ΦPSII	A második fotokémiai rendszer effektív kvantumhatásfoka fényadaptációt követően

1. Bevezetés

A klímaváltozás, valamint a szélsőséges időjárási jelenségek gyakoribbá válása egyre jobban veszélyezteti a növénytermesztést, ami számos kihívás elé állítja a gazdáktól a növénynemesítőkön és agrárszakembereken át a kutatókat is. E környezeti hatások kapcsán megváltozik/megváltozhat a növényeket körülvevő mikróbák összetétele, mely hatással lehet a növények mindennapi életére, növekedésére, fejlődésére és védekezési válaszáira egyaránt. Ezek mellett, ezekkel szoros kapcsolatban jelenik meg a minél ellenállóbb, minél nagyobb hasznot hozó fajták szelektálásának és nemesítésének igénye is. Összességében tehát a környezet-mikróbák-növény hármás alapos és mély ismerete, valamint (alap)kutatása szükségzerű, hogy minél jobban leírjuk és megértsük az egyes biológiai folyamatokat, melyek a változások, válaszok hátterében állnak, így biztosítva lehetőséget a tudományos ismeretek gyakorlati szempontú felhasználására is. Minél mélyebb a tudásunk egy-egy jelenség kapcsán, annál hatékonyabb és célzottabb lehet az esetlegesen szükséges beavatkozás például a növények védekezésének fokozása érdekében.

A növények védekezését számos külső és belső tényező befolyásolja, azonban a gyors és hosszabb távú növényi válaszok és stratégiák fő szabályozói a növényi hormonok és a közöttük kialakuló kölcsönhatások. A növekedést és fejlődést reguláló hormonok, mint például az auxinok, citokininek, gibberellinek és a brasszinoszteroidok, valamint a védekezés szabályozásában szerepet játszó fő hormonok, mint például a szalicilsav, a jázmonátok, az etilén és az abszcizinsav nem elszigetelten, hanem egymással összefonódva befolyásolják a stresszválasz kialakítását. Ugyanakkor egy-egy hormon specifikus hatásokkal is bír, melyekben számos más molekulával, mint például a reaktív oxigénformákkal (ROS) vagy a nitrogén-monoxiddal (NO) működik közre. A bonyolult élettani, biokémiai és molekuláris változások felfedezése és leírása nélkülözhetetlen tehát, hogy minél pontosabb képet kapjunk ezen hormonok kapcsán, mely munka folyamatosan zajlik, egyre több új ismeretet szerezve és bemutatva a növény- és agrártudományok szakterületein.

A növényi hormonok közül a növényi védekezésben szerepet játszó egyik fő molekula a szalicilsav (SA), melyről csupán az utóbbi 30 évben nőtt meg szignifikánsan az ismeretünk. Ma már tudjuk, hogy az eltérő növényfajok és fajták alap SA szintje más és más lehet, mely jelentősen befolyásolhatja az adott faj/fajta védekezési válaszait. Ismerjük az SA jelátvitelét és receptorát, melynek koncentrációfüggő működésével kapcsolatosan még több kérdés tisztázatlan maradt. Emellett ismerjük lokális és szisztémikus hatásait is, melyek kapcsán újabb

és újabb molekulákat azonosítottak az utóbbi 10 évben, de egyes epigenetikai változásokat (pl.: hiszton acetilációt) indukáló hatásai is ismertté váltak az utóbbi időben. Legújabbán pedig bioszintézisének útvonala, transzportja és más hormonokkal vagy éppen a illékony komponensekkel történő kapcsolata került a kutatások fókuszpontjába.

Az SA kapcsán hamar megállapítást nyert annak koncentráció- és időfüggő hatása. Míg egyes alacsonyabb koncentrációk a növények védekezését fokozzák, úgy a nagyobb koncentrációk elpusztítják a növényi sejteket. Ez utóbbi folyamat, a programozott sejthalál (PCD) vizsgálata a 2000-es évek elején indult, de még ma is sok a nyitott kérdés a PCD mechanizmusára és a növények életfolyamataiban betöltött szerepére vonatkozóan. Az időfüggő válaszok pedig feltárták, hogy már 10-15 percen belül jelentős változásokat indukál az SA sejszinten, a több óra/nap alatt kifejtett szervezetszintű hatása mellett. Jelen dolgozat is ezekhez a vizsgálatokhoz kapcsolódik, és azt elemzi, hogy a napszak és a fény jelenléte/hiánya hogyan befolyásolja az SA növényi védekezési válaszok kialakításában játszott szerepét. Ugyanakkor a gyors növényi védekezési válaszok generálásában egy-egy sejtorganellumnak és a rá gyakorolt hormonhatásnak, valamint a sejtorganellumok interakciójának kulcsszerepe lehet. A dolgozatban az SA jelátvivő és effektor molekuláiként is funkcionáló ROS különböző sejtorganellumokban [citoplazma, kloroplasztisz, mitokondrium, endoplazmatikus retikulumban (ER)] történő keletkezésére, valamint azok metabolizmusára gyakorolt hatása kapcsán végzett kutatásokat foglalom össze és mutatom be.

A növények védekezésének pontosabb leírása és megértése, valamint ebben az SA és ROS metabolizmus kapcsolatának sejtorganellum szintű ismerete számos új lehetőséget és irányt mutathat a növény- és agrártudományok számára. Nemcsak az új, SA-produkciót serkentő vagy éppen gátló növényvédő szerek vagy herbicidek fejlesztése, hanem egyes vegyszerek kijuttatásának napszaktól függő időzítése is lehet új perspektíva a ROS generálás vagy kioltás miatt. Emellett további alternatíva lehet a nemesítés számára magasabb endogén SA tartalmú fajták nemesítése, SA markerek (napszakfüggő) vizsgálata és fejlesztése. A hasznosítás további potenciálja még a növényi védekezés vagy PCD indukció további, sejtorganellumokra specifikus markereinek kifejlesztése is. Emellett segítheti olyan mikrobiális összetételű biostimulánsok fejlesztését is, melyek pozitív hatással lehetnek a mezőgazdasági haszonnövények SA által szabályozott védekezési folyamataira különböző stressztényezők mellett.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növények mikrobiális kórokozókkal szembeni védekezésének alapjai

A biotikus stresszorokkal szembeni növényi védekezés leírásának legelfogadottabb modellje szerint a növények első lépésben különböző receptorok segítségével érzékelik a mikrobiális kórokozókat, mely kiváltja az ún. patogén-indukálta immunitást (PTI) vagy az effektor-indukálta immunitást (ETI) (Jones és Dangl, 2006; Saijo és Loo, 2020). A különböző patogén-kapcsolt molekuláris mintázatokat (PAMP) vagy mikroba-kapcsolt molekuláris mintázatokat (MAMP) a PTI kialakulása során a sejtfelszínen lokalizálódó mintázatfelismerő receptorok (PRR) ismerik fel (Jones és Dangl, 2006; Acevedo és mtsai. 2015). A PRR-ek közé tartoznak a leucin-gazdag ismétlődéseket (LRR) tartalmazó receptor-szerű kinázok (RLK), mint az FLS2 (Flagellin Sensing 2) és az EFR, melyek a bakteriális flagellint (flg22 epitóp), továbbá az elongációs faktor (EF)-Tu-t (elf18/elf26 epitóp) detektálják. Emellett a PRR-ek közé sorolható a lizin motívumot (LysM) tartalmazó RLK kitin elicitor receptor kináz (CERK1) is, mely a gomba eredetű kitin oligomereket és a bakteriális peptidoglikánokat ismeri fel (Couto és Zipfel, 2016). A receptor-ligand kötést követően olyan konformációváltozások indukálódnak, melyek koreceptor/adapter kinázokkal fehérje foszforilációs kaszkádokat indítanak el az RLK-kon és receptorszerű citoplazmatikus kinázokon keresztül. A PRR-ek által indukált jelátvitel részeként megnő a citoplazmatikus szabad Ca^{2+} szint, a plazmamembránon lokalizált NADPH-oxidáz (RBOH) aktivitásának köszönhetően fokozódik a ROS produkciója az apoplastban, aktiválódnak a Ca^{2+} -függő protein kinázok (CDPK) és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád, mely végső soron a védekezésben szerepet játszó hormonok, mint például a szalicilsav (SA) bioszintézisét fokozza, és ezáltal széleskörű transzkripció, transláció és metabolikus változásokat indukál a növényi sejtekben (Yu és mtsai. 2017; Saijo és Loo, 2020).

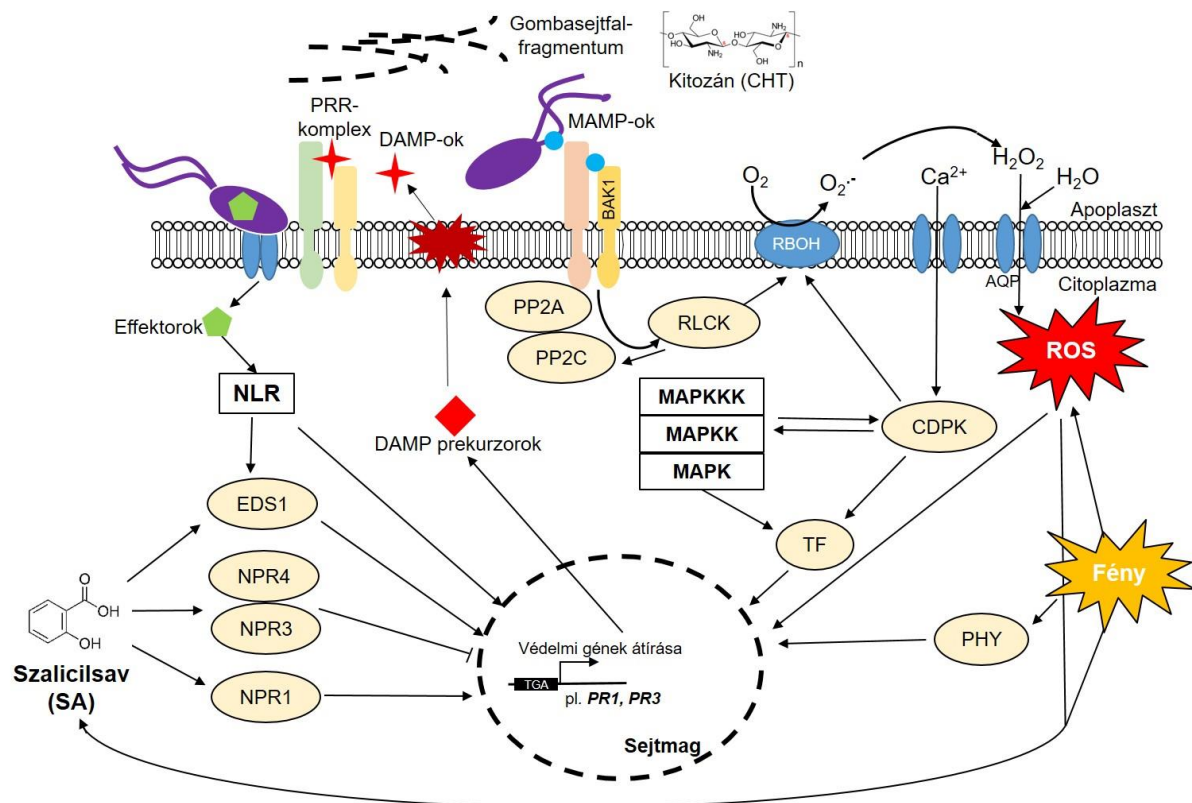
Ugyanakkor a széles spektrumú és gyors PTI legyőzése érdekében a különböző mikrobiális patogének egy másik szinten is támadást indíthatnak a növények ellen, melynek részeként fajra jellemző effektor molekulákat (virulencia faktorokat) termelhetnek (Toruño és mtsai. 2016). Baktériumok esetében az egyik legjelentősebb effektor molekula a koronatin, mely például az elsődleges védekezési válasz részeként indukált sztómazárást meggátolja, ezáltal pedig a patogéneknek további bejutási lehetőséget biztosít (Montillet és Hirt, 2013; Toum és mtsai. 2016). A baktériumok mellett a gombák is képesek virulenciafaktorként például toxinokat szintetizálni (pl.: fumonizinek), melyek a növényi védekezést gyengítik (Xing és mtsai. 2013; Iqbal és mtsai. 2021). Emiatt a növények különböző intracelluláris receptorokat

fejlesztettek ki, beleértve a nukleotid-kötő domént és LRR-t tartalmazó fehérjéket (NLR), amelyek közvetlenül vagy közvetve felismerik a mikrobiális effektorokat. Az NLR aktiválódása a védekezés egy felerősített formáját indukálja, mely gyakran lokalizált programozott sejthalálhoz (PCD) vezet, melynek az egyik formája a hiperszenzitív válasz (HR), ami megakadályozza a patogének további terjedését a megfertőzött növényi szövetben (Jones és Dangl, 2006; Han, 2019). Bár a HR nem szükségszerű, de gyakori kísérője az ETI-nek, mely a PTI-vel összehasonlítva robusztusabb növényi válaszokat generál a kórokozókkal szemben (Jones és Dangl, 2006; Thomma és mtsai. 2011).

A PTI és ETI azonban nem elszigetelten történik, hanem az egész növényre kihathat. A kórokozók és/vagy a károsodás lokális felismerését követően ugyanis olyan jelátviteli folyamatok generálódhatnak, melyek részeként mobilis jelek lokálisan, az adott szervben későbbi hatást is kiváltanak. A lokális rezisztencia mellett a növények disztális, a fertőzéstől távolabbi szerveiben kialakulhat az ún. szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) is, mely a másodlagos fertőzésekkel szemben védi a növényi egyedet (Jones és Dangl 2006; Acevedo és mtsai. 2015; Han, 2019). Emellett ismert az is, hogy a növényi gyökerek mikrobiomjában található jótékony mikrobák elősegíthetik a növények növekedését és fejlődését, valamint az egész növényre kiterjedő védelmet nyújthatnak a különböző kórokozók és növényevők széles köre ellen azáltal, hogy az ún. indukált szisztémás rezisztenciát (ISR) okozzák (Pieterse és mtsai. 2014). A lokális és szisztémikus válaszokban, valamint az ISR során kulcsfontosságú molekulák lehetnek többek között a ROS és a reaktív nitrogénformák, a pipekolinsav (Pip), az N-hidroxi-pipekolinsav (NHP), illetve a hosszútávú hatások kialakításában a védekezéssel kapcsolatos hormonok, mint például az SA, különböző patogenezissel kapcsolatos (PR) védelmi gének és fehérjék szabályozásával (Ding és mtsai. 2018; Hartmann és mtsai. 2018; Vlot és mtsai. 2021).

A különböző növényi kórokozók növényekre gyakorolt rövid- és hosszútávú hatása elicitorokkal is jól tanulmányozható, mint például a kitozán (CHT), amely a gombasejtfalat alkotó kitin deacetilált származéka (Boller és Felix, 2009). A CHT esetében többek között leírták, hogy a CHT gátolja a fény által indukált sztómányitódást paradicsom növényekben, amit a Ca^{2+} és a ROS közvetít (Lee és mtsai. 1999; Khokon és mtsai. 2010). Azt is megfigyelték, hogy a CHT nemcsak gyors ROS produkciót, hanem jelentős NO képződést is indukált a sztómák záródása előtt (Srivastava és mtsai. 2009). Kimutatták azt is, hogy a CHT nem befolyásolja az endogén abszcizinsav (ABA), sem az endogén jázmonsav (JA) szinteket lúdfűben (Issak és mtsai. 2013), hanem az SA jelátvitelén keresztül fejt ki sztómazáró hatását

(Prodhan és mtsai. 2017). Éppen ezért a CHT kezelés hatékony módja lehet a növények SA általi védekezésének további vizsgálatához.



1. ábra: A növények védekezési válaszáinak indukciója és jelátvittele (Saijo és Loo, 2020 alapján módosítva). A mikroba/károsodás-kapcsolt molekuláris mintázatok (MAMP-ok/DAMP-ok) észlelése különböző receptorkomplexeken keresztül történik a növényekben. A sejtfelszínen lokalizálódó mintázatafelismerő receptorok (PRR) aktiválódását követően, például a receptorszerű citoplazmatikus kinázok (RLCK) és a BAK1, valamint a PP2A/2C disszociációját követően egy specifikus intracelluláris jelátvitel aktiválódik, amely magában foglalja a Ca^{2+} jelátvitelt, a Ca^{2+} -függő protein kinázokat (CDPK-k) és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaskádokat, valamint a védekezéssel kapcsolatos transzkripciós faktorokat (TF), mely végső soron a védekezésben szerepet játszó gének átírásához vezet. A patogén effektorok sejten belüli felismerése a nukleotid-kötő leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptorok (NLR) segítségével történik, mely az EDS1 (Enhanced disease susceptibility 1) és az SA jelátviteléhez kapcsolódik (Venugopal és mtsai. 2009). A kórokozó általi kihívásokra válaszul a növényi sejt az SA szintekben bekövetkező változásokat és így az SA NPR1 (Nonexpresser of PR genes 1) általi jelátvitelét is aktiválja a transzkripciós újraprogramozás és védekezés fokozásának érdekében (AQP, akvaporin; CHT kitozán; PHY, fitokróm; PRR, mintafelismerő receptor; RBOH, NADPH-oxidáz; ROS, reaktív oxigénformák).

2.2. A napszak- és fény szerepe a növények védekezési válaszaiban

A környezeti tényezők, többek között a fény, a páratartalom és a hőmérséklet döntően befolyásolják a növények morfológiáját, fiziológiai folyamatait, abiotikus- és biotikus stresszel

szembeni védekezését és az esetleges fertőzések kimenetelét (Panchal és Melotto, 2017; Velásquez és mtsai. 2018). Ezen tényezők közül a fény az egyik legfontosabb környezeti faktor, mely nemcsak a növények optimális növekedését és fejlődését szabályozza, hanem kitüntetett szerepet játszik a növények stresszválaszaiban is (Chen és mtsai. 2004; Kazan és Manners, 2011; Kangasjärvi és mtsai. 2012). A fény mind kvantitatív, mind pedig kvalitatív tulajdonságokkal is bír. A fotonokat különböző fotoreceptorok, úgymint a vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok (phyA–phyE), a kék fényt érzékelő kriptokrómok (cry1, cry2), fototropinok (phot1, phot2) és a Zeitupe család tagjai (ZTL, FKF1, LKP2), valamint az UV fényt detektáló UV-B receptorok (UVR8) segítségével érzékelik a növények (Folta és Carvalho, 2015; Demarsy és mtsai. 2018; Podolec és mtsai. 2021). A fotoreceptorokkal történő fényérzékelés, valamint a növények növekedése és fejlődése (pl.: a hipokotil hosszának növekedése, az árnyék elkerülése stb.) között szoros kapcsolat van, melyet számos hormon szabályoz (de Wit és mtsai. 2016; Paik és Huq, 2019). Emellett a fény biztosítja a szükséges energiát a növények fotoszintéziséhez (Dodd és mtsai. 2005) és befolyásolhatja a redox folyamatokat is (Borbély és mtsai. 2022). Éppen ezért az optimális fényviszonyokhoz képest a magas- és alacsony fényintenzitás, a fény összetételének változása, az árnyék vagy a sötétség, vagy éppen a fényperiódus hosszának és időszakának megváltozása eltérő növényi stresszválaszokat, valamint a sejtek metabolizmusának megváltozását okozhatja. Ezeket a folyamatokat több hormon is szabályozza, mint például az SA, a JA és az ET (Roberts és Paul, 2006; Hua, 2013; Ballaré, 2014; Karapetyan és Dong, 2018; Carvalho és Castillo, 2018). Éppen ezért a fény hiánya (pl.: éjszaka vagy tartós sötétség alkalmával) egyaránt módosíthatja a fénytől, a cirkadián órától és a fotoszintetikus aktivitástól függő fiziológiai-, biokémiai- és molekuláris stresszválaszokat a növényekben, mely különösen fontos lehet a védekezésük szempontjából.

A fény és a sötétség periodikus változása által fenntartott cirkadián óra számos molekuláris, fiziológiai és metabolomikai változást szabályoz az élőlényekben (Reddy és Rey, 2014). Jól ismert, hogy a növényekben a fényperiódus alatt felhalmozott szénhidrátok (pl.: keményítő) felhasználása szintén a cirkadián óra regulációja alatt áll (Graf és mtsai. 2010). A napi ritmus során a felkelő Nap hajnali kék fénye stimulálja a sztómák nyitódását, míg a kék fény a vörös hullámhossztartományba eső fénysugarakkal együtt a szén-dioxid asszimilációját serkenti a fényperiódusban, a C3-as és C4-es növényekben (Suetsugu és mtsai. 2014). Este, a sötétben a sztómák ismét zárva vannak ezekben a növényekben, mely egyben az elsődleges védelmi vonalat is jelenti a patogénnel szemben (Roberts és Paul, 2006; Shimazaki és mtsai. 2007). A növényi hormonok közül az SA és a JA/ET játszik fő szerepet a biotróf, illetve

a nekrotróf kórokozókkal szembeni védekezés során (Wasternack és Hause, 2013). Ugyanakkor a különböző növényi szövetekben az SA és a JA mennyiségének alapszintjei, így a növények védekezési válaszai szintén a cirkadián óra szabályozása alatt állnak (Roden és Ingle, 2009; Spoel és van Ooijen, 2014; Lu és mtsai. 2017; Karapetyan és Dong, 2018). A *TIME FOR COFFEE (TIC)* éjjel expresszalódó óragén gátolja a JA jelátvitelét este, sötétben és hozzájárul az erőteljesebb JA-függő immunválaszok kialakításához reggel. A JA szintekben a fényperiódus közepén mutatható ki maximum, míg az SA szintje éjjel, a sötétben a legmagasabb, mivel az SA bioszintézis egyik kulcsenzimének transzkripciója (*ISOCHORISMATE SYNTHASE 1; ICSI*) az éjszaka expresszalódó óra-transzkripció faktor *CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE)* regulációja alatt áll (Zheng és mtsai. 2015). Éppen ezért a patogének támadásának időpontja és a fény jelenléte vagy éppen hiánya kulcsfontosságú a növények ezen hormonok által szabályozott védekezésében.

Jól ismert, hogy számos baktérium- vagy gombafertőzés eredményességét a sötétség segíti (Santamaría-Hernando és mtsai. 2018). A fényt a patogének is különböző fotoreceptorok segítségével érzékelik (Reddy és Rey, 2014), mely jelentős hatással van fiziológiai folyamataikra, különösen a motilitásukra, adhéziójukra és a virulenciájukra. Ezt számos növénypatogén baktérium esetében is leírták: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Wu és mtsai. 2013; McGrane és Beattie, 2017), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Shah és mtsai. 2016; Moyano és mtsai. 2020), *Pseudomonas cichorii* JBC1 (Nagendran és Lee, 2015; Rajalingam és Lee, 2018), *Agrobacterium fabrum* (Bai és mtsai. 2016), *Xanthomonas campestris* (Bonomi és mtsai. 2016) és *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Kraiselburd és mtsai. 2012). Ismert az is, hogy a fény közvetlenül gátolhatja növénypatogén gombaspórák csírázását, a fonalak növekedését és csökkentheti a gombafertőzés hatékonyságát is. Ezt szintén számos növénypatogén gomba esetében megfigyelték: *Botrytis cinerea* (Caires és mtsai. 2015), *Fusarium graminearum* (Beyer és mtsai. 2004), *Phakopsora pachyrhizi* (Li és mtsai. 2010) és *Puccinia hemerocallidis* (Mueller és Buck, 2003). Éppen ezért a növények számára a védekezés nagyobb kihívást jelent éjjel, illetve sötétben, mint nappal, a fényen (Ballaré, 2014).

Habár az elsődleges védelmi vonalat jelentő sztómák éjjel zárva vannak, hajnalban ki kell nyílniuk, mely „infekciós ablakot” képez a növényi kórokozók számára (Karapetyan és Dong, 2018). A sztómák gyors zárásában és a lokális, valamint a szisztemikus védekezés megindításában kulcsszerepet játszanak a fent említett hormonok, köztük is a kitüntetett szereppel bíró SA (Loake és Grant, 2007; Vlot és mtsai. 2009; Dempsey és Klessig, 2017; Zhang és Li, 2019; Ding és Ding, 2020). A patogének által indukált ROS és NO produkció fokozza mind az SA, mind pedig a JA/ET bioszintézisét a fertőzés helyén, mely hormonok

további ROS és NO keletkezését okozhatják. Ezen szabadgyökök nagymértékű felhalmozódása a fehérjék, lipidek és nukleinsavak károsodását, majd gyors és lokalizált HR-t váltanak ki a növényekben a patogénfertőzés helyén, mely meggátolja a kórokozók további terjedését a növények szöveteiben. A fertőzés helyétől távolabbi növényi szövetekben az SA (közvetett/közvetlen) közreműködésével kialakulhat az SAR. Ez megvédi a növényt a további patogéntámadásoktól azáltal, hogy fokozódik a távolabbi szövetekben a patogenezishez kapcsolt gének (pathogenesis-related, PR) expressziója, a glukanázok- és kitinázok aktivitása, a másodlagos anyagcseretermékek szintézise (pl.: fitoalexinek) és megváltozik a sejtfal összetétele is (pl.: lignin és kallóz felhalmozódás) (Dempsey és Klessig, 2012; Mishina és Zeier, 2007; Gruner és mtsai. 2013; Klessig és mtsai. 2018). Ugyanakkor megfigyelték azt is, hogy nemcsak a szöveti SA, JA és ET koncentrációk, hanem mind a HR, mind pedig az SAR kialakulása nagyban függ a fény jelenlététől, illetve annak hiányától (Roden és Ingle, 2009; Iqbal és mtsai. 2021). Elsőként Zeier és mtsai. (2004) írták le, hogy *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* fertőzést követően az SA szintek alacsonyabbak a sötétben és a kisebb fényintenzitáson történt fertőzést követően, mint a normál fotoperióduson. Ezzel szemben a JA szintekben ellentétes változások következtek be a lúdfű növények leveleiben (Zeier és mtsai. 2004). Mások később kimutatták, hogy az SA szintek szintén alacsonyabbak maradtak és a HR késett a sötétben alkalmazott tarlórépa göndörödés vírus (Turnip Crinkle Virus, TCV) kezelést követően lúdfű levélben (Chandra-Shekara és mtsai. 2006). Ezt követően azt is leírták, hogy a *Pseudomonas syringae* bakteriális növénypatogén-indukálta HR napszakfüggő és az SA akkumuláció, valamint az SAR indukciója a *phyAphyB* mutáns lúdfűben elmarad, igazolva a (vörös) fény szerepét a folyamatban (Griebel és Zeier, 2008). Kimutatták emellett azt is, hogy az SAR kifejezettebb volt a reggel történő patogénfertőzést követően, mint a délután, a sötét periódus előtt végzett kísérletek esetében (Liu és mtsai. 2011).

Összefoglalva megállapítható tehát, hogy mind a napszak (nappal/éjszaka), mind pedig a fény jelenléte vagy hiánya döntő jelentőségű a növényi hormonok által közvetített stresszválaszok koordinálásában. Éppen ezért a különböző, védekezésben szerepet játszó növényi hormonok hatásainak, interakcióinak vizsgálata és megértése nemcsak a gyakorta vizsgált fényszakaszban, hanem a sötétszakaszban, az éjszakai periódusban vagy mesterségesen előidézett sötétítés során is különösen fontos. Ezen folyamatok felderítése és pontosabb megértése új perspektívákat kínálhat a növényi stresszélettani kutatások és a növényvédelem számára egyaránt.

2.3. A szalicilsav (SA) bioszintézise, jelátvittele és élettani hatásai

A szalicilsav (SA) olyan alacsony molekulású (138,121 g/mol), fenolgyeületek közé tartozó benzoészavszármazék, mely jól ismert széles körű, humán gyógyászatban betöltött szerepéről (ld. aszpirin), azonban a növényekben, mint védekezési hormon funkcionál számos biotikus és abiotikus stresszhatás esetében (White, 1979; Raskin, 1992; Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011; Klessig és mtsai. 2018; Ding és Ding, 2020). A különböző növényi fajokra jellemző SA szintek és ezáltal a növények SA-ra történő érzékenysége jelentősen eltérhet. Míg a legjelentősebb modellnövénynek számító lúdfűben az SA alap koncentrációja kb. 0,25 $\mu\text{g gFT}^{-1}$, addig árpyában és szójában 1 $\mu\text{g gFT}^{-1}$. Még magasabb SA szintek mutathatók ki burgonyában, ahol az SA szintje elérheti a 10 $\mu\text{g gFT}^{-1}$ -t vagy rizsben akár a 30 $\mu\text{g gFT}^{-1}$ -t (Raskin és mtsai. 1990; Silverman és mtsai. 1995; Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011). A *Solanaceae* családba tartozó más modellnövények esetében, mint például a dohány és a paradicsom levelében 0,1-0,2 $\mu\text{g gFT}^{-1}$ értéket írtak le, mely azonban egy-egy fertőzés vagy stressz hatására (pl.: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dohány mozaik vírus) akár tíz-ötvenszeresére is nőhet (Enyedi és mtsai. 1992; Catino és mtsai. 2008; Mandal és mtsai. 2009; Gharbi és mtsai. 2016).

Az SA a növényekben, elsősorban lúdfűben végzett vizsgálatok alapján, kétféle úton is szintetizálódik. Ennek a két útvonalnak a kulcsenzimeit az izokorizmát szintáz (ICS) és a fenilalanin ammónia-liáz (PAL) (Chen és mtsai. 2009; Hayat és mtsai. 2010; Dempsey és mtsai. 2011; Klessig és mtsai. 2018; Zhang és Li, 2019; Lefevre és mtsai. 2020). Mindkét útvonal kiindulási molekulája a kloroplasztiszból található korizmát lehet. Azonban nem minden enzimet azonosítottak az egyes útvonalakban és jelentős eltérés is lehet az egyes növényfajok között (pl.: rizs, szója) az SA szintézisében (Lefevre és mtsai. 2020). Általánosságban az ICS útvonal nagyobb dominanciáját (90%) és ehhez képest a PAL útvonal kisebb szerepét (10%) feltételezik lúdfűben (Wildermuth és mtsai. 2001; Garcion és mtsai. 2008; Yokoo és mtsai. 2018). Az egyik legújabb tanulmányban, melyben szénizotópos jelölést alkalmaztak a patogénfertőzés alatt, nem sikerült kimutatni a fenilalaninból a PAL útvonalon keletkező SA-t lúdfűben, ezzel megkérdőjelezve ennek az SA bioszintetikus útnak a szerepét a vizsgált modellnövényben (Wu és mtsai. 2023). Az ICS útvonal első lépéseként a korizmát az ICS működése során izokorizmáttá alakul a kloroplasztiszból, ahonnan az az ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5 (EDS5) transzporterrel (korábban SID1) keresztül a citoplazmába juthat (Rekhter és mtsai. 2019; Zhang és Li, 2019; Lefevre és mtsai. 2020).

A citoplazmában az izokorizmát az avrPphB SUSCEPTIBLE3 (PBS3) enzim közreműködésével alakulhat izokorizmát-9-glutamáttá, majd pedig spontán módon vagy az ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1 (EPS1) enzim közreműködésével SA-vá a lúdfűben (Torrens-Spence és mtsai. 2019; Lefevere és mtsai. 2020). Ezzel szemben a PAL által szabályozott útvonal lehetséges kezdete a korizmát prefénsavvá történő átalakulása a korizmát-mutáz (CM) enzim közreműködésével a citoplazmában, majd pedig több lépésben a fenilalanin (Phe) keletkezése (Lefevere és mtsai. 2020). A Phe ezután a PAL enzim működése során transz-fahéjsavvá (tCA) alakul, majd benzoosav és végül SA képződik belőle (Lefevere és mtsai. 2020).

Az SA a szintézisét követően azonban számos módon módosulhat, raktározódhat vagy inaktíválódhat (Chen és mtsai. 2009; Hayat és mtsai. 2010; Zhang és Li, 2019; Van Gelder és mtsai. 2020). Többek között glikozilációt követően képes SA-2-O- β -d-glükóz (SAG) vagy SA-glükózészter (SGE) formájában a vakuólumban raktározódni (Dean és mtsai. 2005; Li és mtsai. 2022). A vakuólumba történő transzport az ATP-binding cassette (ABC) transzportereken keresztül valósul meg, ahonnan azonban a szabad SA újra felszabadulhat (Dean és Mills, 2004). Emellett az aktív SA-t az SA-3-hidroxiláz (S3H) és az SA-5-hidroxiláz (S5H/DMR6) enzimek 2,3- és 2,5-dihidroxi-benzoosavvá (2,3- és 2,5-DHBA) alakíthatják, ezzel inaktíválva a növényi hormont (Zhang és mtsai. 2013, 2017). A harmadik lehetséges átalakulás az S-adenozin-L-metioninből (SAM) származó metilcsoport SA karboxilcsoportjára történő rákerülése, melyet specifikus SA metiltranszferázok (SAMT) végeznek. Ez az átalakulás leginkább a levelekben és a virágokban jellemző, mivel így az SA légneművé (MeSA), illékony komponenssé válhat, hosszabb távú transzportot és védelmi válaszokat kialakítva. A keletkezési helyétől a távolabbi növényi szervekben a MeSA az SA-binding protein 2 (SABP2) közreműködésével alakulhat vissza SA-vá (Park és mtsai. 2007).

A stresszhatásra megemelkedett SA szinteket a NONEXPRESSER OF PR GENES 1 (NPR1) fehérje érzékeli, melyet alapállapotban diszulfidhidak stabilizálnak és oligomer formában található a citoplazmában (Mou és mtsai. 2003). Az SA hatására oxidatív stressz generálódik, megváltozik a sejtek redox állapota és az NPR1 a diszulfidhidak redukálódása miatt (melyben a 82-es és 216-os cisztein kitüntetett szereppel bír) aktív monomer formává alakul és a sejtmagba transzlokálódik (Fober és Despres, 2005; Wu és mtsai. 2012). Az NPR1 monomer a sejtmagban a TGA transzkripció faktorokhoz (pl.: TGA1, TGA4) kapcsolódva számos védekezéssel kapcsolatos gén átírását indukálja, mint például a *PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 (PRI)* (Klessig és mtsai. 2016, 2018). Az NPR1 kapcsán kimutatták azt is, hogy például az NO a 156-os ciszteinen keresztül képes S-nitrozilálni és inaktívvá tenni,

melyet azonban az SA hatására a tioredoxin megszüntethet (Tada és mtsai. 2008; Lindermayr és mtsai. 2010). Emellett leírták az NPR1 fehérje ubiquitinációját (Ser11/Ser15) és szumoilációját (Ser55/Ser59) is, melyek szintén befolyásolják annak homeosztázisát (Spoel és mtsai. 2009; Saleh és mtsai. 2015). Emellett az NPR1 foszforilálódhat is az SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.8 (SnRK2.8) közreműködésével (Ser589, Thr373), mely szerepet játszik a SAR kialakításában a távolabbi szövetekben (Lee és mtsai. 2015). Az SA receptoraként az NPR1 mellett lúdfüben annak két paralógját is azonosították, az NPR3-at és az NPR4-et (Fu és mtsai. 2012). Az NPR3 és az NPR4 a CULLIN 3 (CUL3) E3 UBIQUITIN LIGASE adaptor fehérjéi, melyek az NPR1-et célozzák meg annak proteaszóma által közvetített degradációja érdekében. Az NPR3 kis affinitású, nagy SA koncentrációkra érzékeny fehérje, míg az NPR4 nagy affinitású, kis SA koncentrációknál működő receptor, ezzel befolyásolva a patogéntámadás során keletkező SA koncentrációjának NPR1 általi érzékelését és az SA jelátvitelének aktiválódását (Fu és mtsai. 2012; Gust és Nürnbergger, 2012).

Az SA leírt élettani hatásai nagyon sokfélék, melyek azonban az irodalom alapján gyakran ellentmondásosak. Ennek oka lehet például a különböző növényekben, növényi szervekben alaptól eltérő SA szint és érzékenység, valamint a külső környezeti tényezők (pl.: fény, hőmérséklet), az SA kezelések koncentrációja, időtartama, pH-ja, a vizsgált szervek eltérő fejlődési stádiuma (Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011; Khan és mtsai. 2015; Sharma és mtsai. 2023). Általánosságban elmondható azonban, hogy az SA nagy (letális) koncentrációban gátolja a csírázást (Rajjou és mtsai. 2006), a növekedést (Kováčik és mtsai. 2009) és az ionfelvételt (Harper és Balke, 1981), sztómazárást indukál (Mori és mtsai. 2001), csökkenti a fotoszintetikus aktivitást (Janda és mtsai. 2012), serkenti a virágzást nem induktív körülmények között (Fu és mtsai. 2020), fokozza a szeneszcenciát (Morris és mtsai. 2000) és allelopatikus hatású (Fang és mtsai. 2009). Ezzel szemben alacsonyabb (szubletális, tolerálható) koncentrációban az SA képes számos élettani és biokémiai folyamatot serkenteni, előzetes edzést („priming”-ot) követően egy másodlagos stresszorral (pl.: só, szárazság, nehézfémstressz, hidegstressz) szemben a növények ellenállóságát fokozni, melyben kulcsszerepet játszik a ROS (Bari és Jones, 2009; Vlot és mtsai. 2009; Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011; Khan és mtsai. 2015; Sharma és mtsai. 2023).

2.4. Az SA és a reaktív oxigénformák (ROS) metabolizmusa

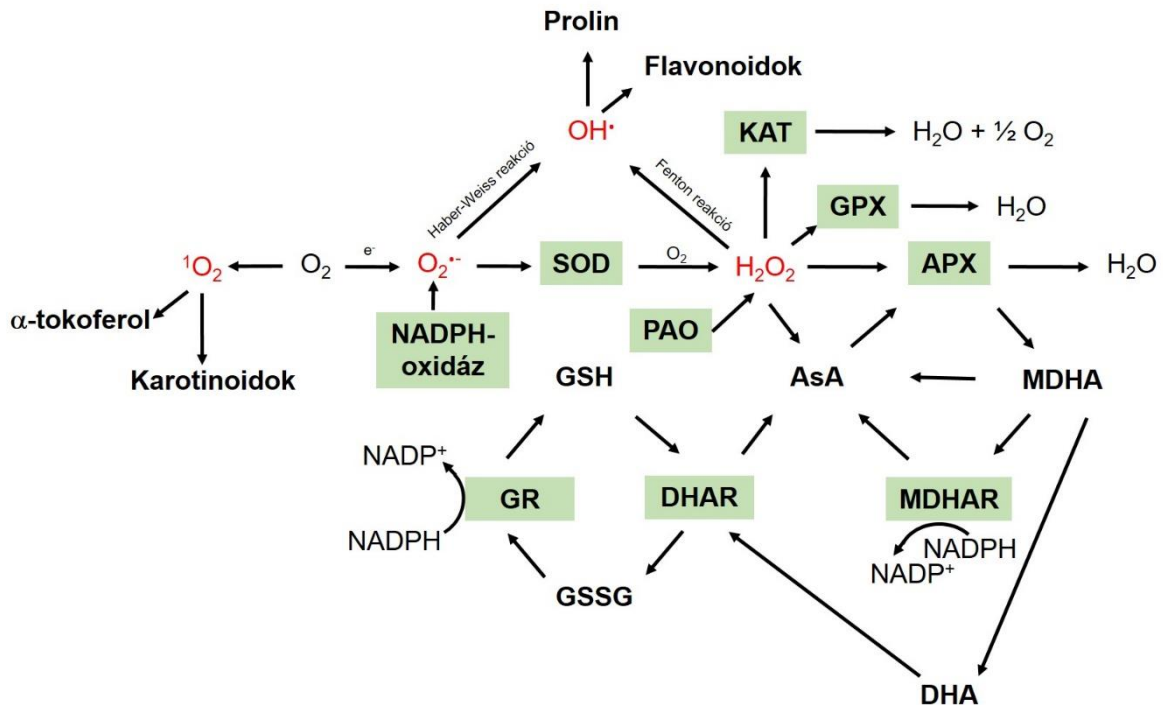
Az SA által indukált jelátvitel számos komponensét azonosították (pl.: MAPK), de az egyik legfontosabb eleme a ROS produkció fokozása a különböző sejtorganellumokban, mint például a mitokondriumban, a kloroplastiszban vagy az ER-ben (Love és mtsai. 2008; Kocsy és mtsai. 2013; Janda és mtsai. 2014; Seyfferth és Tsuda, 2014; Poór és mtsai. 2019; Poór, 2020; Peng és mtsai. 2021). Szoros korreláció figyelhető meg a ROS termelődés és az SA szintek változása között, az SA és a ROS között ugyanis öngerjesztő visszacsatolás alakulhat ki, az SA ROS felhalmozódást indukálhat és fordítva, a ROS produkció SA akkumulációt (Overmyer és mtsai. 2003; Vlot és mtsai. 2009; Miura és Tada, 2014; Xu és Brosche, 2014). A legelső, SA kapcsán végzett vizsgálatok során számos SA-kötő fehérjét (SA-binding proteins; SABPs) azonosítottak a növényekben. Ezek közül a hidrogén-peroxid (H_2O_2) lebontásában szerepet játszó kataláz (KAT) és az aszkorbát-peroxidáz (APX) működését a hormonhoz való kötődésük gátolja, mely oxidatív robbanást idéz elő a növényi sejtekben (Durner és Klessig, 1995; Wendehenne és mtsai. 1998; Horváth és mtsai. 2002). Azóta számos tanulmány igazolta, hogy az SA által szabályozott stresszválasz különböző ROS, például a szuperoxid-gyökönion ($O_2^{\cdot-}$) és a H_2O_2 gyors felhalmozódásától függ, amelyek a HR, és ezáltal a PCD indukciójának, valamint az SAR és az ISR kialakulásának alapvető közvetítői, és amelyek génexpressziós szabályozáson keresztül hozzájárulhatnak a sejtek redox homeosztázisának és az antioxidáns enzimek aktivitásának megváltozásához (Agrawal és mtsai. 2005; Saruhan és mtsai. 2012; Poór és mtsai. 2013; Miura és Tada, 2014; Janda és Ruelland, 2015). Az SA ugyanis fokozhatja a NADPH-oxidáz (Agrawal és mtsai. 2005; Gémes és mtsai. 2011) és a poliamin-oxidázok (PAO) működését is (Zhang és mtsai. 2011), ezáltal befolyásolja a sejtek redox állapotát és növeli az oxidatív stressz mértékét.

Az oxidatív stressz leküzdése érdekében a növényekben gyorsan ható védelmi rendszerek működnek, például nem-enzimatis antioxidánsok és antioxidáns enzimek, amelyek enyhítik az oxidatív stressz-okozta károsodást, mint például a fehérjék, a lipidek és a DNS károsodását (Gill és Tuteja, 2010; Mittler és mtsai. 2011; Mittler, 2017). Az SA KAT és APX enzimek aktivitására gyakorolt gátló hatásán túl azonban számos esetben kimutatták, hogy a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitását fokozza (Rao és mtsai. 1997; Horváth és mtsai. 2002; Ali és mtsai. 2006; Horváth és mtsai. 2007; Khan és mtsai. 2014). Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy az SA képes indukálni az APX mellett egy másik H_2O_2 -lebontó enzim, a gvajakol-peroxidáz (POD) aktivitását is (Horváth és mtsai. 2007; Rivas-San Vicente és

Plasencia, 2011; Tari és mtsai. 2015; Chen és mtsai. 2016). Emellett kimutatták azt is, hogy az SA képes növelni egy negyedik H₂O₂-t lebontó enzim, a glutation peroxidáz (GPX) aktivitását (Ali és mtsai. 2006; Shi és mtsai. 2006), valamint a GXP-kódoló gének transzkripcióját is fokozza a promóterükben lévő W-box cisz-ható elemeken keresztül (Milla és mtsai. 2003). Emellett a Foyer-Halliwell-Asada ciklusban az SA fokozza a glutation reduktáz (GR), a dehidroaszorbát reduktáz (DHAR) és a monodehidroaszorbát reduktáz (MDHAR) enzimek aktivitását is, a veszélyes H₂O₂ szintek szabályozásának érdekében (Ali és mtsai. 2006; Shi és mtsai. 2006; Chen és mtsai. 2011; Kaya és mtsai. 2020).

A nem-enzimikus antioxidánsok közül az SA jelentősen befolyásolja a GSH és az AsA szinteket is, koncentrációtól függően általában növelve azokat (Chen és mtsai. 2011; Tari és mtsai. 2015; Csiszár és mtsai. 2018; Yan és mtsai. 2018; Kaya és mtsai. 2020). Ugyanakkor más antioxidáns szereppel is bíró molekulák szintézisét is befolyásolja az SA. Érdekes módon az exogén SA kezelés az alkalmazott koncentrációk növekedésének függvényében csökkentheti a szinglet oxigént (¹O₂) kioltó α-tokoferol mennyiségét (Noreen és Ashraf, 2010; Kadioglu és mtsai. 2011; Meher és mtsai. 2018), míg az alacsonyabb SA koncentrációk fokozták azt (Saini és mtsai. 2014; Metwally és mtsai. 2018; Desoky és mtsai. 2021; Hajjhashemi és mtsai. 2022). SA-hiányos (*NahG*) lúdfű növényekben szignifikánsabban alacsonyabb az α-tokoferol szintje (Munné-Bosch és mtsai. 2007), míg a *NahG* növények magjaiban szignifikánsan magasabb a vad típusú növényekhez képest (Abreu és Munne-Bosch, 2009). A szintén szinglet oxigént kioltó karotinoidek szintjét az SA az alkalmazott hormonkoncentráció növelésével általában csökkenti (El-Tayeb, 2005; Arfan és mtsai. 2007; Loutfy és mtsai. 2012; Jahan és mtsai. 2019), de növelheti is (Agarwal és mtsai. 2005). A karotinoidek szinglet oxigénnel történő reakciója β-ciklocitrál keletkezését eredményezheti (βCC) (Triantaphylidès és Havaux, 2009; Dogra és mtsai. 2018), mely az *ICSI* expresszióját indukálva, az SA gyors akkumulációját és jelátvitelének aktiválódását okozhatja (Lv és mtsai. 2015). A hidroxilgyök (OH[•]) semlegesítésében szerepet játszó prolin (Szabados és Savouré, 2010) és a flavonoidok (Hernández és mtsai. 2009; Agati és mtsai. 2012) szintjére is szignifikáns hatással van az SA. Kimutatták, hogy az SA növeli a prolin szintet (Misra és Saxena, 2009; Khan és mtsai. 2013; La és mtsai. 2019; Lee és mtsai. 2019) és a prolin az SA szintet (Chen és mtsai. 2011). Emellett az SA jelentős hatással van a flavonoidok metabolizmusára és növelheti az olyan nem-enzimikus antioxidáns funkcióval bíró vegyületek szintjét is, mint a quercetin (Dokhanieh és mtsai. 2013; Wang és mtsai. 2015; Gondor és mtsai. 2016; Kohli és mtsai. 2018; Ullah és mtsai. 2019).

Meg kell említeni, hogy a ROS mellett az SA az NO és vele együtt a peroxinitrit (ONOO^-) produkcióját is fokozhatja, amely hozzájárulhat a stressztolerancia kialakulásához, azonban nagy koncentrációban szintén a PCD indukciójához vezethet (Delledonne és mtsai. 2001; Zottini és mtsai. 2007; Gémes és mtsai. 2011; Mur és mtsai. 2013; Prakash és mtsai. 2021).

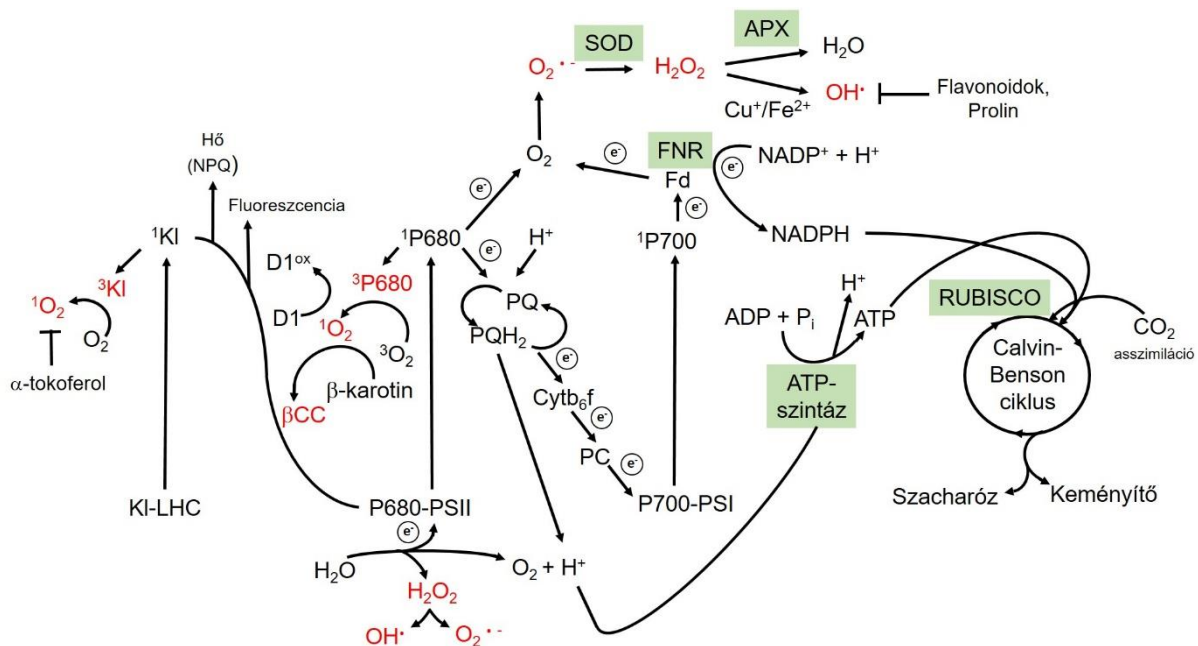


2. ábra: A reaktív oxigénformák (ROS) metabolizmusa növényekben. A különböző sejtorganelumokban keletkezett szuperoxid-gyökkanion ($\text{O}_2^{\bullet -}$) enzimatis úton a szuperoxid-dizmutáz (SOD) által katalizált folyamat során oxigénné és hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakulhat (Alscher és mtsai. 2002). A keletkezett H_2O_2 -t a peroxiszómában lokalizált kataláz (KAT) és a citoplazmatikus vagy kloroplasztikus aszkorbát peroxidáz (APX), valamint más peroxidázok (pl.: gvajakol-peroxidáz, POD; glutation peroxidáz, GPX) vízzé bonthatják (Mhamdi és mtsai. 2010; Czarnocka és Karpiński, 2018). A szuperoxid-gyökkanion produkciójában részt vesz az apoplasztikus NADPH-oxidáz (RBOH) (Sagi és Fluhr, 2006; Pogány és mtsai. 2009; Chapman és mtsai. 2019), míg a H_2O_2 termelődésében a poliamin-oxidázok (PAO) (Moschou és mtsai. 2008; Liu és mtsai. 2014). Emellett különböző nem-enzimatis antioxidánsok, mint például az aszkorbát (AsA)/dehidroaszkorbát (DHA) és a glutation (GSH)/oxidált glutation (GSSG) a Foyer-Halliwell-Asada ciklusban különböző enzimek közreműködésével (glutation reduktáz, GR; dehidroaszkorbát reduktáz, DHAR; monodehidroaszkorbát reduktáz, MDHAR) semlegesítik a káros H_2O_2 -t (Foyer és Noctor, 2009). A Haber-Weiss- és Fenton-reakció során keletkezett hidroxilgyök (OH^\bullet) semlegesítésében a prolin (Szabados és Saviouré, 2010) és a flavonoidok (Hernández és mtsai. 2009; Agati és mtsai. 2012) vesznek részt, míg a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) kioltásában az α -tokoferol (Munné-Bosch és Alegre, 2002; Mesa és Munné-Bosch, 2023) és a karotinoidok (Triantaphylides és mtsai. 2008; Havaux, 2014) játszanak szerepet.

2.5. Az SA hatása a kloroplasztiszokra és a fotoszintézisre

Az SA a ROS-hoz kapcsolódóan közvetett és közvetlen szerepet játszik a különböző élettani folyamatok szabályozásában, ideértve a fotoszintézist is (Mateo és mtsai. 2006; Janda és mtsai. 2014). Az SA és a ROS direkt hatásának egyik fő helye a kloroplasztisz. Az SA nemcsak az enzimatis (pl.: SOD, APX) és nem-enzimatis antioxidánsokat (pl.: AsA, α -tokoferol) regulálja a kloroplasztiszban, hanem hozzájárul a ROS produkcióhoz, pl. a szinglet oxigén keletkezéséhez a fotoszintetikus elektrontranszportlánc gátlásával, illetve a fotoszintetikus apparátus dezintegrálásával (Geng és mtsai. 2024). Az SA képes ugyanis gátolni a II. fotokémiai rendszer (PSII) elektrontranszportját a Q_A akceptor oldalánál, inaktiválni a PSII reakciócentrumát, csökkenteni a klorofill tartalmat és a tilakoidális fehérjék mennyiségét, valamint destabilizálni a tilakoid membránokat *Chlamydomonas reinhardtii*-ban (Gao és mtsai. 2018). Uzunova és Popova (2000) árpaleveleket 1 mM SA-val kezelve kimutatták, hogy az SA a levél anatómiai felépítésében jelentős változásokat eredményezett, valamint az adaxiális és abaxiális epidermisz szélességét is csökkentette. A fotoszintetikus pigmenttartalom csökkenésével párhuzamosan a kloroplasztiszok ultrastruktúráját is megváltoztatta a magas SA dózis. Az-SA kezelt mintákban megfigyelték a gránum-tilakoidok duzzadását, a sztróma koagulációját és a kloroplasztiszok térfogatának növekedését (Uzunova és Popova, 2000). A növekvő SA koncentrációk a PSII maximális- (F_v/F_m) és effektív kvantumhasznosításának (Φ_{PSII}), valamint a fotokémiai kioltás (qP) jelentős csökkenését eredményezte, ugyanakkor a nem-fotokémiai kioltást (NPQ) növelte paradicsom növények leveleiben és a zárósejtekben is (Poór és Tari, 2012). Egy másik vizsgálat során azt is megfigyelték, hogy a PSII érzékenyebb volt a magas SA koncentrációra, mint a PSI dohánylevelekben (Janda és mtsai. 2012). Ennek ellenére az SA PSI-re gyakorolt hatása kevésbé feltárt. Ugyanakkor mások azt is leírták, hogy magas koncentrációjú SA kezelés csökkentette a nettó fotoszintetikus sebességet, valamint a RUBISCO aktivitását és fehérjeszintjét, de növelte a foszfoenol-piruvát (PEP) karboxiláz aktivitását árpanövényekben (Pancheva és mtsai. 1996; Pancheva és Popova, 1998). Ugyanakkor a PEP karboxiláz aktivitás a RUBISCO aktivitással együtt csökkent 0,5 mM SA kezelés hatására kukorica levelében (Krantev és mtsai. 2008). Az SA koncentrációfüggő módon befolyásolja a keményítő szintézisét (pl.: különböző invertázok aktivitását) és amilázok általi lebontását, emellett fokozza a szacharóz akkumulációját (pl.: a szacharóz szintáz enzim által), befolyásolva egy-egy fertőzés kimenetelét és a PCD indukcióját (Gebauer és mtsai. 2017; Kaur és mtsai. 2019). Az exogén módon alkalmazott magas SA koncentrációk (1-5 mM) ROS általi

sztómazáródást is indukáltak, mely szintén negatívan befolyásolta a fotoszintézis hatékonyságát (Poór és mtsai. 2011; Poór és Tari, 2012). Ezenkívül a klorofill és a karotinoid tartalmak is csökkentek a magas koncentrációjú SA kezelés hatására mustár és búza levelekben (Fariduddin és mtsai. 2003; Moharekar és mtsai. 2003). Ugyanakkor az oxidált β -karotinból keletkező β -ciklocitrál (β CC) aktiválja az SA bioszintézisét az *ICSI* gén aktivációján keresztül (Lv és mtsai. 2015). Leírták emellett az SA negatív hatását a PSII-t alkotó D1 protein szintjére és a lebontásában szerepet játszó Deg1 proteázra is (Qui és mtsai. 2011). Ugyanakkor az alacsonyabb SA koncentrációk alkalmazása fokozta a D1 fehérjét kódoló *psbA* gén átírását búzában (Wang és mtsai. 2014). Ismert, hogy az 1 mM SA kezelés fokozta az oxigénfejlesztő komplex (OEC) aktivitását a PSII donor oldalán (F_v/F_0) paradicsomnövények levelében (Moustakas és mtsai. 2022). Kimutatták azt is, hogy az SA bioszintézisében szerepet játszó *ICSI* gén mutációja befolyásolja a plasztokinon (PQ) működését és redox állapotát (Gawroński és mtsai. 2013). Míg az SA citokróm b_6f ($Cytb_6f$) komplexre gyakorolt hatása nem ismert, addig a mobilis plasztocianin (PC) kapcsán egy kísérlet az SA gátló hatását írta le zsázsa PC-t kódoló egyik génjének (*LlaDRT*) esetében (Sinha és mtsai. 2014). Ugyanakkor az SA ferredoxinra (Fd) gyakorolt hatása vonatkozásában számos kérdés még tisztázatlan. Míg az Fd szintjét számos fertőzés (pl.: dohánymozaik vírus X, *Pseudomonas syringae*) negatívan befolyásolhatja az SA jelátvitelen át, ami kihatással van a ROS metabolizmusára is (Wang és mtsai. 2018; Yang és mtsai. 2020), addig a Fd-NADP⁺ oxidoreduktáz (FNR) aktivitását nem vizsgálták az SA kapcsán. Érdekes módon az SA kezelés alacsonyabb koncentrációban növelte az ATP-szintáz fehérje mennyiségét *Baphicacanthus cusia* levelében (Xiang és mtsai. 2010), mely fontos lehet a növényevők elleni védekezés során (Schmelz és mtsai. 2007). Mindazonáltal megállapítható, hogy az SA hatása nagyban függ annak koncentrációjától, az adott növényfajtól és annak fejlődési állapotától vagy a környezeti feltételektől, mint például a fény erősségétől vagy minőségétől (Hayat és mtsai. 2010; Rivas-San Vicente és Plasencia, 2011). Habár megfigyelték, hogy az SA szintézise a kloroplasztiszhoz kötött, és az SA által közvetített jelátviteli utak aktiválódása, valamint a ROS produkció fényfüggő (Chandra-Shekara és mtsai. 2006; Griebel és Zeier, 2008; Goodspeed és mtsai. 2012; Karpinski és mtsai. 2013), az SA fotoszintetikus apparátusra és a fotoszintézis hatékonyságára gyakorolt hatásai a sötétben kevésbé ismertek. Ugyanakkor azt kimutatták, hogy a fotoszintetikus aktivitás változása jelentősen befolyásolhatja a növények védekezési reakcióit a sötétben történt kórokozó fertőzések után (Cheng és mtsai. 2016).



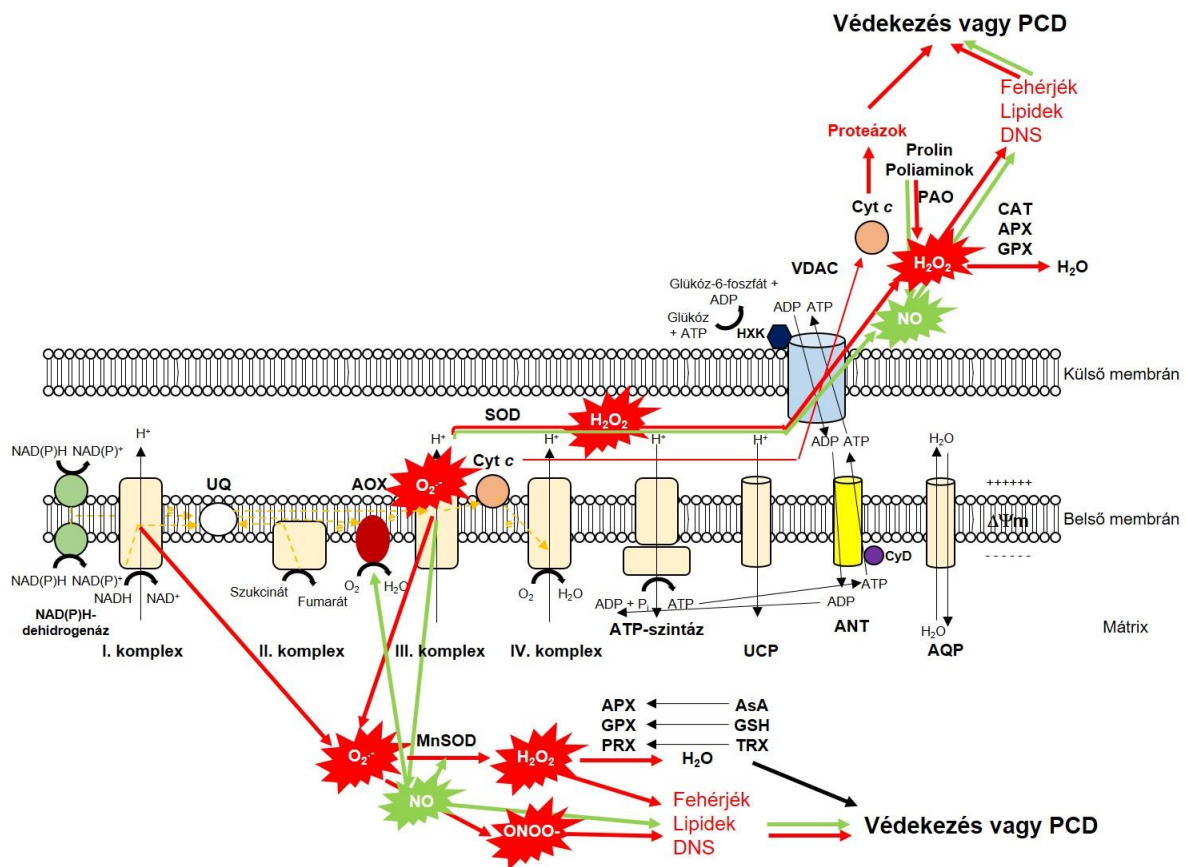
3. ábra: A fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése és a ROS metabolizmusa (Li és Kim, 2022 alapján módosítva). A II. fotokémiai rendszer (PSII) a fénygyűjtő komplexek (LHC) segítségével begyűjti a fény energiáját és a fotokémiai reakció során egy elektron átadódik a kinon (Q) akceptoroknak. A fényenergia elnyelésekor a klorofill (Kl) molekula szinglet halmazállapotú klorofillé (¹Kl) alakul. A többletenergia egy része fluoreszcens fényként vagy hőként disszipálódik, melyet nem-fotokémiai kioltásnak (NPQ) nevezünk. Alternatív folyamatként a ¹Kl spontán bomlása triplett gerjesztett állapotú klorofillt (³Kl) eredményezhet megnövekedett élettartammal. A ³Kl-t az LHC-ban lévő karotinoidok oltják ki, mely visszatér alapállapotába. Ellenkező esetben a ³Kl átadja az elnyelt többlet energiát az alapállapotú O₂-nek, szinglet oxigén képződését (¹O₂) eredményezve. A ¹O₂ szintén a karotinoidokkal vagy az α-tokoferollal oltható ki (Dogra és mtsai. 2018; Mesa és Munné-Bosch, 2023). A PSII reakciócentrumok (P680) energiatöbblete ugyancsak ¹O₂ produkciót eredményezhet a ³P680 túlredukáltsága miatt. A ¹O₂ eloxidálhatja a PSII D1 proteinjét és a β-karotint, β-ciklocitrál keletkezését eredményezve (βCC) (Triantaphylidès és Havaux, 2009; Dogra és mtsai. 2018). A PSII elektrondonor oldalán H₂O₂ és O₂^{•-} keletkezhet a víz kételektronos oxidációjával, illetve a PSII akceptor oldalán a molekuláris oxigén egyelektronos redukciójával (Pospíšil, 2009, 2016). A PSI szintén részt vesz a O₂^{•-} és a H₂O₂ produkciójában. A PSI-ről az elektronakceptor ferredoxin (Fd)-NADP⁺ oxidoreduktáz (FNR) elektronokat visz át az Fd-ről a NADP⁺-ra, hogy NADPH-t termeljen. A keletkezett NADPH-t és a sztróma/lumen közti protongrádiens felhasználva az ATP-szintáz által termelt ATP a fotoszintézis végtermékeiként keményítő és/vagy szacharóz szintézisére használódik fel a Calvin-Benson ciklusban. Annak érdekében, hogy a PSII részben oxidált formában maradjon olyan körülmények között, amikor az elektrontranszportlánc túlredukálódik, az FNR egy elektront visz át az O₂-re, ezáltal O₂^{•-} keletkezik. A keletkezett O₂^{•-} a szuperoxid-dizmutázok (SOD) révén H₂O₂-vé alakul tovább. A H₂O₂-t az aszkorbát peroxidáz (APX) semlegesíti az aszkorbát-glutation cikluson keresztül. A OH[•] a Fenton-reakció során keletkezik a H₂O₂ redukált átmenetifém-ionokkal (pl.: Fe²⁺ és Cu⁺) történő kölcsönhatásából, melynek kioltásában a flavonoidok és a prolin vesz részt (Apel és Hirt, 2004; Das és Roychoudhury, 2014). (PQH₂, plasztokinon; PQ, a plasztokinon oxidált formája; Cytb₆f, citokróm b₆f komplex; PC, plasztocianin).

2.6. Az SA hatása a mitokondriumokra és a mitokondriális elektrontranszportlánc működésére

Az SA koncentrációtól függően szintén jelentős hatással van a másik fő ROS forrásra, a mitokondriumokra (Norman és mtsai. 2004; Nie és mtsai. 2015; Belt és mtsai. 2017; Poór, 2020; Wang és mtsai. 2022). Kimutatták, hogy a lúdfű protoplasztok mitokondriumi csoportokba rendeződnek és megduzzadnak az SA kezelés hatására (Nie és mtsai. 2015). Érdekes módon az AsA, mint antioxidáns exogén alkalmazása csökkentette ezt a morfológiai változást, bizonyítva, hogy az SA által indukált mitokondrium aggregáció nagymértékben függ a mitokondriális ROS termeléstől (Nie és mtsai. 2015). A mitokondriumok morfológiájában bekövetkező változások jelentős biokémiai és fiziológiai változásokat okoznak az energia-metabolizmus (pl.: ATP szintézis) megváltozása miatt (Shugaev és mtsai. 2014), melyek fontos lépései lehetnek a PCD-nek a citokróm *c* (cyt *c*) kiszabadulás és a mitokondriális ROS produkció, valamint az emiatt bekövetkező mitokondriális membránlipid peroxidáció miatt (Hoeberichts és Woltering, 2003; Reape és mtsai. 2008; Van Aken és Van Breusegem, 2015). Kimutatták, hogy az SA (0,02-0,5 M) már percekben belül gátolta az oxigénfogyasztást és az ATP szintézist dohány sejtszuspenzióban, melyet az antioxidáns hatású N-acetilcisztein mérsékel, ezzel szintén igazolva az SA-indukálta ROS produkció mitokondriális elektrontranszportláncra (ETC) gyakorolt gátló hatását (Xie és Chen, 1999). Később szója sejtszuspenzióból tisztított mitokondriumokon is megfigyelték az oxigénfelvétel gátlását 16 órás, 1 mM-os SA kezelést követően (Djajanegara és mtsai. 2002). Norman és mtsai. (2004) írták le elsőként, hogy az SA alacsony koncentrációkban (0,1-0,5 mM) a mitokondriális ETC szétkapcsolójaként működik, míg az SA magasabb koncentrációkban (1-5 mM) erősen gátolja a mitokondriális ETC működését dohány sejtszuspenzióban. Kezdetben kimutatták, hogy az SA blokkolja az elektronáramlást a szubsztrát dehidrogenázokról az UQ poolba (Norman és mtsai. 2004). Később Shugaev és mtsai. (2014) azt figyelték meg cukorrépa (*Beta vulgaris* L.) és sárga csillagfürt (*Lupinus luteus* L.) karógyökereinek és szikleveleinek felhasználásával, hogy a mitokondriális légzésre kifejtett szétkapcsoló hatás és a mitokondriális membránpotenciál változása az SA-kezelés során nemcsak az SA koncentrációtól, de a kezelés időtartamától és a különböző növényi szövetekből izolált mitokondriumok SA-ra való érzékenységétől is függött. Míg a mitokondriumokban található alternatív oxidázra (AOX) gyakorolt pozitív SA hatás történeti okoknál fogva az egyik legjobban tanulmányozott terület (Umbach és mtsai. 2005), az SA közvetlen hatása más mitokondriális ETC alkotóelemekre

azonban ismeretlen maradt. Az AOX kapcsán igazolták az SA koncentrációfüggő hatását annak mennyiségére (Norman és mtsai. 2004) és a kódoló gének expressziójára is (Matos és mtsai. 2009). Az AOX szerepet játszik például a mitokondriális ROS produkció csökkentésében (Maxwell és mtsai. 1999; Millenaar és Lambers, 2003), befolyásolja az NO produkciót (Gupta és mtsai. 2011a; Kumari és mtsai. 2019) és a PCD indukcióját is (Ordog és mtsai. 2002; Robson és Vanlerberghe, 2002). Az oxidatív stressz kapcsán jól ismert, hogy a mitokondriális ETC I. és III. komplexe a ROS produkció fő helye (Møller, 2001; Huang és mtsai. 2016). Korábban leírták, hogy a nátrium-szalicilát kölcsönhatásba lép a patkány májból származó mitokondriális I. komplex Fe-S klaszterével, ami ROS képződéshez vezet (Battaglia és mtsai. 2005). Ugyanakkor az I. komplexet gátló rotenon nem indukált jelentős ROS produkciót a nem fotoszintetizáló szeder (*Rubus fruticosus* L.) sejtszuspenziós tenyészetekben, azonban a III. komplexet az SA-indukálta ROS produkció fő forrásaként azonosították, mivel a 2,5 mM SA kezelések inaktiválták a III. komplex redox ciklusában (Q-ciklus) a szemikinon gyököt (de Souza és mtsai. 2011). Később Nie és mtsai. (2015) fluoreszcens technikákkal igazolták, hogy a 0,5 mM SA kezelés közvetlenül hat a lúdfüvből izolált mitokondriumok III. komplexére, gátolva a mitokondriális oxigénfelvételt és percekben belül oxidatív robbanást okozva. Az SA koncentrációfüggő hatását bizonyították Belt és mtsai. (2017) lúdfüben. Az SA ugyanis mikromillimólos koncentrációban növelte a szukcinát-dehidrogenáz (SDH) aktivitását, valószínűleg a II. komplex ubikinon kötőhelyét is gátolva, és különböző mértékű H₂O₂ produkciót eredményezve. Az SA által indukált gyors mitokondriális ROS produkció része lehet a PCD-t megelőző kettős ROS csúccsal járó oxidatív robbanásnak (Van Aken és Van Breusegem, 2015). Ugyanakkor az SA által generált ROS a mitokondrium membránjainak irreverzibilis változását is okozhatják a PCD indukció részeként. Az SA-okozta membrádepolarizációt követően (Scott és Logan, 2008; Shugaev és mtsai. 2014) a „permeabilitás tranzíciós póruson” (PTP) keresztül a külső membrán áteresztővé válhat a víz és nagyobb molekulák (>1,5 kDa) számára. Ez a mitokondriumok duzzadását váltja ki és az oxidatív stresszt követően, a belső membránról a cyt *c* citoplazmába történő kiszabadulását és a PCD indukcióját eredményezi. A PTP kialakulása jelenleg is tudományos vita tárgya, az egyik elképzelés alapján a külső mitokondriális membrán egyik fő fehérjéje, a feszültségfüggő anioncsatorna (VDAC), a belső membránon lévő adenin nukleotid transzporter (ANT), valamint a mátrixban lokalizált ciklofilin D alkotja (Kusano és mtsai. 2009). A PTP kialakulása gátolható a ciklosporin A és a bongkrek sav ciklofilin D- és ANT inhibitorokkal, de szabályozásában részt vesznek a mitokondriális hexokinázok (HXK) is, melyek a VDAC citoszolikus felszínéhez kapcsolódva, dugóként gátolhatják annak működését (Sarowar és mtsai. 2008; Sun és mtsai. 2008; Camacho-

Pereira és mtsai. 2009; Godbole és mtsai. 2013). Ugyanakkor bár ismert, hogy az SA csökkenti HXK aktivitást (Poór és mtsai. 2011), a HXK szerepe az SA által indukált mitokondriális ROS produkció és az PCD iniciáció során még kevésbé ismert.



4. ábra: A szalicilsav hatása a reaktív oxigénformák (ROS) metabolizmusára és a programozott sejthalál (PCD) iniciációjára a növényi mitokondriumokban. A mitokondriális elektrontranszportlánc (ETC) gátlása a mitokondriális ROS (mtROS) és a nitrogén-monoxid (NO) gyors produkciójához vezethet. A mitokondriális ETC komponensei közül [I. komplex: NAD(P)H dehidrogenáz; II. komplex: szukcinát-dehidrogenáz; III. komplex: Citokróm bc1 komplex; IV. komplex: Citokróm c-oxidáz] a III-as mitokondriális komplex domináns szerepet játszik a szuperoxid-gyökönion (O₂⁻) képződésében, például az SA hatására (Nie és mtsai. 2015). Az O₂⁻ képes reakcióba lépni az NO-val, mely peroxinitrit (ONOO⁻) produkciót eredményez, így befolyásolhatja a sejt redox állapotát vagy éppen PCD-t indíthat el (Delledonne és mtsai. 2001). A keletkezett O₂⁻ azonban a mitokondriális szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzim hatására kevésbé reaktív H₂O₂-vé alakulhat (Alscher és mtsai. 2002). Az exogén SA kezelések növelték a mitokondriális Mn-SOD aktivitást és az őt kódoló gén expresszióját (Takács és mtsai. 2016). A H₂O₂ lebontását számos antioxidáns enzim (pl.: aszkorbát peroxidáz: APX; gvajakol-peroxidáz: POD; peroxiredoxin: PRX; tioredoxinok: TRX) és nem-enzimatis antioxidas (pl.: aszkorbát: AsA; redukált glutation: GSH) végzi, melyeket az SA vagy a H₂O₂ szabályoz, szerepet játszva a sejtek jelátvitelében vagy éppen befolyásolva a fehérjék, lipidek és nukleinsavak oxidálását (Tari és mtsai. 2015). Ezenkívül az SA által regulált alternatív oxidáz (AOX) döntő szerepet játszik a mitokondriális ROS és a sejthalál mechanizmusainak mérséklésében (Umbach és mtsai. 2005). Az SA magas koncentrációja nemcsak toxikus ROS produkciót indukál, hanem a citokróm c (Cyt c) kiszabadulását is okozhatja a feszültségfüggő anioncsatorna (VDAC) és az adenin nukleotid transzporter (ANT) által alkotott permeabilitási tranzíciós póruson (PTP) keresztül, amely hozzájárulhat a sejthalál

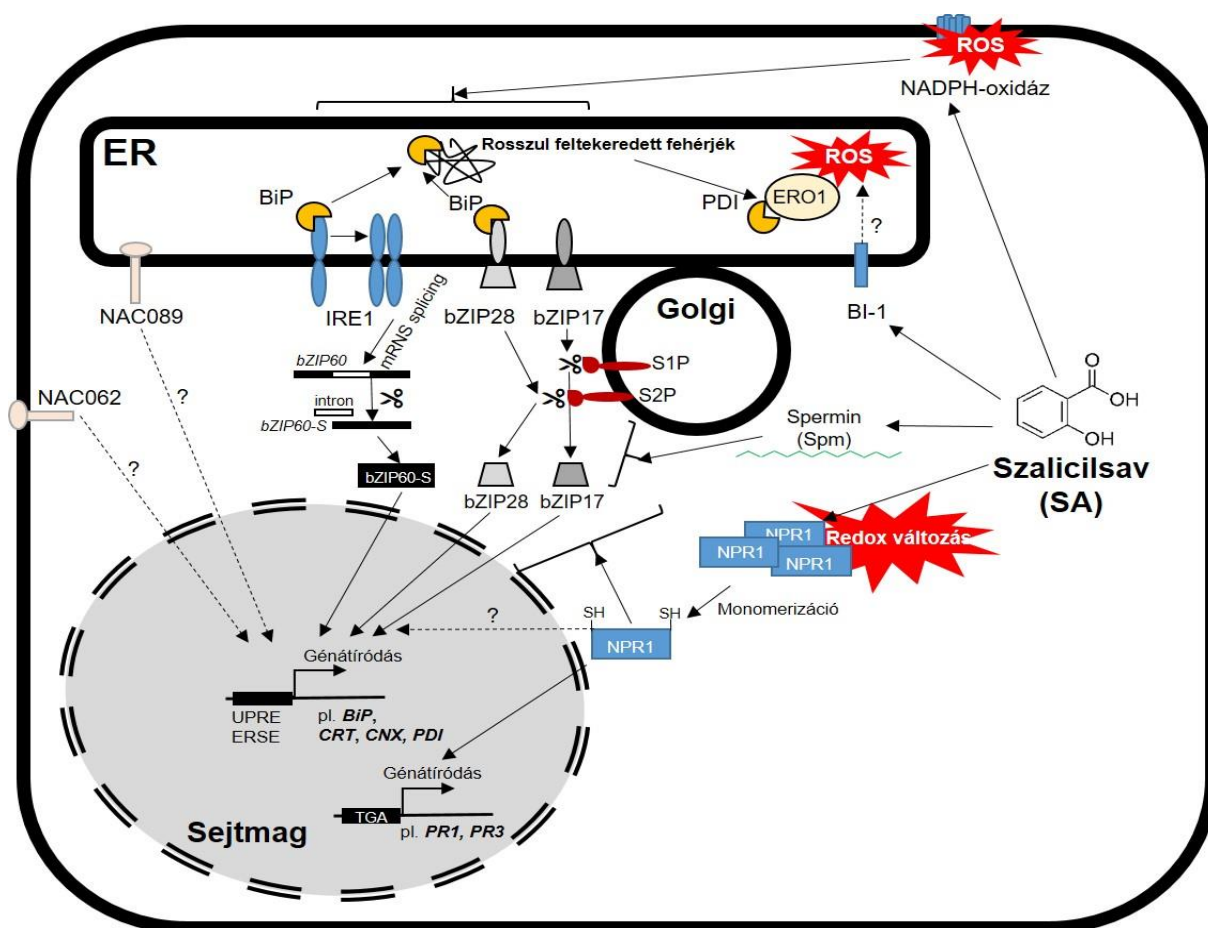
megindításához (Kusano és mtsai. 2009). Ugyanakkor a mitokondriális hexokinázok (mtHXK) fontos szerepet tölthetnek be a PTP SA általi szabályozásában (Poór és mtsai. 2011; Godbole és mtsai. 2013). A mitokondriumok és a citoplazma számos komponensének és molekulájának a szerepe az SA hatásának kitéve azonban nem ismert részleteiben (pl.: akvaporinok: AQP; mitokondriális fehérjék szétkapcsoló fehérjéje: UCP; poliaminok, például spermin: Spm; prolin).

2.7. Az SA hatása az endoplazmatikus retikulumra (ER) és az SA szerepe az ER stressz során

A kloroplasztiszok és a mitokondriumok mellett az SA jelentős hatással bír az ER működésére is (Poór és mtsai. 2019). Jelitto-Van Dooren és mtsai. (1999) elsőként figyelték meg, hogy az SA által indukált védelmi folyamatok és az ER stressz között kapcsolat lehet. Kimutatták ugyanis, hogy az *Erwinia carotovora* patogén által indukált sejtfaldegradáló enzim (CDE) hatására a *PR3* gén expressziója 4-8 óra között éri el a maximumát, míg az ER stresszt csökkentő chaperonokat kódoló gének (pl.: *BiP*, *CRT*, *PDI*) transzkript szintjeinek maximuma már a kezelést követő 2. órában tetőzik, a nem kezelt, disztális dohánylevelekben. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az SA által indukált védekezés részeként, a *PR* gének expressziójának növekedése előtt a növények chaperonokat szintetizálnak, az ER-re gyakorolt stressz csökkentésének érdekében (Jelitto-Van Dooren és mtsai. 1999). Ezt követően Wang és mtsai. (2005) írták le elsőként az SA és az ER stressz kapcsolatát lúdfűben, melyben kulcsszerepet játszik az NPR1, szabályozva a különböző chaperonok expresszióját (pl.: *BiP2*, *CNX*, *CRT*, *PDI*). A szerzők szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az SA fokozza az ER kapacitását, a védelmi fehérjék (pl.: PR1) szintézisének segítése érdekében, így azok foldingját és transzportját, mellyel összhangban chaperon gének (pl.: *BiP2*) és az SA markergén *PR1* is indukálódott (Wang és mtsai. 2005). Később bizonyították, hogy az SA más chaperonok (pl.: *BiP3*) expresszióját is fokozza lúdfűben, azonban kisebb mértékben, mint az ER stresszt kiváltó tunikamicin (Tm) (Nagashima és mtsai. 2014). Emellett azonban azt is kiderítették különböző lúdfű mutánsok felhasználásával, hogy ennek szabályozása az IRE1-bZIP60 és bZIP28 ER stressz útvonalakon keresztül, időfüggő módon, azonban az NPR1-től függetlenül valósul meg (Nagashima és mtsai. 2014). ER stressz esetén ugyanis széttekeredett vagy rosszul hajtogatott fehérjék halmozódnak fel az ER lumenében, melyek egy specifikus sejtválaszt váltanak ki, amely az „unfolded protein response” (UPR) néven ismert (Howell, 2013). Az UPR enyhítheti az ER stresszt az ER fehérjeterhelésének csökkentésével, a fehérjeszintézis szabályozásában részt vevő specifikus gének, például a chaperonok, így az említett *BiP*

felülszabályozásával, valamint elősegíti az ER-hez kapcsolódó fehérjedegradációt (ERAD) vagy az indukált autofágiát (Sun és mtsai. 2021). A növényi UPR két fő ágát azonosították eddig növényekben, az inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) által közvetített basic leucine zipper 60 (bZIP60) útvonalat, valamint a bZIP28 és bZIP17 transzkripciós faktorokon keresztül megvalósuló útvonalat, melyek során a transzkripciós faktorok mindegyike specifikus proteolízisen megy keresztül az UPR-hez kapcsolódó gének transzkripciós aktiválása előtt (Simoni és mtsai. 2022; Ayaz és mtsai. 2024). A két ER stressz útvonal és az SA időbeli hatását erősítették meg mások is, lúdfű mutánsokat (Parra-Rojas és mtsai. 2015) és rizst vizsgálva (Hayashi és mtsai. 2012; Hayashi és Takaiwa, 2015). Ugyanakkor azt is leírták, hogy a Tm-indukálta ER stressz NPR1-függő módon befolyásolja a bZIP60 és bZIP28 transzkripciós szerepét (Lai és mtsai. 2018). Emellett azt is kimutatták, hogy a folyamatban az SA-okozta redox változásoknak (pl.: GSH metabolizmusa) kulcsszerepe lehet (Lai és mtsai. 2018), melyet azonban még kevésbé vizsgáltak. Az SA kezelés kapcsán kimutatták azt is, hogy a kezelés az IRE1 mindkét kódoló génjének (*IREa* és *IRE1b*) expresszióját fokozta lúdfűben (Moreno és mtsai. 2012). A Tm-indukálta ER stressz bZIP60/bZIP28 útvonala emellett függ a CPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENES-5) fehérjétől is, mely a növényi növekedés és védekezés egyik fő szabályozója, és amely gátolja az SA felhalmozódását (Meng és mtsai. 2017).

Ugyanakkor az SA és más, védekezéssel kapcsolatos fitohormonok (pl.: JA, ET) potenciális szerepe az ER stressz által kiváltott oxidatív láncreakciók szabályozásában további kutatásokat igényel, különösen az energiatermelő sejtorganellekre (pl.: kloroplasztiszok) gyakorolt hatásuk vizsgálata vonatkozásában.



5. ábra: A szalicilsav (SA) endoplazmatikus retikulumra (ER) gyakorolt főbb hatásainak sematikus illusztrációja stresszkörülmények között növényekben. A rosszul feltekeredett vagy széttekeredett („unfolded” vagy „misfolded”) fehérjék felhalmozódása az ER-ben az IRE1 konformációváltozását és RNáz funkciójának aktiválását eredményezi, ami a *basic leucine zipper 60* (*bZIP60*) mRNS splicing-ját okozza. Az intron kihalmozódását követően a *bZIP60* mRNS aktív transzkripciós faktorrá transzlálódik, és a sejtmagba transzlokálódva azon „unfolded protein response” (UPR) gének transzkripcióját fokozza, amelyek promóterükben UPR válaszfelet (UPRE) és ER stresszelet (ERSE) tartalmaznak. A *bZIP28*-at és a *bZIP17*-et a Golgi proteázok (S2P és S1P) aktiválják. Ezután a *bZIP*-ek hasított formája transzlokálódik a sejtmagba, és az ERSE-hez kötődik, hogy aktiválja az UPR gének (pl.: *BiP*, *CRT*, *CNX*, *PDI*) expresszióját (Liu és Howell, 2016). Más transzkripciós faktorok, mint például a *NAC062* és *NAC089* is proteolitikus hasításon eshetnek át, és a sejtmagba transzlokálódva elősegíthetik az UPR- vagy sejthalál-kapcsolt gének transzkripcióját (Yang és mtsai. 2014). Az SA-nak sokrétű szerepe van a növények védekező vagy sejthalált indukáló folyamatainak szabályozásában. Az SA többek között a reaktív oxigénformák (ROS) produkcióját indukálhatja a különböző sejtorganelumokban, és aktiválhatja a NADPH-oxidázt (Agarwal és mtsai. 2005; Gémes és mtsai. 2011). Emellett az SA csökkenti az ER lokalizált Bax Inhibitor-1 (BI-1) transzkriptumszintjét, és növeli a vakuoláris processzáló enzimek (VPE) expresszióját, sejthalált indukálva (Godbole és mtsai. 2013; Kovács és mtsai. 2016). Ezenkívül az SA jelentős hatással van a poliaminszintekre (pl.: spermin), amely befolyásolja az ER stresszt a növényekben (Takács és mtsai. 2016). Az SA megváltoztatja a redox homeosztázist és indukálja az NPR1 redukcióját és monomerizációját, amely a sejtmagba transzlokálódik, ahol specifikus TGA transzkripciós faktorokhoz kötődik, indukálva az SA által kiváltott védekező válaszgeének (PR-ek) expresszióját (Klessig és mtsai. 2016, 2018).

3. Célkitűzések

1. **Befolyásolja-e a napszak és a sötét az SA által indukált jelátvitelt a növények lokális és szisztémikus védekezési válaszai során gombaelicitor kitozán (CHT) alkalmazása esetén?**
 - Hogyan befolyásolja a sötétség az SA által indukált jelátvitelt és a növények lokális és szisztémikus védekezési válaszait paradicsom növények leveleiben?
 - Milyen szerepet játszik ebben a ROS és hogyan változik a ROS produkció az eltérő környezeti körülmények hatására?
 - Kialakul-e UPR a CHT kezelést követően és ezt befolyásolja-e a fény jelenléte vagy hiánya?
2. **Hogyan hatnak a különböző koncentrációjú SA kezelések a ROS metabolizmusára fényen és sötétben?**
 - Befolyásolja-e az SA akkumulációját a paradicsom növények leveleiben a fény hiánya?
 - Hogyan hat az SA a két eltérő környezeti körülmény mellett a levelek életképességére és a lipidperoxidációra?
 - Hogyan befolyásolják az SA kezelések a koncentráció és az idő függvényében a ROS produkciót a normál fotoperióduson fényen és sötétben?
 - Hogyan változik a különböző SA koncentrációjú kezelések hatására a ROS metabolizmusában részt vevő főbb enzimek aktivitása és az őket kódoló paradicsom gének kifejeződése fényen és a sötétben?
3. **Hogyan hatnak a különböző koncentrációjú SA kezelések a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra fényen és sötétben?**
 - Hogyan változnak a főbb fotoszintetikus paraméterek a különböző koncentrációjú SA kezeléseket követően a paradicsom növények leveleiben fényen és sötétben?
 - Hogyan hatnak a különböző SA kezelések a kloroplasztiszok szerkezetére az eltérő környezeti körülmények hatására?
 - Hogyan befolyásolják a különböző koncentrációjú SA kezelések a szénhidrátok akkumulációját fényen és a sötétben?
4. **Hogyan változik a HXK-k aktivitása a napszak során és mi a szerepük az SA-indukálta mitokondriális ROS produkcióban?**
 - Hogyan változik a paradicsom növények eltérő korú leveleiben a nap során a HXK-k aktivitása és az őket kódoló gének kifejeződése?

- Hogyan hatnak a különböző koncentrációjú SA kezelések a HXK-k aktivitásra és az őket kódoló gének kifejeződésére?
- Hogyan hatnak a különböző koncentrációjú SA kezelések a mitokondriumok szerkezetére és a mitokondriális *cyt c* szintre?
- A letális koncentrációjú SA kezelés hatására változó mtHXK aktivitás hogyan befolyásolhatja a mitokondriális ROS produkciót?

5. Hogyan befolyásolja a ROS metabolizmust az SA az ER stressz során?

- Milyen szerepe van az SA-nak és hogyan befolyásolhatja a ROS produkciót az ER stressz során paradicsom növények leveleiben?
- Hogyan szabályozhatja az SA a glutation szinteket és a glutation metabolizmusában szerepet játszó enzimeket, valamint az őket kódoló főbb paradicsom géneket az ER stressz során?
- Hogyan befolyásolja az ER stressz a kloroplasztikus ROS produkciót?
- Hogyan hat az ER stressz a fotoszintetikus aktivitásra és ebben milyen szerepet játszhat az SA?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növénynevelési körülmények

Kísérleteinkhez *Solanum lycopersicum* L. (cv. Ailsa Craig, Moneymaker, Castlemart) vad típusú (VT), SA hidroxilázt túltermelő (*NahG*), JA inszenzitív *jai1* (*jasmonic acid-insensitive 1*) és ET receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) paradicsom növényeket használtunk fel. A paradicsom növények magjainak csíráztatása 3 napon keresztül, sötétben, 26°C-on történt desztillált vízzel benedvesített szűrőpapíron, Petri-csészében. A csírázást követően a növényeket kettő hetes korukig perlitben, majd 8 hetes korukig (virágzás előtti fázis) hidropónikus kultúrában neveltük. A tápoldat összetétele az alábbi volt: 2 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KCl, 10⁻⁶ M MnSO₄, 5·10⁻⁷ M ZnSO₄, 10⁻⁷ M CuSO₄, 10⁻⁷ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10⁻⁷ M AlCl₃, 10⁻⁷ M CoCl, 10⁻⁵ M H₃BO₃, 2·10⁻⁵ M Fe(III)-EDTA (pH 5,8). A tápoldat cseréjét heti három alkalommal végeztük. A növények kontrollált körülmények között nőttek, 12/12 órás nappali/éjszakai fotoperiódusban (6:00-18:00 fényszakasz, 18:00-6:00 sötétszakasz; normál fotoperiódus), 200 μmol m⁻²s⁻¹ fényintenzitás alatt, 24/22°C nappali/éjszakai hőmérsékleten, és 55-60%-os relatív páratartalom mellett (Poór és mtsai. 2011). A kísérleteket minden esetben legalább három alkalommal ismételtük.

4.2. Alkalmazott kezelések

4.2.1. A kitozán (CHT) kezelések

A CHT kezelések által indukált lokális és szisztémikus növényi védekezési válaszok napszak-, valamint fényfüggésének tanulmányozása során a VT paradicsom növényeket a hajtáscsúcstól számított 6. levélemeletén kezeltük a CHT kezelőoldattal, különböző időpontokban. A CHT kezelőoldat készítéséhez törzsoldatként alacsony molekulatömegű CHT-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk fel 100 mM nátrium-acetát pufferben (pH 3,6) feloldva, 10 mg ml⁻¹ végkoncentrációban (Shepherd és mtsai. 1997). Ebből a törzsoldatból inkubációs puffer segítségével [10 mM KCl, 5 mM 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES), pH 6,15] hígítottunk 1 mM nátrium-acetát és 100 μg ml⁻¹ CHT végkoncentrációjú kezelőoldatot. Kontroll kezelésként a CHT nélküli, 1 mM nátrium-acetát tartalmú inkubációs puffert alkalmaztuk (Ördög és mtsai. 2011). A vizsgálatok során a szakirodalom tükrében az alábbi időpontokban kapták a növények a gomba elicitor CHT kezelést mókusszűrő ecsettel felkenve a levelek abaxiális oldalára (itt a legnagyobb a sztómadenzitás): a fényperiódus végén, késő délután

(17:00), a sötét periódus elején, este (21:00), a sötét periódus végén, hajnalban (4:00), valamint a fényperiódus elején, reggel (8:00). A kezeléseket követően a védekezési válaszok lokális és szisztémikus detektálása szintén különböző időpontokban (5:00; 9:00; 15:00) történt. A fény növényi védekezési válaszokra gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálatához a reggel (8:00) végzett CHT kezeléseket követően párhuzamosan tartottunk növényeket sötétben, az egy órával későbbi mintavételig (9:00). A lokális védekezési válaszok mellett az egész növényre kiterjedő, szisztémikus válaszokat a CHT-kezelt levélemelethez képest feljebb elhelyezkedő, a hajtáscsúcstól számított 5. levélemeleten detektáltuk. A kísérleteket legalább három alkalommal ismételtük meg.

4.2.2. Az SA és a hormonkezelések

Az SA és az exogén hormon kezeléseket a paradicsom növények tápoldatába mértük. A korábbi eredményeink alapján (Poór és mtsai. 2011; 2013), szubletális 0,1 mM és letális 1 mM SA koncentrációkkal 24 órán át kezeltük a növényeket. Az ER stressz és UPR vizsgálata során a JA kezeléseket 1 és 10 μ M koncentrációkban alkalmaztuk hat órán keresztül, míg az ET prekursor 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) kezeléseket 0,1 és 1 mM koncentrációkban, 24 órán át (Borbély és mtsai. 2019). A mérésekhez az intakt paradicsom növények teljesen kifejlett leveleit használtuk fel. A kezeléseket reggel 9 órakor, 3 órával a fényperiódus kezdete után történtek. Minden kísérletet legalább három alkalommal ismételtünk meg.

4.2.3. Az ER stressz indukciója és az UPR modulálása

Az ER stressz és UPR vizsgálata során a paradicsom növényeket az ER stresszt indukáló, 0,5 μ g ml⁻¹ tunikamicin (Tm) kezelésnek tettük ki a tápoldaton keresztül alkalmazva, 24 órán át. Az ER stressz és UPR modulálásához a növényeket 1 mM 4-fenilvajsav (PBA) kémiai chaperon kezeléseknél is alávetettük (Watanabe és Lam, 2008). A mérésekhez az intakt paradicsom növények teljesen kifejlett leveleit használtuk fel. Minden kezelés reggel 9 órakor, 3 órával a fényperiódus kezdete után történt. A kísérleteket legalább három alkalommal ismételtünk meg.

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

A kontroll és kezelt növények leveleiből történő RNS izolálás (Gallé és mtsai. 2009) első lépéseként a növényi mintákat folyékony nitrogénben, kvarchomok segítségével elporítottuk,

majd kb. 100 mg mintához 1 ml TRI reagenst adtunk [1,82 M guanidium izotiocianát, 11,36 mM nátrium-citrát, 200 mM kálium-acetát (pH 4,0), 0,73 mM N-laurilszarkozin, 45,45% fenol]. Ezt követően a mintákat 65°C-on 3 percig inkubáltuk, majd 200 µl kloroformot adtunk azokhoz. A következő lépés során a mintákat lecentrifugáltuk (11180 g, 15 perc, 4°C), majd a felülúszót átpipettáztuk 375 µl kloroform:izoamilalkoholba (24:1). Az így kapott elegyet ismét lecentrifugáltuk azonos körülmények között. A keletkezett felülúszót 500 µl izopropanolba pipettáztuk át a következő lépés részeként, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Újabb centrifugálást (11180 g, 15 perc, 4°C) követően a keletkezett pelletet 500 µl 70%-os hideg etanollal tisztítottuk, majd az RNS-t 30 µl molekuláris tisztaságú vízben (AccuGENE®, Lonza Group Ltd, Basel, Svájc) oldottuk fel.

A következő lépésben 15 µl RNS mintát 8 µl DNáz enzimmel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) kezeltük 8 µl DNáz puffert, 34 µl molekuláris tisztaságú vizet (AccuGENE®, Lonza Group Ltd, Basel, Svájc) és 0,4 µl RNáz inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) tartalmazó elegyben a genomi DNS maradványok eltávolítása érdekében (Gallé és mtsai. 2009). A folyamat során a mintákat 37°C-on 30 percig, majd 65°C-on 10 percig inkubáltuk. A mintában lévő fehérjéket 300 µl kloroform és 300 µl fenol elegyével távolítottuk el, majd centrifugálást követően (16090 g, 15 perc, 4°C) a felülúszót tovább tisztítottuk 400 µl kloroform segítségével. Ismételt centrifugálást (16090 g, 10 perc, 4°C) követően a felülúszót 550 µl hideg 96%-os etanol és 20 µl 3 M Na-acetát elegyében inkubáltuk -20°C-on egy éjszakán át. Az inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltuk (11180 g, 10 perc, 4°C), majd a pelletet 500 µl 70%-os hideg etanollal mostuk, végül 30 µl molekuláris tisztaságú vízben (AccuGENE®, Lonza Group Ltd, Basel, Svájc) oldottuk fel. Az esetleges RNS degradációt 1%-os (m/v) agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. Az izolált RNS koncentrációját NanoDropND-1000 spektrofotométert (NanoDrop Technologies, Washington, DC, USA) felhasználva mértük meg.

Egy µg tisztított RNS-ből 200 U reverz transzkriptáz (RT) enzimet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) felhasználva cDNS-t szintetizáltunk. A reakció 4 µl RT reakciópuffert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 0,5 µl random hexamer primert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 1 µl 25 mM dNTP keveréket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 0,5 µl RNáz inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) és 13 µl molekuláris tisztaságú vizet (AccuGENE®, Lonza Group Ltd, Basel, Svájc) tartalmazott (Chomczynski és Sacchi, 2006). A reakció 37°C-on 1 órán keresztül zajlott. A szakirodalom alapján kiválasztott és megvizsgálni kívánt gének relatív transzkript szintjét kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR) készülékkel mértük meg (qTOWER Real-Time qPCR

System, Analytik Jena, Jéna, Németország). Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és Sol Genomics (<http://solgenomics.net/>) adatbázisokból azonosított szekvenciákra a Primer3 szoftver (<https://primer3.ut.ee/>) felhasználásával terveztünk primereket (1. táblázat), melyek specifitását az NCBI BLAST segítségével ellenőriztük vissza (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Takács és mtsai. 2016). A qRT-PCR reakcióelegy 5 µl 2X Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-ből (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 3 µl nukleázmentes vízből, 0,4 µl primer párból, és 1,6 µl húszszorosára hígított cDNS-ből tevődött össze. A reakció során az első, 7 percig tartó, 95°C-on történő denaturációs lépést egy 40 ciklusból álló, ismétlődő reakciósor követte (15 másodperc, 95°C; 1 perc, 60°C). A PCR lefutását követően a termékek specifikusságát az olvadási görbék nyomon követésével vizsgáltuk meg. Az adatok analíziséhez a qTOWER 2.2 szoftvert használtuk (Analytik Jena, Jéna, Németország) fel (Takács és mtsai. 2017). A génexpressziós adatok normalizálásához a növényekben mindvégig konstans módon expresszálódó paradicsom *Elongációs faktor 1α* (*SIEF1α*) és a riboszómális *18S* (*SII8S*) gént használtuk fel referenciaként (Løvdal és Lillo, 2009). A kontrollhoz képest a kezelések hatására bekövetkező relatív transzkript szintváltozásokat a $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ módszer alapján határoztuk meg (Livak és Schmittgen, 2001).

1. táblázat: A qRT-PCR analízishez használt oligonukleotid primer párok

Név	Azonosító	Szekvencia (5'–3')	
		Reverz	Forward
<i>SIEF1α</i>	Solyc06g005060	TGGAGGGTATTCAGCAAAGG	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA
<i>SII8S</i>	GQ280796	CGGAGAGGGGAGCCTGAGAA	CCCGTGTTAGGATTGGGTAATTT
<i>SIPR1</i>	Solyc01g106620	CCCCAGCACCAGAATGAAT	CATCCCAGACAAAACTATG
<i>SIBiP</i>	Solyc08g082820	GCTTCCACCAACAAGAACAAT	TCAGAAAGACAATGGGACCTG
<i>SIRBOH1</i>	Solyc08g081690	AAGCCTCGGAAAACACTCG	TGGGGATGACTACTTGAGCA
<i>SICu/ZnSOD</i>	Solyc01g067740	TCATGTCCCTCCCTTTCCAAG	CCGACAAGCAGATTCCCTCTC
<i>SIFeSOD</i>	Solyc06g048410	GACATACGCCCTGTGATGC	ATCCCTCCTCCTTATCCAATG
<i>SIMnSOD</i>	Solyc06g049080	AGCACCTTCTGCGTTCATCT	TTCTCTTGGCTGGGCTATTG
<i>SIKAT1</i>	Solyc12g094620	AATGTGCTTTCCCCTCTTTGT	GATGATGTTTGTCTCCCAACG
<i>SIKAT2</i>	Solyc02g082760	TTAGGATTTGGCTTCAGAGCA	AACAACCTCCCCGTCTTCTTC
<i>SIKAT3</i>	Solyc04g082460	TGTAATGTTCTCCTGGCTGCT	CCCTATTCCTCCTCGTGTCTT
<i>SIAPX1</i>	Solyc06g005160	GCTCTGGCTTGTCTCTCTG	CTGGTGTGTTGCTGTTGAAG
<i>SIAPX2</i>	Solyc06g005150	GGTGGTCTGGTTTGTCTCT	CTGGTGTGTTGCTGTTGAAG
<i>SIH XK1</i>	Solyc03g121070	CCTTTTGTCCACCGCATAAT	TCATCAACCTCCTGGTAAGCA
<i>SIH XK2</i>	Solyc06g066440	TGCCAACCGTGTCAATAAT	TCATCCACCTCCTGGTAAGC
<i>SIH XK3</i>	Solyc12g008510	CAGGCACTTTTGGTTGTGTC	TAATGATGGTTCAGGCGTTG
<i>SIH XK4</i>	Solyc04g081400	CTCCCCATTCGGTATTCACA	GCTGGCAAAAAGGATGTCTAA
<i>SIGSH1</i>	Solyc08g081010	CTGCGACCCATGAAGTATGA	TGCTTTGCTTTCCCTGTTTC
<i>SIGR1</i>	Solyc09g065900	TTCGGAATTGCCTTCACTTATT	GTTGTA CTGAGCTTTGGTGAGC

<i>SIGR2</i>	Solyc09g091840	TGGTGCGATTTTGTTTTTGT	TCTGTTGGTCCTCACAAACG
<i>SIDHAR2</i>	Solyc05g054760	TTCCTACCTTCGTCTCATTCTG	AACAAACATTCTGCCCATGA
<i>SIOXP</i>	Solyc09g010560	CGGGATTGAAACAGACAAGG	CGGCTAACATCAGTGGAGGT
<i>SIGGT</i>	Solyc05g051780	GGACAGTGAACGAAATGCTG	GCAGGAGCGGAGAAGTCAT
<i>SIGSTF2</i>	Solyc06g009020	TGAAAGGAAGGGGGAACAAT	TTTTGCTTTGTGGTGTGCTC
<i>SIGSTU5</i>	Solyc01g086680	CCCTCTTGCCTAAACATCCA	TCTCCCTTCTTCTCCTTTGC
<i>SIGSTT2</i>	Solyc08g080900	GGTGAGTTCGTCCGAGTTAATT	CGAGAAGGTTGGGACATACG
<i>SIGSTT3</i>	Solyc08g080910	TGAAGTGGCTTGATGATACGA	TACAATCAACCCTCGCTGG

4.4. A sztómaapertúra vizsgálata

A mintavételek időpontjában a kontroll és kezelt növények leveleinek abaxiális oldaláról epidermisz nyúzatokat készítettünk, majd pufferbe (10 mM KCl, 5 mM MES, pH 6,15) helyezve a tárgylemezre téve azonnal lefényképeztük őket mikroszkóp segítségével (Nikon Eclipse TS-100, Nikon Instruments, Tokió, Japán) (Melotto és mtsai. 2006). A sztómák pórusátmérőjét az Image-Pro Plus 5.1 szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) határoztuk meg az epidermisz-nyúzatok véletlenszerűen kiválasztott területein. A kísérletek során három, különböző növényről származó epidermisz-nyúzatot legalább 30-40 sztómaapertúrát mértünk le, melyet három alkalommal ismételtünk.

4.5. A szuperoxid-gyökkanion ($O_2^{\cdot-}$) produkciójának meghatározása

A levelek szuperoxid-gyökkanion produkciójához 100 mg levelet 1 ml hideg 0,1 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,2) eldörzsöltünk, mely 1 mM nátrium-dietil-ditiokarbamát-trihidrát (SDDT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) SOD inhibitorot tartalmazott. A mintákat ezután lecentrifugáltuk (18890 g, 15 perc, 4°C), majd 300 µl felülúszót 650 µl jéghideg 0,1 M nátrium-foszfát puffer (pH 7,2) és 50 µl 12 mM nitrokék-tetrazólium-klorid (NBT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) elegyébe pipettáztunk. A mérés során a minták abszorbanciáját a reakció kezdetétől számított 2. (A0) és 7. (AS) percben spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország) detektáltuk 540 nm hullámhosszon. A szuperoxid-gyökkanion produkciót a $\Delta A_{540} = AS - A0$ formula alapján határoztuk meg, majd az eredményeket friss tömegre (FT) vonatkoztatva adtuk meg $\Delta A_{540} (\text{min}^{-1} \text{gFT}^{-1})$ (Chaitanya és Naithani, 1994).

4.6. A hidrogén-peroxid (H₂O₂) szintjének meghatározása

A levelek H₂O₂ szintjeinek meghatározásához 200 mg mintát homogenizáltunk 1 ml jéghideg 0,1% triklórecetsavval (TCA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd centrifugálást követően (13400 g, 10 perc, 4°C) 250 µl felülúszót 250 µl 50 mM kálium-foszfát puffer (pH 7,0) és 500 µl 1 M kálium-jodid (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) elegyéhez adtunk. Tíz perc sötétben történő inkubációt követően 390 nm hullámhosszon mértük meg a minták abszorbanciáját spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével (Velikova és mtsai. 2000). A H₂O₂ szinteket H₂O₂ oldatból (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) készített hígítási sort felhasználva, standard kalibrációs egyenes alapján határoztuk meg, majd az eredményeket µmol gFT⁻¹ formátumban adtuk meg.

4.7. A BiP fehérje kimutatása és mennyiségének meghatározása

A BiP fehérje mennyiségének változását Western blot segítségével vizsgáltuk meg. 200 mg levélmintát folyékony nitrogénben elporítottunk, majd 400 µl módosított Lacus pufferrel [25 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM ditiotreitolt (DTT), 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 0,05% Triton X-100] vontuk ki a fehérjéket (Hurný és mtsai. 2020). Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk (16090 g, 20 perc, 4°C), majd az összfehérje tartalmat Bradford (1976) módszere alapján mértük meg. Ezt követően 15 µg fehérjét tartalmazó kivonatot használtunk fel a denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE; Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Warwickshire, UK) történő elválasztáshoz, 12%-os szeparáló gélen. A következő lépésben a mintákat PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) transzferáltuk (200 mA, 70 perc). A membránok blokkolása egy órán át 24 mg ml⁻¹ szarvasmarha-szérum albumint (BSA) tartalmazó TBS-T [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20] oldattal történt szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránokat TBS-T-ben oldott anti-BIP (AS09 481, 1:2000) és anti-Aktin (AS13 2640, 1:3000) elsődleges (nyúl) antitestekkel (Agrisera, Vännäs, Svédország) jelöltük 4°C-on. Az egy éjszakán keresztül történő inkubációt követően a nem kötődött antitesteket háromszori mosással távolítottuk el a membránról, majd egy órán át torma-peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (Agrisera, Vännäs, Svédország) jelöltük a célfehérjéhez specifikusan kötődött elsődleges antitesteket szobahőmérsékleten. Négyszeri mosást követően HRP szubsztrátként funkcionáló, luminol- és H₂O₂ tartalmú oldatokban 4 percig kezeltük a membránt (Western

Chemiluminescent HRP Substrate, Immobilon, Millipore, USA), majd a kemilumineszcens szignált C-DiGit Western Blot Scannert (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) felhasználva detektáltuk (Meng és mtsai. 2016). A jelölt BiP fehérje relatív mennyiségének meghatározásához ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) szoftvert használtunk fel és az adatokat a szignál területére vonatkozó pixelintenzitásban adtuk meg.

4.8. Az SA tartalom meghatározása

A kontroll és kezelt levelek SA tartalmát nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárással határoztuk meg Pál és mtsai. (2005) módszere szerint kis változtatásokkal, melyhez 1 g mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd centrifugacsövekbe helyezve 2 ml 70%-os metanolt adtunk hozzá, mely 250 ng orto-anizinsavat (oANI) és 25 mg para-hidroxi-benzoosavat (p-HBA) tartalmazott. Ezt követően lecentrifugáltuk (10000 g, 20 perc) őket, majd a pelletet 2 ml 90%-os metanolban újra feloldottuk, centrifugáltuk és a felülúszókat kombinálva vákuum alatt a vizes fázisig bepároltuk szobahőmérsékleten. A maradék vizes fázishoz 1 ml 5%-os TCA-t adtunk, majd centrifugálást követően (15000 g, 10 perc) a felülúszót 3 ml ciklohexán:etil-acetát 1:1 (v/v) arányú elegyével kétszer extraháltuk. Ebben a lépésben a szabad fenolos savak a felső, szerves fázisba kerültek. A metanolban oldódó, kötött fenolos vegyületeket az alsó, vizes fázis tartalmazta, melynek savas hidrolízisét 1,3 ml 8 N HCl-ban oldott 250 ng oANI és 25 µg pHBA hozzáadásával végeztük egy órán át 80°C-on, majd a fent leírtak alapján kétszer particionáltuk. A szerves fázisok vákuum alatt bepárlásra kerültek, majd 1 ml 15% acetonitrilben feloldottuk őket. Az SA mennyiségét fordított fázisú oszloppal (Phenomenex Synergi Fusion-RP, 4 µm; 150x4,6 mm) ellátott HPLC készülékkel (W2690 szeparációs modul, Waters, Milford, MA, USA) szobahőmérsékleten határoztuk meg, melynek detektálása szkennig fluoreszcenciás detektorral (W2475, Waters, Milford, MA, USA) 305 nm gerjesztési és 407 nm emissziós hullámhosszokon történt. Az SA mennyiségét ng gFT⁻¹ értékben adtuk meg.

4.9. Az ionkieresztés vizsgálata

Az életképességet az ionkieresztés (Electrolyte leakage, EL) alapján határoztuk meg 1 cm átmérőjű levélkorongokat felhasználva, melyekből három darabot tettünk 20 ml ioncserélt desztillált vízbe, 2 órán keresztül áztatva őket szobahőmérsékleten a sötétben (Sun és mtsai. 2010). Az inkubáció után megmértük az oldat vezetőképességét (C1) konduktivitást mérő

készülékkel (OK-102/1 Radelkis, Budapest, Magyarország). Ezt követően a mintákat 40 percig 95°C-on forraltuk, majd lehűtés után ismét meghatároztuk az oldatok vezetőképességét (C2). A relatív EL-t az alábbi képlet alapján számoltuk ki: Rel. ionkieresztés (EL) = $(C1/C2) \times 100$.

4.10. A malondialdehid (MDA) tartalom meghatározása

A kezeléseket követően a lipidek peroxidációját a malondialdehid (MDA) tartalom változása alapján határoztuk meg. A mérés során 100 mg levélmintát homogenizáltunk 1 ml 0,1% triklórecetsavban (TCA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és a további lipidperoxidáció megakadályozása érdekében 100 µl 4% butilált hidroxitoluolt (BHT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk a kivonathoz. Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk (16090 g, 20 perc, 4°C) és a felülúszó 250 µl-éhez 1 ml 0,5% tiobarbitursavat adtunk, amelyet 20% TCA-ban oldottunk fel előtte. Ezt a reakcióelegyet fél óráig inkubáltuk 96°C-os vízfürdőben. A minták abszorbanciáját 532 nm hullámhosszon detektáltuk spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével és a 600 nm hullámhosszon mért nem-specifikus értékkel korrigáltuk a kapott értékeket. A $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens felhasználva számoltuk ki az MDA tartalmat (Ederli és mtsai. 2004).

4.11. A NADPH-oxidáz enzimaktivitás meghatározása

A NADPH-oxidáz enzim aktivitásának meghatározásához 500 mg paradicsom levelet folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 1 ml 50 mM Na-foszfát puffert (pH 6,8) és 0,5% Triton X-100 oldatot adtunk hozzá. A mintákat ezután lecentrifugáltuk (16090 g, 20 perc, 4°C) és a továbbiakban a felülúszót használtuk a PAGE-val történő elválasztáshoz. Az elektroforézist 10%-os, 2 mm vastagságú és 120 mm hosszúságú lapgélben, natív körülmények között, 4°C-on végeztük függőleges állású omniPAGE elektroforézis rendszerrel (Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Warwickshire, UK). A szeparáló gél 5 ml akrilamid oldatot (30% akrilamid és 0,8% biszakrilamid), 3,75 ml 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) oldatot, 6,1 ml desztillált vizet, 150 µl 10%-os ammónium-peroxi-diszulfátot (APS) és 15 µl tetrametil-etilén-diamint (TEMED) tartalmazott. A 4%-os gyűjtő gél 1,27 ml akrilamid oldatból, 0,937 ml 1 M TRIS-HCl (pH 6,8) oldatból, 5,17 ml desztillált vízből, 75 µl APS-ből és 7,5 µl TEMED-ből állt. A géltre mintánként 30 µg fehérjét tartalmazó enzimkivonatot vittünk fel, melyet Bradford (1976) módszere alapján határoztunk meg spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország). A futtató puffer 14,4 g glicint és 3,0 g TRIS-t tartalmazott (pH 8,3) literenként. A futtatás három órán

keresztül történt 20 mA áramerősséggel. A futtatást követően a gélben található NADPH-oxidáz izoenzimeket Carter és mtsai. (2007) festési módszerével tettük láthatóvá. 50 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferben feloldottunk 0,2 mM NBT-t, 0,1 mM MgCl₂-ot, 0,2 mM NADPH-t, valamint 1 mM CaCl₂-ot. A gélt 20 percig rázattuk sötétben az izoenzimek megjelenéséig. A NADPH-oxidáz aktivitás meghatározásához ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) szoftvert használtunk fel és az eredményeket a szignál területére vonatkozó pixelintenzitásban adtuk meg.

4.12. Az antioxidáns enzimek aktivitásának mérése

Az antioxidáns enzimek aktivitásának méréséhez 200 mg levelet dörzsöltünk el 1 ml jéghideg 100 mM kálium-foszfát pufferrel (pH 7,0), amely 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) és 1% (m/v) polivinil-polipirrolidont (PVPP) tartalmazott (Tari és mtsai. 2015). Az összfehérje tartalmat Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország).

A SOD enzim (EC 1.15.1.1) aktivitását az NBT riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukciójának gátlása alapján határoztuk meg (Tari és mtsai. 2015). A mérés során az enzimkivonatot 50 mM NBT-t és 0,2 mM riboflavint tartalmazó reakcióelegybe mértük. Ezt követően a 15 perc után keletkezett formazán extinkcióját 560 nm hullámhosszon mértük meg spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével. Egy enzimegység (U) azt az enzimmennyiséget jelenti, amely az NBT redukciójának 50%-os gátlását okozza fény jelenlétében. Az enzim aktivitását U mg⁻¹ fehérje egységben adtuk meg.

A KAT enzim (EC 1.11.1.6) aktivitásának méréséhez az enzimkivonatot 50 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,0) és 1% H₂O₂-ot tartalmazó reakcióelegybe mértük (Tari és mtsai. 2015). A KAT enzim aktivitását a H₂O₂ lebontásának nyomon követésével vizsgáltuk 240 nm-en spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével, az első és a második perc között mért extinkcióváltozás alapján. Egy enzimegység (U) az az enzimmennyiség, mely 1 μmol H₂O₂ elbontását katalizálja 1 perc alatt. A specifikus aktivitást a 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ extinkciós koefficiens segítségével adtuk meg.

Az APX enzim (EC 1.11.1.11) aktivitásának meghatározása során az enzimkivonatot tartalmazó felülúszót 50 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,0) és 5 mM redukált aszkorbátot (ASC) tartalmazó reakciópufferbe mértük (Tari és mtsai. 2015). A reakció kezdetén 10 mM H₂O₂ oldatot adtunk a rendszerhez, majd 1,5 percig mértük a minták abszorbanciáját 290 nm hullámhosszon, spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével. Egy

enzimegység (U) az az enzimmennyiség, amely 1 μmol ASC oxidációját katalizálja 1 perc alatt. A specifikus aktivitást a $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével határoztuk meg.

A POD enzimaktivitás (EC 1.111.7) vizsgálata során az enzimkivonatot tartalmazó felülúszót 50 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,0) és 1% gvajakolt tartalmazó reakciópufferbe mértük (Horváth és mtsai. 2015). A reakció során 1% H_2O_2 oldatot adtunk a rendszerhez, majd 1,5 percig mértük a minták abszorbanciáját 470 nm hullámhosszon spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével. Egy enzimegység (U) az az enzimmennyiség, amely 1 μmol tetragvajakol képződését katalizálta 1 perc alatt. A specifikus aktivitást a $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével számoltuk ki.

4.13. A fotoszintetikus aktivitás meghatározása

A klorofill fluoreszcencia és a PSI (P700) abszorbancia változásait DUAL-PAM-100 (Heinz-Walz, Effeltrich, Németország) fluoriméter segítségével szimultán detektáltuk a levelekben, DUAL-E és DUAL-DR mérőfejek használatával (Klughammer és Schreiber, 2008). A mérések elején 15 perces sötétadaptációt követően meghatároztuk a sötétadaptált állapotban mérhető minimális fluoreszcencia (F_0) értékét modulált mérőfény (620 nm , $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) segítségével. Ezt követően megmértük a sötétadaptált állapotban mérhető maximális fluoreszcencia szintet (F_m) egy $14000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ intenzitású telítési impulzus segítségével. Végül az F_m értékének meghatározása után megkezdődött a minták aktinikus megvilágítása $216 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erősségű vörös fényel (635 nm). Az aktinikus megvilágítást (13 perc) követően rögzítettük a fényadaptált állapot steady state fluoreszcencia szintjének (F_s) értékét, illetve egy telítési fényimpulzus segítségével meghatároztuk a fényadaptált állapot maximális fluoreszcencia szintjét (F_m'). A fényadaptált állapot minimális fluoreszcencia szintjét (F_0') az aktinikus fény tranziens kikapcsolásakor egy 3 másodperces $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ távoli vörös fény (720 nm) segítségével mértük meg. Emellett a P700 redox változásait a 830 és a 875 nm-es mérőfények differencia jeléből határoztuk meg (Klughammer és Schreiber, 2008). Az F_0 és az F_m meghatározást követően megtörtént a maximális P700 jel (P_M) detektálása is. Az aktinikus megvilágítást követő telítési fényimpulzus után pedig meghatároztuk a P_M' értékét is. Ezeket követően az alábbi paramétereket számoltuk ki (Genty és mtsai. 1989; Kramer és mtsai. 2004; Lei és mtsai. 2014; Zhang és mtsai. 2014):

A PSII maximális kvantumhatásfoka sötétadaptált levelekben (F_v/F_m):

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

A PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciója fényadaptált állapotban (q_L):

$$q_L = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0') \times F_0' / F_s$$

A PSII effektív kvantumhatásfoka fényadaptált levelekben [$Y(II)$]:

$$Y(II) = (F_m' - F_s) / F_m'$$

A szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfoka [$Y(NO)$]:

$$Y(NO) = 1 / ((F_m / F_m' - 1) + 1 + q_L \times (F_m / F_0 - 1))$$

A (fény)szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfoka [$Y(NPQ)$]:

$$Y(NPQ) = (1 - Y(II) - 1) / ((F_m / F_m' - 1) + 1 + q_L \times (F_m / F_0 - 1))$$

A szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfoka [$Y(NO)$]:

$$Y(NO) = 1 / ((F_m / F_m' - 1) + 1 + q_L \times (F_m / F_0 - 1))$$

A PSI donor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka [$Y(ND)$]:

$$Y(ND) = 1 - P700_{red}$$

A PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka

$$[Y(NA)]: Y(NA) = (P_M - P_M') / P_M$$

A CEF-PSI kvantumhatásfokának $Y(II)$ feletti aránya / CEF-PSI mértéke [$Y(CEF)/Y(II)$]:

$$Y(CEF)/Y(II) = [Y(I) - Y(II)] / Y(II)$$

4.14. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségének mérése

A fotoszintetikus pigmentek mennyiségének mérése során 25 mg tömegű levélkorongokat egy napig 1 ml 100%-os acetonban inkubáltunk sötétben, 4°C-on. A minták centrifugálását (20112 g, 15 perc, 4°C) követően a felülúszót félre tettük, majd a visszamaradt levélszövetre friss 1 ml aceton/TRIS puffer elegyét (80:20, v/v, pH 7,8) pipettáztuk, és újabb 24 órán keresztül sötétben inkubáltuk 4°C-on. Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk (20112 g, 15 perc, 4°C) és a kapott felülúszót egyesítettük a korábbival. A kivonatok pigmenttartalmát spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével detektáltuk és az alábbi egyenletek segítségével számoltuk ki (Sims és Gamon, 2002):

$$\text{Klorofill } a \text{ (Kl } a) = 0,01261 \times A_{661} - 0,001023 \times A_{534} - 0,00022 \times A_{643}$$

$$\text{Klorofill } b \text{ (Kl } b) = 0,02255 \times A_{643} - 0,00439 \times A_{534} - 0,004488 \times A_{661}$$

$$\text{Karotinoidok} = (A_{470} - 17,1 \times (\text{Kl } a + \text{Kl } b) - 9,479 \times \text{Antocianin korrekció}) / 119,26$$

$$\text{Antocianin korrekció} = 0,0821 \times A_{534} - 0,00687 \times A_{643} - 0,002423 \times A_{661}$$

4.15. A keményítőtartalom és az oldható cukrok mennyiségének meghatározása

A szénhidrátok (keményítő és oldható cukrok) méréséhez 100 mg friss tömegű (FT) levelet 1 ml 80%-os etanollal eldörzsöltünk és 80°C-on 30 percig inkubáltunk vízfürdőben. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (2600 g, 10 perc), és a felülúszót használtuk a továbbiakban a cukortartalom spektrofotometriás meghatározásához (KONTRON, Milánó, Olaszország) 630 nm hullámhosszon, miután azt 72%-os kénsavban oldott 0,2% antronnal reagáltattuk 80%-os etanolban oldott szacharózt (Normapur, VWR Int., Leuven, Belgium) felhasználva standardként.

Ezután a pelletet 1 ml desztillált vízzel mostuk és 1 ml 1,1%-os sósav hozzáadásával 100°C-on 30 percig inkubáltuk vízfürdőben. Az inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltuk (2600 g, 10 perc), majd a keményítőtartalmat spektrofotometriásan (KONTRON, Milánó, Olaszország) mértük meg 630 nm hullámhosszon antronnal, 1,1%-os HCl-ben oldott keményítőt (Normapur, VWR Int., Leuven, Belgium) standardként felhasználva (Hansen és Møller, 1975).

4.16. Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM)

A kloroplasztiszok és mitokondriumok beágyazás utáni elektronmikroszkópiájához a kontroll és kezelt levelekből származó levélszegmenseket (5-6 mm) a mintavételi időpontokban azonnal 2%-os paraformaldehid és 2% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M kálium-foszfát puffer (pH 7,4) elegyébe helyeztük, majd 1 órán át 1%-os (m/v) OsO₄-ben fixáltuk. A mintákat 0,1 M kálium-foszfát pufferrel (pH 7,4) történő öblítést, és növekvő etanol-koncentrációval, valamint acetonnal történő dehidratálást követően beágyaztuk Embed812 gyantába (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Ezeket a beágyazott blokkokat használtuk félvékony (0,7 µm) metszetek elkészítésére, a vizsgált terület kiválasztására, valamint ultravékony (70 nm) metszetek elkészítéséhez is, amelyeket nikkelrácsra helyeztünk fel. Blokkonként három rácsot uranil-acetáttal (Merck, Darmstadt, Németország) és ólom-citráttal (Merck, Darmstadt, Németország) kontrasztfestettünk, majd JEOL JEM 1400 transzmissziós elektronmikroszkóp (Jeol Ltd., Tokió, Japán) segítségével vizsgáltunk és fényképeztünk (Talapka és mtsai. 2016).

A citokróm *c* (cyt *c*) kieresztés vizsgálatához a kezelésenkénti blokkokból három ultravékony metszetet használtunk fel az immunarany jelöléshez. A grideket egy éjszakán át inkubáltuk anti-cyt *c* nyúl poliklonális primer antitesttel (Agrisera, Vännäs, Svédország;

1:1500), majd protein A-arany-konjugált anti-nyúl (18 nm-es aranyrészecskék, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 1:20 végső hígítás) másodlagos antitesttel jelöltük őket 3 órán keresztül. A lépések között a mintákat alaposan mostuk. Az immunreakció specifitását azáltal ellenőriztük, hogy az elsődleges antitestet kihagytuk a jelölési protokollból, és a metszeteket csak a protein A-arany-konjugált másodlagos antitestben inkubáltuk. A metszeteket uranil-acetáttal (Merck, Darmstadt, Németország) és ólom-citráttal (Merck, Darmstadt, Németország) kontrasztoltuk, majd JEOL JEM 1400 transzmissziós elektronmikroszkóp (Jeol Ltd., Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk és fényképeztük. A citoszolban, a mitokondriumok belsejében és a sejtorganelumok környékén lévő, cyt *c*-t jelölő aranyrészecskéket megszámláltuk. A számlálást digitális fényképeken végeztük 20000-szeres nagyítás mellett az AnalySIS 3.2 programmal (Soft Imaging System GmbH, Münster, Németország). Kezelésenként harminc sejtet elemeztünk. Az eredményeket az elemzett sejtkomponensek egységnyi területére eső aranyrészecskék teljes számában fejeztük ki.

4.17. A hexokináz (HXK) enzim aktivitásának mérése

A hexokináz aktivitását a levelekben és a tisztított mitokondriumokban Whittaker és mtsai. (2001) alapján határoztuk meg. A levelek esetében 0,5 g növényi szövetet folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 1 ml hideg extrakciós puffert hozzáadva (20 mM KH_2PO_4 , pH 7,5; 0,5 mM NaEDTA, 5 mM DTT) elhomogenizáltunk. Centrifugálást (15000 g, 15 perc, 4°C) követően a minta hexokináz aktivitását 1 ml 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,5), 2 mM MgCl_2 , 1 mM NaEDTA, 1 mM ATP, 1,0 IU glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH, EC 1.1.1.49), 1,0 IU foszfo-glükóz izomeráz (PGI, EC 5.3.1.9) és 10 mM glükóz (Glc) tartalmú reakcióelegyben mértük, és 5 perc elteltével, szobahőmérsékleten, 340 nm hullámhosszon spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével detektáltuk. Az enzimaktivitást $\text{nmol min}^{-1} \text{mg FT}^{-1}$ és $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg fehérje}^{-1}$ formátumban fejeztük ki a levél, illetve a mitokondrium minták esetében. Az oldható fehérje koncentrációt Bradford (1976) módszere alapján mértük spektrofotometriásan (KONTRON, Milánó, Olaszország).

A mitokondriális HXK (mtHXK) enzimaktivitást ugyanezen módszer felhasználásával mértük az izolált mitokondriumokat felhasználva spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével.

4.18. A glükóztartalom meghatározása

A levelek glükóztartalmának meghatározásához 0,5 g levélszövetet homogenizáltunk el és 30 percig forraltunk 96%-os etanolban. A homogenizátumot kétszer lecentrifugáltuk (12000 g, 20 perc, 4°C), majd a felülúszót használtuk fel a Glc mennyiségének meghatározáshoz egy moduláris Shimadzu HPLC rendszerrel (Shimadzu Corp., Kyoto, Japán), amely két LC20-AD pumpával, egy DGU-14A gáztalanítóval, egy SIL-20A automatikus mintavevővel, egy CTO-10ASVP oszloppal, egy RID-10A detektorral, valamint egy CBM-20A rendszervezérlővel volt ellátva. Az injektálás során 15 µl mintát vittünk fel a SphereClone NH2 (100 x 4,6 mm 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) oszlopra és HPLC minőségű víz:acetonitril (30:70 v/v) elegyével választottuk el. Az áramlási sebesség 1 ml/perc, a kemence hőmérséklete 40°C volt.

4.19. Mitokondriumok izolálása és integritásuk vizsgálata

A paradicsom növények leveleiből a mitokondriumok izolálását Camacho-Pereira és mtsai. (2009) alapján végeztük el néhány lépésben való módosítással. 100 g levélmintát homogenizáltunk el 300 ml jéghideg extrakciós pufferben [10 mM HEPES/Tris puffer (pH 7,4), 0,3 M mannitol, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0,3 mM PMSF, 20 mM β-merkaptóetanol és 0,1 % (w/v) BSA], majd a homogenizátumot 100 mikronos szűrőn átszűrtük. Az így kapott szűrletet két lépésben centrifugáltuk le, elsőként egy rövid ideig tartó, alacsony fordulatszámon (3000 g, 5 perc, 4°C), majd egy magasabb fordulatszámon, hosszabb ideig futtatott centrifugálás (15000 g, 15 perc, 4°C) segítségével. A mitokondriumokat ezután hideg „mosó” pufferben [300 mM szacharóz, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM 3-(N-morfolino)-propánszulfonsav (MOPS) puffer, pH 7,2] oldottuk fel, majd 28% (v/v) Percoll-t tartalmazó hideg mosópufferre rétegeztük és centrifugáltuk (40000 g, 40 perc, 4°C). A gradiens centrifugálás után a mitokondriumokat tartalmazó középső sávot (2. frakció) eltávolítottuk, és 5 ml jéghideg reakciópufferrel hígítottuk Percoll nélküli (0,3 M mannitol, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM TRIS, pH 7,2) „mosó” pufferrel. A hígítást és a tisztítási centrifugálást kétszer megismételtük (12000 g, 10 perc, 4°C). A végső pelletet 1 ml extrakciós pufferben felszuszpendáltuk, és felhasználásig 4°C-on tároltuk. A végső fehérjekoncentráció 10 és 20 mg/ml között változott a Bradford (1976) módszerével történő mérés alapján.

A mitokondrium szuszpenzióban a KAT és a citokróm *c*-oxidáz (COX; EC 1.9.3.1) aktivitásának mérését használtuk markerként a mitokondriális frakciók tisztaságának és integritásának értékelésére (Chen és mtsai. 2009). A KAT aktivitását 10 mM H₂O₂ ($\Delta\varepsilon_{240} =$

$39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) exponenciális bomlásának mérésével határoztuk meg 50 mM kálium-foszfát puffer (pH 7,0) felhasználásával, 240 nm hullámhosszon, spektrofotométerrel detektálva (KONTRON, Milánó, Olaszország). A KAT enzimaktivitás szignifikánsan lecsökkent a tisztítás során, ami azt jelzi, hogy a mitokondrium frakció mentes volt a peroxisómáktól. A COX enzim aktivitását 0,3 M szacharózt, 5 mM MgCl_2 -t, 50 μM redukált cyt *c*-t és 10 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,0) tartalmazó oldatban mértük. A reakciót 5 μl tisztított mitokondrium hozzáadásával indítottuk el, és 550 nm hullámhosszon detektáltuk az oxidált cyt *c* képződését spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország). Kontrollként 0,04%-os Triton X-100-at használtunk a mitokondriumok teljes integritás-vesztéséért.

4.20. A mitokondriális ROS és nitrogén-monoxid (NO) produkció mérése

A mitokondriális ROS és NO produkció detektálásához a mitokondriumokat (0,2 mg fehérje ml^{-1}) standard respirációs pufferben (0,3 M mannitol, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 3 mM MgSO_4 , 10 mM NaCl, 5 mM KH_2PO_4 , 0,3 mM $\beta\text{-NAD}^+$) inkubáltuk, kiegészítve a ROS festés során 10 μM 2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) vagy az NO detekció során 4,5 diaminofluoreszcein-FM DA (DAF-FM DA) fluoreszcens festékekkel (Camacho-Pereira és mtsai. 2009). A minták 10 percig történő inkubációja során a festékek fluoreszcenciáját 495 nm és 517 nm (DCF) vagy 500 nm és 515 nm (DAF) gerjesztési és emissziós hullámhosszon követtük spektrofluoriméterrel (Hitachi f-4500; Tokió, Japán). A II. mitokondriális komplexet 10 mM szukcináttal (Suc) és 0,1 mM adenzin-difoszfáttal (ADP) aktiváltuk. A mitokondriális HXK (mtHXK) enzimet 5 mM Glc felhasználásával aktiváltuk, és 50 μM N-acetil-glükózamin (NAG) hozzáadásával gátoltuk, a respirációs pufferben feloldva.

4.21. A glutation szintek meghatározása

A kezeléseket követően, 250 mg levélszövetet 1 ml 5%-os (v/v) TCA-val elhomogenizáltunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd lecentrifugáltunk (16090 g, 20 perc, 4°C). Az össz glutation tartalom meghatározásához közvetlenül a felülúszót használtuk, míg az oxidált forma (GSSG) mérésénél a felülúszóból vett mintát 2-vinilpiridinnel kezeltük, mely képes elfedni a redukált formát (GSH). Egy óra inkubációt követően trietanolammal semlegesítettük a vinilpiridint. A mérés 412 nm hullámhosszon spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország) történt. A reakcióelegy 0,2 mM NADPH-t, 0,25 mM 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesavat (DTNB), 20 μl kivonatot és 1 U GR enzimet (élesztő; Sigma-Aldrich; St.

Louis; USA) tartalmazott foszfát pufferben (0,1 M, pH 7,5), 1 ml végtérfogatban. A GSH-tartalmat az össz glutation és a GSSG koncentrációjának különbségéből számítottuk ki (Griffith, 1980).

4.22. A glutation metabolizmusával kapcsolatos enzimek aktivitásának mérése

A kezeléseket követően 250 mg levélszövetet elhomogenizáltunk 1 ml jéghideg 100 mM foszfát-pufferben (pH 7,0), amely 1 mM PMSF-et és 1 % (m/v) PVPP-t tartalmazott. Centrifugálást (16090 g, 20 perc, 4°C) követően a felülúszót használtuk fel a glutation metabolizmusával kapcsolatos enzimek aktivitásának vizsgálatához. A minták fehérje tartalmát Bardford (1976) módszere alapján mértük meg spektrofotometriásan (KONTRON, Milánó, Olaszország).

A glutation-reduktáz (GR; EC 1.6.4.2) enzim aktivitásának meghatározása a keletkező GSH mérésén alapul. A GSH 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzoosavval (DTNB) való reakciója során színes vegyület keletkezik, melynek fényelnyelését 412 nm hullámhosszon detektálhatjuk spektrofotométer (KONTRON, Milánó, Olaszország) segítségével. A reakcióelegy 600 µl foszfát-puffert (0,2 M, pH 7,0), 50 µl 2 mM NADPH-t, 50 µl 20 mM oxidált glutationt (GSSG), 50 µl enzimkivonatot és 250 µl 3 mM DTNB-t tartalmazott. A reakciót a DTNB hozzáadásával indítottuk el (Smith és mtsai. 1988). A mérés során meghatároztuk az 1 perc alatt redukálódott DTNB mennyiségét és 1 mg fehérjére vonatkoztatva specifikus aktivitás értéket számoltunk ($\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A dehidroaszorbát reduktáz (DHAR; EC 1.8.5.1) aktivitását Edwards és Dixon (2005) módszerével határoztuk meg. A mérés során a reakcióelegyben 925 µl 100 mM foszfát pufferhez (pH 6,5) 25 µl 0,5 mM dehidroaszorbátot mértünk és a reakciót 50 µl 5 mM GSH-val indítottuk el. A spektrofotométerrel 265 nm hullámhosszon mért extinkció változásból (KONTRON, Milánó, Olaszország) az 1. és 2. perc közötti értékek felhasználásával számoltuk ki az enzim aktivitását. Az egy perc alatt keletkezett aszkorbátot µmól-ban megadva fejeztük ki az enzimegységet (U) ($\epsilon_{265} = 14,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A glutation peroxidáz (GPOX, EC 1.11.1.9) aktivitását Horváth és mtsai. (2015) által használt módszer alapján mértük. A reakcióelegy 4 mM GSH-t, 0,2 mM NADPH-t, 0,05 U GR enzimet (élesztő; Sigma-Aldrich; St. Louis; USA), 100 µl enzimkivonatot és 0,5 mM kumén hidroperoxid (CHP) szubsztrátot tartalmazott 100 mM foszfát pufferben (pH 7,0), 1 ml végtérfogatban. A NADPH fogyását 340 nm hullámhosszon detektáltuk spektrofotométerrel (KONTRON, Milánó, Olaszország), és minden esetben korrigáltuk az értékeket a szubsztrátot

nem tartalmazó reakcióelegy mérésével, hogy kiküszöböljük a nem specifikus NADPH oxidációt. 1 U az az enzimaktivitás, ami 1 perc alatt 1 nmól NADPH oxidációjára képes ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A glutation transzferáz (GST, EC 2.5.1.18) enzimaktivitást egy mesterséges szubsztrát, az 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) segítségével határoztuk meg (Horváth és mtsai. 2015). A reakcióelegy 1 mM GSH-t, 100 μl enzim kivonatot és 1 mM CDNB szubsztrátot tartalmazott 100 mM foszfát pufferben (pH 6,5), 1 ml végtérfogatban. Ezt követően 340 nm hullámhosszon mértük a CDNB-GS konjugátumok képződését spektrofotométer segítségével (KONTRON, Milánó, Olaszország). 1 U az az enzimaktivitás, amely 1 perc alatt 1 nmól konjugátum előállítására képes ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.23. A kloroplasztiszok izolálása

Vad típusú paradicsom növények kifejtett leveleinek 15 g-ját homogenizáltuk 30 ml jéghideg izolációs pufferben [0,3 M szacharóz, 50 mM Tricin/NaOH (pH 7,8), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,2% (m/v) BSA] (Grabsztunowicz és Jackowski, 2013). A homogenizátum szűrése után a mintákat lecentrifugáltuk (1000 g, 7 perc, 4°C), majd a felülúszót leöntöttük, és a zöld pelletet óvatosan 10 ml izoláló pufferben felfuszpendáltuk. A kloroplasztisz szuszpenziót ezután 40-80%-os Percoll gradientsre töltöttük és lecentrifugáltuk (8000 g, 40 perc, 4°C) (Bhattacharya és mtsai. 2020). Az ép kloroplasztiszokat a 40-80%-os Percoll határfelületről gyűjtöttük össze, ezután BSA-t nem tartalmazó 30 ml izolációs pufferrel hígítottuk, majd lecentrifugáltuk (1000 g, 2 perc, 4°C). A felülúszót eltávolítottuk, és a mosott kloroplasztisz pelletet összegyűjtöttük, majd a mosási lépést megismételtük. A mintákat az izolációs pufferben jégen tartottuk a felhasználásig.

4.24. A kloroplasztisz ROS produkciójának detekciója *in vitro*

Az izolált kloroplasztiszok ROS produkcióját 10 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ felhasználásával tettük láthatóvá a BSA nélküli kloroplasztisz izolációs pufferben kontroll körülmények között, valamint 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm hozzáadásával, 60 percig inkubálva, 1 ml-es végtérfogatban (Poór és mtsai. 2013). Pozitív kontrollként H_2O_2 -kezelést alkalmaztunk (az adatokat nem mutatjuk be). A festék zöld fluoreszcenciájának intenzitását és a kloroplasztiszok vörös autofluoreszcenciáját Zeiss Axiowert 200M fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Inc., Jéna, Németország) 20X objektív segítségével detektáltuk. A mintákról digitális fényképeket készítettünk nagy

felbontású digitális kamerát felhasználva (AxioCam HR, HQ CCD kamera; Carl Zeiss Inc., Jéna, Németország). A fluoreszcencia intenzitását az AXIOVISION REL 4.5 szoftver segítségével mértük meg (Carl Zeiss Inc., München, Németország). Az egyes minták mikroszkópmezőit véletlenszerűen választottuk ki.

4.25. A kloroplasztisz H₂O₂ produkciójának detekciója *in vivo*

A kontroll és a 0,5 µg ml⁻¹ Tm-kezelt VT paradicsom növények leveleiből készített levélkorongokat Leica Stellaris 5 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Heidelberg, Németország) vizsgáltuk meg 30 perces 50 µM Amplex™ Red (AR; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) oldatban történt inkubáció után, TRIS/HCl puffer (pH 7,4) felhasználásával (Poór és mtsai. 2015). Az AR fluoreszcens jelének detektálásához 586 nm hullámhosszú fehér fényű lézergyjlesztést (2%-os intenzitás) és 595-640 nm emissziós tartományt, a klorofill képződéséhez pedig 501 nm-es lézergyjlesztést (2%-os intenzitás mellett) és 650-750 nm-es detektálási tartományt használtunk egy 20X HC PC PL APO CS2 objektív (N.A. 0,75) alkalmazása mellett. Végig azonos gerjesztési és detektálási beállításokat használtunk az AR-jelölt és a kontroll minták esetében. Az AR és a klorofill megjelenítéséhez a képeket zöldre, illetve vörösre színeztük.

4.26. Statisztikai analízis

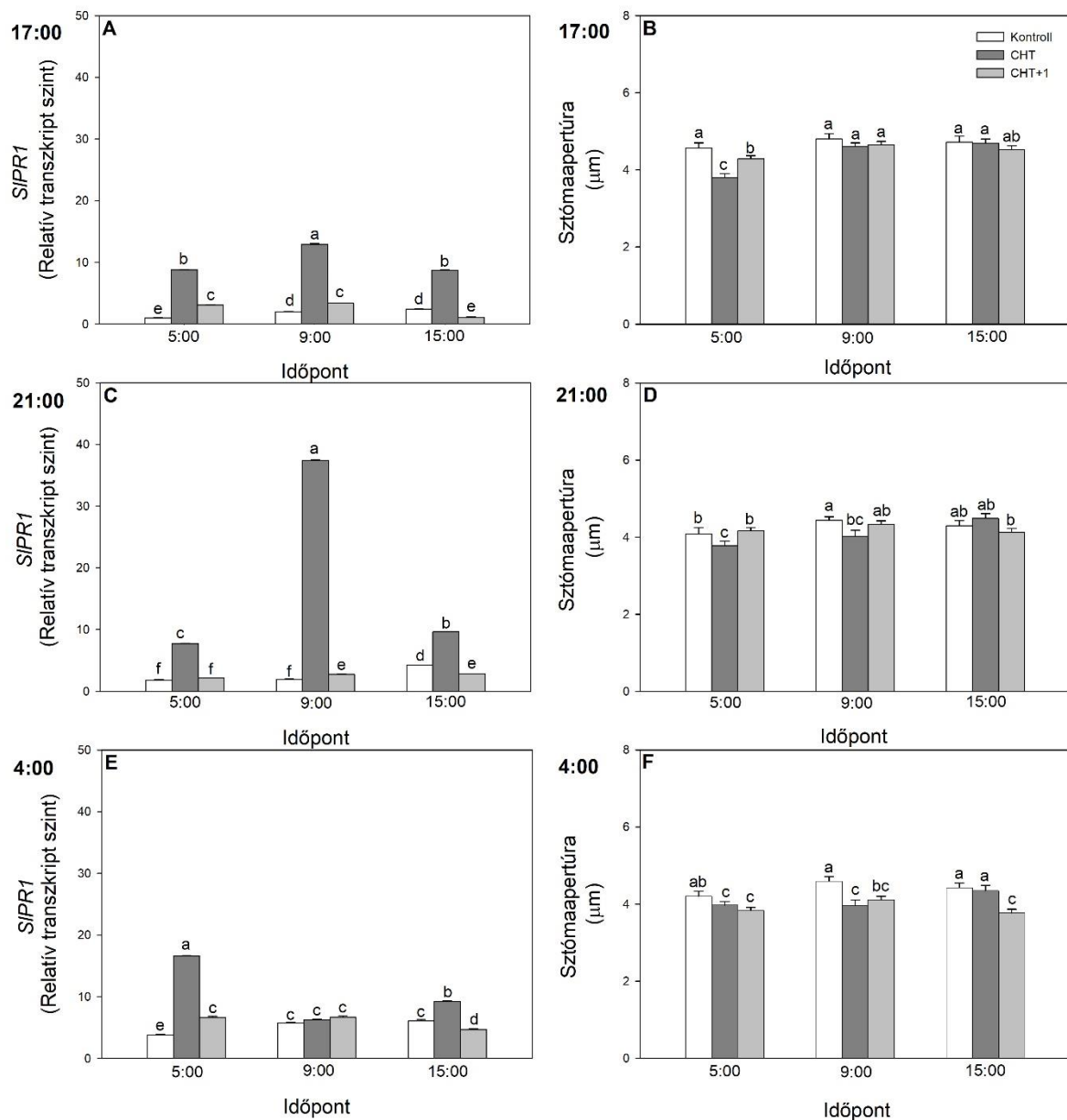
A mért adatokat Microsoft Excel (2016) és SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) programok segítségével dolgoztuk fel és értékeltük ki. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket az egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a statisztikailag szignifikáns, különböző betűvel jelölt átlagok P≤0,05 valószínűségi szinten térnek el egymástól. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) formátumban ábráztuk.

4. Eredmények

4.1. A különböző időpontokban alkalmazott gomba elicitor, kitozán kezelés hatása az SA jelátvitelére és a növények védekezésére

A különböző elicitorok, mint például a kitozán (CHT) jól alkalmazhatók a növényi kórokozók növényekre gyakorolt hatásainak és a növények védekezési válaszainak leírásához. Kísérleteink során különböző napszakokban, délután 17:00 órakor fényben, este 21:00 órakor sötétben és hajnal 4:00 órakor a napfelkelte előtt a sötétben alkalmaztuk a CHT-t a paradicsom növények felülről számított hatodik levélemeletét lekezelve. A kontroll kezelőoldat (ecetsav, mely a CHT oldószere) és a CHT helyi hatása mellett megvizsgáltuk a CHT szisztémikus hatását is (CHT+1), a CHT-val kezelt levélemelet feletti levelekben (a felülről számított ötödik levélemeletet felhasználva). A mintavételek szintén különböző napszakokban történtek, a kezeléseket követő hajnal 5:00 órakor sötétben, majd reggel 9:00 és délután 15:00 órakor a fényszakaszban. Elsőként az SA jelátvitel markergénjének, a paradicsom *PRI* gén expressziójának változását, valamint a CHT sztómamozgásra gyakorolt hatását követtük nyomon (6. ábra).

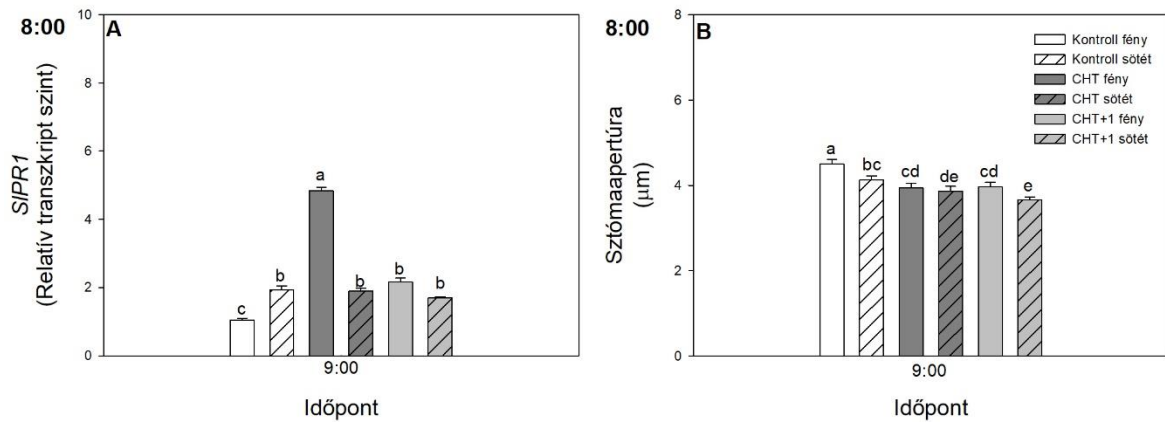
A délután 17:00 órakor alkalmazott CHT kezelés hatására másnap minden vizsgált időpontban nőtt az *SIPRI* relatív transzkript szintje lokálisan, valamint a szisztémikus levelekben 5:00 és 9:00 órakor (6. ábra A). Ezzel párhuzamosan a CHT kezelés hatására azonban csak a hajnali időpontban volt lokálisan sztómazárás kimutatható (6. ábra B). Ezzel szemben az este 21:00 órakor alkalmazott CHT kezelés másnap reggel 9:00 órakor okozta a legnagyobb *SIPRI* expressziót a 17:00 órás kezeléshez (6. ábra A) és a többi mintavételi időponthoz képest (6. ábra C). Szisztémikus hatás az *SIPRI* változása alapján, ugyanebben az időpontban, reggel 9:00 órakor volt kimutatható (6. ábra C). Ugyanakkor a 21:00 órakor történő CHT kezelés hatására reggel 5:00 és 9:00 órakor lokális sztómazáródás volt mérhető a paradicsom növények leveleiben (6. ábra D). A hajnal 4:00 órakor végzett CHT kezelés egy órával később szignifikáns *SIPRI* expresszió-növekedést okozott lokálisan és szisztémikusan is, mely növekedés csak a délutáni 15:00 órakor történő mintavétel során volt tapasztalható a CHT-kezelt levelek esetében, lokálisan (6. ábra E). Ezzel szemben, a hajnali 4:00 órakor alkalmazott CHT kezelés lokálisan és szisztémikusan is gátolta a sztómanyitódást hajnal 5:00 és 9:00 órakor, mely sztómazárás a szisztémikus levelekben délután 15:00 órakor is fennállt (6. ábra F).



6. ábra: A szalicilsav válaszgén *SIPR1* relatív transzkript szintjének (A, C, E) és a sztómaapertúra méretének változása (B, D, E) a különböző időpontokban (17:00, 21:00, 4:00) alkalmazott gomba elicitor kitozán (CHT) kezeléseket követően, vad típusú paradicsom növények leveleiben mérve különböző napszakokban (5:00, 9:00, 15:00) (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján (Kontroll: 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT: $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ kitozánt tartalmazó 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT+1: a CHT-kezelt levelek felett elhelyezkedő, kezeltlen (szisztémikus) levélemelet).

A CHT hatásának és az SA jelátvitel változásának napszakfüggő leírása mellett megvizsgáltuk a sötétség hatását a CHT kezelés- okozta növényi védekezési válaszokra is. A reggel 8:00 órakor alkalmazott CHT kezelés szignifikánsan fokozta az *SIPR1* expresszióját lokálisan és szisztémikusan egyaránt a fényben, míg az a sötétben elmaradt (7. ábra A). Emellett

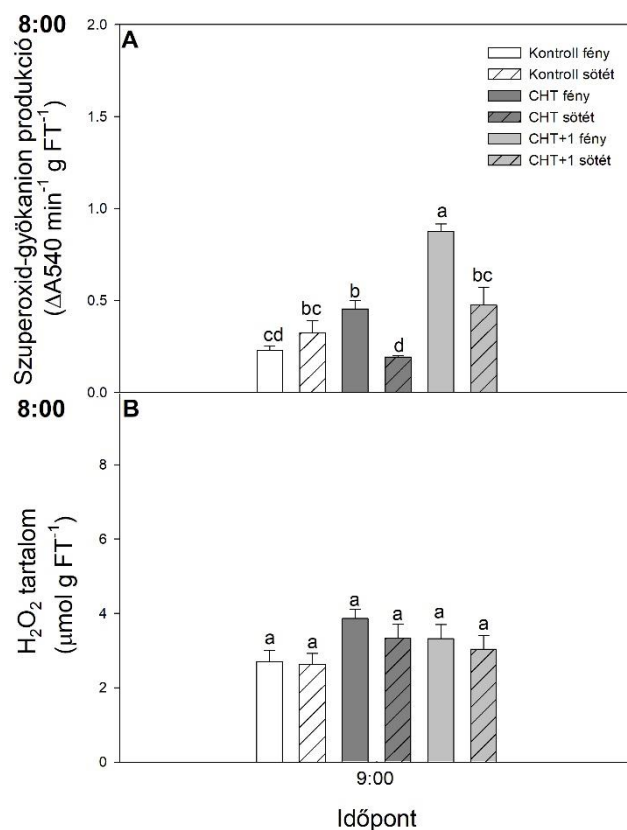
a CHT kezelés lokálisan és szisztémikusan is sztómazáródást indukált a fényben, melyet azonban a sötétség tovább fokozott a szisztémikus levelekben (7. ábra B).



7. ábra: A szalicilsav válaszgén *SIPRI* relatív transzkript szintjének (A) és a sztómaapertúra méretének változása (B) reggel 8 órakor alkalmazott gomba elicitor kitozán (CHT) kezelést követően, vad típusú paradicsom növények leveleiben mérve egy órával később fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján (Kontroll: 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT: 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kitozánt tartalmazó 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT+1: a CHT-kezelt levelek felett elhelyezkedő, kezeletlen (szisztémikus) levélemelet).

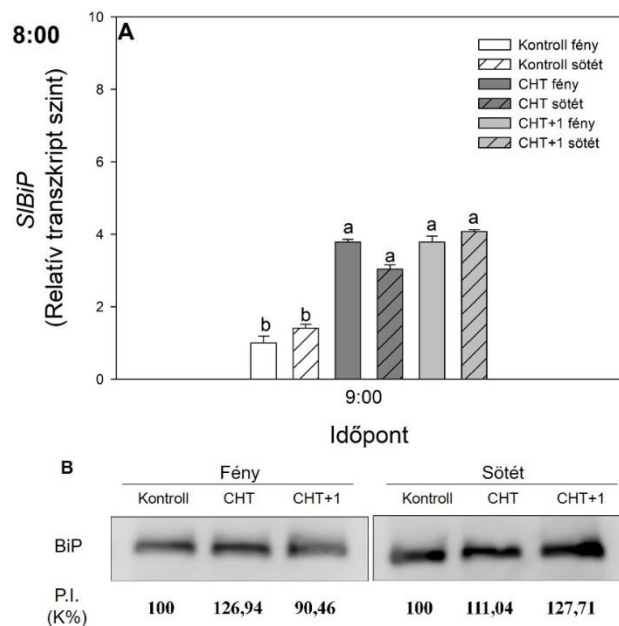
A CHT által indukált védelmi válaszok fényfüggésének további vizsgálatához megmértük a levelek ROS produkcióját a gomba elicitor kezelést követően fényben és sötétben. A fényben történő CHT kezelés szignifikánsan fokozta a szuperoxid-gyökönion produkciót lokálisan és még jelentősebben a szisztémikus (CHT+1) levelekben, egy órával a CHT kezeléseket követően (8. ábra A). Ez a hatás azonban a sötétben alkalmazott CHT kezeléseknél nem volt kimutatható (8. ábra A).

A szuperoxid-gyökönion produkcióval szemben a levelek H_2O_2 szintje bár lokálisan kismértékben nőtt, de nem volt szignifikáns ebben a vizsgált időpontban egyik levélemeletben mérve sem (8. ábra B).



8. ábra: A szuperoxid-gyökkanion produkció (A) és H₂O₂ tartalom (B) változása reggel 8 órakor alkalmazott gomba elicitor kitozán (CHT) kezelést követően, vad típusú paradicsom növények leveleiben mérve egy órával később fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján (Kontroll: 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT: 100 μg ml⁻¹ kitozánt tartalmazó 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT+1: a CHT-kezelt levelek felett elhelyezkedő, kezeltlen (szisztémikus) levélemelet).

A védekezésben szerepet játszó fehérjék (pl.: PR) gyors és nagy mennyiségű termelése ER stresszhez, valamint különböző chaperonok, mint például a BiP-ek aktiválásához és gyors akkumulációjához vezethet. A kísérleteink során nemcsak génexpressziós szinten, hanem Western blot analízissel is vizsgáltuk az SA és ROS produkcióhoz is köthető ER stressz marker BiP mennyiségének változását (9. ábra). A CHT kezelés hatására lokálisan és szisztémikusan is megemelkedett az *SIBiP* expressziója a paradicsom növények leveleiben, mely nem függött a fény jelenlététől vagy annak hiányától (9. ábra A). Fehérje szinten a CHT kezelés kisebb mértékben fokozta a BiP mennyiségét, melyet a sötétség tovább emelt (9. ábra B).

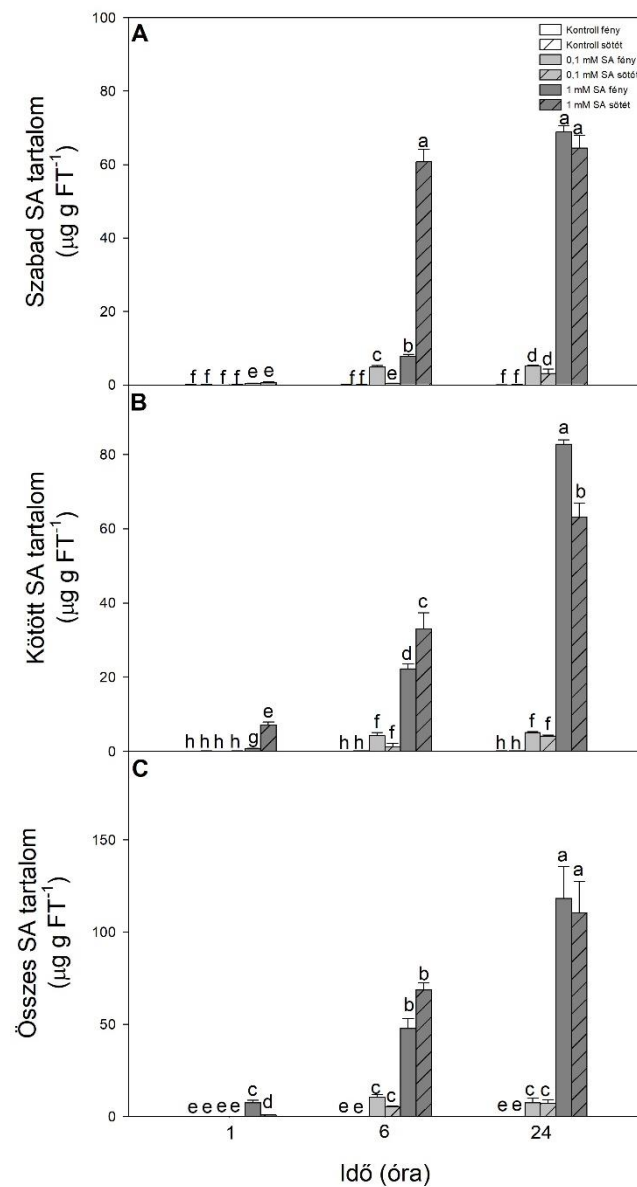


9. ábra: Az *SlBiP* relatív transzkript szintjének (A) és a BiP fehérje mennyiségének (B) változása reggel 8 órakor alkalmazott gomba elicitor kitozán (CHT) kezelést követően, vad típusú paradicsom növények leveleiben mérve egy órával később fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján (Kontroll: 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT: 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kitozánt tartalmazó 1 mM nátrium-acetát puffer; CHT+1: a CHT-kezelt levelek felett elhelyezkedő, kezeletlen (szisztemikus) levélemelet).

4.2. Az SA kezelések fényfüggő hatása a ROS metabolizmusra

Vizsgálataink első lépéseként megnéztük, hogy az exogén módon alkalmazott SA kezelések (0,1 és 1 mM) hogyan befolyásolták az endogén szabad és kötött SA tartalmakat a paradicsom növények leveleiben az idő függvényében, a nappali fény jelenlétében a normál fotoperióduson és annak hiányában, sötétben (10. ábra). Méréseink alapján a szabad SA tartalom $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g FT}^{-1}$ volt a megvilágított kontroll levelekben, ami a sötétben nem változott meg szignifikánsan az első 24 órában (10. ábra A). Hasonlóan nem változott szignifikánsan a kötött és teljes SA tartalom a kontroll levelekben (10. ábra B, C). Ugyanakkor a 0,1 mM SA kezelés hatására a szabad és a teljes SA tartalom is közel százszorosára nőtt a paradicsom növények leveleiben (10. ábra A, C). A sötétben az SA szintek később emelkedtek, 6 óra elteltével a fényben történt kezelések hatására szignifikánsabban nagyobb értékeket mutattak a sötétben végzett kezelésekhöz képest, de az SA-tartalom már nem változott 24 óra elteltével a kétféle környezeti körülmény között (10. ábra A-C). A 0,1 mM SA kezeléssel ellentétben, az 1 mM SA-val végzett kísérletek több mint ezerszeresére növelték az SA szinteket a kontrollhoz képest (10. ábra A-

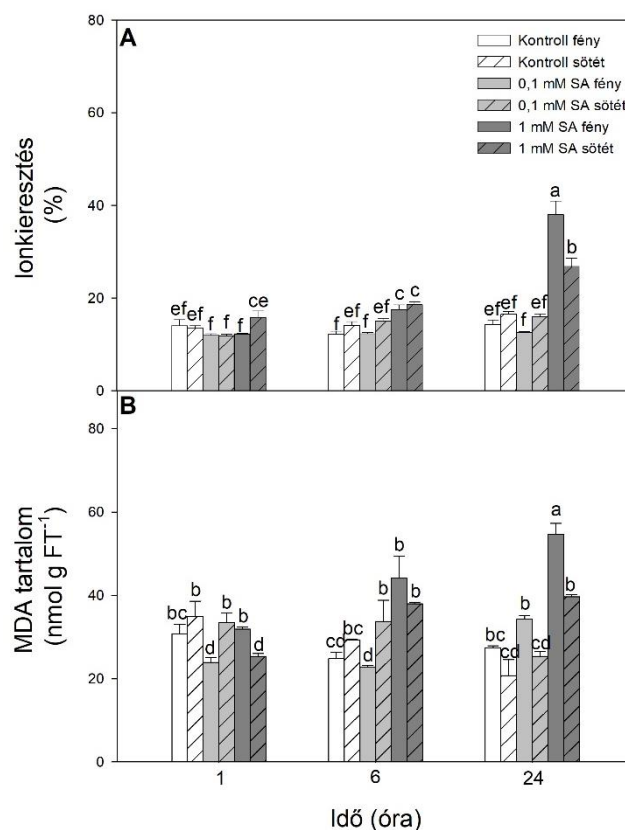
C). Érdekes módon a sötétben alkalmazott 1 mM SA hatására 6 óra elteltével magasabb endogén SA koncentrációk voltak kimutathatók (10. ábra A-C), ami a 24. órára kiegyenlítődt, így a kétféle koncentrációjú SA kezelés hatásában a 24. órára már nem volt szignifikáns különbség tapasztalható az endogén szabad és összes SA mennyisége között a normál fotoperióduson és a sötétben történt SA kezeléseket után.



10. ábra: Az endogén szabad (A), kötött (B) és összes (C) szalicilsav (SA) tartalom változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Az SA kezelések növényekre gyakorolt letális hatását az ionkieresztés és a lipidperoxidáció változásai alapján detektáltuk (11. ábra). A levelek ionkieresztésének növekedése a sejtmembránok integritásának károsodására utal, melyet az 1 mM SA kezelések már a 6. órától kezdődően jelentősen fokoztak (11. ábra A). Az 1 mM SA kezelés szignifikánsan nagyobb ionkieresztést, azaz nagyobb mértékű sejtpusztulást okozott a 24. órában a kontrollhoz képest, mely jelentősen magasabb volt a fényen történő SA kezeléseket követően, mint a sötétben (11. ábra A). Ezzel szemben a 0,1 mM SA kezelések nem okoztak szignifikáns változást a levelek ionkieresztésében az első 24 órában a kontrollhoz képest (11. ábra B).

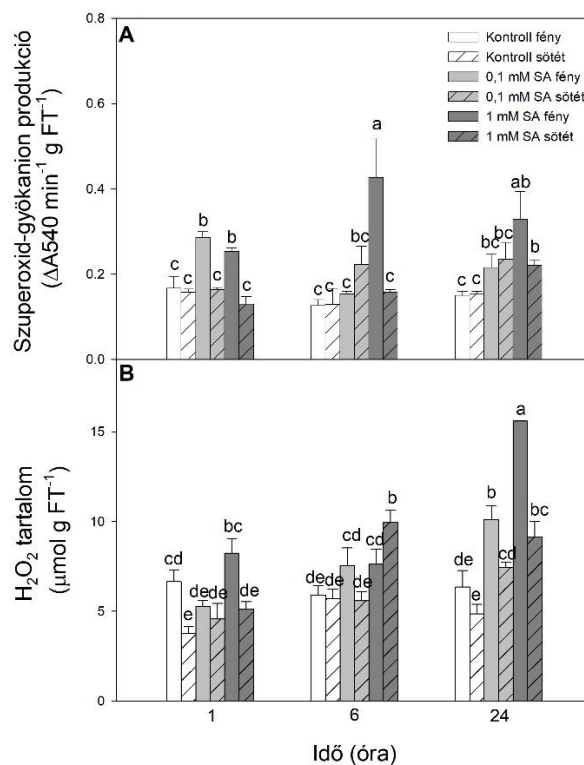
A paradicsom növények leveleiben mért lipidperoxidáció az MDA tartalom változása alapján az ionkieresztéshez hasonlóan változott, azaz az 1 mM SA kezelések hatására már a kezeléseket követő 6. órában nőtt, a maximumát pedig a 24. órában, a fényben történt SA kezeléseket követően mértük (11. ábra B). Ezzel szemben a 0,1 mM SA kezelés hatására nem volt szignifikáns változás kimutatható az MDA akkumulációban a 24 óra elteltével egyik környezeti tényező mellett sem (11. ábra B).



11. ábra: Az ionkieresztés (A) és az MDA tartalom (B) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

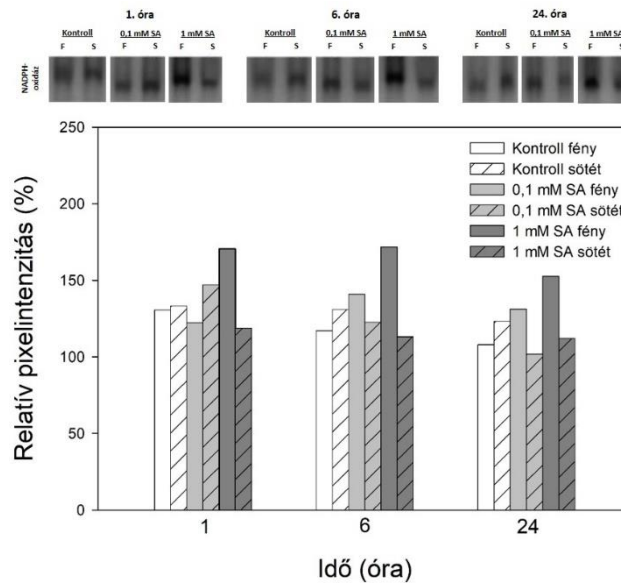
Az életképességet és a lipidperoxidációt meghatározó ROS közül a szuperoxid-gyökönion produkciót és a H_2O_2 tartalmat vizsgáltuk az SA kezeléseket követően a kétféle környezeti körülmény között a paradicsom növények levelében az első 24 órában (12. ábra). A szuperoxid-gyökönion produkció már a kezelést követő 1. órában szignifikánsan nőtt mindkét koncentrációjú SA kezelés hatására a fényben (12. ábra A), mely a 6. órában mutatott maximumot az 1 mM SA kezelés hatására a fényben (12. ábra A). A 24. órára csak az 1 mM SA kezelések indukáltak szignifikáns szuperoxid-gyökönion produkciót a paradicsom növények levelében, mely nem különbözött szignifikánsan a fényen vagy sötétben történt SA kezelések esetében (12. ábra A).

A H_2O_2 tartalom a 6. órában az 1 mM SA kezelés hatására nőtt meg szignifikánsan a sötétben (12. ábra B). A 24. órában az 1 mM SA növelte a legnagyobb mértékben a levelek H_2O_2 tartalmát, melyet a 0,1 mM SA kezelés is szignifikánsan fokozott a kontrollhoz képest a fényen (12. ábra B). Megállapítható, hogy fényben, a normál fotoperiódus mellett alkalmazott SA kezelések szignifikánsabban magasabb H_2O_2 tartalmat eredményeztek a növények leveleiben a sötétben végzett kezelésekhöz képest (12. ábra B).



12. ábra: A szuperoxid-gyökönion produkció (A) és H_2O_2 tartalom (B) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A ROS metabolizmusában szerepet játszó főbb enzimek és az őket kódoló gének közül elsőként a NADPH-oxidáz aktivitását vizsgáltuk meg az SA kezeléseket követően az idő függvényében. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az 1 mM SA kezelés szignifikánsan fokozta a NADPH-oxidáz aktivitását már a kezeléseket követő első órában a fényen, mely a kontrollhoz képest magasabb volt a 6. és 24. órában is (13. ábra). Hasonlóan, a 0,1 mM SA kezelés is fokozta a NADPH-oxidáz aktivitását a kontrollhoz képest a 6. és 24. órában a fényben történt kezelések hatására (13. ábra).



13. ábra: A NADPH-oxidáz aktivitásának változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve. Az itt látható adatok egy reprezentatív kísérlet eredményei, a vizsgálatokat három alkalommal ismételtük meg.

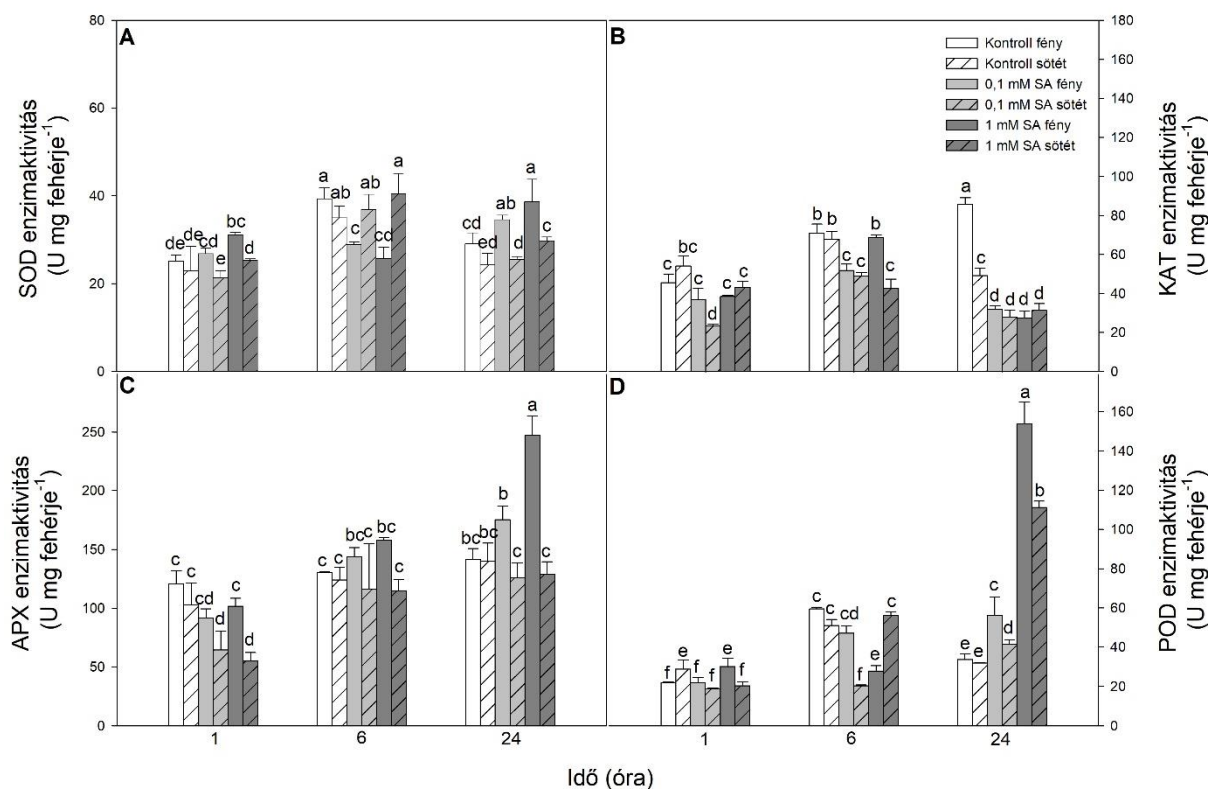
A ROS metabolizmusában szerepet játszó főbb enzimatis antioxidánsok közül elsőként a SOD aktivitását vizsgáltuk meg a különböző koncentrációjú SA kezeléseket követően fényben és sötétben, mely enzim segítségével a szuperoxid-gyökion hidrogén-peroxiddá alakul (14. ábra A). A SOD aktivitását az 1 mM SA kezelés már az első órában fokozta a fényben, mely a 24. órában is szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest a normál fotoperióduson mérve (14. ábra A). Érdekes módon az enzim aktivitása mindkét alkalmazott SA kezelés hatására csökkent a kezelés 6. órájában a fényben, azonban a 24. órára a 0,1 mM SA kezelés is fokozta a kontrollhoz képest a fényben (14. ábra A).

A SOD aktivitására gyakorolt SA hatással szemben a H_2O_2 eliminálásában szerepet játszó KAT enzim aktivitása mindkét SA kezelés hatására csökkent a 24. órában a kontrollhoz képest (14. ábra B). Az enzim aktivitása a 0,1 mM SA kezelés esetében már a 6. órában is

szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest a fény jelenlététől vagy hiányától függetlenül (14. ábra B).

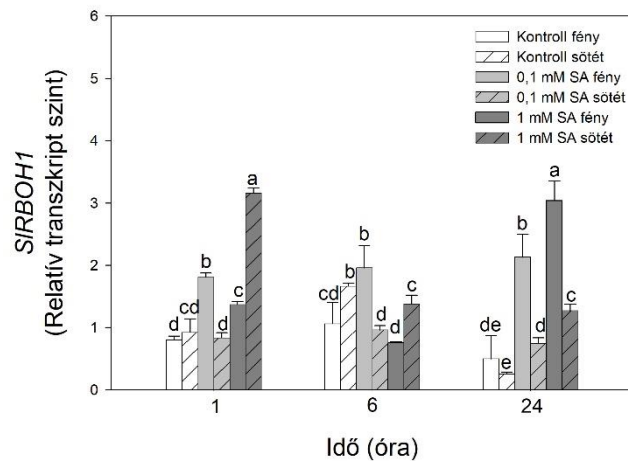
A KAT enzimhez képest a másik H₂O₂-ot lebontó enzim, az APX aktivitása az SA kezeléseket követő első órában csökkent a sötétben, míg egyedül az 1 mM SA kezelés hatására nőtt szignifikánsan a 24. órában a fényben, mely növekedés a sötétben elmaradt (14. ábra C).

A H₂O₂ lebontásában ugyancsak kitüntetett szereppel bíró POD aktivitása az első órában kismértékben fokozódott az 1 mM SA kezelés hatására a fényben, viszont a legjelentősebb növekedés az 1 mM SA kezelés 24. órájában volt mérhető a fényen történt kezelést követően (14. ábra D). Ugyanakkor a sötétben alkalmazott 1 mM SA kezelés is szignifikánsan fokozta a POD aktivitását a 24. órában a kontrollhoz képest (14. ábra D). A 0,1 mM SA kezelést követően szintén szignifikáns POD enzimaktivitás fokozódás volt tapasztalható 24 óra elteltével a paradicsom növények leveleiben, mely a fényben jelentősebb volt a sötétben történt kezelésekhöz képest, viszont kisebb mértékű az 1 mM SA kezeléssel összehasonlítva (14. ábra D).



14. ábra: A szuperoxid-dizmutáz (SOD; A), kataláz (KAT; B), aszkorbát-peroxidáz (APX; C) és a gvajakol-peroxidáz (POD; D) aktivitás változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A ROS metabolizmusában szerepet játszó enzimeket kódoló gének közül elsőként a NADPH-oxidázt kódoló *SIRBOHI* génre gyakorolt idő-, fény- és koncentrációfüggő SA-hatást vizsgáltuk. Az *SIRBOHI* gén expressziója mindkét koncentrációjú SA kezelés hatására fokozódott a fényben, már az SA kezeléseket követő első órában (15. ábra). Emellett mindkét koncentrációban alkalmazott SA kezelés hatására szignifikánsan nőtt az *SIRBOHI* gén relatív transzkript szintje a 24. órában a kontrollhoz képest, különösen a fényen (15. ábra).



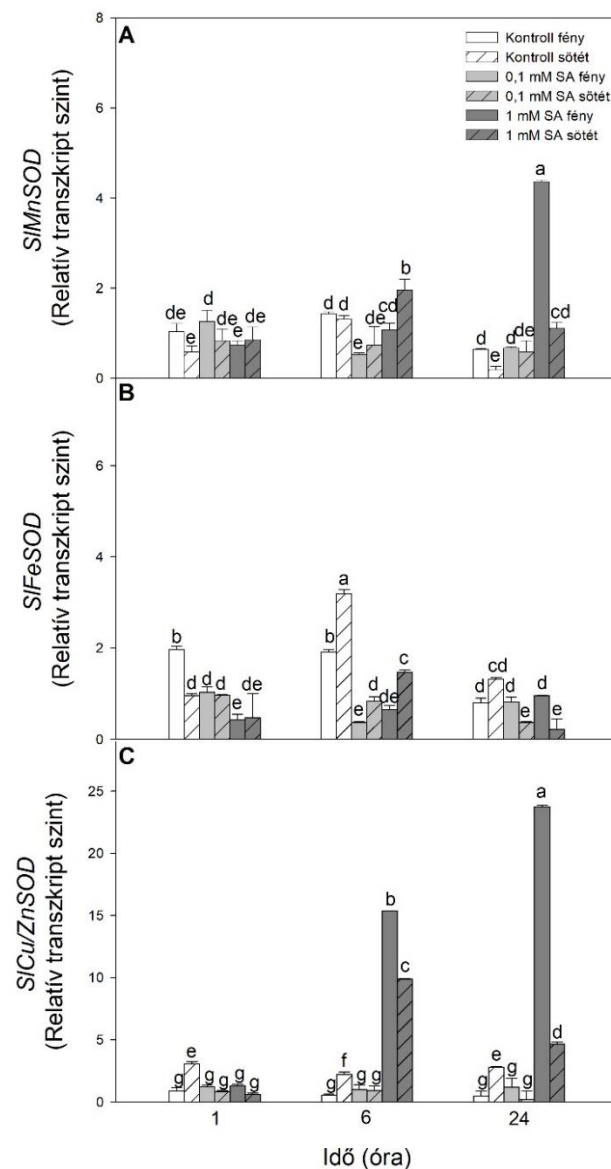
15. ábra: A NADPH-oxidáz enzimet kódoló paradicsom *SIRBOHI* gén relatív transzkript szintjének változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A SOD enzim izoformái számos sejtorganelumban előfordulnak, befolyásolva ezek ROS metabolizmusát. Méréseink során a mitokondriális *SIMnSOD*, valamint a kloroplasztikus *SIFeSOD* és *SICu/ZnSOD* paradicsom gének expresszióját is megvizsgáltuk a különböző koncentrációjú SA kezeléseket követően az idő függvényében, fényben és sötétben egyaránt (16. ábra). Az *SIMnSOD* expressziója a kezelést követő 6. órában a 0,1 mM SA kezelés hatására a fényen csökkent, míg az 1 mM SA kezelést követően a sötétben nőtt (16. ábra A). Ugyanakkor a legjelentősebb változás 24 óra elteltével volt detektálható az 1 mM SA kezelés esetében, mely szignifikánsan fokozta az *SIMnSOD* relatív transzkript szintjét a kontrollhoz képest a fényben (16. ábra A).

Az *SIFeSOD* expressziója az 1 mM SA kezelést követően csökkent a fényben, majd a 24. órára nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest (16. ábra B). Szintén csökkent az *SIFeSOD* gén relatív transzkript szintje a 6. órában a 0,1 mM SA kezelés hatására, ugyanakkor

ebben az időpontban a sötétség a kontrollban fokozta azt a fényben mért expresszióhoz képest (16. ábra B).

A paradicsom *SOD* gének közül az SA kezelések hatására a legjelentősebben az *SICu/ZnSOD* expressziója változott. A gén alap expresszióját a sötétség fokozta a kontroll növények leveleiben minden időpontban (16. ábra C), azonban a legjelentősebben az 1 mM SA kezelés növelte azt a 6. és 24. órában, mely a fényen történt kezeléseket követően mutatkozott magasabbnak (16. ábra C). Ezzel szemben a 0,1 mM SA kezelés hatására nem detektáltunk szignifikáns változást a gén kifejeződésében (16. ábra C).

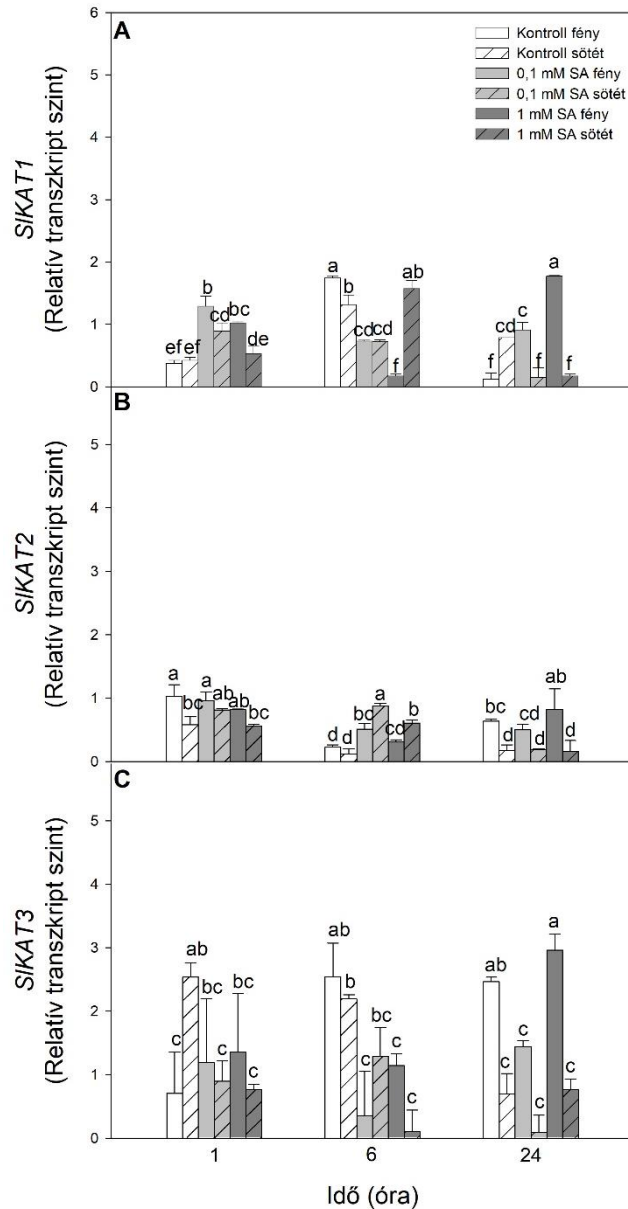


16. ábra: A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimet kódoló paradicsom *SIMnSOD* (A), *SIFeSOD* (B) és *SICu/ZnSOD* (C) gének relatív transzkript szintjének változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A paradicsom genomjában kódolt három *KAT* gén közül az *SIKAT1* expressziója az SA kezelések első órájában kismértékben nőtt a kontrollhoz képest, mely a 6. órában a cirkadián ritmusnak megfelelően alpból magasabb kontroll szinthez képest gátlódott az SA kezelések hatására a fényen (17. ábra A). Az *SIKAT1* gén relatív transzkript szintje a 24. órában az alkalmazott SA koncentrációk függvényében nőtt a kontrollhoz képest a fényben (17. ábra A).

Az *SIKAT2* expressziója jelentősen nem változott az SA kezelések hatására, csupán a 6. órában a sötétben történt SA kezelések hatására fokozódott kismértékben a kontrollhoz képest, míg a 24. órában csökkent (17. ábra B).

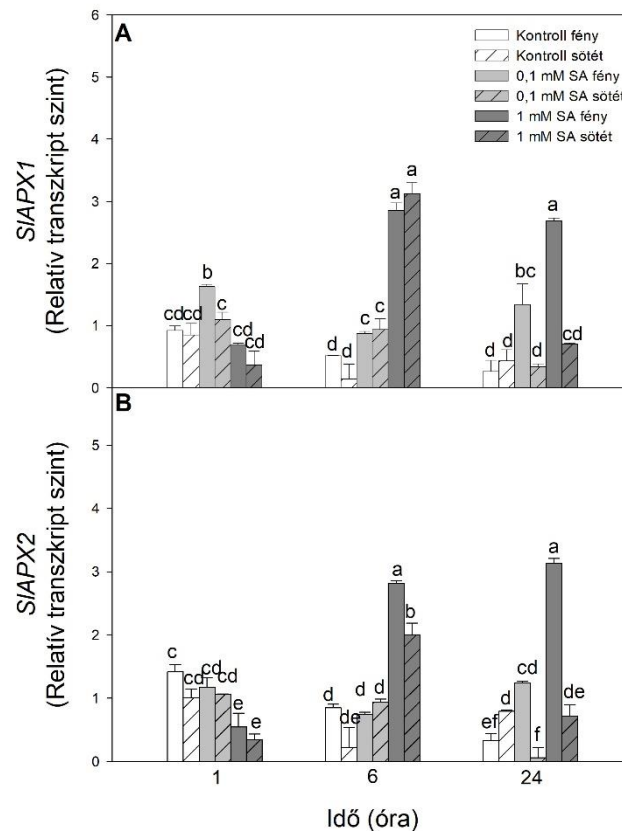
Az *SIKAT3* relatív transzkript szintje mindkét alkalmazott SA kezelés hatására a 6. órában lecsökkent, mely a 0,1 mM SA kezelés hatására a 24. órában is megfigyelhető volt a kontrollhoz képest (17. ábra C). Az *SIKAT3* gén expressziója az SA hatására a sötétben szignifikánsan alacsonyabb volt a 6. és 24. órában a fényben mért kontrollhoz képest (17. ábra C).



17. ábra: A kataláz (KAT) enzimet kódoló paradicsom *SIKAT1* (A), *SIKAT2* (B) és *SIKAT3* (C) gének relatív transzkript szintjének változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A citoszolikus lokalizáltságú két APX izoenzimet kódoló paradicsom gén expresszióját megvizsgálva az *SIAPX1* expressziója szignifikánsan nőtt mindkét koncentrációjú SA kezelés esetében a 6. és 24. órában a fényben (18. ábra A). Az 1 mM SA kezelés azonban jóval nagyobb mértékben fokozta az *SIAPX1* relatív transzkript szintjét a 0,1 mM SA kezeléshez képest a fényben (18. ábra A). Az *SIAPX1* kifejeződése a 24. órában erőteljes fényfüggést mutatott, az SA hatására a sötétben nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest (18. ábra A).

Az *SIAPX1* génhez hasonlóan változott az *SIAPX2* gén kifejeződése az 1 mM SA kezelések hatására az első órában megfigyelhető csökkenést követően, azonban az *SIAPX2* relatív transzkript szintjében bekövetkező változás fényfüggése már a 6. órában megfigyelhető volt, ahol a sötétben végzett 1 mM SA kezelés kisebb mértékben indukálta a gén expresszióját a fényben történt kezelésekhez képest, hasonlóan a 24. órában mértékhez (18. ábra B). A 0,1 mM SA kezelések ugyanakkor csak a 24. órában fokozták az *SIAPX2* expresszióját a fényben, mely változás a sötétben történt kezelések esetében elmaradt (18. ábra B).

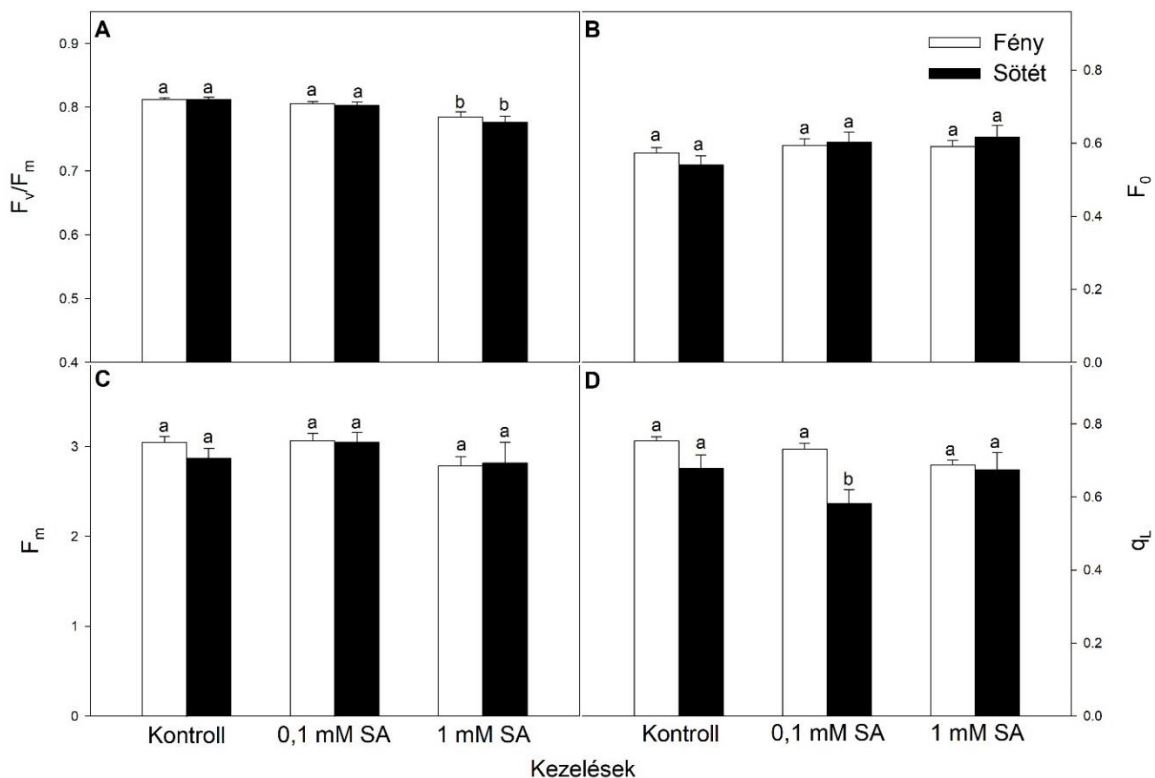


18. ábra: Az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimet kódoló paradicsom *SIAPX1* (A) és *SIAPX2* (B) gének relatív transzkript szintjének változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 1, 6 és 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

4.3. Az SA kezelések fényfüggő hatása a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra

Vizsgálataink második lépéseként megnéztük a különböző koncentrációban alkalmazott SA kezelések fényfüggő hatását a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra, melyek

jelentősen befolyásolják a ROS metabolizmust. A kezeléseket követő 24 óra elteltével elsőként a PSII maximális kvantumhatásfokát (F_v/F_m) analizáltuk, mely nem változott szignifikánsan a 0,1 mM SA-val történt kezelés hatására, de szignifikánsan csökkent az 1 mM SA kezelést követően mind a fényen, mind pedig a sötétben (19. ábra A). Ugyanakkor a sötétadaptált levelek minimális (F_0) és maximális (F_m) fluoreszcenciájának paraméterei nem változtak szignifikánsan az SA kezelése hatására egyik környezeti körülmény között sem (19. ábra B-C). Ezzel szemben a 24 órás fényhiány enyhe csökkenést okozott a PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciójának (q_L) esetében, ami szignifikáns volt a 0,1 mM SA kezelés alatt. Érdekes módon ez a q_L csökkenés nem volt megfigyelhető a magasabb, 1 mM SA koncentráció esetében (19. ábra D).



19. ábra: A PSII maximális kvantumhatásfokának (F_v/F_m ; A), a sötétadaptált levelek minimális fluoreszcenciájának (F_0 ; B), a sötétadaptált levelek maximális fluoreszcenciájának (F_m ; C), és a PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciójának (q_L ; D) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, $n=4$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A többi, fotoszintetikus aktivitást leíró paramétert vizsgálva a PSII effektív kvantumhatásfoka [$Y(II)$] valamivel alacsonyabb volt a sötétben tartott kontroll levelekben, mint a világosban tartott kontrolloknál, a köztük lévő különbség azonban nem volt szignifikáns

(20. ábra A). A $Y(II)$ azonban csökkenő tendenciát mutatott az alkalmazott SA koncentrációk növekedésével mind fényben, mind pedig a sötétben, ami már az 0,1 mM SA kezelés esetében is szignifikáns volt a sötétben (20. ábra A). Ez azonban még erőteljesebb volt az 1 mM SA kezelés hatására, ahol a $Y(II)$ csökkenése szignifikáns volt a kontrollhoz és a fényben 0,1 mM SA-val kezelt növényekhez képest is (20. ábra A).

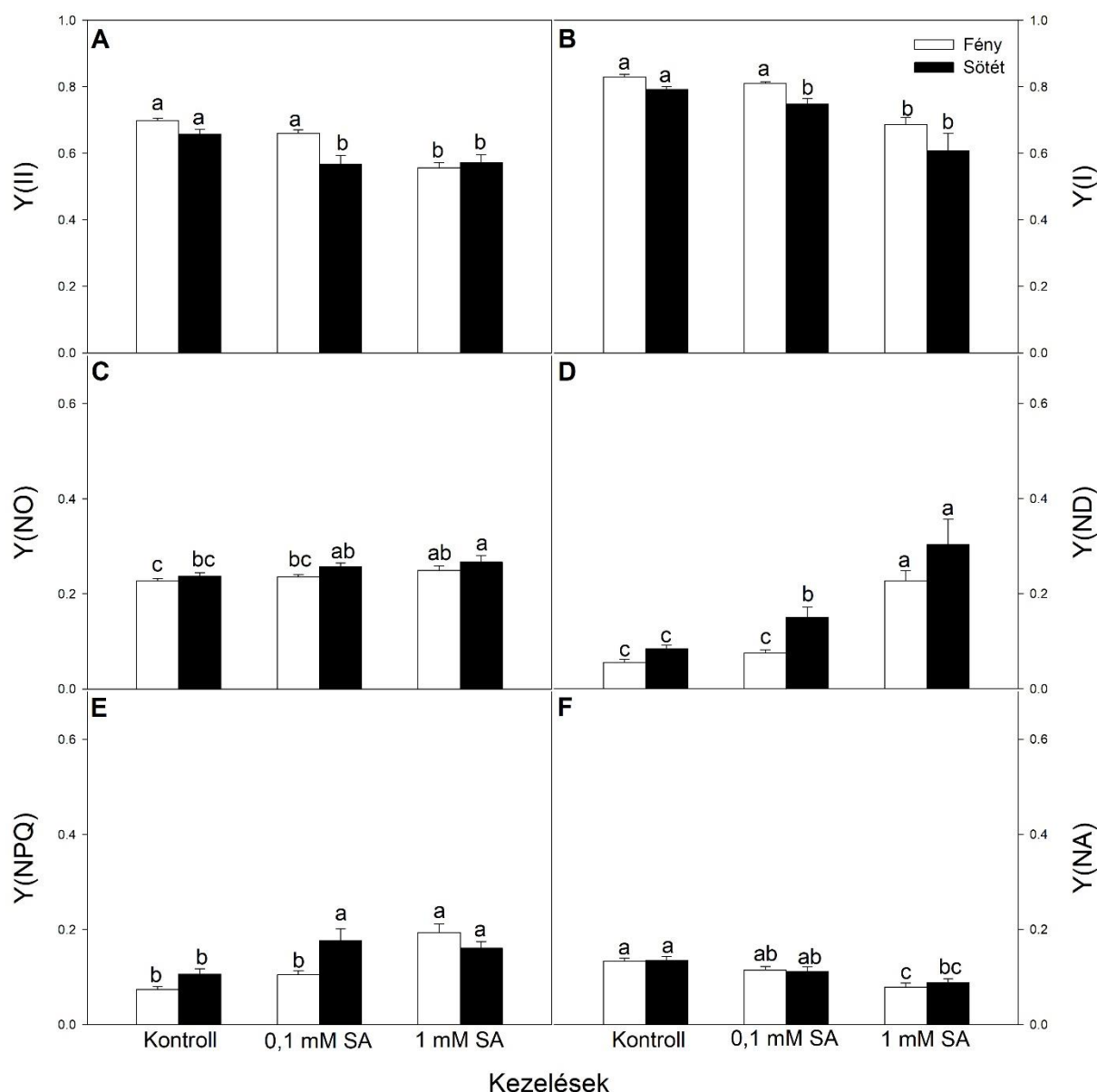
A mérések során a PSI kvantumhatásfoka [$Y(I)$] hasonló tendenciákat mutatott mint a $Y(II)$, azaz a 0,1 mM SA kezelés hatására csak a sötétben, míg az 1 mM SA kezelést követően mindkét környezeti körülmény között szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest (20. ábra B).

A szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfoka [$Y(NO)$] az összes SA kezelés esetében enyhe növekedést mutatott a fényen tartott kontrollhoz képest, de csak az 1 mM SA kezelés esetében volt szignifikánsan magasabb a kontrollnál (20. ábra C), míg a sötétben történt SA kezelések esetében már a 0,1 mM SA kezelést követően is szignifikánsan nőtt az értéke (20. ábra C).

A $Y(NO)$ mellett a szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfoka [$Y(NPQ)$] szintén növekvő tendenciát mutatott az SA 24 órás alkalmazását követően a normál fotoperióduson tartott kontroll növények leveleihez képest (20. ábra E). A 0,1 mM SA kezelés szintén szignifikáns $Y(NPQ)$ növekedést okozott a sötétben a fényben tartott kontrollhoz képest (20. ábra E). Habár az 1 mM SA kezelés hatására a $Y(NPQ)$ növekedése mindkét környezeti feltétel mellett szignifikáns volt, nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető a fényben vagy sötétben 1 mM SA-val kezelt levelek között (20. ábra E).

A PSI donor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [$Y(ND)$] változása ugyanazt a trendet követte, mint a $Y(NPQ)$: az 1 mM SA kezelés hatására mindkét környezeti feltétel mellett szignifikánsan nőtt, míg a 0,1 mM SA alkalmazása csak a sötétben emelte a $Y(ND)$ értéket (20. ábra D).

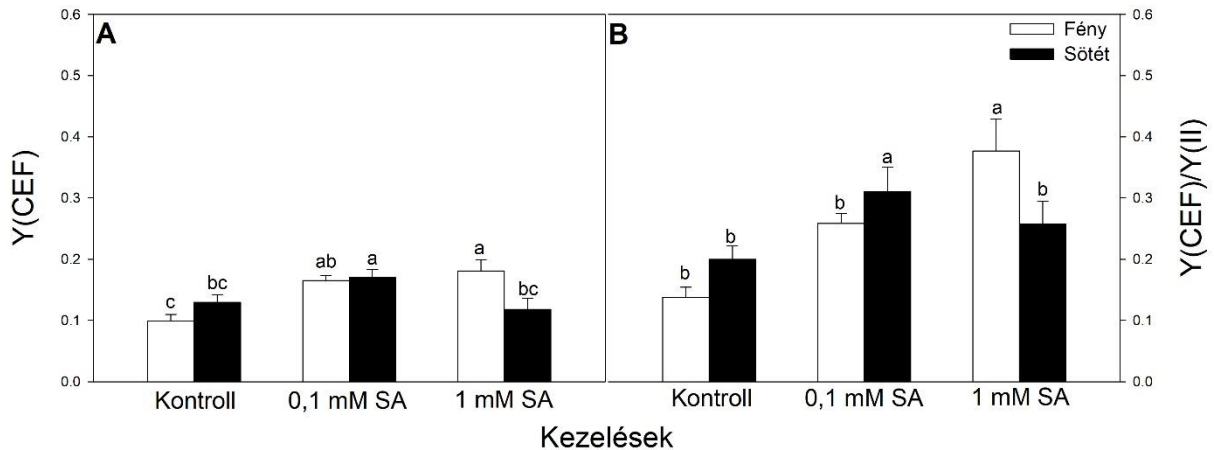
A $Y(ND)$ értékekkel szemben a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfoka [$Y(NA)$] enyhén csökkent a 0,1 mM SA expozíció hatására, mely szignifikáns volt a magasabb, 1 mM SA koncentrációnál mind a fényben, a normál fotoperióduson, mind pedig a sötétben alkalmazott kezelések esetében (15. ábra F). Az 1 mM SA kezelés okozta $Y(NA)$ csökkenés azonban jelentősebb volt a normál fényviszonyok mellett a kontrollhoz képest a kezelt levelekben, mint a sötétben (20. ábra F).



20. ábra: A PSII effektív kvantumhatásfokának [Y(II); A], a PSI kvantumhatásfokának [Y(I); B], a szabályozatlan energia disszipáció kvantumhatásfokának [Y(NO); C], a PSI donor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(ND); D], a szabályozott energia disszipáció kvantumhatásfokának [Y(NPQ); E], és a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(NA); F] változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

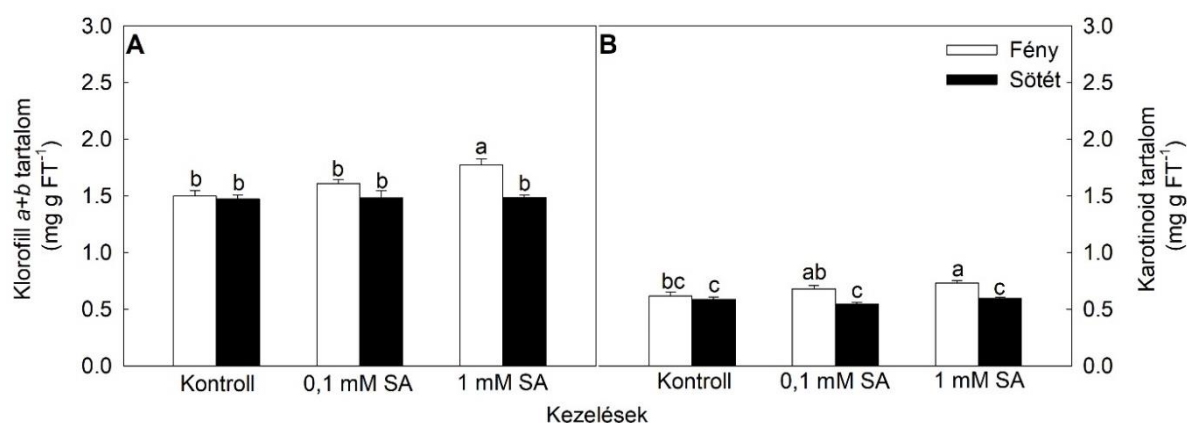
A fényen tartott kontroll növényekhez képest a sötétben tartott kontroll növények leveleiben a PSI körüli ciklikus elektronáramlás kvantumhatásfoka [Y(CEF)] és a $Y(CEF)/Y(II)$ is enyhén nőtt (21. ábra). A Y(CEF) szignifikánsan megemelkedett a 0,1 mM SA

kezelés hatására mind a világosban, mind a sötétben tartott kontrollokhoz képest (21. ábra A), míg a $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ a sötétben történt 0,1 mM SA kezelés hatására nőtt szignifikánsan (21. ábra B). Az 1 mM SA kezelés azonban csak a normál fényviszonyok mellett indukálta szignifikánsan a $Y(\text{CEF})$ és $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ értékeket (21. ábra). Érdekes módon ez azt jelenti, hogy a $Y(\text{CEF})$ sötét inkubációval történő fokozása a magasabb SA koncentráció alkalmazása mellett megszűnt (21. ábra A). Hasonló tendenciák figyelhetők meg a $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ esetében is (21. ábra B).



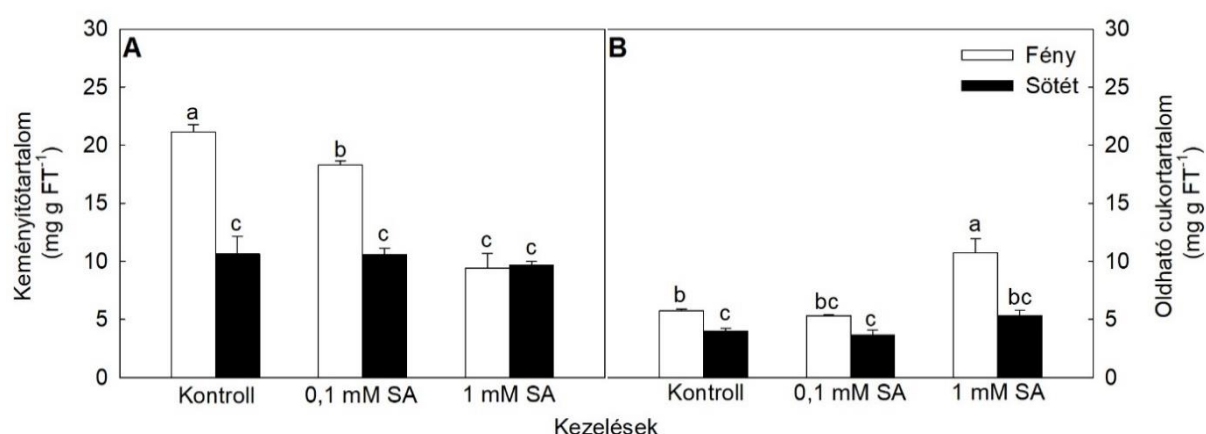
21. ábra: A PSI körüli ciklikus elektronáramlás (CEF) kvantumhatásfokának (Y) mértéke [$Y(\text{CEF})$; A] és a $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ (B) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=4). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A fotoszintetikus pigmentek mennyiségében azonban az 1 mM SA kezelések nem okoztak szignifikáns csökkenést, ellenben növelték a levelek klorofill $a+b$ (22. ábra A) és karotinoid (22. ábra B) tartalmát a paradicsom növények leveleiben 24 óra elteltével normál fotoperiódus mellett a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a fotoszintetikus pigmentek nem változtak szignifikánsan a sötétben alkalmazott SA expozíciók hatására (22. ábra).



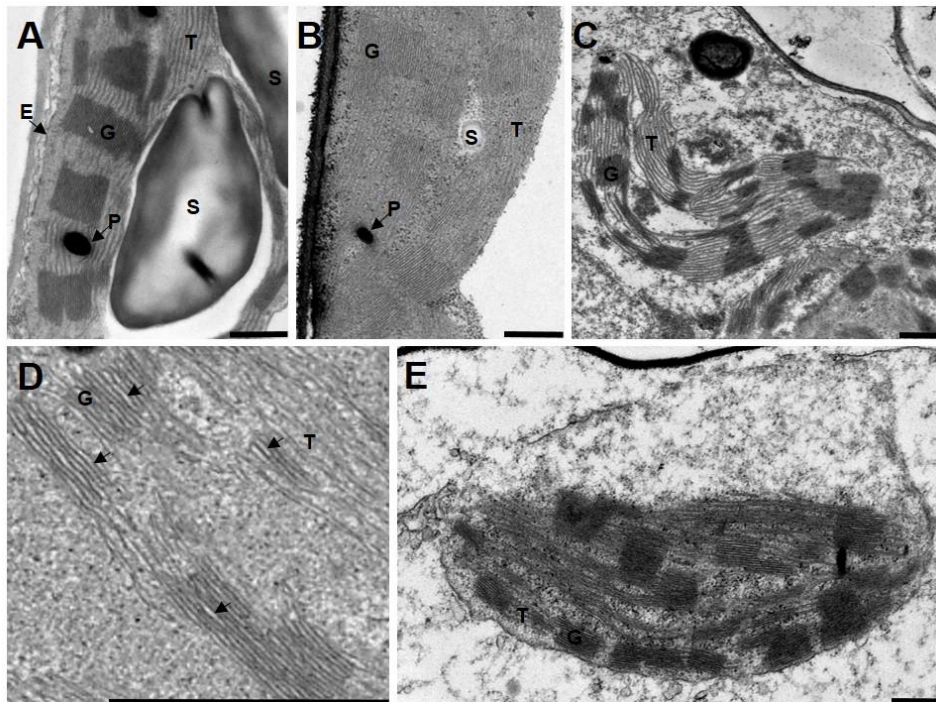
22. ábra: A klorofill *a+b* (A) és a karotinoidok (B) tartalmának változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Megvizsgáltuk az SA kezelések hatását a fotoszintézis kulcstermékeire, a keményítő- és oldható cukortartalom változására 24 óra elteltével mindkét környezeti körülmény mellett a paradicsom növények leveleiben (23. ábra). A keményítő és az oldható cukrok felhalmozódása jelentősen csökkent a levelekben a 24 órás sötét inkubáció hatására (23. ábra). Az SA kezelések az alkalmazott koncentrációk függvényében fokozatos csökkenést okoztak a levelek keményítőtartalmában (23. ábra A), és ezzel párhuzamosan az 1 mM SA kezelés növelte az oldható cukortartalmat a normál fotoperióduson tartott levelekben (23. ábra B). Nem volt azonban szignifikáns különbség kimutatható a levelek keményítő- és oldható cukortartalmában a sötétben végzett SA kezelések esetében (23. ábra).



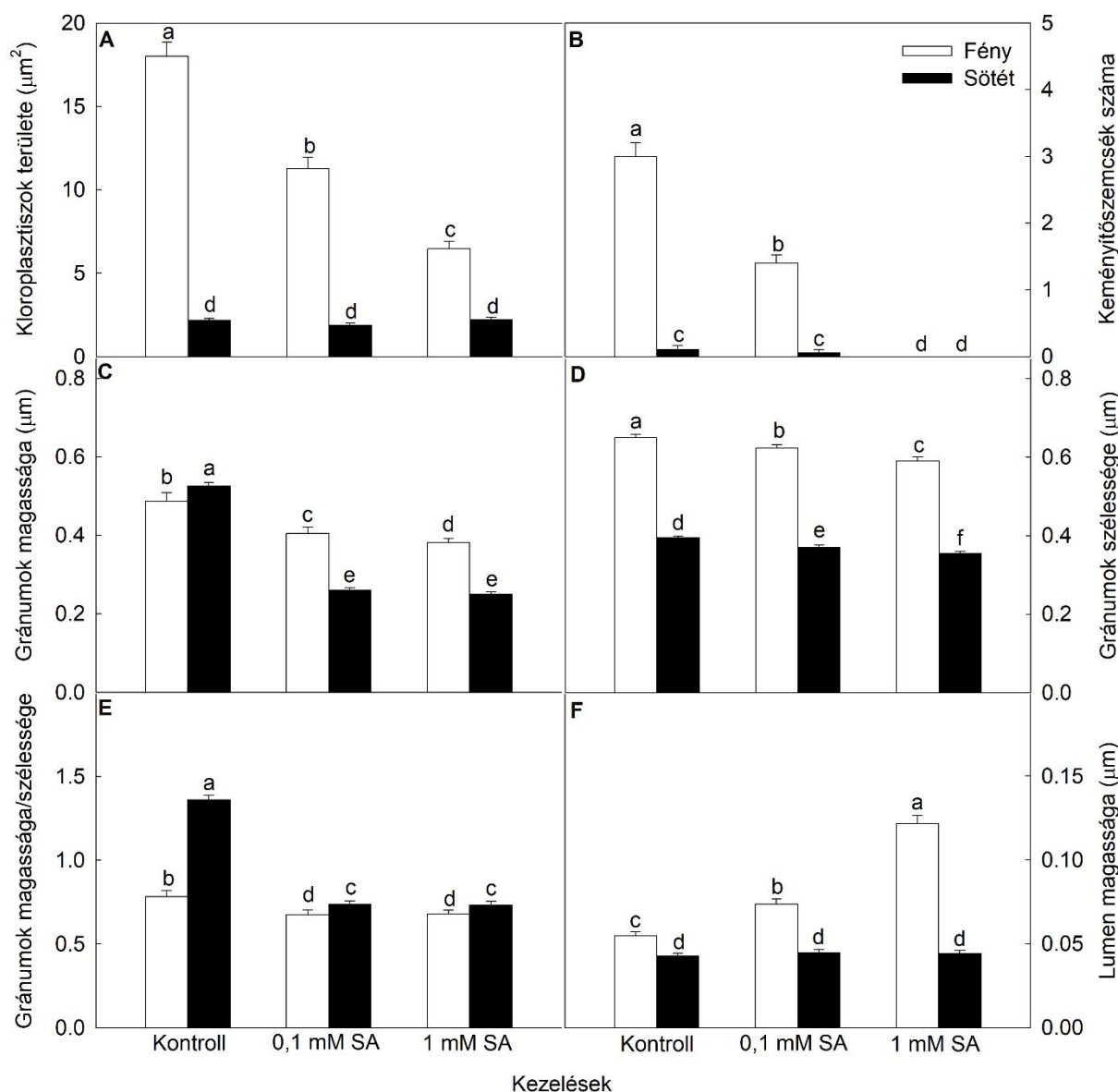
23. ábra: A keményítő (A) és az oldható cukrok (B) tartalmának változása vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A különböző koncentrációjú SA kezelések kloroplasztisz szerkezetre gyakorolt hatásának kimutatására transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeket (TEM) készítettünk. A világosban vagy sötétben tartott kontroll növények paliszád parenchimájában található kloroplasztiszok csak kismértékű és jól ismert citológiai eltéréseket mutattak a vizsgált sejtszervecske alakjában és szerkezetében (pl.: a gránumok szélessége, a plasztiszok területe) (24. ábra A-B). A fényben tartott kontroll növények leveleiből származó kloroplasztiszok keményítőszemcséket tartalmaztak (24. ábra A), de ezek csak ritkán találhatók meg a sötétben tartott kontroll növények esetében (24. ábra B). A 0,1 mM SA kezeléshez képest az 1 mM SA-val kezelt növények leveleiben a kloroplasztiszok elvesztették normál szerkezetüket, gömb alakúak, hosszúkásak vagy ívesek voltak (24. ábra C). Emellett a tilakoid membránok tágulását, tilakoid vezikulák megjelenését és hosszú, hullámos, deformált lumeneket figyelhetünk meg az 1 mM SA-val kezelt, fényen tartott növények leveleiben (24. ábra D). Ezzel szemben az 1 mM SA kezelés a kloroplasztiszok vakuolizációját idézte elő, de a lumenben nem okozott jelentős deformációt sötét körülmények között (24. ábra E).



24. ábra: Reprezentatív transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek a kifejlett vad típusú paradicsomlevelek paliszád parenchima sejtjeiben található kloroplasztiszokról 24 órás fényben vagy sötétben történt 1 mM SA kezeléseket követően. A: Normál szerveződésű és szerkezetű kloroplasztisz fényben, normál fotoperióduson tartott kontroll növények levelében. B: Kloroplasztisz a sötétben tartott kontroll növények levelében. C: Kloroplasztiszok a fényen történt 1 mM SA-val kezelt növények leveleiben, ahol néhány kloroplasztisz károsodott. D: Kloroplasztiszok nagy nagyítása a fényen történt 1 mM SA-val kezelt növények leveleiben, ahol hullámos grana- és sztrómatilakoidok figyelhetők meg (nyilak). E: Kloroplasztisz a sötétben történt 1 mM SA-val kezelt növények leveleiben (E: kloroplasztisz burok; G: gránum; P: plasztoglobulus, S: keményítőszemcsé, T: tilakoidok). Mércse = 500 nm.

A TEM-es felvételek elemzése során először a kloroplasztiszok területét vizsgáltuk, mely szignifikánsan nagyobb volt a fényen tartott kontroll mintákban, mint a 24 órás sötét inkubációt követően (25. ábra A). A kloroplasztiszok területe a keményítőszemcsék jelenlététől is függött, amelyek leginkább a normál fotoperiódus mellett voltak megfigyelhetők a mintákban. Ugyanakkor az SA kezelések szignifikánsan csökkentették a levelek kloroplasztiszaiban a keményítőszemcsék számát az SA kezelések növekvő koncentrációjának függvényében (25. ábra B). A kloroplasztiszok területe és a keményítőszemcsék száma jelentősen kisebb volt a sötétben kezelt növények esetében a fényen tartott kontrollhoz képest, és csak csekély változást mutatott az SA kezelések során (25. ábra A-B). A 24 órás sötét-inkubáció jelentősen megnövelte a kloroplasztiszok gránumainak magasságát és emellett a kontroll növények kloroplasztiszában a gránumszélesség csökkenését indukálta (25. ábra C-D). A kloroplasztiszok gránumaiban bekövetkező változásokat a gránumok magasságának és szélességének arányában is vizsgáltuk (25. ábra E). Az SA kezelések mindkét paramétert fokozatosan csökkentették az alkalmazott koncentrációk függvényében, ami jelentősebb volt a sötétben SA-kezelt növények kloroplasztiszaiban (25. ábra C-D). A gránumok magasságával ellentétben az SA kezelések növelték a lumen magasságát, de ez csak fényben volt megfigyelhető (25. ábra F).

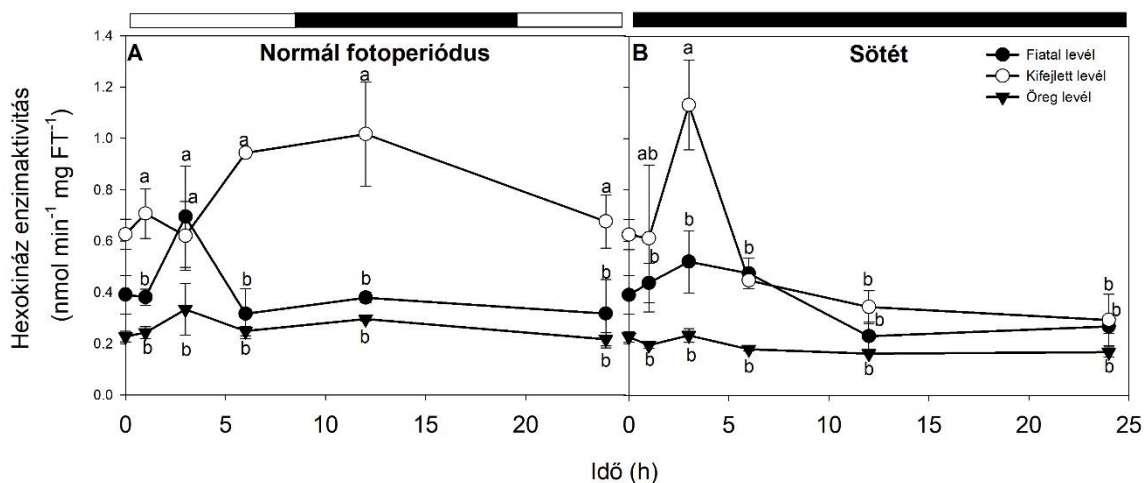


25. ábra: A kloroplasztiszok területének (A), a keményítőszemcsék számának (B), a gránumok magasságának (C), a gránumok szélességének (D), a gránumok magassága és szélessége arányának (E), és a lumen magasságának (F) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben található paliszád parenchima sejtekben vizsgálva kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag \pm SE, n=10). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

4.4. A hexokinázok és szerepük az SA-indukálta mitokondriális ROS produkcióban

Munkánk során megvizsgáltuk a cukrok metabolizmusában és a mitokondriális PCD gátlásában is szerepet játszó hexokinázok (HXK) szerv- és fényfüggő működését. A HXK glükózfüggő

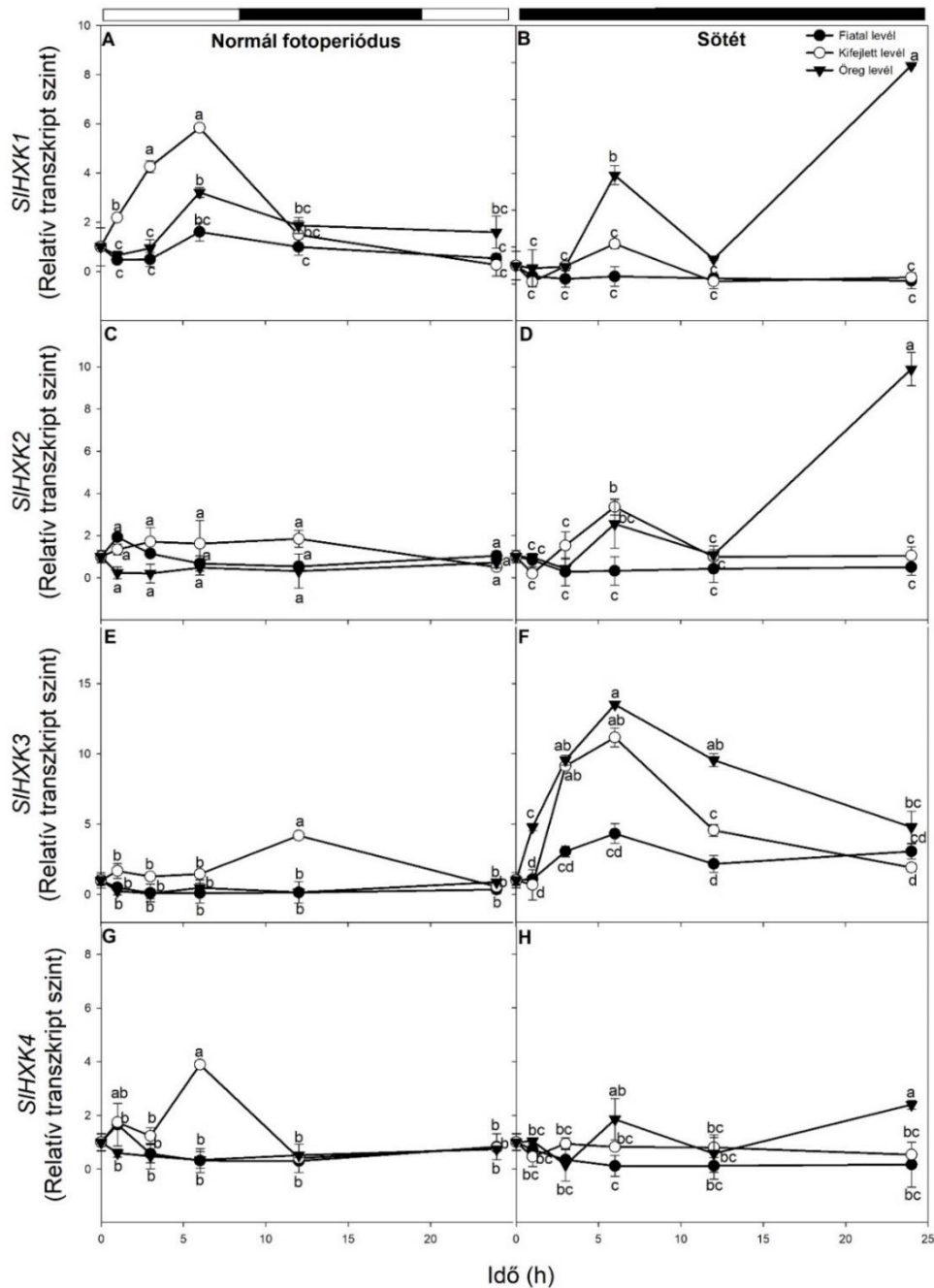
specifikus aktivitása levélemelet- és fotoperiódus-függő változást mutatott a paradicsom növényekben (26. ábra). Normál fotoperióduson a legjelentősebb enzimaktivitás változásokat a kifejlett levelekben figyeltük meg, ahol a legmagasabb szintet mutatta a HXK aktivitás a többi levélemelethez képest, elsősorban a fényperiódus második harmadától kezdődően (26. ábra A). Ehhez hasonló, de kevésbé hangsúlyos tendenciák figyelhetők meg a normál fotoperióduson a többi levélpozícióban is (26. ábra A). Érdekes módon a sötét hatására a HXK aktivitás 3 óra elteltével megnőtt a kifejlett levelekben, majd folyamatosan csökkent a 24 óráig tartó sötétség hatására a paradicsom növények minden levelében (26. ábra B).



26. ábra: A hexokináz (HXK) aktivitás változása normál fotoperióduson (A) és 24 órán át sötétben (B) tartott vad típusú paradicsom növények különböző korú leveleiben reggel 9:00 órától mérve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A paradicsom növényben kódolt *HXK* géneket vizsgálva (mitokondriális *SIHXK1-3* és a kloroplasztisban lokalizált *SIHXK4*) az *SIHXK1* és az *SIHXK4* transzkriptumszintjei mutatták a legjelentősebb napi ingadozást a kifejlett levelekben a normál fotoperióduson; a maximum a késői világos időszakban volt mérhető, majd a gének expressziói a sötétszakaszban lecsökkentek (27. ábra A, G). Hasonló tendencia figyelhető meg az *SIHXK1* esetében az öreg levelekben is (27. ábra A). Az *SIHXK3* expressziója viszont a korai sötét időszakban volt a legmagasabb a kifejlett levelekben (27. ábra E). A sötétség hatására az *SIHXK1* expressziója hasonló tendenciát mutatott, de kisebb mértékű volt a napi változás a normál fotoperiódushoz képest a kifejlett levelekben, míg az *SIHXK1* transzkripció szintjei szignifikáns csúcsot mutattak 6 óra elteltével az öreg levelekben, amelyet egy második maximum is követett 24 óra elteltével a sötétség hatására (27. ábra B). Az *SIHXK1* változásához hasonló tendenciák figyelhetők meg az *SIHXK2* expressziós mintázatában is az öreg levelekben a sötétben, azonban az *SIHXK2* relatív transzkript szintje a sötétben csak a kifejlett levelekben nőtt meg 6 óra

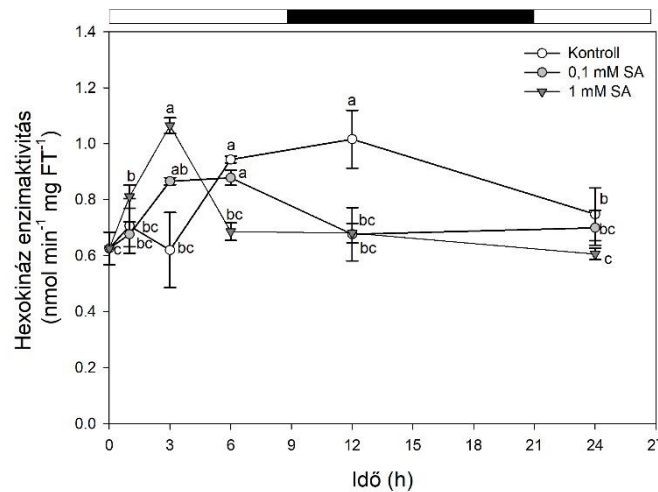
elteltével szignifikánsan (27. ábra D). Ezekhez a változásokhoz képest az *SIHXX3* expressziója már nagyon korán reagált a fény hiányára, mivel az *SIHXX3* relatív transzkript szintje nyolcszorosára nőtt a sötét kezelés hatására a kifejlett és öreg levelekben (27. ábra F). Az *SIHXX4* expressziója csupán 24 óra elteltével emelkedett meg a sötétség hatására az öreg levelekben (27. ábra H).



27. ábra: A hexokinázt (HXK) kódoló mitokondriális *SIHXX1* (A, B), *SIHXX2* (C, D), *SIHXX3* (E, F) és a kloroplasztikus *SIHXX4* (G, H) gének relatív transzkript szintjének változása normál fotoperióduson (A, C, E, G) és 24 órás sötétség hatására (B, D, F, H) vad típusú paradicsom növények különböző korú leveleiben reggel 9:00 órától mérve (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

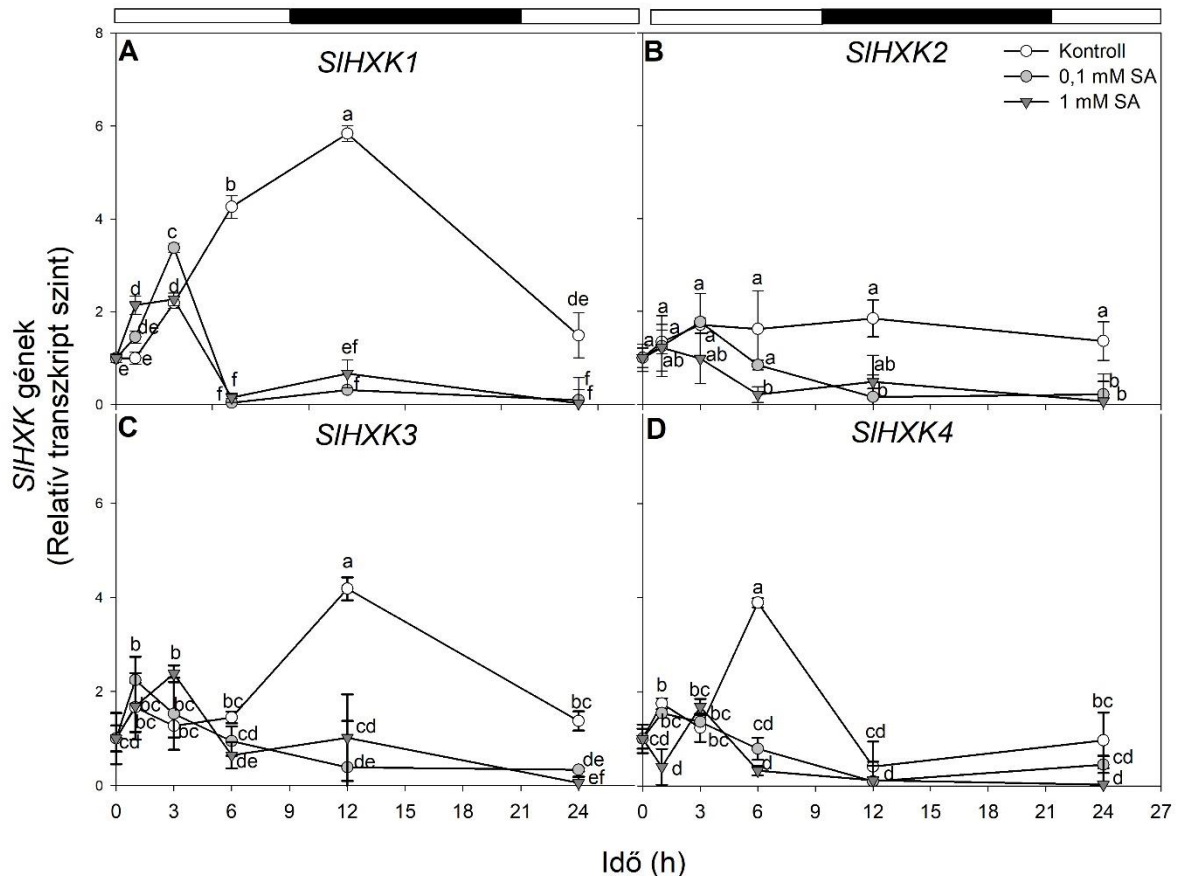
A következőkben különböző koncentrációjú SA kezelések hatását vizsgáltuk a HXK enzim aktivitására paradicsom növények kifejlett leveleiben a normál fotoperióduson (28. ábra). A HXK aktivitás glükóz szubsztráttal 3 óra elteltével nőtt, majd a 6. órától szignifikánsan lecsökkent az 1 mM SA kezelés hatására a kifejlett levelekben (28. ábra). A HXK aktivitás szintén szignifikánsan csökkent a 0,1 mM SA kezelés eredményeként a 6. órától, de 12 óra elteltével az enzimaktivitás visszatért a kontroll szintre (28. ábra).

Ezzel szemben az SA kezelések hatására a kifejlett levelek glükóz szintje szignifikánsan nőtt (0,1 mM SA: $14,4 \pm 0,7 \mu\text{mol g FT}^{-1}$; 1 mM SA: $14,5 \pm 0,5 \mu\text{mol g FT}^{-1}$) a 24 óra elteltével a kezeletlen kontrollhoz képest ($10,3 \pm 0,4 \mu\text{mol g FT}^{-1}$).



28. ábra: A hexokináz (HXK) aktivitás változása vad típusú paradicsom növények kifejlett leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően, normál fotoperióduson (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

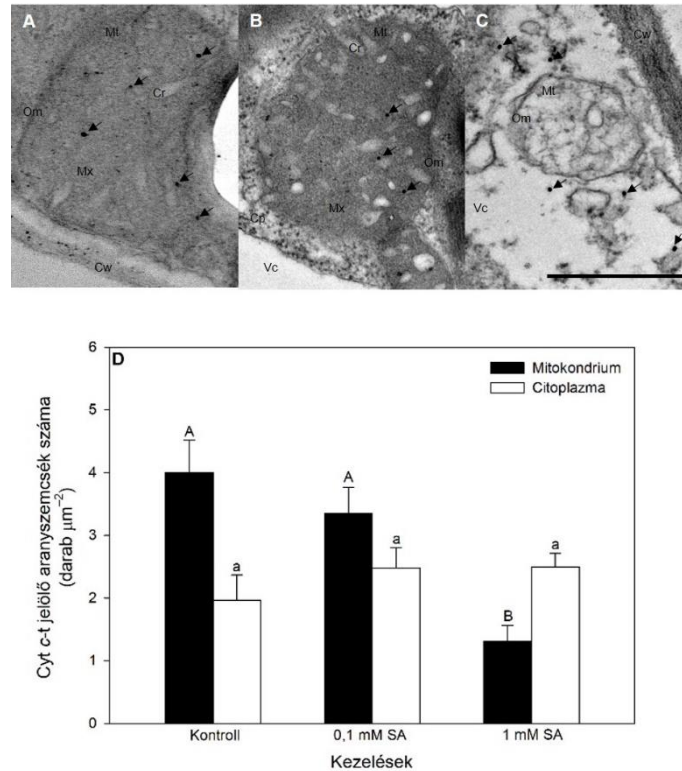
A paradicsom növények kifejlett leveleiben történő HXK aktivitás változása mellett megvizsgáltuk az SA kezelések paradicsom *HXK* génekre gyakorolt idő- és koncentrációfüggő hatását is. A mérések alapján a napirritmusos expressziót mutató *SIHXK* gének relatív transzkript szintjét mindkét koncentrációjú SA kezelés csökkentette 6 óra elteltével (29. ábra).



29. ábra: A hexokinázt (HXK) kódoló mitokondriális *SIHXK1* (A), *SIHXK2* (B), *SIHXK3* (C) és a kloroplasztikus *SIHXK4* (D) gének relatív transzkript szintjének változása vad típusú paradicsom növények kifejtett leveleiben kontroll körülmények között, valamint 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést követően, normál fotoperióduson (Átlag \pm SE, $n=3$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Az SA mitokondriumokra gyakorolt morfológiai hatásainak és a sejthalált kiváltó korai citológiai változásoknak a kimutatása a paradicsom növények leveleiben TEM felvételek és immunhisztokémiai eljárások segítségével történt. A vizsgálatok alapján a paradicsom növények mezofillumának parenchima sejteiben jelentős változások történnek a mitokondriumok szerkezetében a 24 órás SA kezeléseket követően (30. ábra A-C). Az SA-kezelések a mitokondriális kriszták duzzadását és dezorganizációját, valamint a mitokondriumok szétesését és vakuolizációját okozták, ami a legsúlyosabbnak a magasabb, 1 mM-os SA koncentráció alkalmazásánál bizonyult (30. ábra C). Mivel a mitokondriumok fontos elemei a sejthalál indukciójának, nyomon követtük immunhisztokémiai eljárásokkal a citokróm *c* (cyt *c*) felszabadulását a mitokondriális intermembrán térből az SA kezeléseket követően 24 órával. A mitokondriális cyt *c* szintek csak az 1 mM SA kezelés hatására csökkentek le szignifikánsan, ami arra utal, hogy a PCD megindult az említett SA kezelést

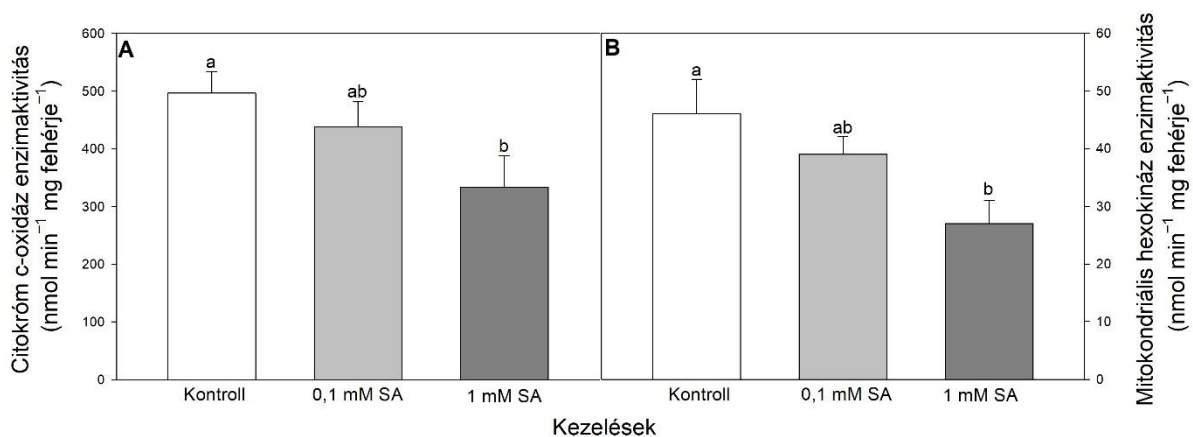
követően (30. ábra D). A mitokondriális frakcióval ellentétben a mitokondriumok körüli citoszol *cyt c* szintje csak kismértékben emelkedett, ami viszont nem volt szignifikáns az SA-val kezelt növények esetében (30. ábra D).



30. ábra: Reprezentatív transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek a kifejlett vad típusú paradicsomlevelek paliszád parenchima sejtjeiben található mitokondriumokról 24 órával 0,1 és 1 mM SA kezeléseket követően a normál fotoperióduson. A: Normál szerveződésű és szerkezetű mitokondrium kontroll levélből. B: Mitokondrium a 0,1 mM SA-val kezelt paradicsom növények levelében, ahol az SA kezelés a mitokondriális kriszták duzzadását okozta. C: Mitokondrium az 1 mM SA-val kezelt paradicsom növények levelében, ahol az SA kezelés a mitokondriumok szétesését és vakuolizációját váltotta ki. D: A *cyt c*-t jelölő (nyilakkal jelezve az A-C ábrákon) aranyrészecskék száma a mitokondriumokban és a mitokondriumok körüli citoplazmában a paradicsom növények levelében 24 órával a 0,1 vagy 1 mM SA kezelés után (Cp: citoplazma; Cr: mitokondriális kriszta; Cw: sejtfa, Mx: mitokondriális mátrix; Mt: mitokondrium; OM: mitokondriális külső membrán; Vc: vakuólum). Átlag + SE, n=30. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P < 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. Mércse = 500 nm.

Mivel a HXK enzim SA kezelésekre hatására bekövetkező aktivitásbeli és transzkripciós változásai befolyásolják a levelek fiziológiai és biokémiai válaszait, ideértve a mitokondriális metabolizmus megváltozását és a sejtthál indukcióját, ezért az SA-kezelt növények leveleiből mitokondriumokat izoláltunk, hogy megvizsgáljuk a mitokondriális HXK (mtHXK) szerepét az SA által indukált ROS- és NO-produkcióban. A mérések kapcsán elvégeztük a citokróm *c*-oxidáz (COX) aktivitásának mérését is (31. ábra A). A COX aktivitás szignifikánsan lecsökkent

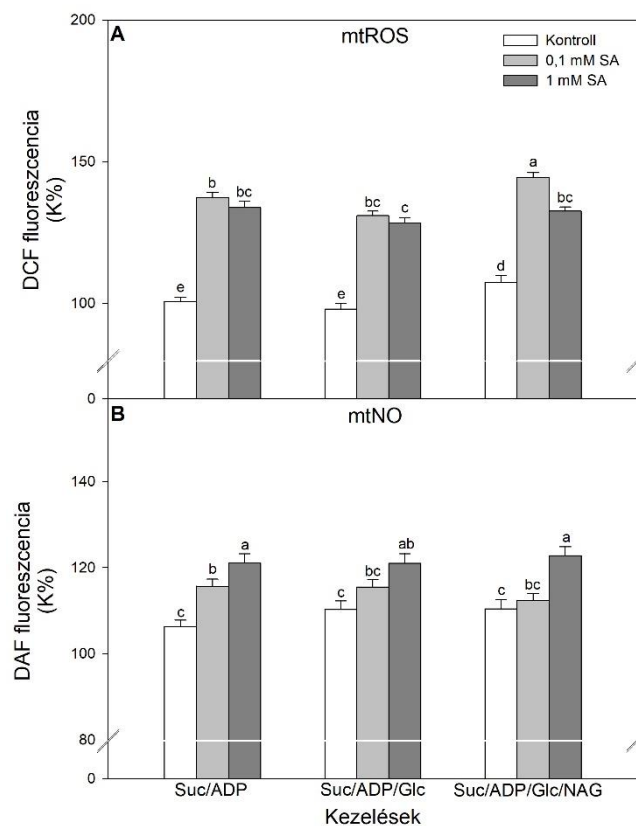
az 1 mM SA kezelés hatására, ami arra utal, hogy az SA magas koncentrációja mitokondriális dezorganizációt indukált, és sejthalált idézett elő a paradicsomnövények leveleiben. Ennek részeként szabadult ki a cyt *c* a mitokondriális intermembrán térből a citoszolba (30. ábra C-D). Emellett megmértük a mtHXXK aktivitást is a 24 órás SA kezeléseknél kitétt növények leveleiből izolált mitokondriumokban. Az mtHXXK aktivitás mérsékelt mértékben csökkent a 0,1 mM SA kezelés hatására a mitokondriumokban, míg szignifikánsan csökkent az 1 mM SA kezelést követően (31. ábra B).



31. ábra: A citokrom c-oxidáz (COX; A) és a mitokondriális hexokináz (mtHXXK; B) aktivitás változása vad típusú paradicsom növények kifejlett leveleiből izolált mitokondriumokban, mely növények előtte kontroll körülmények között nőttek vagy 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést kaptak normál fotoperióduson (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A következő kísérletsorozatban az mtHXXK aktivitás szerepét vizsgáltuk a mitokondriális ROS (mtROS) és NO (mtNO) termelésében, a 24 órás SA kezeléseknél kitétt növények leveleiből izolált mitokondriumokban (32. ábra). Először szukcinátot és ADP-t adtunk a kontroll és SA-kezelt paradicsom növények leveleiből izolált mitokondriumokhoz, hogy fokozzuk a mitokondriális ETC aktivitást. A szukcinát felgyorsította az elektronáramlást a mitokondriális ETC-ban a II-es komplexnél, és az ADP-vel együtt növelte az O₂-felhasználás mértékét, így az mtROS generálását és az mtHXXK aktivitást (Camacho-Pereira és mtsai. 2009). Kísérleteinkben az mtROS és mtNO termelést mindkét koncentrációjú SA kezelés szignifikánsan fokozta a kezelt növények kifejlett leveléből származó mitokondriumokban (32. ábra), ezzel párhuzamosan az mtHXXK aktivitás alacsonyabb volt, mint a kontroll mintákban (31. ábra B). A HXXK enzim szubsztrátjának számító glükóz (Glc) hozzáadása kismértékben, de nem szignifikánsan csökkentette az mtROS produkciót az SA-kezelt

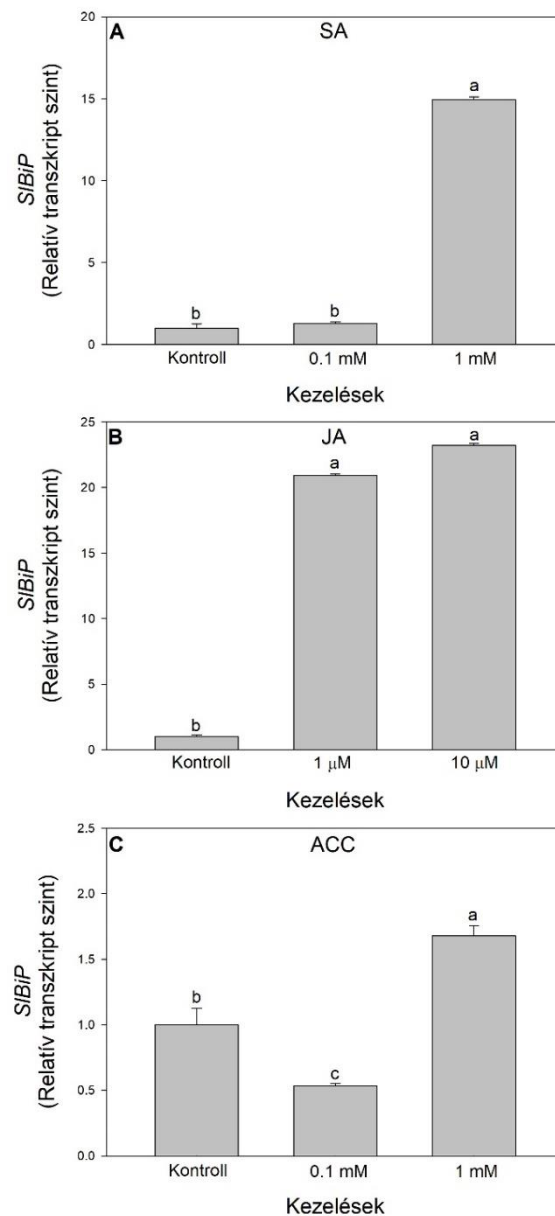
növények leveleiből izolált mintákban (32. ábra A). Ezt megfordította viszont a HXX inhibitor N-acetil-glükózamin (NAG) alkalmazása, amely fokozta az mtROS termelését a kontroll és az SA-val kezelt növények leveleiből származó mitokondriumokban, különösen az alacsonyabb, 0,1 mM SA koncentráció alkalmazása esetén (32. ábra A). Ez utóbbi kezelések azonban nem befolyásolták szignifikánsan az mtNO szintet, amely az mtHXX aktivitástól függetlenül szignifikánsan megemelkedett az alkalmazott SA-koncentrációk növekedésével (32. ábra B). Ezek a kísérletek igazolták, hogy a csökkent mtHXX aktivitás a NAG jelenlétében hozzájárulhat az mtROS termelés fokozódásához, de az NO termelést nem befolyásolja az SA-kezelt növények leveleiből származó mitokondriumokban. Ezenkívül az 1 mM SA kezelés szignifikánsan csökkentette az mtHXX aktivitást (31. ábra B), ami jól korrelált a COX aktivitás csökkenésével (31. ábra A), utalva arra, hogy az mtHXX Glc foszforiláló aktivitása képes szabályozni az mtROS termelést ép mitokondriumok esetén (0,1 mM SA), de ez a hatás az erősen sérült mitokondriumokban az 1 mM SA kezelés esetében megszűnt.



32. ábra: A mitokondriális ROS (mtROS; A) és NO (mtNO; B) produkció változása vad típusú paradicsom növények leveleiből izolált mitokondriumokban, mely növények előtte kontroll körülmények között nőttek vagy 24 óráig tartó 0,1 és 1 mM SA kezelést kaptak normál fotoperióduson. Az izolált mitokondriumokat különböző szubsztrátok és inhibitorok alkalmazásával teszteltük (Suc: szukcinát; ADP: adenzin-difoszfát; Glc: glükóz; NAG: N-acetil-glükózamin). (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

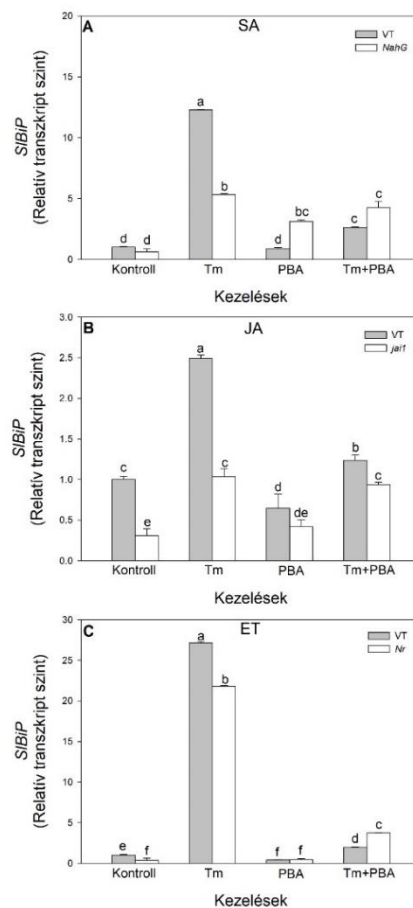
4.5. Az SA szerepe a ROS metabolizmusban ER stressz során

A különböző védekezéssel kapcsolatos növényi hormonok (SA, JA, ET) ER stressz és UPR során betöltött szerepének tanulmányozásához az *SIBiP* relatív transzkript szintjének változását vizsgáltuk meg elsőként (33. ábra). Eredményeink alapján mind az 1 mM SA (33. ábra A), az 1 és 10 μ M JA (33. ábra B), és az 1 mM ACC kezelés (33. ábra C) szignifikánsan emelte az *SIBiP* expresszióját a paradicsom növények leveleiben.



33. ábra: Exogén szalicilsav (SA; A), jázmonsav (JA; B) és etilén prekursor 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC; C) kezelés hatása az ER stressz marker *SIBiP* relatív transzkript szintjének változására vad típusú paradicsom növények leveleiben (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

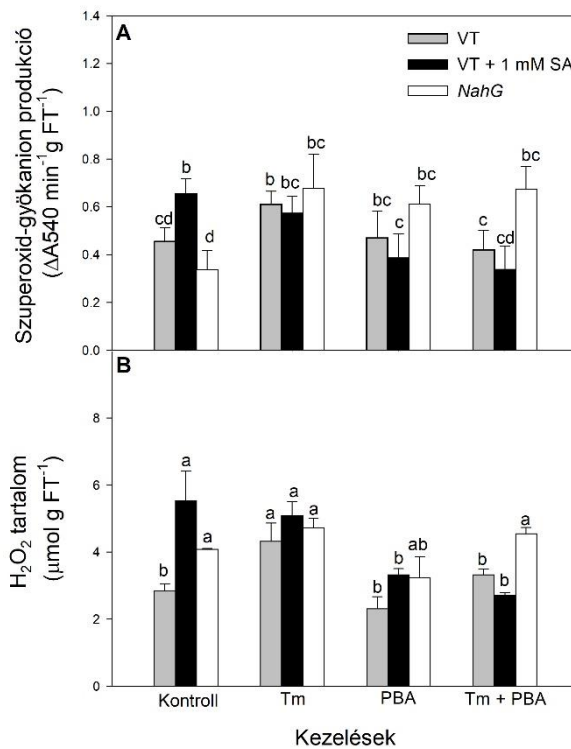
Az SA, JA és ET szerepét az ER stressz és UPR során különböző mutáns és transzgenikus paradicsom genotípusok felhasználásával vizsgáltuk tovább (34. ábra). A paradicsom *BiP* gén expressziója alacsonyabb volt a JA inszenzitív *jail* és az etilén receptor mutáns *Never ripe (Nr)* mutánsokban a vad típusú (VT) növényekhez képest, míg nem volt kimutatható szignifikáns különbség az SA hiányos *NahG* és vad típusú paradicsom növények leveleiben (34. ábra). Az ER stresszt mesterségesen indukáló Tm kezelés minden genotípusban szignifikáns *SIBiP* expresszió-növekedést okozott, mely azonban a hormonmutánsokban minden esetben szignifikánsan alacsonyabb volt a VT-hoz képest (34. ábra). A kémiai chaperon PBA kezelés minden esetben csökkentette az *SIBiP* relatív transzkript szintjét a megfelelő kontrollokhoz képest a *NahG* növények kivételével (34. ábra A). A PBA együttes alkalmazása a Tm kezeléssel szignifikánsan mérsékelte a Tm-okozta *SIBiP* expressziót, ami a *jail* növényekben alacsonyabb, míg az *Nr* növények leveleiben magasabb volt a VT-hoz képest (34. ábra).



34. ábra: Az ER stressz marker *SIBiP* relatív transzkript szintjének változása vad típusú (VT), SA hiányos *NahG* (A), JA inszenzitív *jail* (B), és ET receptor mutáns *Nr* (C) paradicsom növények leveleiben 24 órás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm és 1 mM PBA kezeléseket követően (Átlag \pm SE, $n=5$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Az SA szerepének további tanulmányozásához az SA hiányos *NahG* paradicsom növények felhasználása mellett exogén 1 mM-os SA kezelést alkalmaztunk a VT növények esetében. A ER stressz modulátorok közül az ER stresszt indukáló Tm kezelés szignifikánsan növelte a VT paradicsom növények leveleinek szuperoxid-gyökönion produkcióját, míg a kémiai chaperon PBA gátolta azt (35. ábra A). Az SA kezelések általában fokozták a VT növényekben a szuperoxid-gyökönion produkciót, amelyet a Tm kezelés nem befolyásolt szignifikánsan, azonban a PBA kissé csökkentette azt (35. ábra A). A legkisebb szuperoxid-gyökönion produkció az SA hiányos *NahG* növények leveleiben volt kimutatható a VT növényekhez képest, de minden kezelés növelte azt ebben a genotípusban (35. ábra A).

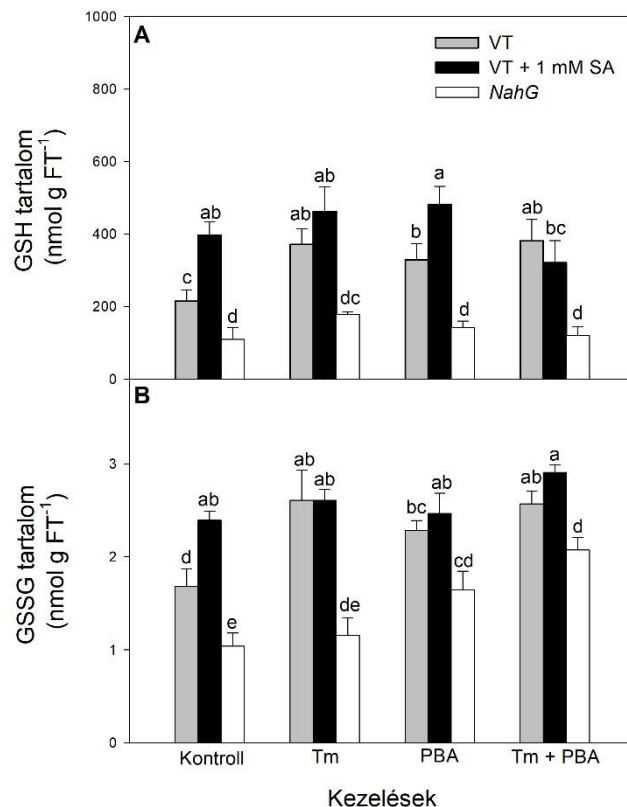
A levelek H_2O_2 tartalmát szignifikánsan növelte a Tm kezelés a VT levelekben a kontrollhoz képest, míg a PBA mérsékelte a Tm hatását (35. ábra B), hasonlóan a szuperoxid-gyökönion produkcióhoz (35. ábra A). Az SA kezelés szintén növelte a H_2O_2 szintet a VT növények leveleiben, hasonlóan az SA+Tm együttes kezeléshez, azonban a PBA alkalmazása csökkentette azt (35. ábra B). A *NahG* növények leveleiben nem volt szignifikáns változás H_2O_2 tartalomban a kezelések hatására, de az alap H_2O_2 szintek általában magasabbak voltak, mint a VT levelekben mérték (35. ábra B).



35. ábra: A szuperoxid-gyökönion produkció (A) és a H_2O_2 tartalom (B) változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve 1 mM SA kezeléseket követően (Átlag \pm SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A GSH szintet szignifikánsan megnövelte a Tm és PBA kezelés a VT növények leveleiben (36. ábra A). Ugyanakkor az 1 mM-os SA kezelés szintén GSH-felhalmozódást eredményezett a Tm kezeléshez hasonlóan, de nem különbözött az SA+Tm együttes kezelés- okozta változásoktól (36. ábra A). A legalacsonyabb GSH szintet általában a *NahG* növények leveleiben tapasztaltuk, függetlenül a kezelésektől, amelyek nem eredményeztek szignifikáns változást a transzgenikus növények leveleiben (36. ábra A).

A GSSG szintet a Tm és a PBA kezelés növelte szignifikánsan a VT paradicsom növények leveleiben, hasonlóan az SA kezeléshez (36. ábra B). Az SA alkalmazása eredményezte a legmagasabb GSSG szinteket a VT növények leveleiben a kezeletlen kontrollhoz képest, míg a Tm és a PBA kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az SA által indukált GSSG növekedést (36. ábra B). A legalacsonyabb GSSG szinteket a *NahG* növények leveleiben mutattuk ki a VT levelekhez képest, de a PBA-kezelések önmagukban és Tm kezeléssel kombinálva is növelték a GSSG tartalmat ebben a genotípusban (36. ábra B).



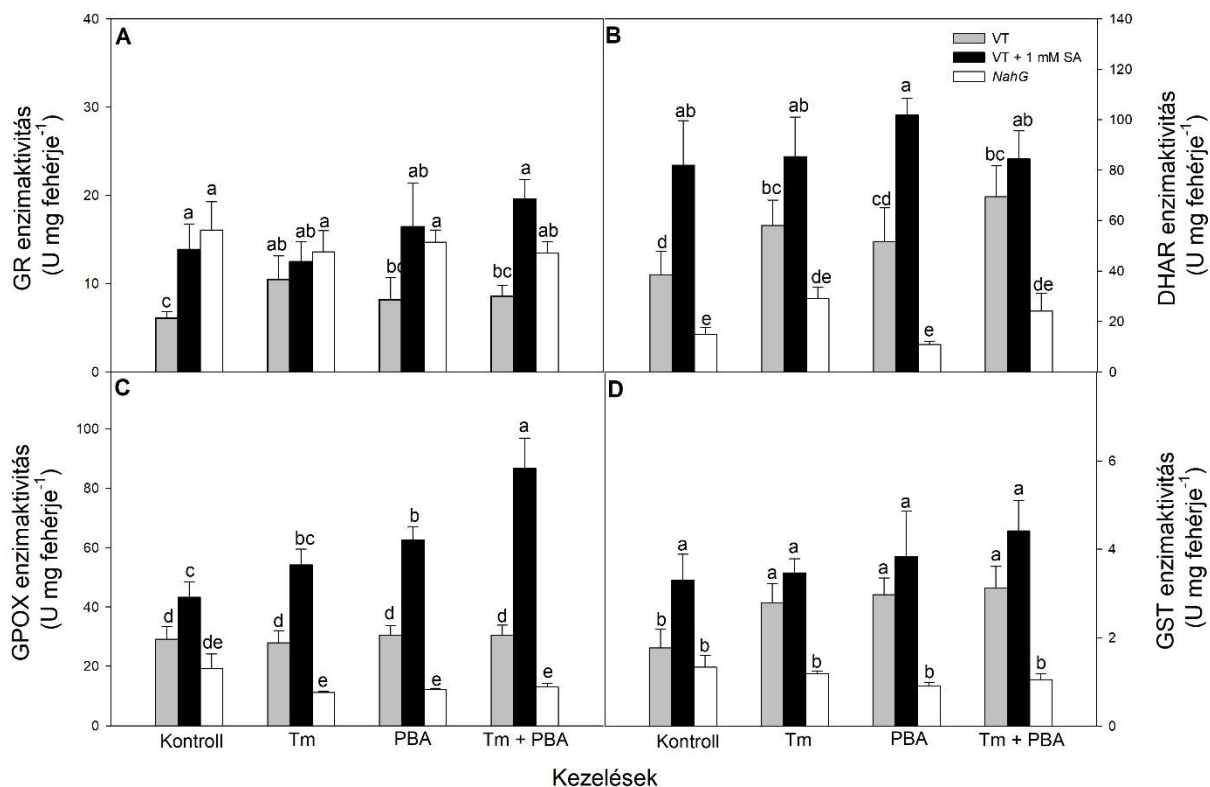
36. ábra: A redukált glutation (GSH; A) és az oxidált glutation (GSSG; B) tartalom változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás 5 µg ml⁻¹ Tm, 1 mM PBA, illetve 1 mM SA kezeléseket követően (Átlag ± SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok P ≤ 0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A glutation metabolizmusában részt vevő kulcsenzimek aktivitásának elemzése alapján a GR aktivitását szignifikánsan növelte a Tm kezelés, amit a PBA alkalmazása mérsékelte a VT növények leveleiben (37. ábra A). Az SA kezelés önmagában és bármilyen kombinációban a Tm és PBA ER stressz modulátorokkal szignifikánsan növelte a GR aktivitást a VT levelekben a kontrollhoz képest (37. ábra A). Érdekes módon a GR aktivitás a *NahG* levelekben volt a legmagasabb a VT kontroll levelekhez, valamint az egyéb kezelésekhöz képest, és nem változott szignifikánsan ebben a genotípusban egyik ER stressz modulátor alkalmazását követően sem (37. ábra A).

A DHAR aktivitást a Tm kezelés növelte, és nem változtatta meg szignifikánsan a PBA-val történő együttes kezelés sem a VT növények leveleiben (37. ábra B). Az SA alkalmazása eredményezte a legmagasabb DHAR aktivitást a VT növények leveleiben a kezeletlen kontrollhoz képest, amit az ER stresszel kapcsolatos modulátorok mind magas szinten tartottak, függetlenül az SA szinttől (37. ábra B). A legalacsonyabb DHAR aktivitást a *NahG* növények leveleiben mértük, mely szignifikánsan nem változott egyik kezelés esetében sem (37. ábra B).

A GPOX aktivitás nem változott szignifikánsan a Tm és PBA kezelése hatására a VT növények leveleiben (37. ábra C), de megnőtt az SA alkalmazása, illetve minden SA kezelés mellett végzett ER stressz modulátor kezelés esetén (37. ábra C). A legmagasabb GPOX aktivitást a PBA kezelése során, valamint az SA és Tm kezelésekkel együtt végzett kísérletek esetén detektáltuk a VT növények leveleiben (37. ábra C). A legalacsonyabb GPOX aktivitást a *NahG* növények leveleiben mértük a VT növények kontroll és más ER stresszt moduláló kezelésekhöz képest (37. ábra C). Emellett a GPOX aktivitás ebben a paradicsom genotípusban nem mutatott szignifikáns változást egyik kezelés esetében sem (37. ábra C).

A GST aktivitást a Tm kezelés növelte, de a PBA alkalmazása nem befolyásolta ezt a VT növények leveleiben (37. ábra D). Az SA alkalmazása általában önmagában és az összes társkezelés esetében is növelte a GST aktivitást, különösen PBA kezeléssel kombinálva (37. ábra D). A legalacsonyabb GST aktivitást a *NahG* növények leveleiben mértük a VT növényekhez képest, amit egyik ER stressz modulátor sem változtatott meg szignifikánsan (37. ábra D).



37. ábra: A glutation-reduktáz (GR; A), dehidroaszorbát-reduktáz (DHAR; B), glutation-peroxidáz (GPOX; C) és glutation S-transzferáz (GST; D) aktivitása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve 1 mM SA kezeléseket követően (Átlag \pm SE, $n=5$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A glutation metabolizmusban részt vevő kulcsenzimek aktivitásának elemzése mellett a hozzájuk kapcsolódó paradicsom gének expresszióját is megvizsgáltuk az ER stressz alatt. A glutation bioszintézisben szerepet játszó *SIGSH1* relatív transzkript szintjét a Tm csökkentette a VT növények leveleiben a kontrollhoz képest (38. ábra A). Az SA kezelés szintén csökkentette az *SIGSH1* expresszióját a kontrollhoz képest a VT növények leveleiben, és csak az SA kezeléssel együtt alkalmazott PBA növelte az *SIGSH1* expresszióját (38. ábra A). Ehhez hasonló változásokat figyeltünk meg a *NahG* növények leveleiben, ahol az SA hiány csökkentette az *SIGSH1* relatív transzkript szintjét a VT kontrollhoz képest, de a PBA növelte azt (38. ábra A).

A paradicsom növényekben a GR enzimet kódoló gének közül az *SIGR1* expressziója nem változott szignifikánsan (38. ábra B), míg az *SIGR2* expressziója szignifikánsan nőtt a Tm kezelés hatására a VT növények leveleiben (38. ábra C). Ugyanakkor a PBA alkalmazása mindkét *SIGR* gén expresszióját indukálta, és a kombinált Tm+PBA kezelés szintén

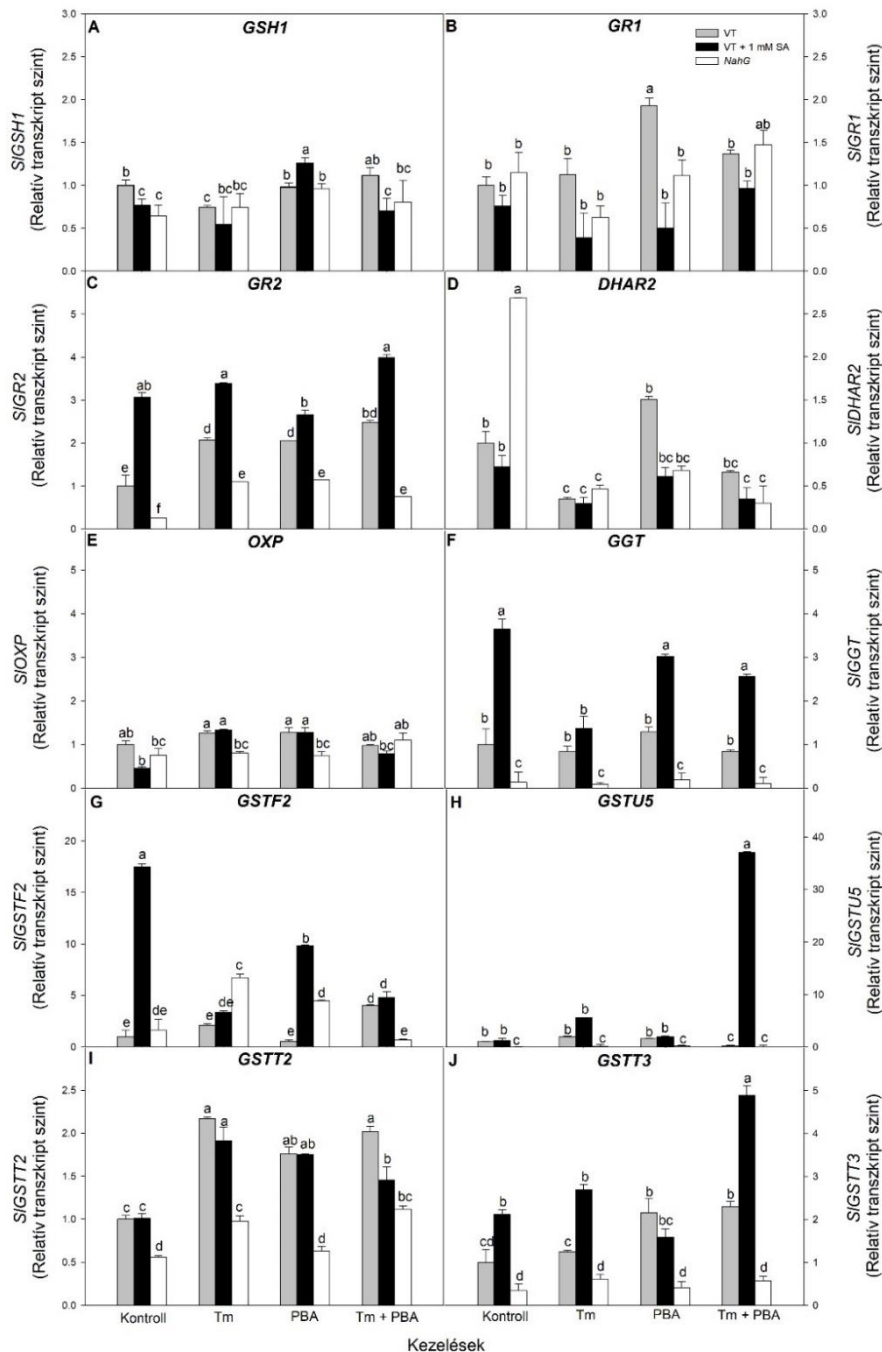
szignifikánsan növelte az *SIGR2* transzkriptumok felhalmozódását (38. ábra C). Az SA expozíció nem változtatta meg szignifikánsan az *SIGR1* expresszióját sem önmagában, sem más ER stressz modulátorral együtt alkalmazva (38. ábra B). Ugyanakkor az SA kezelés minden esetben növelte az *SIGR2* relatív transzkript szintjét (38. ábra C). Az exogén SA kezeléshez hasonlóan, az *SIGR1* expressziója nem változott szignifikánsan a *NahG* növények leveleiben az ER stressz alatt (38. ábra B), míg az *SIGR2* transzkriptumok felhalmozódását a Tm és PBA kezelések fokozták, de kisebb mértékben, mint a VT növények leveleiben (38. ábra C).

Az *SIDHAR2* expresszióját a Tm kezelés csökkentette a VT növények leveleiben, de azt a PBA kezelés nem változtatta meg szignifikánsan, hasonlóan az SA kezeléshez (38. ábra D). Érdekes módon az *SIDHAR2* expressziója a *NahG* növények leveleiben volt a legmagasabb kontroll körülmények között, összehasonlítva a VT növények leveleivel, amelyet viszont az összes ER stressz modulátor kezelés csökkentett (38. ábra D).

A GSH katabolizmussal kapcsolatos kiválasztott paradicsomszekvenciák közül sem az *SIOXP* (38. ábra E), sem az *SIGGT* (38. ábra F) gének expresszióját nem befolyásolta szignifikánsan a Tm vagy a PBA kezelés a VT növények leveleiben. Ugyanakkor, míg az SA kezelés alapvetően csökkentette az *SIOXP* expresszióját (38. ábra E) a kezeletlen kontroll levelekhez képest, addig a Tm és a PBA az SA kezelésekkel együtt növelte azt, ami a *NahG* növények leveleiben nem volt kimutatható (38. ábra E). Ezzel szemben az SA alkalmazása alapvetően növelte az *SIGGT* expresszióját a kezeletlen kontrollhoz képest (38. ábra F), amit a Tm kezelés mérsékelte, de a PBA kezelés nem befolyásolt érdemben (38. ábra F). Az *SIGGT* expressziója jelentősen alacsonyabb volt és nem változott szignifikánsan az ER stressz modulátorokkal történő kezelések hatására sem a *NahG* növények leveleiben (38. ábra F).

A paradicsom növényekben kiválasztott kulcsfontosságú GST enzimet kódoló gének közül a Tm kezelések egyedül az *SIGSTT2* expresszióját növelték szignifikánsan a VT növények leveleiben, hasonlóan a PBA kezelésekhez (38. ábra I). Ugyanakkor a Tm és a PBA kombinált kezelés az *SIGSTF2* (38. ábra G), az *SIGSTT2* (38. ábra I) és az *SIGSTT3* (38. ábra J) esetében is szignifikáns transzkriptum-felhalmozódást eredményezett. Az SA alkalmazása alapvetően fokozta az *SIGSTF2* (38. ábra G) és az *SIGSTT3* (38. ábra J) expresszióját a VT növények leveleiben. Az SA kezeléssel együtt alkalmazott Tm magasabb *SIGSTT2* expressziót eredményezett a vad típusú növények leveleiben (38. ábra I), valamint PBA kezeléssel kombinálva az *SIGSTF2* (38. ábra G) és az *SIGSTT2* (38. ábra I) expressziója is nőtt. Az SA+Tm+PBA együttes kezelés az *SIGSTU5* (38. ábra H), az *SIGSTT2* (38. ábra I) és az *SIGSTT3* (38. ábra J) transzkriptum-felhalmozódását eredményezte a VT növények leveleiben. A *NahG* növények leveleiben a Tm kezelés fokozta az *SIGSTF2* (38. ábra G) és az *SIGSTT2*

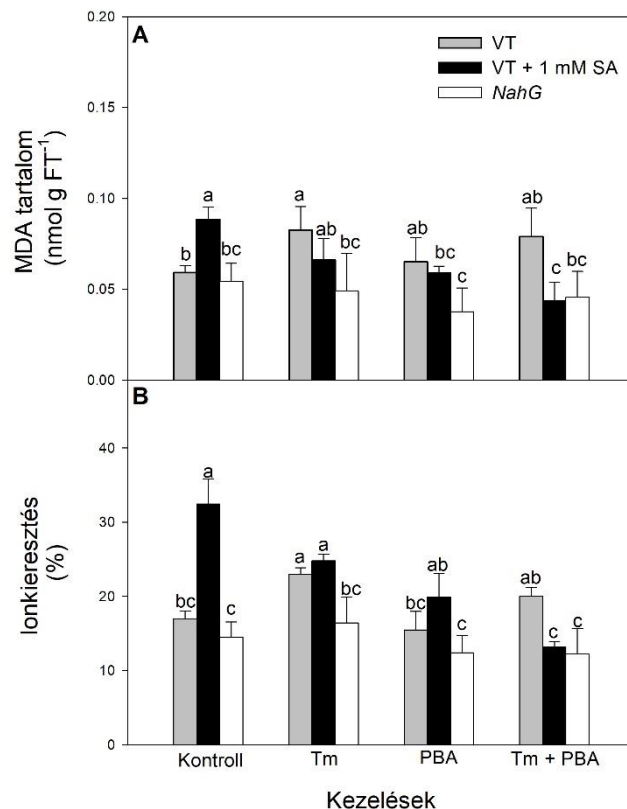
(38. ábra I) expresszióját, de az *SIGSTT2* expressziójának növekedése alacsonyabb volt a VT növényekben mértékhez képest, és nem változott szignifikánsan a PBA hatására (38. ábra I). Az *SIGSTU5* (38. ábra H) és az *SIGSTT2* (38. ábra I) relatív transzkript szintjei nem változtak szignifikánsan a *NahG* növények leveleiben egyik ER stressz modulátor kezelés esetében sem.



38. ábra: A GSH bioszintézisével [*SIGSH1* (A), *SIGR1* (B), *SIGR2* (C)] és felhasználásával vagy lebontásával [*SIDHAR2* (D), *SIOXP* (E), *SIGGT* (F), *SIGSTF2* (G), *SIGSTU5* (H), *SIGSTT2* (I) és *SIGSTT3* (J)] kapcsolatos gének relatív transzkript szintjének változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve 1 mM SA kezeléseket követően (Átlag \pm SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

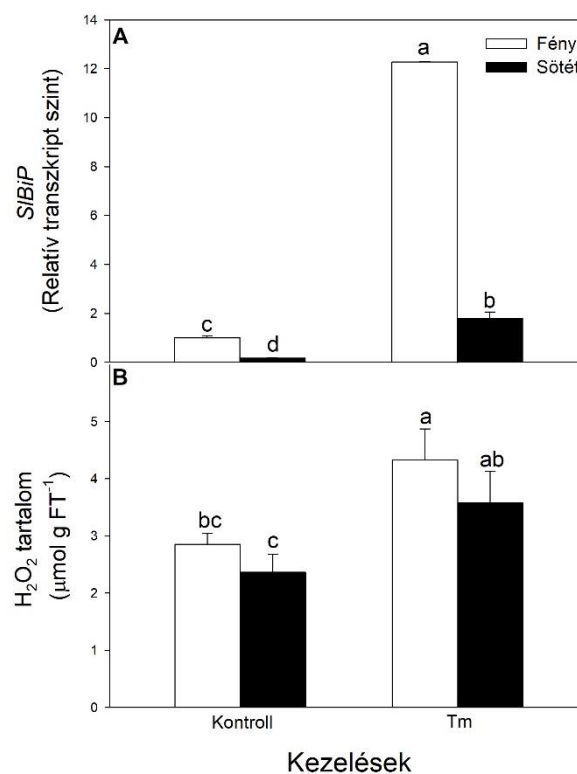
A Tm és az SA kezelés hatására fokozódott a lipidperoxidáció az MDA tartalom szignifikáns növekedése alapján a VT növények leveleiben (39. ábra A). Érdekes módon ugyanakkor nem történt szignifikáns változás az MDA szintekben a Tm+SA kombinált kezelés esetében (39. ábra A). A PBA kismértékben mérsékelte a Tm által kiváltott magasabb lipidperoxidációt, és szignifikánsan csökkentette az SA által okozott megemelkedett lipidperoxidációt a VT növények leveleiben (39. ábra A). Ugyanakkor az MDA szintje alacsonyabb és változatlan maradt a *NahG* növények leveleiben az ER stressz alatt (39. ábra A).

Szignifikáns ionkieresztést mértünk a Tm kezelést követően a VT levelekben, amit a PBA alkalmazása csupán kismértékben csökkentett (39. ábra B). Ugyanakkor az SA kezelés okozta a legmagasabb ionkieresztést a VT növények leveleiben, amelyet a Tm és különösen a PBA kezelés mérsékel (39. ábra B). A *NahG* növények leveleiben az ionkieresztés nem változott szignifikánsan az ER stressz hatására (39. ábra B).



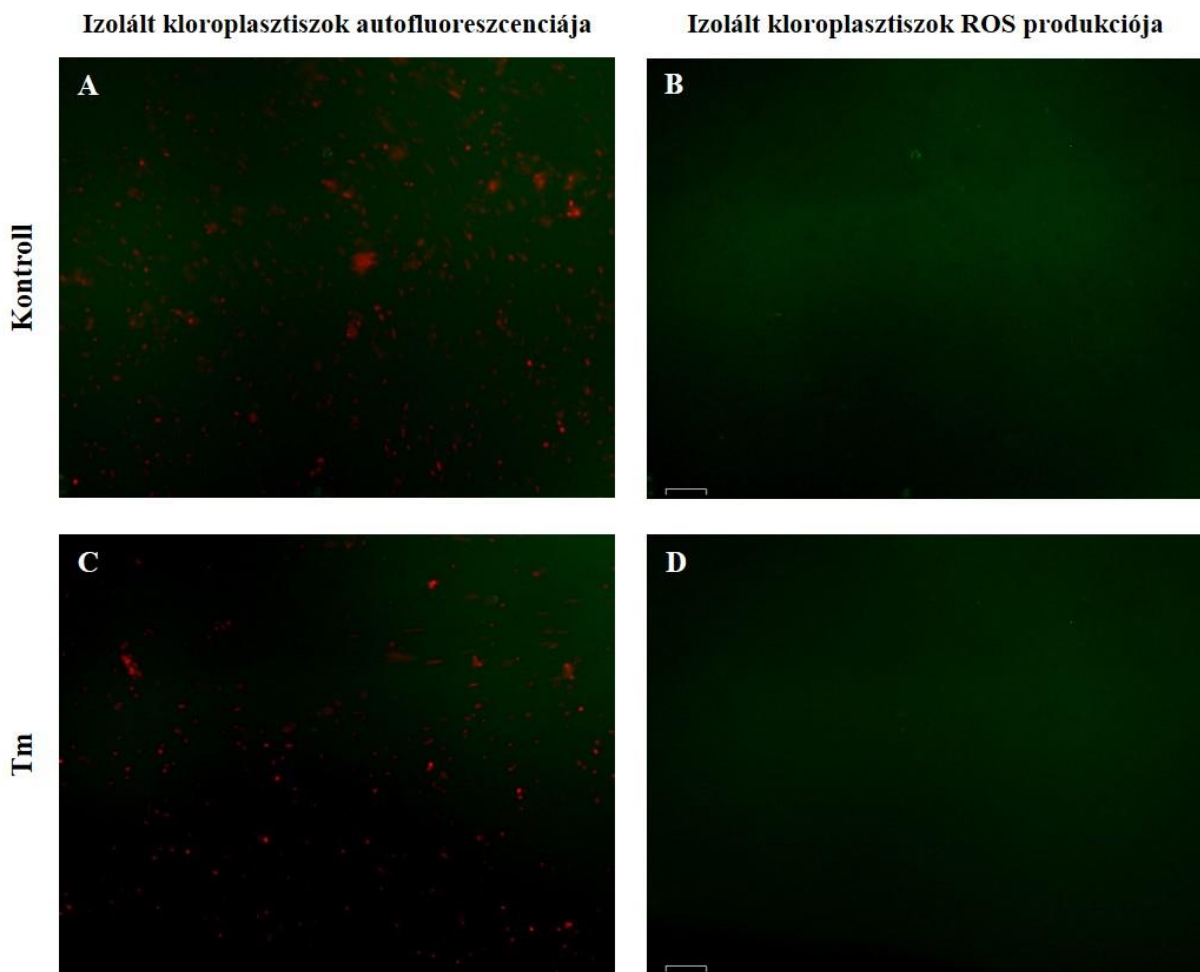
39. ábra: Az MDA tartalom (A) és az ionkieresztés (B) változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás 5 µg ml⁻¹ Tm, 1 mM PBA, illetve 1 mM SA kezeléseket követően (Átlag ± SE, n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy vajon az SA mellett az SA bioszintézisében is szerepet játszó, valamint jelentős ROS forrás kloroplasztiszok milyen szerepet töltenek be a Tm által kiváltott ER stressz során és az UPR-ben. Ehhez elsőként VT paradicsom növényeket kezeltünk Tm-el 24 órán át a normál fotoperióduson fényben és sötét körülmények között (40. ábra). Az eredmények alapján az *SIBiP* UPR markergén expresszióját mindkét körülmény között növelte a Tm, viszont a markergén sötétben lényegesen kisebb mértékben expresszáldott (40. ábra A). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a kloroplasztiszok potenciális szerepet játszhatnak a robusztusabb UPR aktiválásában normál fénykörülmények között. Ebben a folyamatban játszhat kiemelt szerepet a kloroplasztikus ROS produkció. A kloroplasztikus ROS Tm-expozíció alatti lehetséges szerepének vizsgálatához a VT paradicsom növényeket normál fotoperiódus mellett sötétben is megkezeltek az ER stresszt kiváltó Tm-nel és megmértük a levelek H₂O₂ tartalmában bekövetkező változásokat (40. ábra B). A Tm kezelése hatására szignifikáns H₂O₂ tartalom növekedést mértünk normál növekedési körülmények között a kontroll növényekhez képest, ugyanakkor a H₂O₂ tartalom sötétben kissé alacsonyabb maradt (40. ábra B). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kloroplasztiszok és a fotoszintetikus fényreakciók gátlása lehet a ROS forrása az ER stressz alatt.



40. ábra: Az *SIBiP* relatív transzkript szintjének (A) és a H₂O₂ tartalom (B) változása vad típusú paradicsom növények leveleiben 24 órás 5 μg ml⁻¹ Tm kezelést követően fényben, a normál fotoperióduson és sötétben kezelve (Átlag ± SE, n=3). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

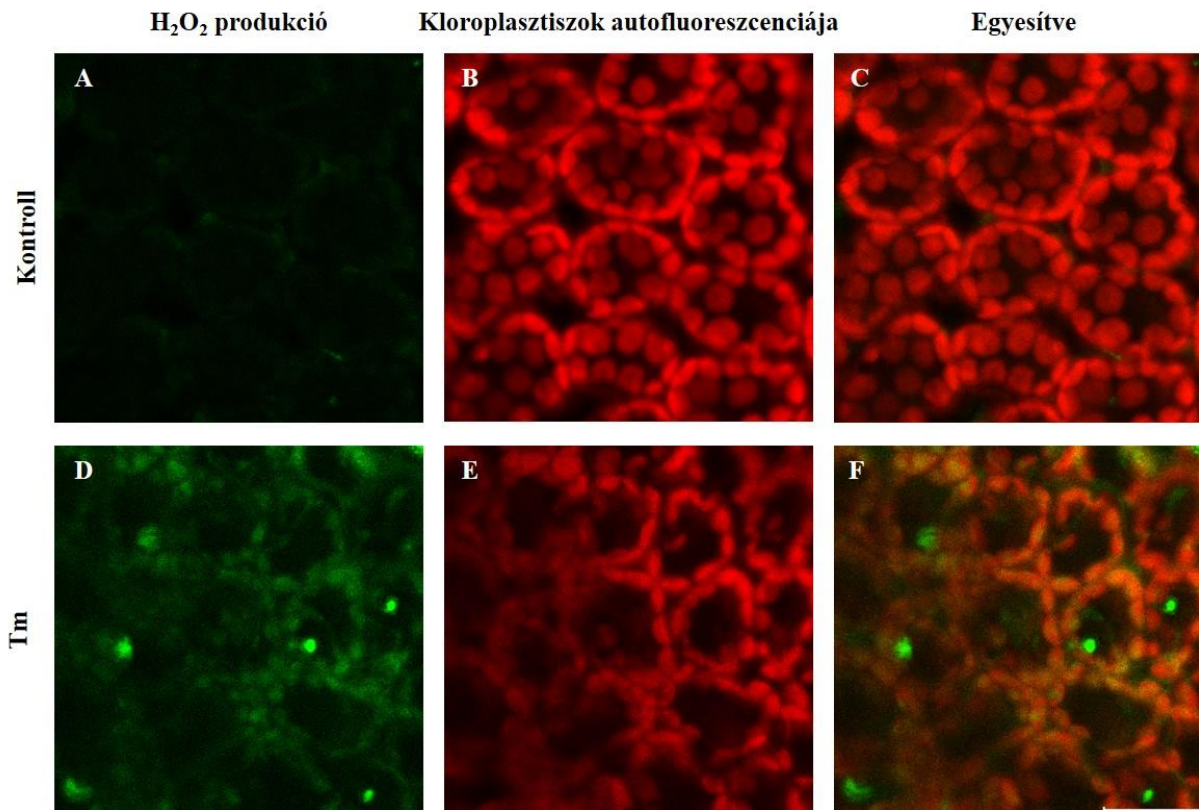
Kérdésként merült fel azonban, hogy vajon a kloroplasztiszok ROS produkciójára direkt módon hat-e a Tm. A közvetlen hatás vizsgálatához vad típusú kontroll paradicsom növények leveleiből intakt kloroplasztiszokat izoláltunk, melyeket Tm-nel kezeltünk *in vitro*, majd a ROS szint változását H₂DCFDA fluoreszcens festékkel detektáltuk (41. ábra). Az eredmények alapján a Tm nem indukált jelentős ROS termelést 1 órán belül az izolált paradicsom kloroplasztiszokban (361±14 A.U.) a kontrollhoz (394±19 A.U.) képest. Ezek az eredmények viszont arra utalnak, hogy a Tm csak közvetett hatással lehet a kloroplasztiszokra, melyeket a következőkben tovább vizsgáltunk.



41. ábra: Az autofluoreszcencia (A, C) és a reaktív oxigénformák produkciójában (ROS; B, D) bekövetkezett változások reprezentatív képe vad típusú paradicsom növények izolált kloroplasztiszáiban kontroll körülmények között vagy 60 perces 0,5 µg ml⁻¹ Tm kezelést követően (vonalzó: 50 µm; a zöld szín a ROS produkciót, a piros szín a kloroplasztiszok autofluoreszcenciáját mutatja).

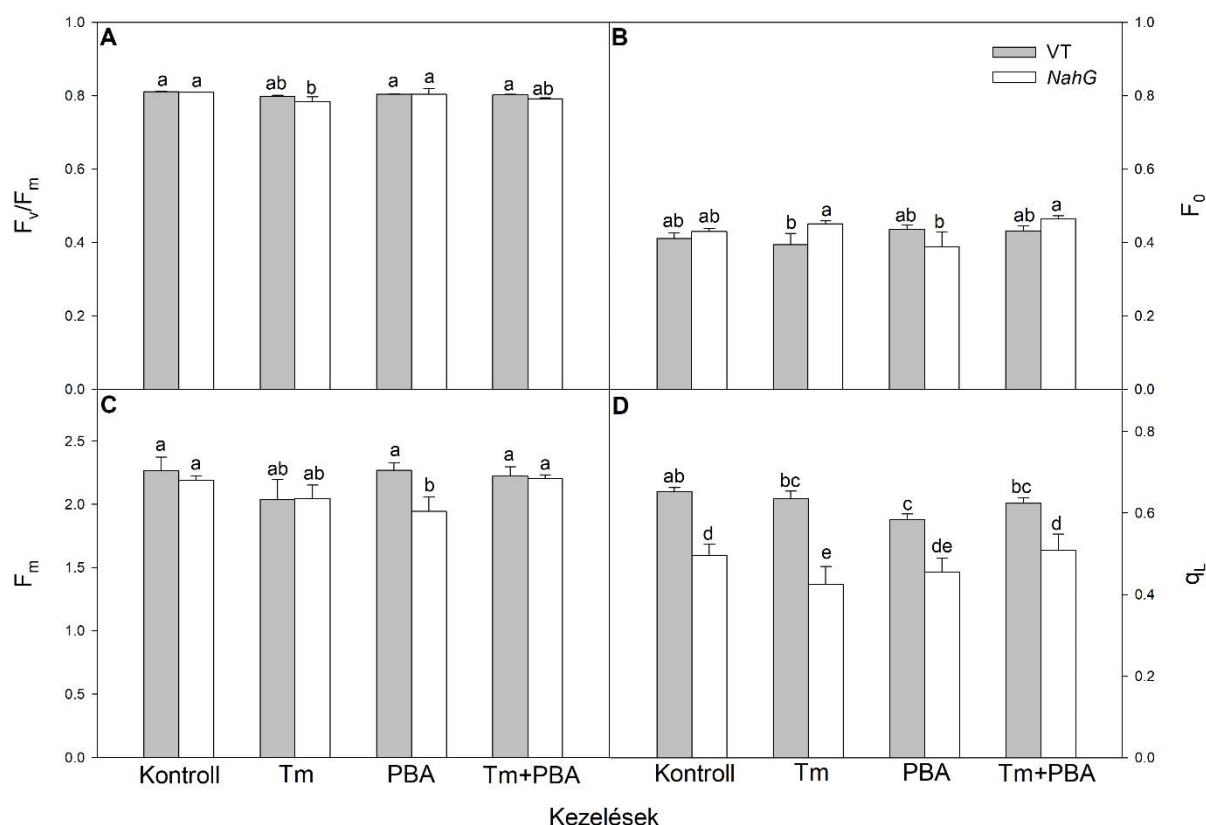
Az izolált kloroplasztiszok vizsgálatát követően megnéztük a Tm hatását a ROS produkcióra a levelekben *in situ* konfokális mikroszkóp segítségével (42. ábra). Az eredmények

alapján a Tm-kezelt növények leveleiben szignifikáns H_2O_2 termelés (165 ± 22 A.U.) volt kimutatható a kontrollhoz (57 ± 5.7 A.U.) képest (42. ábra A, D), amelynek jelentős hányada a kloroplasztiszokból származott (42. ábra C, F).



42. ábra: A H_2O_2 produkció változása (A, D), a kloroplasztiszok autofluoreszcenciája (B, E) és a kettő egyesített (C, F) reprezentatív képe vad típusú paradicsom növények leveleiben kontroll körülmények között vagy 24 órás $0,5 \mu g ml^{-1}$ Tm kezelést követően (vonalzó: $20 \mu m$).

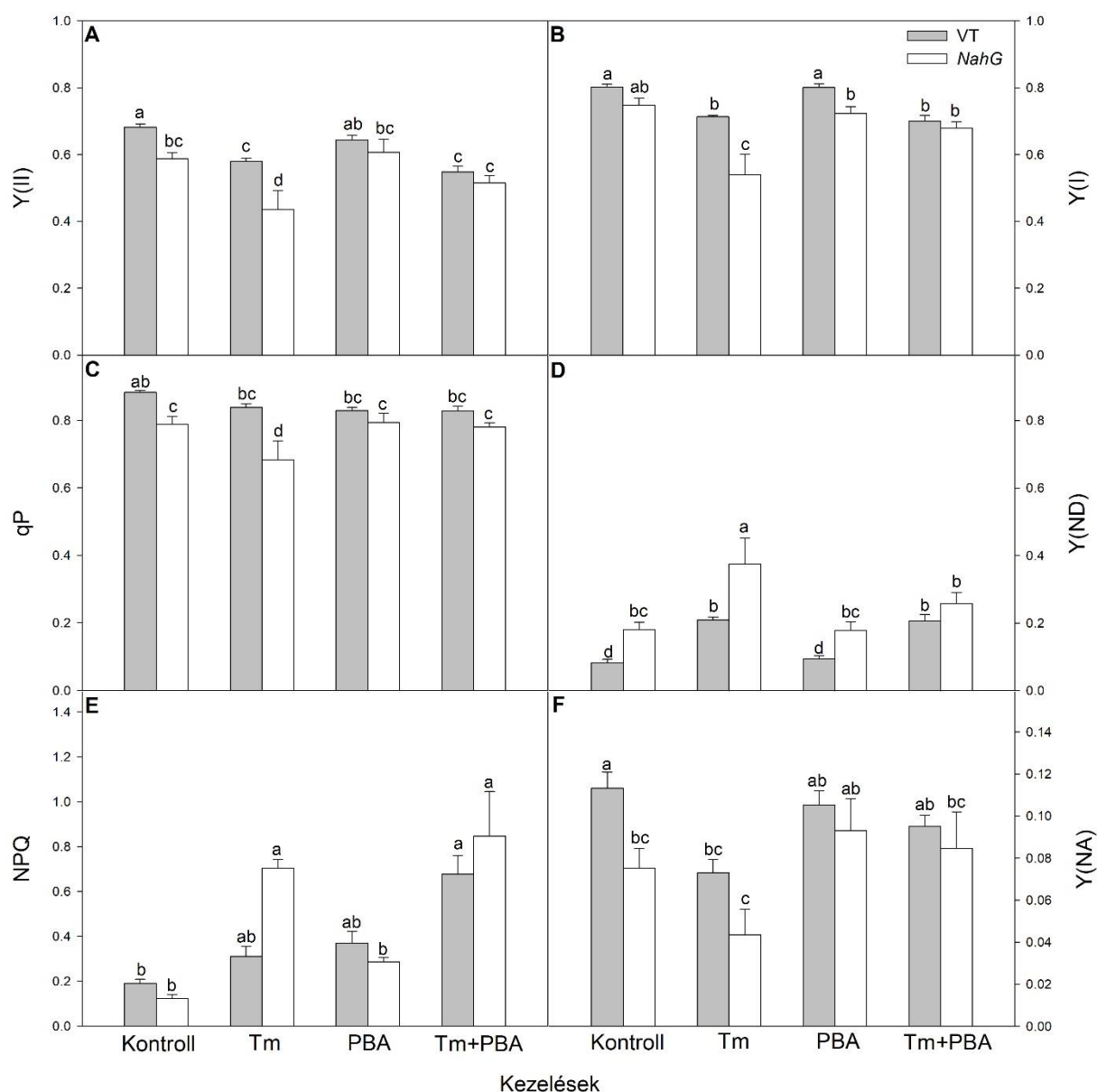
Kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy vajon az ER stressz hogyan hat a fotoszintetikus aktivitásra és ebben milyen szerepet játszhat az SA. Méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy a 24 órás Tm kezelés csak kismértékben csökkentette az F_v/F_m értéket a VT paradicsom növények leveleiben, azonban ez szignifikánsan csökkent az SA-hidroxilázt túltermelő *NahG* levelekben a kontrollhoz képest (43. ábra A). Az F_0 és F_m paraméterek nem változtak szignifikánsan a Tm és PBA kezeléseket követően a VT paradicsom növények leveleiben (43. ábra B, C), azonban ezek az értékek a PBA kezelés hatására alacsonyabbak voltak, mint a Tm+PBA kezelést követően a *NahG* levelekben (43. ábra B, C). Érdekes módon a q_L paraméter alapvetően magasabb volt a VT levelekben a *NahG* növényekhez képest, amit azonban a Tm szignifikánsan csökkentett ebben a paradicsom genotípusban, viszont a PBA kezelés szignifikánsan növelte azt a Tm mellett alkalmazva (43. ábra D).



43. ábra: A PSII maximális kvantumhatásfokának (F_v/F_m ; A), a sötétadaptált levelek minimális fluoreszcenciájának (F_0 ; B), a sötétadaptált levelek maximális fluoreszcenciájának (F_m ; C), és a PSII reakciócentrumok nyitott állapotú frakciójának (q_L ; D) változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve kombinált kezeléseiket követően (Átlag \pm SE, $n=6$). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A PSII effektív kvantumhasznosítását [$Y(II)$] szignifikánsan csökkentette a Tm kezelés a kontrollokhoz képest a VT és a *NahG* paradicsom növényekben egyaránt, mely csökkenés a transzgenikus növényekben volt a legnagyobb (44. ábra A). A PBA alkalmazása önmagában nem befolyásolta a $Y(II)$ paraméter értékét, és a Tm által kiváltott $Y(II)$ csökkenést csak a *NahG* genotípusban enyhítette (44. ábra A). A PSII-höz hasonlóan a PSI $Y(I)$ is szignifikáns csökkenést mutatott a Tm expozíció alatt nemcsak a VT-ban, hanem különösen a *NahG* levelekben, ahol a $Y(I)$ értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a Tm-kezelt VT növényekhez képest (44. ábra B). A PBA kezelés itt sem hatott önmagában a $Y(I)$ paraméterre, míg a *NahG* növények levelében mérsékelte a Tm-indukálta csökkenést (44. ábra B). Érdekes módon a fotokémiai kioltási együttható (qP) alapvetően alacsonyabb volt a *NahG* levelekben, mint a VT növényekében mértek (44. ábra C). Ennek ellenére a Tm kezelés csak a *NahG* növényekben csökkentette szignifikánsan a qP paraméter értékét, amit a PBA együttes alkalmazása a Tm-nel

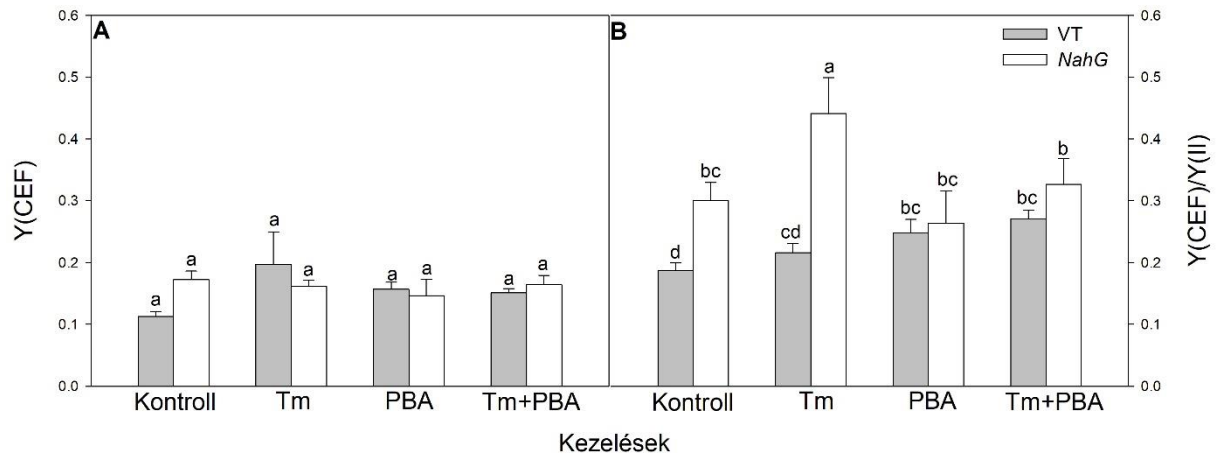
mérsékelt (44. ábra C). A nem-fotokémiai kioltás (NPQ) paraméter értéke a Tm és Tm+PBA kezelések hatására szignifikánsan megemelkedett a *NahG* növényekben a kontrollhoz képest, és a Tm+PBA együttes alkalmazása a VT növények leveleiben is növelte az NPQ értékét (44. ábra E). Ugyanakkor az NPQ változatlan maradt a Tm-indukálta ER-stresszben lévő VT növényekben (44. ábra E). A PSI donor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(ND)] értéke szignifikánsan megnőtt a Tm kezelésre, mely szignifikánsan a legmagasabb a *NahG* növények esetében volt (44. ábra D). A Y(ND) szintén szignifikánsan magas volt a Tm+PBA együttes kezelés hatására a VT levelekben, de alacsonyabb a *NahG* növényekben a Tm kezeléssel összehasonlítva (44. ábra D). Ugyanakkor a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(NA)] csökkenése volt megfigyelhető a Tm kezelés hatására mindkét paradicsom genotípusban (44. ábra F). Mindemellett a Y(NA) alapvetően alacsonyabb volt a *NahG* levelekben, mint a VT növényekben (44. ábra F). A PBA kezeléseknek nem volt szignifikáns hatása a Y(NA) fotoszintetikus paraméterre egyik genotípusban sem, összehasonlítva a megfelelő kontrollokkal (44. ábra F).



44. ábra: A PSII effektív kvantumhatásfokának [Y(II); A], a PSI kvantumhatásfokának [Y(I); B], a fotokémiai kioltás (qP; C), a PSI donor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(ND); D], a nem-fotokémiai kioltás (NPQ; E), és a PSI akceptor oldali limitációjából fakadó nem-fotokémiai kioltás kvantumhatásfokának [Y(NA); F] változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve kombinált kezeléseiket követően (Átlag \pm SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Érdekes módon a PSI körüli ciklikus elektronáramlást (CEF) csak kismértékben növelte a Tm kezelés a VT növényekben, és alapból kicsit magasabb volt a *NahG* növények levelében a VT kontrollhoz képest (45. ábra A). Ugyanakkor míg a $Y(\text{CEF})/Y(\text{II})$ szignifikánsan megnőtt a PBA kezelések hatására a VT növények levelében, addig a *NahG* növények esetében egyedül

a Tm emelte az értékét (45. ábra B). A Y(CEF)/Y(II) a kontroll levelek esetében azonban a *NahG* növényeknél alacsonyabb volt a VT kontrollhoz képest (45. ábra B).



45. ábra: A PSI körüli ciklikus elektronáramlás (CEF) kvantumhatásfokának (Y) mértéke, [Y(CEF); A] és a Y(CEF)/Y(II) (B) változása vad típusú (VT) és SA hiányos *NahG* paradicsom növények leveleiben 24 órás $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tm, 1 mM PBA, illetve kombinált kezeléseiket követően (Átlag \pm SE, n=6). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

6. Eredmények értékelése

6.1. A különböző időpontban alkalmazott gomba elicitor, kitozán kezelés hatása az SA jelátvitelére és a növények védekezésére

Kísérleteink során elsőként a CHT napszakfüggő hatását vizsgáltuk az SA jelátvitelére és a növények védekezésére. Az intakt paradicsom növények különböző levélemeleteit felhasználva nemcsak a lokális, hanem a szisztémikus hatást is teszteltük. A növények patogének elleni gyors védekezése szempontjából ugyanis a lokális és szisztémikus válaszok optimális időzítése kulcsfontosságú (Liu és mtsai. 2011). Korábban már leírták, hogy a CHT által indukált növényi védekezési válaszok SA-függők, mivel azok a *NahG* lúdfű növényekben nem voltak kimutathatók (Proadhan és mtsai. 2017). Először az SA markergénjének, a paradicsom *PR1* génnek az expresszióját vizsgáltuk meg a különböző időpontokban alkalmazott CHT kezeléseket követően. Az *SIPRI* relatív transzkript szintjének növekedése már hajnalban (5:00) elkezdődött a CHT-kezelt paradicsom levelekben, és a nappali korai világos szakaszban (9:00) érte el a maximumát. A legmagasabb *SIPRI* expressziót a 21:00 órákor, este a sötétben kezelt levelekben mértük másnap reggel 9:00 órákor, ami a CHT által kiváltott védekezési válaszok késleltetésére utal ezekben a növényekben, ahol a sztómák ekkor szintén bezáródtak. Ezzel szemben a hajnal 4:00 órákor végzett CHT kezelés egy órával később már szignifikáns *SIPRI* expresszió-növekedést okozott lokálisan és szisztémikusan egyaránt, és egyben gátolta a sztómanyitódást is hajnal 5:00 és reggel 9:00 órákor, mely a gyors védelmi válaszok aktiválódásának fényfüggését igazolja. Korábbi vizsgálatok ugyanis azt bizonyították, hogy a CHT gátolja a fény által kiváltott sztómanyitódást és indukálja a sztómazáródást lúdfűben (Lee és mtsai. 1999; Srivastava és mtsai. 2009; Khokon és mtsai. 2010). Ez a reggeli időpont kulcsfontosságú lehet a növények védekezési válaszainak szempontjából, mivel a reggeli sötét/világos átmenet során mind a vörös, mind pedig a kék fény serkenti a sztómák reggeli nyitódását, ami elősegíti a transzspirációt és a CO₂ felvételét a fotoszintézishez (Shimazaki és mtsai. 2007). Ezenkívül a fény hatására a zárósejtek kloroplasztisaiban keletkező ATP hozzájárulhat a növények fényfüggő sztómanyitódásához is (Suetsugu és mtsai. 2014). Ismert azonban, hogy a CHT kezelés csökkenti a lineáris elektrontranszport sebességét (ETR) és az ionszatórnák aktivitását is a lóbab (*Vicia faba* L.) zárósejtjeiben, így hozzájárul a sztómazáródás indukálásához és/vagy a fény által kiváltott sztómanyitódás gátlásához (Ördög és mtsai. 2011). Ezenkívül kimutatták, hogy a CHT erőteljes ROS és NO termelést okoz a sztómákban, melyek a sztómazárás indukációjának jelátviteli elemei (Srivastava és mtsai. 2009). Eredményeink arra

is rávilágítanak, hogy a CHT kezelések minden esetben sztómazáródást eredményeztek a hajnali vizsgálati időpontban. Ez a CHT kezelésre adott növényi válasz jelentős lehet, mivel a normál hajnali sztómányitódás fertőzési ablakot biztosíthat egyes kórokozók számára. Így a sztómányitódás gátlása vagy a sztómazárás elősegítése az egyik legkorábbi védekezési reakciója a növényeknek, gátolva ezzel számos kórokozó behatolását a levél szöveteibe (Karapetyan és Dong, 2018).

Ezzel szemben a CHT-kezelt levelekben a késő délutáni órákban a sztómák pórusátmérője nem tért el szignifikánsan a kontrolloktól, ami szintén a CHT által indukált védekezési válaszok napszakfüggő voltára utal. Délután ugyanis a sztómák elkezdnek bezáródni, és befejezik a fotoasszimilátumok felhalmozását (Lawson, 2009). Ez a természetes cirkadián óra-regulálta változás felülírhatja a CHT által kiváltott sztómamozgást délután. A sztómák nyitását és zárását meghatározó JA/SA hormonegyensúly ugyanis eltérő délutánonként, ahol a JA szintek mutatnak maximumot (Goodspeed és mtsai. 2012). Ezenkívül a szacharóz szintén fontos kapcsolóelem a sztómányílás méretének változása és a fotoszintézis között (Kang és mtsai. 2007), mely a legnagyobb koncentrációban a fényfázis közepe táján, délután figyelhető meg. Bár a szacharózkoncentráció változása döntően befolyásolhatja a sztómák nyitottságát, de a mögöttes jelátviteli mechanizmusok még nem tisztázottak teljes mértékben (Daloso és mtsai. 2016).

A cirkadián szabályozás és a fény hatásainak megkülönböztetésére sötét kezelést alkalmaztunk a világos fázisban, reggel 8:00 órakor. A CHT kezelés 1 órán belül szignifikáns *SIPRI* expressziót indukált a fényben lokálisan és szisztemikusan is. Mások szintén az SA által közvetített gyors szisztemikus választ figyelték meg 2 órán belül a baktériumfertőzött lokális levelektől távolabbi levelekben dohány növényeket felhasználva (Jelitto-Van Dooren és mtsai. 1999). Ezek alapján eredményeink arra utalnak, hogy a CHT kezelést követő első óra döntő jelentőségű lehet a szisztemikus válasz kialakulásában. Ezzel szemben a sötétség gátolta az *SIPRI* relatív transzkript szintjének növekedését a CHT kezeléseket követően, ami arra utal, hogy a CHT által kiváltott SA-függő védekezési válaszok fényfüggők lehetnek. Az *SIPRI* expresszió változásához képest a sötétség viszont természetes módon fokozta a sztómazárást (Desikan és mtsai. 2004). Mások azt bizonyították, hogy a CHT-indukált *PR1* expresszió egy napon belül figyelhető meg, például rizs szuszpenziós sejtenyészetben (Lin és mtsai. 2005), sárgarépa levélben (Jayaraj és mtsai. 2009), vagy kivi gyümölcsében (Hua és mtsai. 2019), de a CHT napszak- és fényfüggő hatásait ezidáig intakt növények különböző levélszintjeit felhasználva még nem vizsgálták.

Számos tanulmány igazolta, hogy a CHT kezelések hosszú távú, akár napokig tartó hatást fejtenek ki a növényekben (Ben-Shalom és mtsai. 2003; Manjunatha és mtsai. 2009). Ugyanakkor a CHT kezeléseket követő első óráknak döntő jelentősége lehet a gyors szisztemikus védekezési válaszok kialakításában és optimalizálásában, különösen a gyors ROS-produkció által (Devireddy és mtsai. 2020). Kimutatták, hogy a H₂O₂ felhalmozódása és a citoszolikus NAD(P)H elérhetősége szükséges a CHT által kiváltott sztómazáródáshoz, mely során a ROS szint már 5 perc elteltével elkezdett emelkedni a sztómákban (Iriti és mtsai. 2009; Li és mtsai. 2009; Srivastava és mtsai. 2009). A CHT által kiváltott oxidatív robbanás általában a kezelést követő első órán belül mutat csúcsot. A H₂O₂ akkumulációja a CHT alkalmazását követően rövid időn belül elérte a maximumot; 12 perc után búza sejttenyészetben, 30 perc után *Brassica napus* levelekben és 50 perccel később rizs szuszpenziós sejttenyészetben (Lin és mtsai. 2005; Paulert és mtsai. 2010; Yin és mtsai. 2013). Rossard és mtsai. (2010) leírták, hogy a CHT kezelés utáni H₂O₂-produkció nem korlátozódott kizárólag a kezelés első fázisára. *Beta vulgaris* levélkorongokkal végzett kísérletek alapján kimutatták ugyanis, hogy a H₂O₂-produkció kettős csúcsot mutatott, 1 órával a kezelés után, és egy elhúzódó, 4 óra után észlelhető második csúcsot, részben a Cu/ZnSOD-aktivitás fokozódásának köszönhetően (Rossard és mtsai. 2010). Érdekes módon kísérletünkben a H₂O₂ szintek nem mutattak szignifikáns változást 1 órával a CHT-kezelések után, viszont a szuperoxid-gyökion-produkció fokozódott a paradicsom növényekben lokálisan, ami a szisztemikus levelekben még kifejezettebb volt. Ez a sötétben elmaradt, ami arra utal, hogy a fény kulcsszerepet játszik a CHT-indukálta ROS-produkcióban a rezisztencia kialakulásának kezdeti szakaszában. CHT-kezelt *Artemisia annua* növények segítségével leírták a különböző ROS-helyi termelődésének időbeli változásait is, ahol az eredményeinkhez hasonlóan gyors és folyamatos szuperoxid-gyökion-produkció volt megfigyelhető közvetlenül a kezelés után, míg a H₂O₂-tartalom csak órák múlva kezdett emelkedni, és csak 24 órával később érte el a maximumát (Lei és mtsai. 2011). Mindezen megfigyelések a H₂O₂ helyett a szuperoxid-gyökionnak tulajdonítanak kulcsszerepet a növények védekezési reakcióinak gyors indukciójában a CHT-kezelést követően, bizonyos növényfajokban. A korai és magas szuperoxid-gyökion-produkcióról bizonyították, hogy az a NADPH-oxidáz direkt CHT általi aktiválódásának köszönhető, míg az antioxidáns rendszer, például a glutation-peroxidáz (GPX), a KAT és az APX indukciója csökkentheti a H₂O₂-szintet a CHT-kezeléseket követően a növényekben (Prasad és mtsai. 2017; Turk, 2019; Xu és mtsai. 2020). Emellett a gyors szuperoxid-gyökion-akkumuláció és a késleltetett H₂O₂-termelés a SOD viszonylag lassú aktiválódásával is magyarázható (Lei és mtsai. 2011).

A védekezéshez szükséges PR fehérjék az ER-en keresztül szintetizálódnak, ahol stressz körülmények között fokozódik a BiP chaperon felhalmozódása, még mielőtt megemelkedik a PR fehérjék transzlációja (Carvalho és mtsai. 2014). Az ER stresszt kiváltó, rosszul feltekeredett vagy fel nem tekeredett fehérjék felhalmozódása mérsékelhető az UPR során, amelyben a BiP fehérjék akkumulációja kulcsfontosságú szerepet játszik, ezáltal fontos UPR markerként is funkcionál (Cheng és mtsai. 2015). Számos tanulmány igazolta a folyamatban az SA kulcsszerepét (Wang és mtsai. 2005; Nagashima és mtsai. 2014; Lai és mtsai. 2018). A CHT által kiváltott BiP felhalmozódásról először Malerba és mtsai. (2012) számoltak be platán sejtszuspenzióban, amely jelentős változásokat okozott az ER szerkezetében. Eredményeink alapján mi is fokozott *SlBiP* transzkriptum felhalmozódást figyeltünk meg a CHT kezelések után, ami ER stressz és UPR indukciójára utal a CHT kezelést követően a paradicsom növényekben. Mások is gyors *BiP* expressziót tapasztaltak mind lokálisan, mind pedig szisztémikusan *Erwinia carotovora* által kiválasztott sejtfaldegradáló enzim hatására, ami átmeneti volt, és egy másik PR fehérje, a β -1,3-glükánáz indukciója előtt volt kimutatható dohányban (Jelitto-Van Dooren és mtsai. 1999). A BiP felhalmozódása általában szoros korrelációt mutatott a génexpressziós adatokkal, azonban ebben az időpontban a fehérjeszintek különbségei nem voltak elég markánsak ahhoz, hogy szignifikáns következtetéseket vonjunk le belőlük. Az *SlBiP* fokozott expresszióját a CHT-kezelt levelekben a fény hiánya nem befolyásolta jelentősen, ami arra utal, hogy a BiP CHT-indukálta expressziója független a fény jelenlététől. A szisztémikus *SlBiP* expressziót és BiP fehérje felhalmozódást korábban még nem írták le, ami további adatot szolgáltat a CHT által kiváltott védekezési válaszok pontosabb megértéséhez intakt növényekben.

6.2. Az SA kezelések fényfüggő hatása a ROS metabolizmusára

Az SA kapcsán jól ismert a hormon faj-, szerv-, koncentráció- és időfüggő hatása, azonban fényfüggő hatása kevésbé kutatott (Rivas-San Vicente és Plasencia 2011; Khan és mtsai. 2015; Sharma és mtsai. 2023). A fény, mint energiaforrás, döntően befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást, ezáltal pedig stressz esetén a különböző ROS keletkezését és metabolizmusát, elsősorban a kloroplasztisz, másodsorban más sejtorganellumok, mint például a mitokondriumok és az ER működése révén (Love és mtsai. 2008; Seyfferth és Tsuda, 2014; Van Aken és Van Breusegem, 2015; Cheng és mtsai. 2016;). Éppen ezért fontos vizsgálni és megérteni, hogy egy-egy hormon, mint például az SA hogyan befolyásolja a növények védekezését vagy a sejthalál folyamatát fényben és sötétben, és a folyamatban a ROS és a ROS

metabolizmusa hogyan és milyen sejtorganellumokhoz kapcsolódva vesz részt. Ismert ugyanis, hogy az SA által indukált védekezési folyamatok a növényekben fényfüggők, a sötétben a ROS és az általuk kialakított HR késve és kisebb mértékben jelentkezik a fényben mértékhez képest *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* fertőzés során lúdfüben (Genoud és mtsai. 2002). Igazolták azt is, hogy az első 24 óra döntő jelentőségű a fertőzéseket követően az SA által indukált lokális és szisztémikus válaszok kialakításában lúdfüben (Liu és mtsai. 2011). Éppen ezért vizsgálataink során ezt az időintervallumot céloztuk meg feltérképezni. A különböző MAMP- és PAMP-ok hatására ugyanis az első órában percekben belül aktiválódik a NADPH-oxidáz, hozzájárulva a gyors ROS produkcióhoz, mely a lokális sejtválasz kialakítása mellett a szisztémikus jel propagációjában is részt vesz (Mittler és mtsai. 2011; Dubiella és mtsai. 2013; Devireddy és mtsai. 2020; Fichman és mtsai. 2023). Emellett azt is kimutatták, hogy fertőzések esetén az SA akkumuláció és az SA által indukált jelátvitel egy korai (0-6 óra) és egy későbbi (6-24 óra) fázist mutat a növényekben a transzkripció változások és a kromatin átrendeződés alapján (van den Burg és Takken, 2009). Munkánk során két különböző koncentrációjú SA kezelés hatását vizsgáltuk (0,1 mM; 1 mM), mivel korábbi eredményeink alapján a 0,1 mM SA kezelés hatékonyan bizonyult kémiai edzésként a másodlagos sóstressz káros hatásai ellen paradicsomban (Tari, 2002; Szepesi és mtsai. 2005; Szepesi és mtsai. 2009; Gémes és mtsai. 2011), míg az 1 mM SA kezelés PCD-t indukált a paradicsom növényekben 24 órán belül (Poór és mtsai. 2011, 2013).

A vizsgálataink első lépéseként azt néztük meg, hogy a különböző koncentrációjú exogén SA kezelések hogyan befolyásolják a paradicsom növények kifejlett leveleinek endogén SA szintjét az idő függvényében fényben a normál fotoperióduson mérve és sötétben. A 0,1 mM SA kezelést követően az endogén SA szintek 24 órán belül majdnem százszorosra nőttek, míg az 1 mM SA kezelés hatására több mint ezerszeresre. A 0,1 mM SA kezelés hatására az endogén SA szintek már a 6 órában elérték a maximumot, míg az 1 mM SA kezelés hatására a 24. órában volt ez megfigyelhető. Gharbi és mtsai. (2016) hasonló megfigyelést tettek, mely szerint az exogén 0,1 mM SA-val történő kezelés százszorosára emelte az endogén SA tartalmakat az azonos genotípusú paradicsom növényekben. Ugyanakkor méréseink alapján az SA kezeléseket követő 24. órára a szabad és teljes SA tartalmak esetében a fényen és sötétben történt kezelések között nem volt szignifikáns különbség, így a fény jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az endogén SA akkumulációt.

Az exogén SA kezelések növényekre gyakorolt letális hatását az ionkieresztés és a lipidperoxidáció változásai alapján követtük nyomon. Méréseink alapján az 1 mM SA kezelés indukált visszafordíthatatlan sejtpusztulást az ionkieresztés változása alapján (>40%), mely a

fényben történt kezelést követően volt a legjelentősebb 24 óra után. Korábbi méréseink alapján szintén az 1 mM SA kezelés indukált jelentős ionkieresztést és sejthalált paradicsom sejtuszuspenzióban (Poór és mtsai. 2013). Ezzel szemben a 0,1 mM SA kezelés nem okozott szignifikáns változást a paradicsom levelek sejtmembrán integritásában. Az 1 mM SA kezelés hatására bekövetkező ionkieresztés fokozódásával párhuzamosan nőtt a lipidperoxidáció mértékét jelző MDA tartalom is, amely az oxidatív károsodás egyik fő indikátora (Sharma és mtsai. 2012). Az MDA tartalom már a 6. órában fokozódott és a 24. órára még tovább nőtt az 1 mM SA kezelés esetében, mely szintén magasabb volt a fényben a sötétben történt kezeléshez képest. Eredményeink tehát nemcsak az SA membránintegritásra, az oxidatív stresszre és a sejthalál indukcióra gyakorolt hatásának koncentrációfüggését erősítik meg, hanem annak fényfüggő hatására is utalnak.

Méréseink során azt is kimutattuk, hogy az alkalmazott SA kezelések az idő függvényében befolyásolják a szuperoxid-gyökionon termelést és a H₂O₂ szinteket a paradicsom növények leveleiben, melyek a fény jelenlétében vagy hiányában másként alakulnak. Eredményeink megerősítették, hogy az SA kezelések gyors ROS termelést indukálnak a növényekben és már a kezeléseket követő első órában szignifikánsan fokozódott a szuperoxid-gyökionon termelés mindkét alkalmazott SA kezelés esetében, mely a 24. órában csak a magasabb, 1 mM SA kezelést követően volt kimutatható. Ezzel párhuzamosan a H₂O₂ szintek is nőttek az SA-kezelt levelekben a fényen, és később, kisebb maximummal mutatott csúcsot a sötétben. Az 1 mM SA kezelés magasabb szuperoxid-gyökionon és H₂O₂ akkumulációt indukált a megvilágított levelekben, mint a 0,1 mM SA vagy a sötétben történt 1 mM SA kezelés. A kezdeti ROS termelés hiánya a sötétben a letális SA koncentráció alkalmazása mellett arra utal, hogy az SA-indukálta ROS termelés nagymértékben függ a fény jelenlététől. Van Aken és Van Breusegem (2015) tanulmánya megerősíti, hogy a ROS termelés korai csúcsa közvetve a plazmamembrán-lokalizált NADPH-oxidáz vagy más energiatermelő sejtorganellektől származik, mint például a kloroplasztiszok vagy a mitokondrium. Korábban megfigyelték, hogy a biotikus stressz által kiváltott kétfázisú ROS termelés megelőzte a sejthalált a növényekben. Ennek részeként a ROS szintjének első maximumát percekkel a kezdeti inger után mérték, a második, intenzívebb robbanás pedig néhány órával később következett be a stressz hatására (Dat és mtsai. 2003; Van Aken és Van Breusegem, 2015). Az első maximum egy iniciáló robbanás („priming burst”), amely beindítja a sejthalál folyamatát a sejtekben. A ROS termelés hasonló kinetikáját mértük korábban a letális sóstressznek kitett paradicsom növényekben (Takács és mtsai. 2017), és kétfázisú

etiléntermelést figyeltek meg H₂O₂ kezelésnek kitett dohánylevél korongokban is, ami súlyos szövetelhaláshoz és PCD-hez vezetett (Wi és mtsai. 2010).

A ROS produkcióban kitüntetett szereppel bírnak a plazmamembrán-lokalizált növényi NADPH-oxidázok (RBOH), melyek apoplasztikus ROS-t termelnek azáltal, hogy az apoplasztban a molekuláris oxigént szuperoxid-gyökönionra redukálják, és redukálószerként citoplazmatikus NADPH-t használnak fel. A lúdfű genomjában 10 *RBOH*-kódoló gén található, melyek kapcsán kimutatták, hogy a különböző izoformák eltérő folyamatokban vehetnek részt. Ezek az enzimek felelősek a gyorsan mozgó ROS jel generálásáért az apoplasztban, ezáltal közvetítve a szisztemikus stresszválaszt számos abiotikus és biotikus stressz esetén (Jasper és Kangasjärvi, 2010). A paradicsom növényben leírt RBOH1 egy olyan homológ, amelyet a Ca²⁺ és a Ca²⁺-függő foszforiláció aktivál (Sagi és Fluhr, 2006). Az SA NADPH-oxidáz aktivitásra és ROS produkcióra gyakorolt hatását már korábban leírták (Agarwal és mtsai. 2005), de sötétben eddig még nem vizsgálták. Méréseink alapján a NADPH-oxidáz aktivitást már az 1. órától kezdődően fokozta az 1 mM SA kezelés, de csak a 6. órától emelkedett meg szignifikánsan a 0,1 mM SA kezelés esetében a fényen. A NADPH-oxidáz alegységét kódoló *SIRBOH1* gén expressziója szintén fokozódott mindkét koncentrációjú SA kezelés hatására már az első órában a fényen. Sötétben azonban az 1 mM SA kezelés esetében korai expresszió-növekedést figyeltünk meg, ami enzimaktivitás szinten elmaradt. Ez arra utal, hogy míg az *SIRBOH1* gén expresszióját mindkét SA kezelés fokozta a megvilágított növényekben, addig az enzimaktivitás nagyobb mértékben nőtt a sejthalált indukáló SA koncentrációnál, azonban csak a fényben. A NADPH-oxidáz működése közben termelődött szuperoxid-gyökönion a sejtfalban H₂O₂-vé alakulhat különböző enzimek közreműködésével, mint például a peroxidázok, az oxalát-oxidáz és amin-oxidázok hatására (Jimenez-Quesada és mtsai. 2016). A NADPH-oxidáz által termelt ROS a kloroplasztisz ROS produkcióval is kapcsolatba kerülhet (Miller és mtsai. 2009). A fotoszintetikus elektrontranszport gátlása stressz körülmények között túlzott gerjesztési energiához és ROS képződéshez vezethet, ami befolyásolhatja a redox homeosztázist patogéntámadás és abiotikus stressz esetén is. Így a szövetek megvilágítása és ennek következtében a kloroplasztiszok által generált ROS a sejthalál egyik modulátora lehet. Emellett azt is megfigyelték, hogy a HR indukációjának részei a kloroplasztiszból származó és az SA által indukált jelek, valamint azok kölcsönhatása is (Genoud és mtsai. 2002). Korábban megfigyeltük, hogy az SA fokozta vagy nem befolyásolta szignifikánsan a paradicsom növények fotoszintetikus aktivitását 0,001-0,1 mM koncentráció intervallumban, de fotoinhibíciót okozott az 1 mM SA, mely gátolta a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működését paradicsom növények levelében (Poór és mtsai. 2011). Ez azt jelenti, hogy a

fotoszintetikus apparátus ROS produkciója megnövekedett a letális SA koncentráció alkalmazása esetében. Mivel az antioxidáns enzimeket kódoló gének és a nem-enzimatikus antioxidánsok szintézisében részt vevő gének a sejtmagban kódoltak, a kloroplasztiszokból származó jelek, mint például a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének gátlása, a redox homeosztázis változásai, a szinglett oxigén fokozott termelése és más ROS produkciója (szuperoxid-gyökanion és H_2O_2) át kell, hogy jussanak, mint jelek a sejtmagba (Mittler és mtsai. 2011). Ez a retrográd jelátvitel az SA-indukált jelátvitellel kombinálva eredményezi a védekező gének aktiválódását, vagy indukálja a genetikailag kódolt sejthalált.

A növények több olyan antioxidáns enzimmel rendelkeznek, amelyek a ROS mennyiségét a káros szint alatt tartják. A folyamat első lépéseként a szuperoxid-gyökaniont molekuláris oxigénné és H_2O_2 -vé történő dizmutációt a SOD izoenzimek végzik (Alscher és mtsai. 2002). Méréseink alapján csupán az 1 mM SA kezelés fokozta szignifikánsan a SOD aktivitását az SA kezelések korai fázisában a fényben. Ezzel szemben az SA kezelések 24. órájában mindkét alkalmazott SA kezelés növelte a SOD aktivitást a paradicsom növények leveleiben. Jól ismert, hogy az egyes SOD izoenzimek egymástól függetlenül szabályozódnak a különböző sejtorganellumokban (Attia és mtsai. 2009). Méréseink alapján leginkább a kloroplasztikus *SICu/ZnSOD* és a mitokondriális *MnSOD* gének expressziója fokozódott az 1 mM SA-val kezelt levelekben a fényen, míg a 0,1 mM SA kezelés esetében nem volt jelentős változás kimutatható. Ez arra utal, hogy az oxidatív stressz aktiválhatja a kloroplasztikus *Cu/ZnSOD* és a mitokondriális *MnSOD* expresszióját a fényen. Hasonló eredményeket kaptak mások is a Cu/ZnSOD és MnSOD aktivitás vizsgálata kapcsán oxidatív stressz alatt, metilviologénnel kezelt lúdfű növényekben (Alscher és mtsai. 2002).

A SOD által termelt H_2O_2 káros szintjét több enzim, például a KAT, az APX vagy a POD regulálhatja. A KAT-ok fő csoportjai közül az I. osztályú KAT enzimek erősen expresszálódnak a levelekben, fényfüggők és részt vesznek a fotorespiráció során keletkező H_2O_2 eltávolításában. A II. osztályú KAT enzimek főként a vaszkuláris szövetekben találhatóak, a III. osztályba tartozó KAT enzimek pedig a peroxiszómákban lokalizálódnak. Egyes KAT izoenzimek expresszióját a cirkadián óra szabályozza (Luna és mtsai. 2005). Ismert, hogy a KAT fehérje érzékeny a fotoinaktivációra, ami az enzimaktivitás csökkenéséhez vezet, emellett bizonyított, hogy a KAT aktivitását az SA gátolja (Agarwal és mtsai. 2005; Horváth és mtsai. 2007; Tari és mtsai. 2015). Érdekes módon mindkét koncentrációjú SA kezelés már az 1. órától gátolta a KAT enzim aktivitását a paradicsom növények leveleiben, és ez független volt a megvilágítástól. Ezenkívül mindkét koncentrációjú SA kezelés csökkentette az *SIKAT1* és *SIKAT3* gének expresszióját 6 óra elteltével a fényben.

A másik H_2O_2 -semlegesítő enzim, az APX aktivitása mutatta a legjelentősebb fényfüggést az SA kezeléseket követően. Az első órában az APX aktivitás nem változott szignifikánsan az SA kezeléseket követően a fényben, ami a KAT aktivitás gátlásával párhuzamosan hozzájárulhat a H_2O_2 felhalmozódásához. Később, a 6. és 24. órában az APX aktivitás nőtt és a citoszolikus izoenzimeket kódoló *SIAPX1* és *SIAPX2* gének relatív transzkript szintje is megemelkedett a megvilágított levelekben az 1 mM SA kezelés esetében. Érdekes módon az APX aktivitása csak kismértékben változott a sötétben. Korábban azt bizonyították, hogy az SA nemcsak az APX aktivitást, hanem az aszkorbát-tartalmat is megnövelte számos növényben, amely az APX enzim koszubsztrátjaként fontos szerepet tölt be abban, hogy az enzim katalizálja a H_2O_2 vízzé történő átalakulását az aszkorbát-glutation ciklus részeként (Khan és mtsai. 2015). Hasonló eredményeket kaptunk az AsA felhalmozódásában az SA előkezelést kapott és sóstressznek kitett paradicsom növényekben is (Tari és mtsai. 2015). Ugyanakkor az SA APX aktivitásra gyakorolt fényfüggő hatását eddig még nem vizsgálták. Az APX aktivitás változásához hasonlóan a POD aktivitása szintén szignifikánsan megemelkedett az 1 mM SA kezelés hatására, de csak később, a 24. órában, mindkét környezeti körülmény között, viszont magasabb szinttel a fényben. A POD aktivitás viszont hozzájárulhat a H_2O_2 sötétben történő lebomlásához, ami különösen fontos KAT és APX indukció hiányában az SA kezeléseket követően.

6.3. Az SA kezeléseknél fényfüggő hatása a fotoszintetikus aktivitásra és a kloroplasztiszokra

A ROS metabolizmus alakulásában kulcsszerepet játszanak a kloroplasztiszok és a fotoszintetikus aktivitás (Mateo és mtsai. 2006; Love és mtsai. 2008; Janda és mtsai. 2014; Seyfferth és Tsuda, 2014), így az SA ezekre gyakorolt hatását, valamint annak fényfüggését vizsgáltuk a továbbiakban.

Eredményeink azt mutatták, hogy az 1 mM SA-val végzett exogén kezelés az F_v/F_m érték szignifikáns csökkenését okozta, függetlenül attól, hogy a kezelés során jelen volt-e vagy hiányzott a fény. Meglepő módon a 0,1 mM SA kezelés szignifikáns hatást gyakorolt a q_L paraméterre azáltal, hogy fokozta a PSII reakciócentrumainak zárását a 24 órás sötét inkubáció után. Korábban már megfigyeltük, hogy az SA koncentrációfüggő módon (Poór és mtsai. 2011) és az idő függvényében (Poór és Tari, 2012) csökkentette az F_v/F_m értéket a paradicsom növényekben, de ez a hatás függhet a fényintenzitástól (Karpinski és mtsai. 2013). Ez azonban az első megfigyelés, amely szerint a 24 órás sötét inkubáció is befolyásolta az SA hatását a

fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitására. Ezenkívül korábban csupán néhány tanulmány vizsgálta az SA hatását a PSI aktivitására (Janda és mtsai. 2012), a részletes ismereteink a hormon kapcsán még hiányosak.

A vizsgált fotoszintetikus paraméterek közül a Y(II) és Y(I) a sötétben kezelt mintákban a 0,1 mM SA-val történő kezelés hatására szignifikánsan lecsökkentek, mellyel párhuzamosan nőtt a Y(CEF) és a Y(NPQ), mely azonban a Y(NO) jelentős növekedésével is együtt járt. Ezek a változások párhuzamosan magasabb Y(ND) értékkel jelentkeztek, míg a Y(NA) nem változott szignifikánsan, ami azt jelenti, hogy a Y(I) leszabályozottsága PSII eredetű. A fokozódó CEF védelmet nyújthat a PSII fotoinhibíciója ellen azért, hogy a tilakoid membránon keresztül nagyobb proton gradienst generál az elektronok átvitelével a PSI-ről a plasztokinonra (Takahashi és mtsai. 2009). A CEF-nek azonban fontos szerepe van a PSI fotoinhibíciójának megelőzésében is, mivel a felesleges elektronáramot az oxigénre is disszipálhatja, ami szuperoxid-gyököniont generálhat. A szuperoxid-gyököniont ezután a víz-víz ciklus mechanizmusa ártalmatlanítja (Ort és Baker, 2002). Az SA hatására bekövetkező Y(NPQ) növekedés jól jelzi a fotoprotektív mechanizmusok aktiválódását, amelyek leginkább a xantofill ciklushoz és a tilakoid membránokon átívelő ΔpH kialakulásához kapcsolódnak. Habár a Y(CEF) és Y(CEF)/Y(II) változása pozitív korrelációt mutat a Y(NPQ) értékével (Miyake és mtsai. 2010; Lei és mtsai. 2014; Zhang és mtsai. 2014), a tilakoid membránokon átívelő ΔpH kialakulását és ezáltal a Y(NPQ) növekedését részben CEF-független mechanizmusok (pl.: NAD(P)H-oxidoreduktáz-függő fotorespiráció) (Miyake és mtsai. 2010) vagy akár más, ΔpH -független folyamatok (Jahns és Holzwarth, 2012) indukálhatják a magas koncentrációjú SA kezeléseket követően a sötétben. Ugyanakkor a 0,1 mM SA kezelés csak nagyon kis változást okozott a fényben alkalmazva a Y(II) és Y(I), a Y(NPQ) és a Y(ND) fotoszintetikus paraméterek tekintetében.

A Y(II) és Y(I) paraméterek értékeit az 1 mM SA kezelés szintén csökkentette a paradicsom növények leveleiben, azonban ezek a csökkenések eltérő háttérfolyamatra utalnak a fényen és a sötétben kezelt növények esetében. A fényen történt kezelések esetében a magas CEF által indukált NPQ hatékonyabban védheti a fotokémiai rendszereket. Ezzel szemben a sötétben kezelt levelek esetében a CEF kevésbé volt hatékony, ezért a Y(NO) jelentősen megnőtt. Ezek a megfigyelések az F_0 enyhe növekedésével párhuzamosan arra utalhatnak, hogy a PSII szuperkomplex károsodhatott az SA kezelés hatására. Az NPQ mechanizmusok azonban képesek eloszlatni az LHCII által elnyelt többletenergiát, és az antioxidáns rendszerrel együttműködve enyhíteni tudják az SA által indukált ROS fotoszintetikus apparátusra gyakorolt káros hatásait (Müller és mtsai. 2001). Eredményeink alapján az SA kezeléseket mind a Y(CEF)-

et, mind pedig a Y(NPQ)-t szignifikánsan fokozták, különösen a sötétben alkalmazott 0,1 mM SA kezelés esetében, ami arra utal, hogy a sötét inkubáció után nagyobb szükség van a fényvédő mechanizmusok aktivációjára. Korábban lucfenyőben éjszaka vizsgálták a fény hiányának hatását a klorofill fluoreszcencia paraméterekre (Roháček és Barták, 1999). Ekkor azt találták, hogy a klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek közül már 6 óra sötétség után megnövekedett az NPQ értéke, ami csökkent Y(II) értékkel társult. A fotoszintetikus apparátus SA kezelés által kiváltott károsodását a fokozott fotoprotektív mechanizmusok is enyhíthetik, amelyek sötétben az alacsonyabb SA koncentráció esetében még hatékonyabbak voltak. Az SA expozíció ilyen körülményei között a klorofill *a+b* és karotinoid tartalmak nem csökkentek szignifikánsan, így ezek nem befolyásolják a klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek változásait.

A fotoszintetikus termékek felhalmozódása is eltérő volt az SA kezeléseket követően a két különböző környezeti tényező mellett a vizsgált paradicsom növények leveleiben. A sötétség szignifikánsan csökkentette a keményítő- és oldható cukortartalmat a kontroll levelekben, de ezt az SA kezelés nem befolyásolta jelentősen a sötétben. Az SA kezeléseket azonban jelentős változásokat okoztak a szénhidrát-tartalomban a fényben alkalmazva. Az 1 mM SA kezelés szignifikánsan csökkentette a keményítő tartalmat, de növelte ezekben a levelekben az oldható cukortartalmat. A szacharóz és a glükóz magas szintje kiválthatja a levelek öregedését és fokozhatja a programozott sejthalált (van Doorn, 2008), így a keményítősintézis hiánya és az oldható cukrok egyidejű felhalmozódása hozzájárulhat a sejthalál megindításához a magasabb, 1 mM-os SA koncentráció esetében.

A kloroplasztiszok morfológiájára gyakorolt káros SA hatást elsőként árpa (*Hordeum vulgare* L.) növényekben írták le (Uzunova és Popova, 2000). A mi eredményeink paradicsom növények leveleiben azonban elsőként igazolták, hogy a kloroplasztiszok szerkezetére gyakorolt SA hatás a fény jelenlététől vagy hiányától is függ. Az SA kezeléseket az alkalmazott koncentrációk függvényében csökkentették a kloroplasztiszok területét a fényben, de ez a paraméter állandó és független maradt az SA kezelésektől a sötétben. A kloroplasztiszok alakját és területét is meghatározhatja azonban a keményítőszemcsék jelenléte és mennyisége, amit a napiritmus is szabályoz (Gebauer és mtsai. 2017; O'Leary és mtsai. 2017). Érdekes módon a kloroplasztiszok területe a keményítőszemcsék számával párhuzamosan jelentősebben csökkent a fényben, de a gránumok magassága a sötétben történt SA expozíció után még erőteljesebben csökkent a fényben mértékhez képest. Ezenkívül megfigyelhettük a tilakoid membránok hosszú, hullámos torzulását és a lumen tágulását az 1 mM SA kezelést követően a fényben. A gránumok szerkezeti stabilitása és optimális mérete a PSII-LHCII szuperkomplex

kialakulásától függ (Kirchhoff, 2014). Éppen ezért a PSII-LHCII szuperkomplex változásai, mint például az LHCII számának csökkenése (Kim és mtsai. 2009) és/vagy a PSII mennyiségének csökkenése (Iwai és mtsai. 2014) befolyásolják a gránumok képződést és csökkentik azok méretét. Ezenkívül a fotoszintetikus membránok gazdagok nem-foszfortartalmú és töltetlen glicero-glikolipidekben. Ezeknek két fő típusa, a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG) és a digalaktozil-diacilglicerol (DGDG) szintén szerepet játszik a kloroplasztiszok fotokémiai rendszereit felépítő fehérjekomplexek stabilizálásában (Rocha és mtsai. 2018). A közelmúltban megfigyelték, hogy az 1 mM SA kezelés megváltoztatta az MGDG/DGDG arányt és csökkentette az MGDG szintet lenlevelekben (*Linum usitatissimum* L.), ami hozzájárulhat a kloroplasztisz membránok biogenezésében és stabilizálásában bekövetkező változásokhoz (Belkadhi és mtsai. 2015). A klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek közül az F_v/F_m és a Y(II) csökkenése az 1 mM SA kezelés hatására, amit az F_0 enyhe növekedése is kísért mind fényen a normál fotoperióduson, mind pedig a sötétben alkalmazva, arra utal, hogy a PSII szuperkomplex károsodhatott és/vagy a D1 „turnover” gátlódhatott. Az SA fontos szerepet játszik a tilakoid membránfehérjék szintézisének szabályozásában különböző környezeti stresszorok jelenléte esetén. Érdekes módon Chen és mtsai. (2016) leírták, hogy a 0,25 mM SA kezelés növelte a kéthetes búzपालánták kloroplasztiszainak D1, Lhcb3 és Lhcb6 tartalmát, de nem változtatta meg az Lhcb1, Lhcb2, Lhcb4 és Lhcb5 tartalmát 24 óra elteltével. Ezenkívül mások leírták, hogy a 0,3 mM SA kezelés képes volt befolyásolni a D1 fehérje „turnoverét” a búzalevelekben lévő protein kinázok aktivitásának szabályozásán keresztül (Zhao és mtsai. 2011). Ugyanakkor Gao és mtsai. (2018) megfigyelték, hogy a D1 és a fő PSII és PSI fehérjék mennyisége szignifikánsan csökkent már 0,6 mM SA jelenlétében *Chlamydomonas reinhardtii* algában, és az SA a tilakoid membránfehérjék degradációját okozta. Emellett ismert, hogy a PSII D1 alegysége a fotooxidatív stressz fő célpontja (Kirchhoff, 2014), amelyet az SA indukálhat a kloroplasztiszokban (Poór és Tari, 2012). Így a D1 fehérjeszint csökkenése potenciálisan hozzájárulhat a gránumok magasságának csökkenéséhez, amit fénystressz esetén korábban már leírtak (Herbstová és mtsai. 2012). Kirchhoff és mtsai. (2011) a sötéthez és a fényhez alkalmazkodó lúdfű levelekben azt figyelték meg, hogy a gránumtilakoid lumene jelentősen kitágul és megduzzad a fényben, amit a sötétben a fehérjék diffúziójának korlátozása megakadályozott. A lumen tágulása lehetővé teszi a luminális Deg proteázok érintkezését a PSII-vel, hozzájárulva a fénykárosodott PSII fehérjék helyreállításához (Kirchhoff, 2014). Ezenkívül Mishev és mtsai. (2011) kimutatták, hogy a D1 fehérje lebontásában szerepet játszó *Deg1* és *FtsH5* kloroplasztikus proteáz gének expressziója gátolt a lúdfű növények leveleiben

a sötétben, ami arra utal, hogy ezek a proteázok főként a megvilágított levelekben működnek. Ezek az eredmények mind arra utalhatnak, hogy a PSII reakcióközpontoknak nagyobb helyreállító kapacitásra van szükségük fényben az 1 mM SA kezelés után, mint sötétben.

6.4. A hexokinázok és szerepük az SA-indukálta mitokondriális ROS produkciónban

Ahogy a korábbiakban láthattuk, a fény nemcsak a növények növekedésében és fejlődésében, hanem a védekezési reakcióikban is központi szerepet játszik. Emellett szükséges a fotoszintézishez és más metabolikus vagy transzkripciós folyamatokhoz egyaránt (Kangasjärvi és mtsai. 2012; Zhang és Zhou, 2013; Ballaré, 2014). Ismert, hogy a sötétség fokozza a levelek öregedését, ami eltérő egy-egy árnyékhatásnak kitett levél vagy a sötétbe került egész növény esetében (Weaver és Amasino, 2001; van Doorn, 2008). A sötétség által kiváltott öregedés jelentős klorofillvesztést, a fotoszintetikus aktivitás csökkenését és a cukoranyagcsere megváltozását eredményezi, aminek az egyik fő szabályozó enzime a HXK (Bolouri-Moghaddam és mtsai. 2010). Ugyanakkor egyes tanulmányok szerint a HXK-ok kulcsszerepet játszanak a levelek öregedésének szabályozásában is, azáltal, hogy gátolják a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus kialakulását (Sarowar és mtsai. 2008; Godbole és mtsai. 2013). Azonban a HXK-ok aktivitása és génextpressziós változása a különböző levélpozíciókban a sötétség által indukált öregedés esetén tisztázatlan maradt.

Korábban már leírták, hogy a HXK aktivitást a cirkadián óra szabályozza, dohánylevélben a fényperiódus alatt enyhén emelkedik, míg éjszaka lecsökken (Häusler és mtsai. 2000). Eredményeink hasonló tendenciát mutattak a kifejlett paradicsom növények leveleiben, azonban különbségek voltak megfigyelhetők a különböző levélemeletek alap HXK aktivitásában. A mérések alapján kontroll körülmények között a kifejlett paradicsom levelekben volt a legnagyobb a HXK aktivitás, a legalacsonyabb pedig az öreg levelekben volt mérhető. A kifejlett levelekben a HXK aktivitás a fényperiódus 6-9. órájában érte el a maximumát, és a sötét kezelés korai szakaszában is magas maradt. A fiatal levelekben a HXK aktivitás maximumát a fényperiódus második harmadában mértük, ami arra utal, hogy ebben az időszakban a forráslevelek jobb szénhidrát-ellátottságra kerültek. Ezzel szemben a HXK aktivitás már 6 óras sötétség után minden levélszinten gátolt volt.

Eredményeink azt is felfedték, hogy a négy azonosított paradicsom *HXK* gén idő- és levélspecifikus expressziót mutatott a normál fotoperiódus mellett. A legmagasabb expressziót a kifejlett levelekben tapasztaltuk, különösen a mitokondriális *SIHXK1* és a kloroplasztikus

SIHXX4 transzkript szintek esetében a fényperiódus második felében. A HXK-ok cirkadián szabályozásáért felelős cisz-ható elemeket nemcsak a paradicsom, hanem a kukorica HXK-promóter szekvenciáiban is leírták (Zhang és mtsai. 2014). A különböző korú levelekben megfigyelt expressziós mintázatok meghatározhatják a HXK-ok enzimaktivitását a forrás és felhasználó szervekben. Korábban azt találták, hogy a sötét kezelés az *AtHXK1* expresszióját fokozta lúdfű levelekben (Buchanan-Wollaston és mtsai. 2005). Eredményeink azt mutatták, hogy az *SIHXX*-k expressziója szintén szignifikánsan megváltozott a sötét kezelést követően 6 órán belül, és szignifikáns változásokat mutatott levélspecifikus módon is. Az *SIHXX1* és *SIHXX4* expressziója csökkent a kifejlett paradicsom levelekben, és gátolt volt a normál fotoperiódushoz képest a sötétkezelés hatására, de ezen *HXK* gének relatív transzkript szintje szignifikánsan megemelkedett 6 és 24 óra elteltével az öreg levelekben. A különböző levélpozíciókban lévő eltérő expressziós mintázatok a *HXK* gének expressziójának eltérő hormonális és metabolikus szabályozására utalhatnak a sötétség által indukált öregedési folyamatok során intakt növényekben.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációjú SA kezelések hogyan hatnak a HXK enzimaktivitásra és a gének expressziójára normál fotoperióduson a fényben. A méréseink alapján az SA kezelések 6. órájától szignifikánsan lecsökkent a HXK aktivitás és a vizsgált paradicsom *HXK* gének expressziója az intakt paradicsom növények kifejlett leveleiben. A HXK-ok aktivitásának és transzkripciójának csökkenése jó összhangban van a levélszövetekben mért magasabb glükóz szintekkel az SA kezeléseket követően. A glükóz, mint szubsztrát befolyásolhatja a HXK-ok glükokináz aktivitását, így hatással lehet a mitokondriális és a fotoszintetikus cukoranyagcserére is (Zhang és Xing, 2008). Ezenkívül a HXK aktivitás gátlása vagy az mtHXK alacsony szintje hozzájárulhat az SA által kiváltott mitokondriális ROS termeléshez és a mitokondriumokból történő *cyt c* kiszabadulásához a levélsejtekben (Camacho-Pereira és mtsai. 2009; Godbole és mtsai. 2013).

A növényi levelekben a sejthalált különböző citológiai folyamatok és specifikus morfológiai változások kísérik, mint például a kromatin aggregációja és a DNS fragmentációja. Ezek a folyamatok a részét képezik a mitokondriumok morfológiájában, így aktivitásában és metabolizmusában is bekövetkező változások (Lam és mtsai. 2001), a mitokondriumok integritásának elvesztése és a mitokondriumokból történő *cyt c* kiszabadulása, mely a sejthalál proteázok általi végső végrehajtása előtt megy végbe (Dat és mtsai. 2003). Eredményeink alapján elmondható, hogy az SA expozíció a mitokondriális kriszták SA koncentrációtól függő dezorganizációját, a mitokondriumok duzzadását és vakuolizációját, valamint a *cyt c*

kiszabadulását okozta a mitokondriumokból a paradicsomlevelek paliszád parenchima sejtjeiben, 24 órával az 1 mM SA kezelést követően.

A cyt *c* kiszabadulása mellett, a levelekben mért eredményeknek megfelelően az mtHXX aktivitás szintén szignifikánsan csökkent az SA kezelésnek kitett növények leveleiből izolált mitokondriumokban. Éppen ezért az mtHXX aktivitás gátlása és az mtHXX expresszió alacsony szintje hozzájárulhat a fokozottabb mitokondriális ROS produkcióhoz a 24 órás 1 mM-os SA kezelést követően (Camacho-Pereira és mtsai. 2009; Godbole és mtsai. 2013). Ezenkívül a COX aktivitás csökkenése az 1 mM SA kezelés hatására a mitokondriumok külső membránjainak 24 órán belüli szétesését jelzi.

A mitokondriális ETC a ROS termelés és az ATP szintézis egyik fő helyszíne, mely nagymértékben függ a belső mitokondriális membránon átívelő protongradiens által generált $\Delta\Psi_m$ -tól (Møller, 2001). A $\Delta\Psi_m$ disszipációját figyelték meg cukorrépában (*Beta vulgaris* L.) és sárga csillagfürt (*Lupinus luteus* L.) etiolált csíranövények szikleveleiben az SA kezeléseket követően, mivel az SA az alkalmazott koncentrációtól és a kezelés időtartamtól függően gátolhatja a mitokondriális ETC-t (Shugaev és mtsai. 2014). Camacho-Pereira és mtsai. (2009) burgonyagumó-szövetek (*Solanum tuberosum* L.) segítségével kimutatták, hogy az mtHXX aktivitás kulcsfontosságú, „megelőző antioxidáns” szerepet játszik azáltal, hogy az alapállapotú ADP újrahasznosítási mechanizmusa révén csökkenti a mitokondriális ROS képződését. Ezzel párhuzamosan az O₂ fogyasztás növekedését figyelték meg a mtHXX glükózzal történt aktiválása után, ami arra utal, hogy az ETC sebessége glükóz jelenlétében is fokozódik (Camacho-Pereira és mtsai. 2009). Kísérleteink során a mitokondriális ROS és NO produkció szintén megemelkedett a kifejlett paradicsom növények leveleiből származó mitokondriumokban, miután szukcinátot és ADP-t adtunk a rendszerhez. Mindazonáltal a mitokondriális ROS termelés csak kismértékben csökkent a glükóz hozzáadásával ezekben az SA-kezelt mintákban. A HXX inhibitor NAG alkalmazása ugyanakkor jelentősen megnövelte a kontroll és az SA-val kezelt mitokondriumok ROS produkcióját, különösen a 0,1 mM SA kezelés esetében. Bár az NO produkció jelentős SA koncentráció-függőséget mutatott, a glükóz vagy NAG alkalmazása nem befolyásolta jelentősen ezekből a mintákból az NO felszabadulását. Ezen túlmenően az NO képződésének forrása és mechanizmusa nem teljesen ismert a mitokondriumokban. Számos faj levélszövetéből (pl.: *Pisum sativum* L.) származó mitokondriumok még anoxia alatt sem termeltek jelentős mennyiségű NO-t, de más fajokban, például dohány és árpa sejtszuspenzió gázfázisában az NO kibocsátása nanomoláris tartományban mérhető volt ózon ütközéses gázfázisú kemilumineszcencia segítségével (Gupta és mtsai. 2011b). Mivel konstitutív NOS-szerű aktivitás nem található a növényi

mitokondriumokban, rendszerünkben kizárható az L-arginin eredetű NO képződés, illetve a mitokondriális ETC általi nitritredukció is a hozzáadott nitrit hiányában. Így a DAF fluoreszcencia kémiai természete ebben a rendszerben nem ismert.

6.5. Az SA szerepe a ROS metabolizmusban ER stressz során

A következőkben megvizsgáltuk a különböző védekezéssel kapcsolatos növényi hormonok (SA, JA, ET) ER stressz és UPR során betöltött szerepét, mely kapcsán megmértük az *SIBiP* gén relatív transzkript szintjének változását. Eredményeink alapján mind az 1 mM SA, a 10 μ M JA, és az 1 mM ACC kezelés szignifikánsan fokozta a paradicsom növények leveleiben az UPR markergén kifejeződését, a legnagyobb mértékben pedig a magas koncentrációjú (letális) SA és JA kezelések. Az SA ER stresszben és UPR során betöltött szerepét tovább vizsgáltuk az SA hiányos *NahG* növényekben, ER stresszt indukáló Tm kezelés, kémiai chaperon PBA alkalmazása és ezek kombinált használata mellett. Az *SIBiP* UPR markergén expresszióját szignifikánsan megnövelte a Tm, amit a PBA-val történő együttes kezelés mérsékelte. Maga az SA is szignifikánsan növelte az *SIBiP* expresszióját, ugyanakkor a Tm hatása jelentősebb volt 24 óra elteltével. A Tm-indukálta *SIBiP* expresszió a *NahG* növényekben szignifikánsan alacsonyabb volt a VT növényekhez képest. Ugyanakkor a PBA növelte az *SIBiP* transzkriptum szintjét mind önmagában, mind pedig a Tm kezeléssel kombinálva a transzgenikus növényekben. Jól ismert, hogy a Tm SA-függő módon indukálja a *BiP* expresszióját lúdfűben (Wang és mtsai. 2005; Nagashima és mtsai. 2014), és a PBA enyhítheti ezt a növekedést (Watanabe és Lam, 2008; Howell, 2013). Ugyanakkor Hayashi és Takaiwa (2015) beszámolt arról is, hogy az exogén SA alkalmazás felülírhatja a Tm által kiváltott UPR-t lúdfűben, ahol az SA csökkentette az *AtBiP3* expresszióját, hasonlóan a PBA kémiai chaperonnal végzett kezeléshez (Hayashi és Takaiwa, 2015). A folyamatok hátterében meghúzódó biokémiai és molekuláris változások, mint például a ROS metabolizmus változásai azonban mindaddig tisztázatlanok maradtak. Emellett, habár az SA szerepét az ER stressz és az UPR során alaposan tanulmányozták, a mögöttes mechanizmusok, kölcsönhatások és más védekezéssel kapcsolatos fitohormonok, például a JA és az ET szerepe szintén tisztázatlan maradt (Nawkar és mtsai. 2018; Park és Park, 2019; Xu és mtsai. 2019).

A JA és az UPR marker *BiP* chaperon közötti kölcsönhatást *BiP*-túltermelő transzgenikus szójanövényekben erősítették meg, ahol a JA tartalom szignifikánsan alacsonyabb volt a VT növényekhez képest kontroll körülmények között (Coutinho és mtsai. 2019). Először Moreno és mtsai. (2012) vizsgálták meg a metil-jázmonát (MeJA) hatását

lúdfűben. Eredményeik azt mutatták, hogy a 0,03 mM MeJA kezelés nem aktiválta a bZIP60-mediálta ER stressz útvonalat 5 órán belül. Xu és mtsai. (2019) ugyanakkor kimutatták, hogy a MeJA 1 mM koncentrációban, 3 órán belül átmenetileg képes UPR marker géneket indukálni, mint például a *BiP*, a *protein-diszulfid-izomeráz (PDI)*, a *calnexin (CNX)* és a *calreticulin (CRT)* expresszióját. Ugyanakkor a *bZIP60* transzkript szintje csak 12 óra elteltével volt magasabb az 1 mM MeJA-nak kitett lúdfűben (Xu és mtsai. 2019). Ezek a génexpressziós adatok a JA gyors és koncentrációfüggő hatására utalnak, de a biokémiai és fiziológiai változásokat eddig még nem vizsgálták. Eredményeink azt bizonyították, hogy az exogén JA kezelés már mikromoláris koncentrációban szignifikánsan indukálta az *SIBiP* expresszióját a paradicsom növények leveleiben. Ennek nagy jelentősége lehet, mert korábban leírták, hogy a JA vagy az SA exogén alkalmazása csak millimoláris koncentrációban növelte a *BiP* gén expresszióját lúdfűben (Xu és mtsai. 2019) vagy szójában (Nagashima és mtsai. 2014). Emellett ezek az exogén módon alkalmazott alacsonyabb hormonkoncentrációk közelebb állhatnak a növényekben a különböző biotikus stresszorok hatására bekövetkező természetes endogén változásokhoz is (Seo és mtsai. 2001; Leitner és mtsai. 2005). A JA potenciális szerepét az ER stressz és az UPR során VT és JA jelátviteli mutáns (*jail*) paradicsom növényekkel vizsgáltuk tovább. Eredményeink alapján a Tm kezelés szignifikánsan indukálta az *SIBiP* expresszióját a VT növényekben, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a *jail* levelekben, megerősítve a JA szerepét az UPR során. Az *SIBiP* transzkriptumok felhalmozódását a PBA gátolta mindkét vizsgált paradicsom genotípusban, ami azt jelzi, hogy a Tm kezelés volt az UPR indukációjának fő oka. A BiP chaperon és a védekezésben szerepet játszó növényi hormonok, mint például a JA közötti szoros kapcsolatot korábban megerősítették a *BiP* gént túltermelő transzgenikus szójanövényekben is, ahol a JA tartalom alacsonyabb volt a VT növényekhez képest kontroll körülmények között (Coutinho és mtsai. 2019).

A JA mellett az ET UPR során betöltött szerepe szintén többnyire tisztázatlan, annak ellenére, hogy az ET a stressztolerancia vagy a PCD aktiválásának az egyik fő finomhangolója (Depaepe és mtsai. 2021). Az ET szerepe az ER stressz során azért lehet jelentős, mert nemcsak az érzékelése és a jelátvitel történik az ER-ben (Gallie, 2015), hanem az ET a JA és SA mellett szabályozza a ROS metabolizmust is, ami a fehérjék oxidációjának módosításával hozzájárulhat az UPR kialakulásához, vagy éppen az oxidált és károsodott fehérjék lebontásához (Ozgur és mtsai. 2015, 2018). Korábban már leírták, hogy az ET-t felszabadító ethephone (2-klór-etán-foszfonsav) kezelés szignifikánsan magas H₂O₂ és NO szinteket, és ezzel párhuzamosan BiP akkumulációt eredményezett 24 óra elteltével hegyi juhar (*Acer pseudoplatanus* L.) sejtszuspenzióban (Malerba és mtsai. 2010). Ezenkívül korábban azt

is leírták, hogy a szárazság stressz mind az ER stressz jelátviteléhez (például *IRE1*, *bZIP60*, *bZIP28*, *bZIP17*, *BiP*), mind pedig az ET bioszintéziséhez és jelátviteléhez (például *ACS*-ek, *ACO*-k, *ETR*-ek, *ERS*-ek, *ERF*-ek) kapcsolódó gének expresszióját indukálta 7 nap után *Jatropha curcas* csíranövényekben (Zhang és mtsai. 2015). Emellett mások kimutatták, hogy a ROS produkció vagy az ET érzékelés gátlása csökkentette az ER stressz-közvetített PCD-t a BiP2 által, szárazság által sújtott lúdfű növények gyökereiben (Mira és mtsai. 2017). Ezek ellenére az ET funkciója más védekezéssel kapcsolatos fitohormonokkal együttműködve az UPR során kevésbé feltárt. Eredményeink alapján az ET prekursor ACC kezelés az alkalmazott koncentrációtól függően befolyásolta az *SIBiP* expresszióját a paradicsom növények leveleiben. Esetünkben a gyökéren keresztül felvett ACC csak a magasabb koncentrációban, az 1 mM kezelést követően eredményezte az *SIBiP* transzkriptumok jelentős felhalmozódását 24 óra elteltével. A különböző ACC koncentrációk eltérő hatását korábban a ROS metabolizmus változása kapcsán figyeltük meg (Borbély és mtsai. 2019, 2020). Az ET potenciális szerepét az ER stressz és UPR során tovább elemeztük VT és ET receptor mutáns, *Nr* paradicsom növények felhasználásával. Eredményeink alapján a Tm szignifikánsan indukálta az *SIBiP* expresszióját mindkét paradicsom genotípusban, de alacsonyabb volt a gén kifejeződése az *Nr* levelekben, ami az ET szerepét erősíti meg az UPR során. A PBA és a Tm együttes alkalmazása csökkentette az *SIBiP* transzkriptumok felhalmozódását mindkét paradicsom genotípusban, bár kisebb mértékben az *Nr* növényekben, de megerősítve, hogy a Tm volt az oka az UPR indukciójának.

A növények védekezési reakciói, valamint az UPR nagymértékben függenek a ROS metabolizmusától (Ozgur és mtsai. 2015, 2018), amelyet többek között az SA jelentősen befolyásol (Saleem és mtsai. 2021). A ROS közül a szuperoxid-gyökönion és a H₂O₂ gyorsan keletkeznek, és olyan jelátviteli komponensként vagy káros molekulaként viselkedhetnek, amelyek károsítják a sejtek integritását a lipidek, fehérjék és nukleinsavak oxidációja révén (Saleem és mtsai. 2021; Vlot és mtsai. 2021). Kísérleteink során szignifikáns szuperoxid-gyökönion és H₂O₂ produkciót mértünk a Tm kezelés után a VT paradicsom levelekben, amelyek nem függték az SA szint exogén módon történő növelésétől vagy a *NahG* növényekben az alacsonyabb SA szinttől. Először Ozgur és mtsai. (2015) számoltak be magasabb H₂O₂ tartalomról a Tm kezelés után lúdfűben. Eredményeink alapján az SA kezelésnek kevés hatása van a Tm-indukálta H₂O₂ termelésre, de az SA hiánya magasabb szuperoxid-gyökönion felhalmozódást eredményezett az ER stressz alatt. A PBA és a Tm együttes alkalmazása mindkét ROS szintjét csökkentette a Tm-indukált növekedéshez képest, ami az SA kezelés mellett szintén megfigyelhető volt, míg az SA hiányában a *NahG*

növényekben elmaradt. Megállapítható tehát, hogy a PBA ROS produkcióra gyakorolt hatása SA-függő volt. Ugyanakkor a ROS szintek és a hatásuk az ER-re, valamint a sejtek életképességére függhet az antioxidáns rendszertől, például a glutation metabolizmusától is (Uzilday és mtsai. 2017; Ozgur és mtsai. 2018), amelyet az SA jelentős mértékben befolyásolhat (Saleem és mtsai. 2021).

A glutationnak az ER-ben történő oxidatív stressz szabályozásában betöltött szerepéről szóló első, élesztőben végzett tanulmány (Ponsoero és mtsai. 2017) után Uzilday és mtsai. (2017) részletesen megvizsgálták a Tm glutation metabolizmusra gyakorolt hatását lúdfűben is. Ugyanakkor jól ismert, hogy az SA, az UPR kulcsfontosságú hormonja szintén jelentős hatással van a GSH szintjére és a glutation metabolizmussal kapcsolatos enzimek működésére, leginkább a GSH keletkezését indukálva, hogy elősegítse a különböző stresszhatások túlélését a növényekben (Tari és mtsai. 2015; Kaya és mtsai. 2020). Méréseink során elsőként megvizsgáltuk az SA kezelés hatását a glutation szintekre és a glutation metabolizmusára ER stressz alatt. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy mind a Tm, mind pedig a PBA elősegítette a GSH felhalmozódását a VT levelekben, valamint fokozta a GSSG tartalom növekedését. Uzilday és mtsai. (2017) szintén a glutation tartalom növekedéséről számoltak be a Tm jelenlétében lúdfű csíranövényekben, mely függött az alkalmazott Tm kezelés koncentrációjától. Ugyanakkor méréseink alapján azt tapasztaltuk, hogy míg az SA kezelés kismértékben növelte a GSH felhalmozódását az ER stressz alatt, az alacsony endogén SA koncentráció a *NahG* növényekben viszont szignifikánsan alacsonyabb GSH szintet eredményezett a Tm kezelés mellett. Hasonló változásokat figyelhattunk meg a GSSG esetében is, kivéve a PBA kezelést, amely növelte a GSSG mennyiségét a *NahG* növényekben önmagában és Tm kezeléssel együtt alkalmazva is. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a Tm által kiváltott ER stressz GSH és GSSG felhalmozódást eredményezett a paradicsom növényekben, ami nagymértékben függött az SA szintjétől a levelekben. Ezenkívül a PBA hatása a GSSG szintjére kevésbé függött az SA endogén szintjétől. A PBA hatásának pontosabb megértése további vizsgálatokat igényel.

A GSH/GSSG szintet számos enzim szabályozza, különösen a GR és a DHAR, de a GST enzim is (Hasanuzzaman és mtsai. 2019). A GR és a DHAR az Asada-Halliwell-Foyer ciklus kulcsfontosságú tagjai közé tartoznak, amelyben a H₂O₂-t a GSH és az aszkorbát semlegesíti (Noctor és mtsai. 2012; Hasanuzzaman és mtsai. 2019; Noctor és mtsai. 2024). Méréseink alapján ER stressz alatt a GR enzim aktivitása szignifikánsan megnőtt, amint korábban is megfigyeltek Tm-kezelt lúdfű csíranövényekben (Uzilday és mtsai. 2017). Ugyanakkor a PBA alkalmazása jelentősen csökkentette a Tm-indukálta GR aktivitás-

növekedést. A GR kulcsfontosságú enzim az ER stressz alatt, mivel semlegesíti például az ERO1 által termelt H_2O_2 -t és hozzájárul az optimális GSH/GSSG arány fenntartásához, megelőzve a GSH készlet kimerülését. Érdekes módon szignifikánsan magasabb GR aktivitást tapasztaltunk a megemelt SA szintek jelenlétében és az SA hiányában is a Tm kezelésekk mellett a VT és a *NahG* paradicsom növényekben mérve a kezeletlen VT kontrollhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az SA nagymértékben részt vesz a GR aktivitás szabályozásában, amint arról már más tanulmányok is beszámoltak (Tari és mtsai. 2015; Kaya és mtsai. 2020), de korábban még nem vizsgálták azt az ER stressz során. A Tm a GR enzim mellett szignifikánsan fokozta a DHAR aktivitását is. Ugyanakkor a DHAR aktivitást az SA kezelésekk tovább növelték a Tm kezeléshez képest, de az szignifikánsan alacsonyabb volt a *NahG* levelekben és nem változott szignifikánsan a Tm kezelés hatására ebben a genotípusban. Bár a Tm és az SA DHAR aktivitásra gyakorolt hatását már korábban is kimutatták (Tari és mtsai. 2015; Uzilday és mtsai. 2017; Kaya és mtsai. 2020), méréseink alapján először írhatjuk le, hogy a DHAR aktivitása függ az SA szintjétől az ER stressz alatt. Érdekes módon a GPOX enzim aktivitása nem változott jelentősen a Tm- vagy PBA-kezelések során sem a VT, sem a *NahG* paradicsom növények leveleiben, amit korábban már lúdfüvel végzett kísérletek során is megfigyeltek a Tm-indukálta ER stressz során (Uzilday és mtsai. 2017). Az SA azonban jelentősen fokozta a GPOX aktivitást a VT paradicsom növények leveleiben önmagában, valamint a Tm és/vagy a PBA kezeléssel kombinálva. Az SA GPOX enzimre gyakorolt hatása jól ismert (Horváth és mtsai. 2015), amely enzim nem csak a H_2O_2 lebontásában, hanem a sejt redox homeosztázisának szabályozásában is döntő szerepet játszik a tiol/diszulfid vagy NADPH/NADP⁺ egyensúly szabályozása által (Hasanuzzaman és mtsai. 2019). A növényi GST-k szintén döntő szerepet játszanak a sejtek méregtelenítési folyamataiban és a ROS homeosztázis szabályozásában a GSH-t szubsztrátként felhasználva (Edwards és Dixon, 2005; Gallé és mtsai. 2021). Méréseink alapján a GST aktivitást nemcsak a Tm kezelés növelte, amit lúdfüben is megfigyeltek (Uzilday és mtsai. 2017), hanem a PBA és az SA is, paradicsom növények leveleiben vizsgálva. Bár az SA GST-kre kifejtett hatásait jól dokumentálták (Horváth és mtsai. 2015), az ER stressz alatti szerepe nem ismert. Meglepő módon a GST-k aktivitása nem változott szignifikánsan *NahG* növényekben a VT növényekhez képest vagy SA kiegészítés hatására, ami elsőként utal az SA kulcsszerepére a GST-k szabályozásában az ER stressz alatt.

A glutataion metabolizmusához kapcsolódóan különböző kulcsgéneket választottunk ki a szakirodalom alapján a további vizsgálatainkhoz (Islam és mtsai. 2017; Gallé és mtsai. 2021), és ezek SA-függő expresszióját elemeztük az ER stressz és UPR során. Meglepő módon a

glutation bioszintézishez kapcsolódó *SIGSH1* expresszióját csökkentette a Tm és az SA kezelés a paradicsom növények leveleiben, és csak az SA és a PBA együttes alkalmazása növelte meg kismértékben az *SIGSH1* transzkriptumok szintjét. Ezzel szemben korábban leírták, hogy a *GSH1* expresszióját a Tm fokozza lúdfü csíranövényekben (Uzilday és mtsai. 2017), az SA kezelés pedig paradicsom növények gyökereiben (Gallé és mtsai. 2021), ami arra utal, hogy a kezeléseknél jelentős a koncentráció-, idő- és szervfüggő hatása. Ugyanakkor a paradicsom GR enzimet kódoló két szekvencia kifejeződése jelentős SA-függést mutatott, különösen az *SIGR2* változása, amelynek transzkript szintjének növekedését a Tm fokozta, és azt tovább fokozta az SA kezelés, míg a *NahG* növényekben alacsonyabb maradt, ami az SA hatását erősíti meg a gén kifejeződésének szabályozásában az ER stressz során. Korábban már beszámoltak róla, hogy mindkét paradicsomban kódolt *GR* gén kifejeződését az SA indukálja a paradicsom növények gyökereiben (Gallé és mtsai. 2021), de ez az első olyan megfigyelés, amely az SA szerepét vizsgálta a *GR* gének indukciójára az ER stressz során levelekben. Érdekes módon a PBA alkalmazása mindkét *GR* gén expresszióját fokozta, és a Tm kezeléssel kombinálva is jelentősen növelte az *SIGR2* gén expresszióját, ami arra utal, hogy a kémiai chaperon potenciális hatással van a *GR* gének indukciójára. Az *SIGSH1* génhez hasonlóan a Tm és az SA kezelés csökkentette az *SIDHAR2* expresszióját a VT növények leveleiben, de a PBA vagy az SA kiegészítés nem változtatta meg azt jelentősen. Az *SIDHAR2* alap expressziója azonban szignifikánsan magasabb volt az SA hiányos *NahG* levelekben kontroll körülmények között, amelyet minden kezelés elnyomott. Ezzel szemben Gallé és mtsai. (2021) magas *SIDHAR2* génexpressziót mértek az SA kezeléseket után a paradicsom növények gyökereiben. Eredményeink alapján az *SIOXP* és az *SIGGT* expresszióját nem befolyásolta szignifikánsan a Tm kezelés a VT paradicsom növények leveleiben, ahogyan azt a lúdfü növények esetében is megfigyelték korábban (Uzilday és mtsai. 2017). Eredményeink ugyanakkor először tárták fel az SA szignifikáns hatását az *SIGGT* szabályozására. Az SA kiegészítés szignifikánsan növelte az *SIGGT* relatív transzkript szintjét a kezeletlen kontrollhoz képest, amit a Tm kezelés mérsékelte, de a PBA nem. Ezzel párhuzamosan az *SIGGT* relatív transzkript szintje szignifikánsan alacsonyabb volt és nem változott az ER stressz hatására a *NahG* növények leveleiben, ami arra utal, hogy az SA kulcsfontosságú szerepet tölthet be a GGT által szabályozott apoplastikus GSH katabolizmus szabályozásában. Ezen túlmenően, a szakirodalom alapján kiválasztott paradicsom *GST*-k expressziójában jelentős változásokat mértünk az ER stressz során a paradicsom növényekben. A magasabb rendű növényekben a *GST*-ket tizennégy osztályba sorolják, köztük a tau (U), phi (F) és théta (T) csoportokba (Gallé és mtsai. 2021). Paradicsomban 90 *GST*-t kódoló gént azonosítottak szerv- és

stresszspecifításokkal jellemezve (Islam és mtsai. 2017). Méréseink során az *SIGSTF2*, *SIGSTU5*, *SIGSTT2* és *SIGSTT3* expresszióját vizsgáltuk az ER stressz és UPR mellett, korábbi adatok alapján ugyanis mindegyiket indukálta az SA (Gallé és mtsai. 2021), és a fertőzések, mint például a *Phytophthora infestans* és a *Botrytis cinerea* infekció a paradicsom növények levelében (Islam és mtsai. 2017). Ezen GST-eket kódoló szekvenciák közül az *SIGSTT2* szignifikáns expressziót mutatott az ER stressz során, ami alacsonyabb maradt a *NahG* növényekben, de expressziója jelentősen megnőtt az SA jelenlétében, ami arra utal, hogy szabályozása SA-függő az ER stressz és UPR során. Ugyanakkor az SA megnövelte az *SIGSTF2* és *SIGSTT3* expresszióját is, hasonlóan, mint ahogy azt paradicsomban korábban is kimutatták már az SA jelenlétében (Gallé és mtsai. 2021). A PBA hatását a *GST* gének expressziójára először vizsgáltuk, és az eredmények alapján az *SIGSTF2*, *SIGSTU5* és *SIGSTT3* magas indukcióját figyelhettük meg a Tm- és/vagy SA kezelés hatására, ami ezáltal hozzájárulhat az ER-stressz káros hatásainak enyhítéséhez.

A koncentrációtól és időtől függő Tm- és SA-kezelések lipidperoxidációt és ezáltal a sejtek életképességének elvesztését eredményezik a növényekben (Ozgur és mtsai. 2015). Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a Tm hasonló mértékű MDA akkumulációt indukált, mint az SA, amelyet a PBA enyhített, de az MDA tartalom alacsonyabb maradt a *NahG* növényekben a VT levelekhez képest, ami arra utal, hogy a változások redox szabályozásban az ER stressz és UPR során az SA jelentős mértékben részt vesz. Az SA hiányos *NahG* genotípusban a ROS produkció, valamint a GSH szint és a kulcsfontosságú glutationhoz kapcsolódó enzimek aktivitása sem változott a Tm által indukált ER stressz során. Ezzel párhuzamosan a kezelések hatására a *NahG* növények leveleiben nem tapasztaltunk szignifikáns életképesség csökkenést az ionkieresztés mérése alapján a VT növényekhez képest. Ugyanakkor az SA által kiváltott ionkieresztés lecsökkent a Tm- és különösen a PBA kémiai chaperonnal történő együttes kezelések hatására, ami a mindkét vegyszer által aktivált védekezési reakciók eredménye lehet, például a megnövekedett GSH tartalom és GST aktivitásnak köszönhetően.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy vajon az SA mellett a kloroplasztiszok milyen szerepet töltenek be a Tm által kiváltott ER stressz és UPR során. Eredményeink alapján a kloroplasztiszok potenciális szerepet játszhatnak a robusztusabb UPR aktiválásában a normál fénykörülmények között, melyben kulcsszerepet játszhat a kloroplasztikus ROS produkció. A Tm kezelések hatására ugyanis szignifikánsan magasabb H₂O₂ növekedést mértünk normál növekedési körülmények között a fényben, mint sötétben, és hasonló változást figyeltünk meg az *SIBiP* génexpresszióban is, azaz a sötétség mérsékli mindkettőt az ER stressz során.

Ugyanakkor kérdésként merül fel, hogy vajon a Tm kezelések direkt hatnak-e a kloroplasztikus ROS produkcióra a fényben vagy nem. Paradicsom növények leveleiből izolált intakt kloroplasztiszokat megkezelve Tm-mel nem tapasztaltunk ROS produkciót, ami a Tm közvetett hatására utalt. Ezeket erősítik meg korábbi vizsgálatok is, melyek során a Tm által indukált ER stressz során a magas ROS produkció mellett a kloroplasztikus Cu/ZnSOD vagy APX aktivitás növekedését figyelték meg lúdfüben (Ozgun és mtsai. 2014). Emellett a kloroplasztiszok és az ER közötti ROS-on keresztül fenntartott kapcsolatot fotoszintézis-gátlók, például MV vagy DCMU alkalmazásával is kimutatták (Ozgun és mtsai. 2015). Ugyanakkor az ER stresszt kiváltó Tm potenciális közvetlen és/vagy közvetett hatásai a kloroplasztiszokra és a fotoszintetikus ETC-re, mint a ROS forrására és célpontjára tisztázatlanok maradtak. Kísérleteinkkel a Tm kloroplasztiszokra gyakorolt direkt hatásának kizárását követően igazoltuk *in situ* konfokális mikroszkóp segítségével az indirekt hatást a kloroplasztikus ROS keletkezésében. Ebben a folyamatban az ERO1 által okozott ROS (Soares és mtsai. 2019) lehet a fő forrás, amely további gyors oxidatív robbanásokat válthat ki a sejten belül, például a kloroplasztiszok által. Ezenkívül a PSII javításában részt vevő fehérjék, például az FtsH2 (Dogra és mtsai. 2019) szintézisének gátlása a fotoszintetikus elektrontranszport gátlásához is vezethet, és ezáltal tovább növelheti a kloroplasztikus ROS produkcióját.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a Tm kezelés által kiváltott ER stressz hogyan hathat a fotoszintetikus aktivitásra és ebben milyen szerepet játszik az SA. A VT növények leveleiben a Tm kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az F_v/F_m paraméter értékét, azonban a *NahG* növények esetében szignifikánsan csökkent mind az F_v/F_m , mind pedig a q_L paraméter értéke a kontrollhoz képest, ami az SA UPR kialakulását elősegítő, védő funkciójára utal (Wang és mtsai. 2005; Nagashima és mtsai. 2014). A Y(II) szignifikánsan csökkent mindkét vizsgált paradicsom genotípusban a Tm kezelést követően, azonban a legjelentősebb csökkenés a *NahG* paradicsom növények leveleiben volt mérhető, melyet a PBA kezelés nem enyhített. A Y(II) változásához hasonlóan a Y(I) is szignifikáns csökkenést mutatott a Tm kezelés hatására, legnagyobb mértékben a *NahG* növényekben. A q_P egyedül a *NahG* levelekben csökkent szignifikánsan a Tm kezelés hatására. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Tm alkalmazása gátló hatással van mind a PSII, mind pedig a PSI működésére. Ez a hatás azonban szignifikánsan függött az SA jelenlététől. A kloroplasztikus ETC gátlása és a PSII túlzott gerjesztése a stressz alatt ROS felhalmozódást eredményezhet, ami fehérjekárosodást okozhat, például a PSII D1 fehérjében (Li és Kim, 2022). A fotoszintetikus apparátus védelme érdekében a növények különféle védekezési stratégiákat fejlesztettek ki, mint például az antioxidáns rendszer aktiválása és a nem-fotokémiai kioltás (NPQ) fokozása. Az NPQ részt

vesz a II. fénybegyűjtő komplex (LHCII) által felfogott többletenergia eloszlásában, és gátolja a ROS túlzott mértékű *produkción*át, amely károsítaná a fotoszintetikus apparátust (Miyake, 2010; Ghosh és mtsai. 2023). Az NPQ értéke mind a Tm, mind pedig a Tm+PBA kombinált kezelések hatására is megemelkedett, de a legjelentősebben a *NahG* növényekben nőtt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NPQ-n keresztül megvalósuló fotoprotektív mechanizmusokat a Tm és a Tm+PBA kombinált kezelés az SA-tól függetlenül aktiválta. A Y(ND) értéke mindkét paradicsom genotípusban szignifikánsan nőtt a Tm kezelés hatására, de különösen a *NahG* növényekben, míg a Y(NA) ezzel ellentétesen változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Tm-indukálta ER stressz a PSI fotoinhibícióját és a PSI akceptor oldali redukcióját okozta az SA-tól függően. A PSI akceptor oldali túlredukciója klorofill-triplettek képződéséhez vezethet. Ezenkívül a NADPH felhalmozódása a PSI-nél hozzájárulhat a Mehler-reakció felgyorsításához, amely szuperoxidgyökök képződését okozhatja. Így az ER stressz által kiváltott ROS akkumuláció a kloroplasztiszokban fotoinhibícióhoz és a PSI károsodásához vezethet (Huang és mtsai. 2011; Zhang és mtsai. 2014). A lineáris elektrontranszport mellett a Y(CEF)/Y(II) paraméterre volt szignifikáns hatással a PBA, mely az SA-tól függetlenül növelte azt. Emellett a *NahG* növényekben a Y(CEF)/Y(II) értéke szignifikánsan megemelkedett a Tm kezelés hatására is a kontrollhoz és a VT levelekben mértékhez képest is. A magasabb CEF segít megvédeni a PSII-t a fotoinhibíció ellen azáltal, hogy proton gradienst hoz létre a tilakoid membránon keresztül, a PSI-ről a plasztokinonra történő elektrontranszfer révén (Takahashi és mtsai. 2009). Emellett a CEF-nek szerepe van a PSI fotoinhibíció megelőzésében is azáltal, hogy a felesleges elektronáramot a molekuláris oxigén felé tereli, ami szuperoxid-gyökanion felhalmozódást eredményez, amely a víz-víz ciklus során hasznosulhat (Ort és Baker, 2002). Így az SA hiánya hozzájárulhat a Tm-indukálta ER stressz során a fotoszintetikus apparátus károsodáshoz a fokozott ROS produkció és a CEF korlátozása révén, míg a kémiai chaperon PBA alkalmazása elősegítheti a fotoszintetikus apparátus védelmét a CEF fokozása által az SA-tól függetlenül.

7. Összefoglalás

Kísérleteink első részében elsőként igazoltuk intakt paradicsom növények kifejlett leveleiben, hogy a gomba elicitor CHT kezelés növények védekezésére gyakorolt hatása napszakfüggő, mely szorosan kapcsolódhat az SA jelátviteléhez, az *SIPRI* SA markergén expressziós változása alapján. A sötét periódus előtt, 17:00 órakor alkalmazott CHT kezelés ugyanis másnap minden vizsgált időpontban (5:00, 9:00, 15:00) indukálta az *SIPRI* expresszióját, azonban a sötét periódus elején, 21:00 órakor alkalmazva a CHT kezelést reggel 9:00 órakor váltotta ki a maximális *SIPRI* expressziót. A növények védekezésében történt későbbi válaszok háttérében a sötétség és napi ritmus szabályozó szerepe állhatott. A CHT által indukált gyors védekezési válaszok a reggel 5:00 és 8:00 órakor alkalmazott kezeléseket követően mutatkoztak, ahol nemcsak lokálisan nőtt az *SIPRI* relatív transzkript szintje a kezeléseket követő egy órán belül, hanem a szisztémikus levelekben is, melyet sztómazárás is követett. A reggel 8:00 órakor, párhuzamosan sötétben végzett kísérletek jól mutatják a CHT által indukált SA jelátvitel fényfüggését, mivel az a fényben mértekhez képest ez kevésbé aktiválódott. A CHT által indukált védekezési válaszok részeként megvizsgáltuk a reggel 8:00 órakor történő kezeléseket követően a szuperoxid-gyökönion termelést és a H_2O_2 szintekben történt változásokat. Míg a szuperoxid-gyökönion termelés a CHT hatására szignifikánsan fokozódott lokálisan és szisztémikusan egyaránt, addig ez a sötétben nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a CHT kezeléseket követően egy órán belül a H_2O_2 szintek nem változtak jelentősen. Ezzel párhuzamosan a védekezéshez szükséges fehérjék (pl.: PR-ek) szintézise nagy nyomást jelenthet az ER számára, ezért megvizsgáltuk, hogy a BiP chaperonra hogyan hat a paradicsom növények levelében a CHT kezelés. Az *SIBiP* expressziója fokozódott a CHT hatására lokálisan és szisztémikusan egyaránt, mely nem mutatott fényfüggést, mivel sötétben egyaránt nőtt a vizsgált gén relatív transzkript szintje és kismértékben a fehérje szintje is.

Az SA által indukált védekezési válaszok fényfüggésének pontosabb megértéséhez az intakt paradicsom növényeket a gyökéren keresztül exogén SA kezeléseket tettük ki, szubletális (0,1 mM) és PCD-t indukáló (1 mM) koncentrációkban. Vizsgálataink elején megmértük, hogy a normál fényperiódus alatt és a sötétben történt SA kezeléseket befolyásolják-e a levelekben mért szabad SA szinteket. Méréseink alapján megállapítható, hogy az exogén SA kezeléseket a koncentráció függvényében fokozták a paradicsom levelek szabad- és összes SA tartalmát, melyek nem függtek a fény jelenlététől vagy annak hiányától a vizsgálat 24. órájában. Az SA kezeléseket növények életképességére gyakorolt hatását az ionkieresztés és a lipidperoxidáció változásával követtük nyomon. Az 1 mM SA kezelés fokozta az ionkieresztést

és a lipidperoxidációt az MDA tartalom változása alapján, de míg szignifikánsan magasabb MDA szinteket és ionkieresztést eredményezett a normál fotoperióduson a fényben mérve a 24. órára, addig a sötétben történt 1 mM SA kezelés hatására ez lényegesen kisebb mértékű volt. Ezekkel az adatokkal jól korrelálnak a szuperoxid-gyökkanion és H₂O₂ szintekben bekövetkező időfüggő változások, viszont míg a szuperoxid-gyökkanion produkció a kezelések 6. órájára, addig a H₂O₂ tartalom változása a 24. órára emelkedett meg szignifikánsan az 1 mM SA kezelés esetében a fényben, ami szignifikánsan kisebb volt a sötétben történt kezelések hatására. A ROS metabolizmusban résztvevő enzimek, mint például a NADPH-oxidáz, SOD, APX és POD aktivitása szintén fokozódott az 1 mM SA kezelés hatására normál fotoperióduson a fényben történt kezelések során 24 óra elteltével, mely a sötétben elmaradt a POD kivételével. Hasonló, de kisebb mértékű és sokszor nem szignifikáns változásokat detektáltunk a 0,1 mM SA kezelés esetén ezekben az enzimekben. Ugyanakkor a H₂O₂ elbontásában szerepet játszó KAT enzim aktivitását az SA kezelések a fénytől függetlenül gátolták a 24. órára. A főbb enzimatikus antioxidánsokat kódoló gének közül az 1 mM SA kezelés hatására az enzimaktivitás változásának megfelelően nőtt az *SIRBOH1*, *SIMnSOD*, *SICu/ZnSOD*, *SIKAT1*, *SIAPX1* és *SIAPX2* gének expressziója, mely a sötétben történt SA kezelés hatására kisebb mértékű volt vagy nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest. Megállapítható tehát, hogy a letális koncentrációjú SA kezelés hatására bekövetkező szuperoxid-gyökkanion produkció és H₂O₂ szint-növekedés, a ROS metabolizmusában résztvevő NADPH-oxidáz, SOD, APX és POD enzimaktivitás-fokozódás, valamint az említett őket kódoló gének expressziós növekedése fényfüggő.

A ROS metabolizmust jelentősen befolyásolhatja az SA fotoszintetikus apparátusra és kloroplasztiszokra gyakorolt hatása a növényekben. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a letális koncentrációjú SA kezelés a fény jelenlététől vagy hiányától függetlenül csökkentette az F_v/F_m fotoszintetikus paraméter értékét. Ugyanakkor a q_L paraméter a szubletális koncentrációjú SA kezelés hatására a sötétben történt kezelés esetén szignifikánsan csökkent. Ennek az alacsonyabb SA koncentrációnak a fotoszintetikus apparátusra gyakorolt fényfüggő hatását tovább bizonyította a Y(II) és Y(I) csökkenése is, valamint a Y(NPQ) és Y(ND) növekedése is, mely a sötétben történő 0,1 mM SA kezelések esetében a védelmi folyamatok aktiválódásának elmaradását tükrözheti. A letális koncentrációjú SA kezelés esetén elsőként mutattuk ki, hogy nemcsak a PSII, hanem a PSI rendszerre is jelentős hatása van, az 1 mM SA kezelés ugyanis szignifikánsan csökkentette a Y(II) és Y(I), valamint a Y(NA) paraméter értékeit, de fokozta a Y(NO) és Y(NPQ), valamint a Y(ND) paraméterek értékeit a fény jelenlététől vagy hiányától függetlenül. Ugyanakkor a Y(CEF)/Y(II) érték 1 mM SA kezelés

hatására történő növekedése a sötétben történt kezelés esetében kisebb maradt a fényhez képest, mely eltérő fotoprotektív folyamatok aktivációjára utalhat a két környezeti tényező esetén. A kezelések nem okoztak a fotoszintetikus pigmentek mennyiségében lényeges csökkenést. Ugyanakkor a fotoszintézis termékeiben, a levelek keményítő tartalmában és az oldható cukrok akkumulációjában jelentős változások történtek az SA kezelések hatására. Az SA kezelések ugyanis csökkentették a levelek keményítő tartalmát az alkalmazott koncentrációk függvényében a normál fotoperióduson a fényben mérve, mely a sötétben alapvetően alacsonyabb volt, és az SA kezelések nem befolyásolták ezt. Ezzel párhuzamosan a levelek oldható cukortartalma az alkalmazott SA kezelések növekvő koncentrációjának függvényében nőtt, míg a sötétben nem változott. TEM analízist követően megállapítható, hogy az 1 mM SA oldattal kezelt növények leveleiben a kloroplasztiszok elvesztették normál szerkezetüket, gömb alakúak, hosszúkásak vagy ívesek voltak. Emellett a letális koncentrációjú SA kezelés hatására a tilakoid membránok tágulását, tilakoid vezikulák megjelenését és hosszú, hullámos, deformált lumeneket figyelhettünk meg. Ugyanakkor az 1 mM SA kezelés a kloroplasztiszok vakuolizációját okozta, de a lumenben nem eredményezett jelentős deformációt a sötétben történt kezelések esetében. A TEM felvételek elemzése alapján a kloroplasztiszok területe, a keményítőszemcsék száma, a gránumok magassága és szélessége az alkalmazott SA koncentrációk függvényében a normál fotoperióduson a fényben csökkent, míg a sötétben nem vagy kisebb mértékben változott. Ezzel szemben a kloroplasztiszok lumenjének magassága az SA hatására jelentősen nőtt a fényben, mely a sötétben nem volt megfigyelhető, igazolva az SA kloroplasztiszok szerkezetére gyakorolt fényfüggő hatását.

A cukrok metabolizmusában és a mitokondriális PCD gátlásában is szerepet játszó HXK-ok szerv- és fényfüggő működése kapcsán megállapítottuk, hogy a HXK-ok glükózfüggő specifikus aktivitása levélemelet- és fotoperiódus-függő változást mutatott a paradicsom növényekben, mely a kifejtett levelekben volt a legnagyobb a normál fotoperióduson, és ami a meghosszabbított 24 órás sötétség hatására korábban nőtt, majd lecsökkent a fényben mértékhez képest. A HXK aktivitás változásához hasonlóan, az enzimet kódoló gének közül az *SIHKK1* és az *SIHKK4* transzkriptum szintjei mutatták a legjelentősebben napi ingadozást a kifejtett levelekben a normál fotoperióduson. A sötétben azonban az *SIHKK3* gén fejeződött ki a legszignifikánsabban és a legkorábban, valamint ez mutatta a legjelentősebb változást elsősorban az idősebb levelekben, az *SIHKK1* génhez hasonlóan. Az SA kezelések hatására a HXK aktivitás a 6. órától szignifikánsan lecsökkent a normál fotoperióduson, melyet jelentős glükózakkumuláció kísért a paradicsom növények kifejtett leveleiben. Ezzel párhuzamosan az SA kezelések hatására a napiritmust mutató vizsgált *SIHKK* gének relatív transzkript szintje

szignifikánsan lecsökkent a kezelések 6. órájától. A levelek mezofillumában található parenchima sejtek mitokondriumait TEM analízisnek kitéve megállapíthattuk, hogy a letális koncentrációjú SA kezelések a mitokondriális kriszták duzzadását és dezorganizációját, valamint a mitokondriumok szétesését és vakuolizációját okozták. Ezzel párhuzamosan szignifikánsan lecsökkent a mitokondriumok cyt *c* szintje, mely az 1 mM SA kezelés hatására bekövetkező PCD indukcióját igazolta a paradicsom növények kifejlett leveleiben. Az 1 mM SA kezelés hatására emellett csökkent a COX és mtHXX aktivitás a kezelt levelekből származó mitokondriumokban. Ugyanakkor az mtROS és mtNO produkció fokozódott az SA-kezelt növények leveleinek mitokondriumaiban, melyet a HXX enzim szubsztrátjának számító glükóz nem befolyásolt, viszont az mtROS produkciót a HXX inhibitor NAG szignifikánsan növelte, igazolva, hogy az SA hatására csökkent mtHXX aktivitás a NAG jelenlétében hozzájárulhat az mtROS termelés fokozódásához.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy nemcsak az SA, hanem más jelentős, védekezésben szerepet játszó hormonok, mint például a JA és az ET is részt vesz az ER stressz kiváltásában és az UPR indukciójában a paradicsom *BiP* gén expressziójának változása alapján. Emellett különböző hormon mutáns és transzgenikus paradicsom növények felhasználásával igazoltuk, hogy a Tm kezelés által indukált *SiBiP* génexpresszió növekedése kisebb mértékű volt a *NahG*, *jai1* és *Nr* paradicsom növények leveleiben a VT növényekhez képest. A kémiai chaperon PBA kezelés mérsékelte a Tm által kiváltott ER stresszt, mely azonban nem függött az SA jelenlététől, viszont a JA szignifikánsan befolyásolta azt. Az SA szerepét tovább vizsgálva megállapíthatjuk, hogy az SA kezelések általában fokozták a szuperoxid-gyökanion produkciót a Tm kezeléshez hasonlóan, amelyet az együttes Tm+SA kezelés nem befolyásolt szignifikánsan, azonban a PBA csökkentette azt. Ehhez hasonlóan változott a levelek H₂O₂ tartalma is, a Tm és Tm+SA kezelések növelték a VT levelekben, míg a PBA csökkentette azt. A *NahG* növények leveleiben nem volt szignifikáns változás a mért ROS tartalomban a kezelések hatására, de az alap H₂O₂ szintek általában magasabbak voltak, míg a szuperoxid-gyökanion szintek alacsonyabbak a VT levelekben mértékhez képest. A GSH és GSSG szinteket szignifikánsan növelte a Tm és PBA kezelés a VT növények leveleiben. Ugyanakkor az 1 mM-os SA kezelés hasonló GSH és GSSG felhalmozódást eredményezett a Tm kezeléshez képest és nem különbözött az SA+Tm együttes kezelés- okozta változásoktól. A legalacsonyabb GSH és GSSG szinteket általában a *NahG* növények leveleiben mértük, utalva az SA jelentős szerepére a folyamatban. A GR, DHAR és GST enzimek aktivitását fokozta a Tm kezelés, azonban csak a DHAR és GST aktivitás mutatott jelentősebb SA-függést a paradicsom növények leveleiben. A GPOX aktivitás nem változott szignifikánsan a Tm és PBA kezelések

hatására. A glutation metabolizmusban részt vevő kulcsenzimeket kódoló vizsgált paradicsom gének közül az *SIGR2* és *SIGGT*, valamint az *SIGSTT2* aktiválódott az SA-tól függően, mivel ezen gének relatív transzkript szintje a *NahG* növények leveleiben alacsony volt és az SA kezelés hatására fokozódott a VT levelekben. Az *SIGR1*, *SIGSTF2*, *SIGSTU5* és *SIGTT3* gének expressziója nem változott jelentősen a Tm kezelés hatására, míg az *SIGSH1* és *SIDHAR2* expressziója csökkent a VT növények leveleiben. A PBA kezelés ugyanakkor fokozta az *SIGR1*, *SIGR2*, *SIGSTT2* és *SIGSTT3* gének transzkripcióját, mely szerepet játszhat a Tm-indukálta ER stressz mérséklésében, ahogyan a lipidperoxidáció és az ionkieresztés is csökkent a VT növények leveleiben a kémiai chaperon kezelés hatására. Az SA további szerepét erősíti az ER stressz és a redox folyamatok szabályozásában, hogy a *NahG* növények leveleiben alacsonyabb maradt az MDA szint és az ionkieresztés a Tm kezelés hatására, a VT növényekben mértékhez képest. Mindemellett megvizsgáltuk, hogy az SA-tól függően a kloroplasztiszok milyen szerepet töltenek be a Tm által kiváltott ER stressz és UPR során. Igazoltuk, hogy a sötétben történő Tm kezelés hatására az *SIBiP* expressziója szignifikánsan alacsonyabb és a H₂O₂ akkumulációja valamivel kisebb maradt a fényben mértékhez képest a VT növények leveleiben. Izolált kloroplasztiszok felhasználásával igazoltuk, hogy a Tm kezelés csak közvetetten hathat a kloroplasztiszok ROS produkciójára. Ezzel párhuzamosan konfokális mikroszkópia segítségével bizonyítottuk, hogy a Tm-kezelt növények leveleiben szignifikánsan megnőtt a kloroplasztikus ROS produkció. Ennek alapján a kloroplasztisz tehát a Tm-indukált ROS közvetett forrása és egyben célpontja is lehet. Éppen ezért az ER stressz fotoszintetikus apparátusra gyakorolt hatásának tanulmányozása során megvizsgáltuk a Tm hatását, és megfigyeltük, hogy a Tm kezelés szignifikánsan csökkentette a Y(I) és Y(II), valamint a Y(NA) fotoszintetikus paraméterek értékeit és párhuzamosan növelte a Y(ND), NPQ és CEF értékeit. Ugyanakkor ezek a változások, az NPQ kivételével még kifejezettebbek voltak a *NahG* növények leveleiben, utalva az SA UPR során betöltött védekezést elősegítő szerepére.

8. Tézisek

- A gomba elicitor hatására történő *SIPRI* expresszió napszakfüggést mutatott a paradicsom növények kifejtett leveleiben. Ezzel párhuzamosan a levelekben történt lokális és szisztémikus sztómazáródás és mértéke szintén függött a CHT kezelés alkalmazásának időpontjától.
- A CHT által indukált egy órán belüli lokális *SIPRI* indukció a sötétben nem figyelhető meg a fényperiódus elején történt kezelés során, mely a CHT kezelésre adott SA-függő védekezési válaszok fényfüggését igazolja. Ennek részeként a CHT kezelés-indukálta lokális és szisztémikus szuperoxid-gyökion produkció kisebb mértékű a sötétben történt CHT alkalmazás hatására a fényben mértékhez képest. Ugyanakkor az UPR markergén *SIBiP* expressziójának egy órán belüli fokozódása nem mutatott fényfüggést.
- A gyökéren keresztül alkalmazott exogén szubletális és letális 0,1 és 1 mM SA kezelések a koncentráció függvényében szignifikánsan megemelték a levelek szabad és teljes SA tartalmát a 24. órára, mely nem mutatott fényfüggést.
- A 0,1 és 1 mM SA kezelések hatására az alkalmazott koncentráció függvényében fokozódott a levelekben a lipidperoxidáció és az ionkieresztés mértéke a 24. órára normál fotoperióduson, a fényben, mely azonban kisebb mértékű vagy változatlan maradt a sötétben történt SA kezelések hatására.
- Az SA kezelések az alkalmazott koncentráció és az idő függvényében fokozták a paradicsom növények leveleiben a szuperoxid-gyökion produkciót és növelték a H_2O_2 szinteket a normál fotoperióduson a fényben, mely a sötétben szignifikánsan kisebb vagy változatlan maradt.
- A ROS metabolizmusban résztvevő főbb enzimek közül a letális koncentrációjú SA kezelés hatására jelentősen fokozódott a NADPH-oxidáz, a SOD, az APX és a POD aktivitása a normál fotoperióduson, a fényben, míg a sötétben ez a hatás kisebb mértékű volt vagy elmaradt a 24. órára. Mindkét koncentrációjú SA kezelés a fény jelenlététől vagy hiányától függetlenül gátolta a KAT enzim aktivitását. Az enzimeket kódoló gének közül az *SIRBOH1*, *SIMnSOD*, *SICu/ZnSOD*, *SIKAT1*, *SIAPX1* és *SIAPX2* letális koncentrációjú SA kezelés által kiváltott relatív transzkript szintnövekedése mutatott fényfüggést, mivel azok a sötétben jelentősen kisebbek voltak vagy elmaradtak a fényben mértékhez képest.
- Az SA letális koncentrációban a fény jelenlététől vagy hiányától függetlenül csökkentette a Y(II) és Y(I), valamint a Y(NA) fotoszintetikus paraméterek értékeit, és ezzel

párhuzamosan növelte a Y(NO) és Y(NPQ), valamint a Y(ND) paraméterek értékeit. Ezek a változások az alacsonyabb koncentrációjú, 0,1 mM SA kezelések esetén a sötétben voltak kimutathatók, utalva a fotoszintetikus apparátusra gyakorolt SA hatás koncentráció- és fényérzékenységre.

- TEM analízis segítségével kimutattuk, hogy az 1 mM SA kezelés hatására a paradicsom növények leveleiben a kloroplasztiszok elvesztették normál szerkezetüket, gömb alakúak, hosszúkásak vagy ívesek voltak. Emellett a letális koncentrációjú SA kezelés hatására a tilakoid membránok tágulását, tilakoid vezikulák megjelenését és hosszú, hullámos, deformált lumeneket figyelhettünk meg. Ugyanakkor az 1 mM SA kezelés a kloroplasztiszok vakuolizációját okozta, de a lumenben nem eredményezett jelentős deformációt a sötétben történt kezelések esetében. Emellett a kloroplasztiszok területe, a keményítőszemcsék száma, a gránumok magassága és szélessége az alkalmazott SA koncentráció függvényében a normál fotoperióduson a fényben csökkent, míg a sötétben nem változott szignifikánsan. Ugyanakkor a kloroplasztiszok lumenjének magassága az SA kezelés hatására fokozódott a fényben, mely a sötétben nem volt megfigyelhető.
- Az SA kezelések csökkentették a levelek keményítő tartalmát az alkalmazott SA kezelések erősségének függvényében a normál fotoperióduson a fényben mérve, mely a sötétben alapvetően alacsonyabb volt és elmaradt. Ezzel párhuzamosan a levelek oldható cukortartalma az alkalmazott SA kezelések növekvő koncentrációjának függvényében nőtt, míg a sötétben nem változott.
- A HXK-ok glükózfüggő specifikus aktivitása levélemelet- és fotoperiódus-függő változást mutatott a paradicsom növényekben, mely a kifejtett levelekben volt a legnagyobb a normál fotoperióduson, és ami a meghosszabbított 24 órás sötétség hatására korábban nőtt, majd lecsökkent a fényben mértékhez képest. A HXK enzimeket kódoló paradicsom gének közül az *SIHKK1* és az *SIHKK4* transzkriptum szintjei mutattak a legjelentősebben napi ingadozást a kifejtett levelekben a normál fotoperióduson, fényen. A sötétben azonban az *SIHKK3* gén fejeződött ki a legszignifikánsabban és a legkorábban, valamint a legjelentősebb változást elsősorban az idősebb levelekben mutatta, az *SIHKK1* génhez hasonlóan.
- Az SA kezelések szignifikánsan csökkentették a HXK aktivitást a 6. órától normál fotoperióduson a paradicsom növények kifejtett leveleiben, melyet jelentős glükózakkumuláció kísért a 24. órára. Ezzel párhuzamosan az SA kezelések hatására a

napiritmust mutató vizsgált *SIHXK* gének relatív transzkript szintje szintén szignifikánsan lecsökkent az SA kezelések 6. órájától.

- Az SA kezelések a mitokondriális kriszták duzzadását és dezorganizációját, valamint a mitokondriumok szétesését és vakuolizációját okozták, mellyel párhuzamosan szignifikánsan lecsökkent a mitokondriumok cyt *c* szintje, igazolva az 1 mM SA PCD-t indukáló hatását.
- Az 1 mM SA kezelés hatására csökkent a HXK és COX aktivitás a kezelt levelekből származó mitokondriumokban és ezzel párhuzamosan fokozódott az mtROS és mtNO produkciója. A HXK enzim szubsztrátjának számító glükóz hozzáadása a mitokondrium szuszpenzióhoz nem befolyásolta az mtROS produkcióját, viszont a HXK inhibitor NAG alkalmazása szignifikánsan növelte azt, igazolva, hogy az SA kezelés hatására vagy a NAG jelenlétében csökkent mtHXK aktivitás hozzájárulhat az mtROS termelés fokozódásához és a PCD indukcióhoz.
- Kimutattuk, hogy az ER stressz és UPR szabályozásában részt vesz az SA mellett a JA és az ET is, mivel az exogén SA, JA és ACC kezelések fokozták az *SIbIP* expresszióját, ami az ER stresszt kiváltó Tm hatására a *NahG*, *jai1* és *Nr* paradicsom növények leveleiben alacsonyabban maradt. A kémiai chaperon PBA hatása kevésbé függött az SA-tól, mint a JA és ET hormonoktól a Tm kezelés mellett.
- A *NahG* növények leveleiben nem volt szignifikáns változás a szuperoxid-gyökkanion és a H₂O₂ tartalomban az ER stressz kezelések hatására a kezeletlen VT kontrollhoz képest, de az alap H₂O₂ szint magasabb volt, míg a szuperoxid-gyökkanion szint alacsonyabb a VT levelekben mértékhez képest.
- A GSH és GSSG szinteket szignifikánsan növelte a Tm és PBA kezelés a VT növények leveleiben. Emellett az 1 mM SA kezelés hasonló GSH és GSSG felhalmozódást eredményezett a Tm kezeléshez képest és nem különbözött az SA+Tm együttes kezelés- okozta változásoktól. A legalacsonyabb GSH és GSSG szinteket általában a *NahG* növények leveleiben mértük, utalva az SA jelentős szerepére a folyamat szabályozásában.
- A glutation metabolizmusában szerepet játszó enzimek közül a GR, a DHAR és a GST enzimek aktivitását fokozta a Tm kezelés, azonban csak a DHAR és GST aktivitás mutatott jelentősebb SA-függést a paradicsom növények leveleiben. A GPOX aktivitás nem változott szignifikánsan a Tm és PBA kezelésekre sem.
- A glutation metabolizmusában részt vevő kulcsenzimeket kódoló paradicsom gének közül az *SIGR2* és *SIGGT*, valamint az *SIGSTT2* aktiválódott az SA-tól függően, mivel ezen

gének relatív transzkript szintje a *NahG* növények leveleiben alacsony volt és az SA kezelés hatására fokozódott a VT levelekben. Az *SIGR1*, *SIGSTF2*, *SIGSTU5* és *SIGTT3* gének expressziója nem változott szignifikánsan a Tm kezelés hatására, míg az *SIGSH1* és az *SIDHAR2* expressziója csökkent a VT növények leveleiben. A PBA kezelés ugyanakkor fokozta az *SIGR1*, *SIGR2*, *SIGSTT2* és *SIGSTT3* gének transzkripcióját, mely szerepet játszhat a Tm-indukálta ER stressz mérséklésében.

- Az SA további szerepét erősíti az ER stressz és a redox folyamatok szabályzásában, hogy a *NahG* növények leveleiben alacsonyabb maradt az MDA szint és az ionkieresztés a Tm kezelést követően, a VT növényekben mértékhez képest.
- A sötétben történő Tm kezelés hatására az *SIBiP* expressziója szignifikánsan alacsonyabb és a H₂O₂ akkumulációja valamivel kisebb maradt a fényben mértékhez képest a VT növények leveleiben. Izolált kloroplasztiszok felhasználásával igazoltuk, hogy a Tm kezelés csak közvetetten hathat a kloroplasztiszok ROS produkciójára. Konfokális mikroszkópia segítségével bizonyítottuk, hogy a Tm-kezelt növények leveleiben szignifikánsan megnőtt a kloroplasztikus ROS produkció.
- A Tm kezelés szignifikánsan csökkentette a Y(I) és Y(II), valamint a Y(NA) fotoszintetikus paraméterek értékeit és párhuzamosan növelte a Y(ND), az NPQ és a CEF értékeit. Ugyanakkor ezek a változások, az NPQ kivételével kifejezettebbek voltak a *NahG* növények leveleiben, igazolva az SA UPR során betöltött védekezést segítő szerepét.

9. Irodalomjegyzék

- Abreu, M. E., Munne-Bosch, S. (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1261-1271.
- Acevedo, F. E., Rivera-Vega, L. J., Chung, S. H., Ray, S., Felton, G. W. (2015). Cues from chewing insects—the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 80-86.
- 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. *Biologia Plantarum*, 49, 541-550.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2006). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 25, 613-620.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55(1), 373-399.
- Arfan, M., Athar, H. R., Ashraf, M. (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress?. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 685-694.
- Attia, H., Karray, N., Lachaâl, M. (2009). Light interacts with salt stress in regulating superoxide dismutase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 177(3), 161-167.
- Ayaz, A., Hu, C., Li, Y. (2024). Current advances and future prospects of ER stress signaling and its chemical mitigation in plants. *Plant Growth Regulation*, 1-5.
- Bai, Y., Rottwinkel, G., Feng, J., Liu, Y., Lamparter, T. (2016). Bacteriophytochromes control conjugation in *Agrobacterium fabrum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 192-199.
- Ballaré, C. L. (2014) Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 335-363.
- Bari, R., Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 473-488.
- Battaglia, V., Salvi, M., Toninello, A. (2005). Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33864-33872.
- Belkadhi, A., De Haro, A., Obregon, S., Chaïbi, W., Djebali, W. (2015). Exogenous salicylic acid protects phospholipids against cadmium stress in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 102-109.
- Belt, K., Huang, S., Thatcher, L. F., Casarotto, H., Singh, K. B., Van Aken, O., Millar, A. H. (2017). Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase. *Plant Physiology*, 173(4), 2029-2040.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., Fallik, E. (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22(2), 285-290.
- Beyer, M., Röding, S., Ludewig, A., Verreet, J. A. (2004). Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. *Journal of Phytopathology*, 152(2), 92-97.
- Bhattacharya, O., Ortiz, I., Walling, L. L. (2020). Methodology: an optimized, high-yield tomato leaf chloroplast isolation and stroma extraction protocol for proteomics analyses and identification of chloroplast co-localizing proteins. *Plant Methods*, 16, 1-21.
- Boller, T., Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 379-406.

- Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS Journal*, 277(9), 2022-2037.
- Bonomi, H. R., Toum, L., Sycz, G., Sieira, R., Toscani, A. M., Gudesblat, G. E., Malamud, F. (2016). *Xanthomonas campestris* attenuates virulence by sensing light through a bacteriophytochrome photoreceptor. *EMBO Reports*, 17(11), 1565-1577.
- Borbély, P., Bajkán, S., Poór, P., Tari, I. (2019). Exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid controls photosynthetic activity, accumulation of reactive oxygen or nitrogen species and macroelement content in tomato in long-term experiments. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1110-1126.
- Borbély, P., Gasperl, A., Pálmai, T., Ahres, M., Asghar, M. A., Galiba, G., ... Kocsy, G. (2022). Light intensity-and spectrum-dependent redox regulation of plant metabolism. *Antioxidants*, 11(7), 1311.
- Borbély, P., Poór, P., Tari, I. (2020). Changes in physiological and photosynthetic parameters in tomato of different ethylene status under salt stress: Effects of exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid treatment and the inhibition of ethylene signalling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 345-356.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., ... Leaver, C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42(4), 567-585.
- Caires, N. P., Rodrigues, F. A., Furtado, G. Q. (2015). Infection process of *Botrytis cinerea* on Eucalypt leaves. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8), 604-611.
- Camacho-Pereira, J., Meyer, L. E., Machado, L. B., Oliveira, M. F., Galina, A. (2009). Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. *Plant Physiology*, 149(2), 1099-1110.
- Carter, C., Healy, R., O'Tool, N. M., Naqvi, S. S., Ren, G., Park, S., ... Thornburg, R. W. (2007). Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology*, 143(1), 389-399.
- Carvalho, H. H., Silva, P. A., Mendes, G. C., Brustolini, O. J., Pimenta, M. R., Gouveia, B. C., ... Fontes, E. P. (2014). The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology*, 164(2), 654-670.
- Carvalho, S. D., Castillo, J. A. (2018). Influence of light on plant-phyllosphere interaction. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1482.
- 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(4), 473-478.
- Chaitanya, K. K., Naithani, S. C. (1994). Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. *New Phytologist*, 126(4), 623-627.
- Chandra-Shekara, A. C., Gupte, M., Navarre, D., Raina, S., Raina, R., Klessig, D., Kachroo, P. (2006). Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip Crinkle Virus in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 45(3), 320-334.
- Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., Muday, G. K. (2019). RBOH-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. *Chemical Research in Toxicology*, 32(3), 370-396.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., Lü, W., Jin, J. B., Hua, X. (2011). Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids*, 40, 1473-1484.
- Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, 38: 87-117.
- Chen, S., Zimei, L., Cui, J., Jiangang, D., Xia, X., Liu, D., Yu, J. (2011). Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. *Plant Growth Regulation*, 65, 101-108.

- Chen, X., Wang, Y., Li, J., Jiang, A., Cheng, Y., Zhang, W. (2009). Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), 407-415.
- Chen, Y. E., Cui, J. M., Li, G. X., Yuan, M., Zhang, Z. W., Yuan, S., Zhang, H. Y. (2016). Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 60(1), 139-147.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling Behavior*, 4(6), 493-496.
- Cheng, D. D., Liu, M. J., Sun, X. B., Zhao, M., Chow, W. S., Sun, G. Y., ... Hu, Y. B. (2016). Light suppresses bacterial population through the accumulation of hydrogen peroxide in tobacco leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 512.
- Cheng, Q., Zhou, Y., Liu, Z., Zhang, L., Song, G., Guo, Z., ... Yang, D. (2015). An alternatively spliced heat shock transcription factor, Os HSFA 2dI, functions in the heat stress-induced unfolded protein response in rice. *Plant Biology*, 17(2), 419-429.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Coutinho, F. S., Dos Santos, D. S., Lima, L. L., Vital, C. E., Santos, L. A., Pimenta, M. R., ... de Oliveira Ramos, H. J. (2019). Mechanism of the drought tolerance of a transgenic soybean overexpressing the molecular chaperone BiP. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 457-472.
- Couto, D., Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552.
- Czarnocka, W., Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.
- Csiszár, J., Brunner, S., Horváth, E., Bela, K., Ködmön, P., Riyazuddin, R., ... Tari, I. (2018). Exogenously applied salicylic acid maintains redox homeostasis in salt-stressed *Arabidopsis gr1* mutants expressing cytosolic roGFP1. *Plant Growth Regulation*, 86, 181-194.
- Daloso, D. M., Dos Anjos, L., Fernie, A. R. (2016). Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytologist*, 211(3), 809-818.
- Das, K., Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Dat, J. F., Pellinen, R., Tom Beeckman, Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjärvi, J., ... Van Breusegem, F. (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal*, 33(4), 621-632.
- de Souza, W. R., Vessicchi, R., Dorta, D. J., Uyemura, S. A., Curti, C., Vargas-Rechia, C. G. (2011). Characterization of *Rubus fruticosus* mitochondria and salicylic acid inhibition of reactive oxygen species generation at Complex III/Q cycle: potential implications for hypersensitive response in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43, 237-246.
- de Wit, M., Galvão, V. C., Fankhauser, C. (2016). Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 513-537.
- Dean, J. V., Mills, J. D. (2004). Uptake of salicylic acid 2-O- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia Plantarum*, 120(4), 603-612.
- Dean, J. V., Mohammed, L. A., Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 287-296.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13454-13459.
- Demarsy, E., Goldschmidt-Clermont, M., Ulm, R. (2018). Coping with 'dark sides of the sun' through photoreceptor signaling. *Trends in Plant Science*, 23(3), 260-271.
- Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F. (2012). SOS—too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17(9), 538-545.
- Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, 15(1), 23.
- Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.

- Depaepe, T., Hendrix, S., van Rensburg, H. C. J., Van den Ende, W., Cuypers, A., Van Der Straeten, D. (2021). At the crossroads of survival and death: the reactive oxygen species–ethylene–sugar triad and the unfolded protein response. *Trends in Plant Science*, 26(4), 338-351.
- Desikan, R., Cheung, M. K., Clarke, A., Golding, S., Sagi, M., Fluhr, R., ... Neill, S. (2004). Hydrogen peroxide is a common signal for darkness-and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Functional Plant Biology*, 31(9), 913-920.
- Desoky, E. S. M., Selem, E., Abo El-Maati, M. F., Hassn, A. A., Belal, H. E., Rady, M. M., ... Ali, E. F. (2021). Foliar supplementation of clove fruit extract and salicylic acid maintains the performance and antioxidant defense system of *Solanum tuberosum* L. under deficient irrigation regimes. *Horticulturae*, 7(11), 435.
- Devireddy, A. R., Liscum, E., Mittler, R. (2020). Phytochrome B is required for systemic stomatal responses and reactive oxygen species signaling during light stress. *Plant Physiology*, 184(3), 1563-1572.
- Ding, P., Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in Plant Science*, 25(6), 549-565.
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, 173(6), 1454-1467.
- Djajanegara, I., Finnegan, P. M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., Day, D. A. (2002). Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Molecular Biology*, 50, 735-742.
- Dodd, A. N., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J. M., Millar, A. J., Webb, A. A. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 309(5734), 630-633.
- Dogra, V., Duan, J., Lee, K. P., Kim, C. (2019). Impaired PSII proteostasis triggers a UPR-like response in the *var2* mutant of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 70(12), 3075-3088.
- Dogra, V., Rochaix, J. D., Kim, C. (2018). Singlet oxygen-triggered chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathways: an emerging perspective. *Plant, Cell Environment*, 41(8), 1727-1738.
- Dokhanieh, A. Y., Aghdam, M. S., Fard, J. R., Hassanpour, H. (2013). Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. *Scientia Horticulturae*, 154, 31-36.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C. P., ... Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8744-8749.
- Dugardeyn, J., Van Der Straeten, D. (2008). Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant science*, 175(1-2), 59-70.
- Durner, J., Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11312-11316.
- Ederli, L., Reale, L., Ferranti, F., Pasqualini, S. (2004). Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiologia Plantarum*, 121(1), 66-74.
- Edwards, R., Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 169-186.
- El-Tayeb, M. A. (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45, 215-224.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2480-2484.
- Fang, C. X., Xiong, J., Qiu, L., Wang, H. B., Song, B. Q., He, H. B., ... Lin, W. X. (2009). Analysis of gene expressions associated with increased allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.) induced by exogenous salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 57, 163-172.
- Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41, 281-284.
- Fichman, Y., Rowland, L., Oliver, M. J., Mittler, R. (2023). ROS are evolutionary conserved cell-to-cell stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(31), e2305496120.

- Fobert, P. R., Després, C. (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 378-382.
- Folta, K. M., Carvalho, S. D. (2015). Photoreceptors and control of horticultural plant traits. *HortScience*, 50(9), 1274-1280.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants Redox Signaling*, 11(4), 861-905.
- Fu, L., Tan, D., Sun, X., Ding, Z., Zhang, J. (2020). Transcriptional analysis reveals potential genes and regulatory networks involved in salicylic acid-induced flowering in duckweed (*Lemna gibba*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 512-522.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228-232.
- Gallé, Á., Bela, K., Hajnal, Á., Faragó, N., Horváth, E., Horváth, M., ... Csiszár, J. (2021). Crosstalk between the redox signalling and the detoxification: GSTs under redox control?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 169, 149-159.
- Gallé, Á., Csiszár, J., Secenji, M., Guóth, A., Cseuz, L., Tari, I., ... Erdei, L. (2009). Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 166(17), 1878-1891.
- Gallie, D. R. (2015). Ethylene receptors in plants-why so much complexity?. *F1000prime Reports*, 7.
- Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., ... Qiang, S. (2018). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1-12.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., Métraux, J. P. (2008). Characterization and biological function of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(3), 1279-1287.
- Gawroński, P., Górecka, M., Bederska, M., Rusaczek, A., Ślesak, I., Kruk, J., Karpiński, S. (2013). Isochorismate synthase 1 is required for thylakoid organization, optimal plastoquinone redox status, and state transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 64(12), 3669-3679.
- Gebauer, P., Korn, M., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Koch, C., Voll, L. M. (2017). Sugar accumulation in leaves of *Arabidopsis sweet11/sweet12* double mutants enhances priming of the salicylic acid-mediated defense response. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1378.
- Gémes, K., Poór, P., Horváth, E., Kolbert, Z., Szopkó, D., Szepesi, Á., Tari, I. (2011). Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum*, 142(2), 179-192.
- Geng, R., Li, X., Huang, J., Zhou, W. (2024). The chloroplast singlet oxygen-triggered biosynthesis of salicylic acid and jasmonic acid is mediated by EX1 and GUN1 in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environment* 47(8), 2852-2864.
- Genoud, T., Buchala, A. J., Chua, N. H., Métraux, J. P. (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(1), 87-95.
- Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1), 87-92.
- Gharbi, E., Martínez, J. P., Benahmed, H., Fauconnier, M. L., Lutts, S., Quinet, M. (2016). Salicylic acid differently impacts ethylene and polyamine synthesis in the glycophyte *Solanum lycopersicum* and the wild-related halophyte *Solanum chilense* exposed to mild salt stress. *Physiologia Plantarum*, 158(2), 152-167.
- Ghosh, D., Mohapatra, S., Dogra, V. (2023). Improving photosynthetic efficiency by modulating non-photochemical quenching. *Trends in Plant Science*, 28(3), 264-266.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Godbole, A., Dubey, A. K., Reddy, P. S., Udayakumar, M., Mathew, M. K. (2013). Mitochondrial VDAC and hexokinase together modulate plant programmed cell death. *Protoplasma*, 250, 875-884.

- Gondor, O. K., Janda, T., Soós, V., Pál, M., Majláth, I., Adak, M. K., ... Szalai, G. (2016). Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1447.
- Goodspeed, D., Chehab, E. W., Min-Venditti, A., Braam, J., Covington, M. F. (2012). Arabidopsis synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4674-4677.
- Grabsztunowicz, M., Jackowski, G. (2013). Isolation of intact and pure chloroplasts from leaves of *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low irradiance for studies on Rubisco regulation. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82(1).
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., Smith, A. M. (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9458-9463.
- Griebel, T., Zeier, J. (2008). Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*, 147(2), 790-801.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207-212.
- Gruner, K., Griebel, T., Návarová, H., Attaran, E., Zeier, J. (2013). Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 252.
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., van Dongen, J. T. (2011a). On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science*, 16(3), 160-168.
- Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U., Manjunatha, G., Segu, S., Moran, J. F., Neelawarne, B., ... Kaiser, W. M. (2011b). The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Science*, 181(5), 520-526.
- Gust, A. A., Nürnberger, T. (2012). A life or death switch. *Nature*, 486(7402), 198-199.
- Hajihashemi, S., Jahantigh, O., Alboghobeish, S. (2022). The redox status of salinity-stressed *Chenopodium quinoa* under salicylic acid and sodium nitroprusside treatments. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1030938.
- Han, G. Z. (2019). Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist*, 222(1), 70-83.
- Hansen, J., Møller, I. B. (1975). Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry*, 68(1), 87-94.
- Harper, J. R., Balke, N. E. (1981). Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiology*, 68(6), 1349-1353.
- Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., ... Zeier, J. (2018). Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell*, 173(2), 456-469.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A., Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8(9), 384.
- Häusler, R. E., Schlieben, N. H., Nicolay, P., Fischer, K., Fischer, K. L., Flügge, U. I. (2000). Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta*, 210, 371-382.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597-606.
- Hayashi, S., Takaiwa, F. (2015). Visualization of endoplasmic reticulum stressed cells for forward genetic studies in plants. *Journal of Plant Physiology*, 180, 61-66.
- Hayashi, S., Wakasa, Y., Takahashi, H., Kawakatsu, T., Takaiwa, F. (2012). Signal transduction by IRE1-mediated splicing of bZIP50 and other stress sensors in the endoplasmic reticulum stress response of rice. *The Plant Journal*, 69(6), 946-956.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental botany*, 68(1), 14-25.

- Herbstová, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M. V., Kirchoff, H. (2012). Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20130-20135.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in Plant Science*, 14(3), 125-132.
- Hoerberichts, F. A., Woltering, E. J. (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays*, 25(1), 47-57.
- Horváth, E., Bela, K., Papdi, C., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. (2015). The role of Arabidopsis glutathione transferase F9 gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4), 406-418.
- 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 Science*, 163(6), 1129-1135.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 290-300.
- Howell, S. H. (2013). Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 477-499.
- Hua, C., Li, Y., Wang, X., Kai, K., Su, M., Zhang, D., Liu, Y. (2019). The effect of low and high molecular weight chitosan on the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on kiwifruit and host response. *Scientia Horticulturae*, 246, 700-709.
- Hua, J. (2013) Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 406-413.
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., Millar, A. H. (2016). The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1551-1559.
- Huang, W., Zhang, S. B., Cao, K. F. (2011). Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature. *Plant and Cell Physiology*, 52(2), 297-305.
- Hurný, A., Cuesta, C., Cavallari, N., Ötvös, K., Duclercq, J., Dokládál, L., ... Benková, E. (2020). SYNERGISTIC ON AUXIN AND CYTOKININ 1 positively regulates growth and attenuates soil pathogen resistance. *Nature Communications*, 11(1), 2170.
- Iqbal, N., Czékus, Z., Poór, P., Ördög, A. (2021). Plant defence mechanisms against mycotoxin Fumonisin B1. *Chemico-Biological Interactions*, 343, 109494.
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8, 475.
- Iqbal, Z., Iqbal, M. S., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ansari, M. I. (2021). Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 631810.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomasasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 493-500.
- Islam, S., Rahman, I. A., Islam, T., Ghosh, A. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PLoS One*, 12(11), e0187504.
- Issak, M., Okuma, E., Munemasa, S., Nakamura, Y., Mori, I. C., Murata, Y. (2013). Neither endogenous abscisic acid nor endogenous jasmonate is involved in salicylic acid-, yeast elicitor-, or chitosan-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(5), 1111-1113.
- Iwai, M., Yokono, M., Nakano, A. (2014). Visualizing structural dynamics of thylakoid membranes. *Scientific Reports*, 4(1), 3768.
- Jahan, M. S., Wang, Y., Shu, S., Zhong, M., Chen, Z., Wu, J., ... Guo, S. (2019). Exogenous salicylic acid increases the heat tolerance in Tomato (*Solanum lycopersicum* L) by enhancing photosynthesis efficiency and improving antioxidant defense system through scavenging of reactive oxygen species. *Scientia Horticulturae*, 247, 421-429.

- Jahns, P., Holzwarth, A. R. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 182-193.
- Janda, K., Hideg, É., Szalai, G., Kovács, L., Janda, T. (2012). Salicylic acid may indirectly influence the photosynthetic electron transport. *Journal of Plant Physiology*, 169(10), 971-978.
- Janda, M., Ruelland, E. (2015). Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 117-128.
- Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G., Pál, M. (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2537-2546.
- Jaspers, P., Kangasjärvi, J. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 405-413.
- Jayaraj, J., Rahman, M., Wan, A., Punja, Z. K. (2009). Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. *Annals of Applied Biology*, 155(1), 71-80.
- Jelitto-Van Dooren, E. P., Vidal, S., Denecke, J. (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *The Plant Cell*, 11(10), 1935-1943.
- Jiménez-Quesada, M. J., Traverso, J. Á., Alché, J. D. D. (2016). NADPH oxidase-dependent superoxide production in plant reproductive tissues. *Frontiers in Plant Science*, 7, 359.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R., Acet, T. (2011). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regulation*, 64, 27-37.
- Kang, Y. U. N., Outlaw Jr, W. H., Andersen, P. C., Fiore, G. B. (2007). Guard-cell apoplastic sucrose concentration—a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader *Vicia faba* L. *Plant, Cell Environment*, 30(5), 551-558.
- Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., Noctor, G. (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1619-1636.
- Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., Noctor, G. (2012) Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1619-1636.
- Karapetyan, S., Dong, X. (2018). Redox and the circadian clock in plant immunity: A balancing act. *Free Radical Biology and Medicine*, 119, 56-61.
- Karpiński, S., Szechyńska-Hebda, M., Wituszyńska, W., Burdiak, P. (2013). Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell Environment*, 36(4), 736-744.
- Kaur, H., Kaur, K., Gill, G. K. (2019). Modulation of sucrose and starch metabolism by salicylic acid induces thermotolerance in spring maize. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66, 771-777.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Ahmad, P. (2020). The role of endogenous nitric oxide in salicylic acid-induced up-regulation of ascorbate-glutathione cycle involved in salinity tolerance of pepper (*Capsicum annum* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 10-20.
- Kazan, K., Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4087-4100.
- Khan, M. I. R., Asgher, M., Khan, N. A. (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67-74.
- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 462.
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., Khan, N. A. (2013). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling Behavior*, 8(11), e26374.
- Khokon, M. A. R., Uraji, M., Munemasa, S., Okuma, E., Nakamura, Y., Mori, I. C., Murata, Y. (2010). Chitosan-induced stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated reactive oxygen species production in Arabidopsis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11), 2313-2315.
- Kim, E. H., Li, X. P., Razeghifard, R., Anderson, J. M., Niyogi, K. K., Pogson, B. J., Chow, W. S. (2009). The multiple roles of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes define structure and optimize function of Arabidopsis chloroplasts: a study using two chlorophyll b-less mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(8), 973-984.

- Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., ... Reich, Z. (2011). Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(50), 20248-20253.
- Kirchhoff, H. (2014). Structural changes of the thylakoid membrane network induced by high light stress in plant chloroplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1640), 20130225.
- Klessig, D. F., Choi, H. W., Dempsey, D. M. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(9), 871-888.
- Klessig, D. F., Tian, M., Choi, H. W. (2016). Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals. *Frontiers in Immunology*, *7*, 206.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, *1*(2), 201-247.
- Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., Galiba, G. (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Science*, *211*, 77-91.
- Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Gautam, V., Arora, S., Bhardwaj, R., ... Ahmad, P. (2018). Combined effect of 24-epibrassinolide and salicylic acid mitigates lead (Pb) toxicity by modulating various metabolites in *Brassica juncea* L. seedlings. *Protoplasma*, *255*, 11-24.
- Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Strnad, M., Repčák, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports*, *28*, 135-143.
- Kovács, J., Poór, P., Szepesi, Á., Tari, I. (2016). Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biologica Hungarica*, *67*, 148-158.
- Kraiselburd, I., Alet, A. I., Tondo, M. L., Petrocelli, S., Daurelio, L. D., Monzon, J., ... Orellano, E. G. (2012). A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri relevant for host plant colonization. *PloS One*, *7*(6), e38226.
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G. E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, *79*, 209-218.
- 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. *Journal of Plant Physiology*, *165*(9), 920-931.
- Kumari, A., Pathak, P. K., Bulle, M., Igamberdiev, A. U., Gupta, K. J. (2019). Alternative oxidase is an important player in the regulation of nitric oxide levels under normoxic and hypoxic conditions in plants. *Journal of Experimental Botany*, *70*(17), 4345-4354.
- Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T., Takahashi, Y. (2009). Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Reports*, *28*, 1301-1308.
- La, V. H., Lee, B. R., Zhang, Q., Park, S. H., Islam, M. T., Kim, T. H. (2019). Salicylic acid improves drought-stress tolerance by regulating the redox status and proline metabolism in *Brassica rapa*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *60*, 31-40.
- Lai, Y. S., Renna, L., Yarema, J., Ruberti, C., He, S. Y., Brandizzi, F. (2018). Salicylic acid-independent role of NPR1 is required for protection from proteotoxic stress in the plant endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(22), E5203-E5212.
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, *411*(6839), 848-853.
- Lawson, T. (2009). Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*, *181*(1).
- Lee, B. R., Islam, M. T., Park, S. H., Jung, H. I., Bae, D. W., Kim, T. H. (2019). Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany*, *157*, 1-10.
- Lee, H. J., Park, Y. J., Seo, P. J., Kim, J. H., Sim, H. J., Kim, S. G., Park, C. M. (2015). Systemic immunity requires SnRK2. 8-mediated nuclear import of NPR1 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *27*(12), 3425-3438.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I. S., Oh, K. Y., Jeong Choi, E., ... Lee, Y. (1999). Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology*, *121*(1), 147-152.

- Lefevre, H., Bauters, L., Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 338.
- Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Wang, H., ... Liu, B. (2011). Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 176-182.
- Lei, Y. B., Zheng, Y. L., Dai, K. J., Duan, B. L., Cai, Z. Q. (2014). Different responses of photosystem I and photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery. *Trees*, 28, 923-933.
- Leitner, M., Boland, W., Mithöfer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 167(2), 597-606.
- Li, D., Zhou, J., Zheng, C., Zheng, E., Liang, W., Tan, X., ... Wang, X. (2022). OsTGAL1 suppresses the resistance of rice to bacterial blight disease by regulating the expression of salicylic acid glucosyltransferase OsSGT1. *Plant, Cell Environment*, 45(5), 1584-1602.
- Li, M., Kim, C. (2022). Chloroplast ROS and stress signaling. *Plant Communications*, 3(1).
- Li, X., Mo, J., Guo, T., Yang, X. (2010). Effects of light on urediniospore germination, appressorium formation and infection efficiency of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 153-161.
- Li, Y., Yin, H., Wang, Q., Zhao, X., Du, Y., Li, F. (2009). Oligochitosan induced *Brassica napus* L. production of NO and H₂O₂ and their physiological function. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 612-617.
- Lin, W., Hu, X., Zhang, W., Rogers, W. J., Cai, W. (2005). Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Journal of Plant Physiology*, 162(8), 937-944.
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., Durner, J. (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *The Plant Cell*, 22(8), 2894-2907.
- Liu, J. X., Howell, S. H. (2016). Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytologist*, 211(2), 418-428.
- Liu, P. P., von Dahl, C. C., Klessig, D. F. (2011). The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiology*, 157(4), 2216-2226.
- Liu, T., Kim, D. W., Niitsu, M., Maeda, S., Watanabe, M., Kamio, Y., ... Kusano, T. (2014). Polyamine oxidase 7 is a terminal catabolism-type enzyme in *Oryza sativa* and is specifically expressed in anthers. *Plant and Cell Physiology*, 55(6), 1110-1122.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Loake, G., Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 466-472.
- Loutfy, N., El-Tayeb, M. A., Hassanen, A. M., Moustafa, M. F., Sakuma, Y., Inouhe, M. (2012). Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Research*, 125, 173-184.
- Løvdaal, T., Lillo, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 238-242.
- Love, A. J., Milner, J. J., Sadanandom, A. (2008). Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends in Plant Science*, 13(11), 589-595.
- Lu, H., McClung, C. R., Zhang, C. (2017). Tick tock: circadian regulation of plant innate immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 287-311.
- Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., Foyer, C. H. (2005). Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 417-423.
- Lv, F., Zhou, J., Zeng, L., Xing, D. (2015). β-cyclocitral upregulates salicylic acid signalling to enhance excess light acclimation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4719-4732.
- Malerba, M., Crosti, P., Cerana, R. (2010). Ethylene is involved in stress responses induced by fusicoccin in sycamore cultured cells. *Journal of Plant Physiology*, 167(17), 1442-1447.

- Malerba, M., Crosti, P., Cerana, R. (2012). Defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *Protoplasma*, 249, 89-98.
- Mandal, S., Mallick, N., Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 642-649.
- Manjunatha, G., Niranjana-Raj, S., Prashanth, G. N., Deepak, S., Amruthesh, K. N., Shetty, H. S. (2009). Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(7), 737-743.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. M., Karpinski, S. (2006). Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1795-1807.
- Matos, A. R., Mendes, A. T., Scotti-Campos, P., Arrabaça, J. D. (2009). Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein. *Physiologia Plantarum*, 137(4), 485-497.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8271-8276.
- McGrane, R., Beattie, G. A. (2017). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a regulates multiple stages of plant colonization via the bacteriophytochrome BphP1. *MBio*, 8(5), 10-1128.
- Meher, H. C., Singh, G., Chawla, G. (2018). Metabolic alternations of some amino acids, coenzymes, phytohormones and vitamins in chickpea crop grown from seeds soaked with defense stimulator. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-13.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969-980.
- Meng, F., Luo, Q., Wang, Q., Zhang, X., Qi, Z., Xu, F., ... Sun, G. (2016). Physiological and proteomic responses to salt stress in chloroplasts of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Scientific Reports*, 6(1), 23098.
- Meng, Z., Ruberti, C., Gong, Z., Brandizzi, F. (2017). CPR 5 modulates salicylic acid and the unfolded protein response to manage tradeoffs between plant growth and stress responses. *The Plant Journal*, 89(3), 486-501.
- Mesa, T., Munné-Bosch, S. (2023). α -Tocopherol in chloroplasts: nothing more than an antioxidant?. *Current Opinion in Plant Biology*, 74, 102400.
- Metwally, A. M., Radi, A. A., El-Shazoly, R. M., Hamada, A. M. (2018). The role of calcium, silicon and salicylic acid treatment in protection of canola plants against boron toxicity stress. *Journal of Plant Research*, 131, 1015-1028.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.
- Milla, M. A. R., Maurer, A., Huete, A. R., Gustafson, J. P. (2003). Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, 36(5), 602-615.
- Millenaar, F. F., Lambers, H. (2003). The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biology*, 5(01), 2-15.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84), ra45-ra45.
- Mira, M. M., Huang, S., Kapoor, K., Hammond, C., Hill, R. D., Stasolla, C. (2017). Expression of Arabidopsis class 1 phytochrome (AtPgb1) delays death and degradation of the root apical meristem during severe PEG-induced water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5653-5668.
- Mishev, K., Ananiev, E. D., Humbeck, K. (2011). Organ-specific effects of dark treatment on photosynthesis and the expression of photosynthesis-related genes. *Biologia Plantarum*, 55, 269-278.
- Mishina, T. E., Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 50(3), 500-513.

- Misra, N., Saxena, P. (2009). Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science*, 177(3), 181-189.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309.
- Miura, K., Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, 5, 4.
- Miyake, C. (2010). Alternative electron flows (water–water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant and Cell Physiology*, 51(12), 1951-1963.
- Moharekar, S. T., Lokhande, S. D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A., Chavan, P. D. (2003). Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica*, 41, 315-317.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 561-591.
- Montillet, J. L., Hirt, H. (2013). New checkpoints in stomatal defense. *Trends in Plant Science*, 18(6), 295-297.
- Moreno, A. A., Mukhtar, M. S., Blanco, F., Boatwright, J. L., Moreno, I., Jordan, M. R., ... Pajeroska-Mukhtar, K. M. (2012). IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS One*, 7(2), e31944.
- Mori, I. C., Pinontoan, R., Kawano, T., Muto, S. (2001). Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant and Cell Physiology*, 42(12), 1383-1388.
- Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P., Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, 23(5), 677-685.
- Moschou, P. N., Delis, I. D., Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiologia Plantarum*, 133(2), 140-156.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935-944.
- Moustakas, M., Sperdoui, I., Adamakis, I. D. S., Moustaka, J., İşgören, S., Şaş, B. (2022). Harnessing the role of foliar applied salicylic acid in decreasing chlorophyll content to reassess photosystem II photoprotection in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7038.
- Moyano, L., Carrau, A., Petrocelli, S., Kraiselburd, I., Gärtner, W., Orellano, E. G. (2020). Bacteriophytochromes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 modulate the early stages of plant colonization during bacterial speck disease. *European Journal of Plant Pathology*, 1-18.
- Mueller, D. S., Buck, J. W. (2003). Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Disease*, 87(4), 442-445.
- Muller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31-57.
- Munné-Bosch, S., Penuelas, J., Llusia, J. (2007). A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed NahG transgenic Arabidopsis plants. *Plant Science*, 172(4), 756-762.
- Mur, L. A., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A., Hebelstrup, K. H. (2013). Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*, 4, 215.
- Nagashima, Y., Iwata, Y., Ashida, M., Mishiba, K. I., Koizumi, N. (2014). Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 55(10), 1772-1778.

- Nagendran, R., Lee, Y. H. (2015). Green and red light reduces the disease severity by *Pseudomonas cichorii* JBC1 in tomato plants via upregulation of defense-related gene expression. *Phytopathology*, 105(4), 412-418.
- Nawkar, G. M., Lee, E. S., Shelake, R. M., Park, J. H., Ryu, S. W., Kang, C. H., Lee, S. Y. (2018). Activation of the transducers of unfolded protein response in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 214.
- Nie, S., Yue, H., Zhou, J., Xing, D. (2015). Mitochondrial-derived reactive oxygen species play a vital role in the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 10(3), e0119853.
- Noctor, G., Cohen, M., Trémulot, L., Châtel-Innocenti, G., Van Breusegem, F., Mhamdi, A. (2024). Glutathione: a key modulator of plant defence and metabolism through multiple mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 75(15), 4549-4572.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell Environment*, 35(2), 454-484.
- Noreen, S., Ashraf, M. (2010). Modulation of salt (NaCl)-induced effects on oil composition and fatty acid profile of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2608-2616.
- Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M., Day, D. A. (2004). Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology*, 134(1), 492-501.
- O'Leary, B. M., Lee, C. P., Atkin, O. K., Cheng, R., Brown, T. B., Millar, A. H. (2017). Variation in leaf respiration rates at night correlates with carbohydrate and amino acid supply. *Plant Physiology*, 174(4), 2261-2273.
- Ordog, S. H., Higgins, V. J., Vanlerberghe, G. C. (2002). Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response. *Plant Physiology*, 129(4), 1858-1865.
- Ort, D. R., Baker, N. R. (2002). A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis?. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 193-198.
- Overmyer, K., Brosché, M., Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*, 8(7), 335-342.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., Sekmen, A. H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1377-1390.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Iwata, Y., Koizumi, N., Turkan, I. (2018). Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3333-3345.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., Turkan, I. (2015). The effects of induced production of reactive oxygen species in organelles on endoplasmic reticulum stress and on the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Annals of Botany*, 116(4), 541-553.
- Ördög, A., Wodala, B., Hideg, É., Ayaydin, F., Deák, Z., Horváth, F. (2011). Chitosan elicited immune response reduces photosynthetic electron transport and ion channel activity in the guard cells of *Vicia*. *Acta Biologica Szegediensis*, 55, 135-138.
- Paik, I., Huq, E. (2019, August). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. In *Seminars in Cell Developmental Biology* (Vol. 92, pp. 114-121). Academic Press.
- 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*) plants. *Physiologia Plantarum*, 125(3), 356-364.
- Panchal S, Melotto M (2017) Stomata-based defense and environmental cues. *Plant Signal & Behavior*, 12:2021-2032.
- Pancheva, T. V., Popova, L. P. (1998). Effect of salicylic acid on the synthesis of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 152(4-5), 381-386.
- Pancheva, T. V., Popova, L. P., Uzunova, A. N. (1996). Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology*, 149(1-2), 57-63.

- Park, C. J., Park, J. M. (2019). Endoplasmic reticulum plays a critical role in integrating signals generated by both biotic and abiotic stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 399.
- 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*(5847), 113-116.
- Parra-Rojas, J., Moreno, A. A., Mitina, I., Orellana, A. (2015). The dynamic of the splicing of bZIP60 and the proteins encoded by the spliced and unspliced mRNAs reveals some unique features during the activation of UPR in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, *10*(4), e0122936.
- Paulert, R., Ebbinghaus, D., Urlass, C., Moerschbacher, B. M. (2010). Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. *Plant Pathology*, *59*(4), 634-642.
- Peng, Y., Yang, J., Li, X., Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: biosynthesis and signaling. *Annual review of plant biology*, *72*, 761-791.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 347-375.
- Podolec, R., Demarsy, E., Ulm, R. (2021). Perception and signaling of ultraviolet-B radiation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *72*(1), 793-822.
- Pogány, M., von Rad, U., Grun, S., Dongó, A., Pintye, A., Simoneau, P., ... Durner, J. (2009). Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis*-*Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology*, *151*(3), 1459-1475.
- Ponsero, A. J., Igarria, A., Darch, M. A., Miled, S., Outten, C. E., Winther, J. R., ... Toledano, M. B. (2017). Endoplasmic reticulum transport of glutathione by Sec61 is regulated by Ero1 and Bip. *Molecular Cell*, *67*(6), 962-973.
- Poór, P. (2020). Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants. *Biomolecules*, *10*(2), 341.
- Poór, P., Tari, I. (2012). Regulation of stomatal movement and photosynthetic activity in guard cells of tomato abaxial epidermal peels by salicylic acid. *Functional Plant Biology*, *39*(12), 1028-1037.
- Poór, P., Czékus, Z., Tari, I., Ördög, A. (2019). The multifaceted roles of plant hormone salicylic acid in endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 5842.
- Poór, P., Gémes, K., Horváth, F., Szepesi, A., Simon, M. L., Tari, I. (2011). Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology*, *13*(1), 105-114.
- Poór, P., Kovács, J., Borbély, P., Takács, Z., Szepesi, Á., Tari, I. (2015). Salt stress-induced production of reactive oxygen-and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant Never ripe and wild type tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *97*, 313-322.
- Poór, P., Kovács, J., Szopkó, D., Tari, I. (2013). Ethylene signaling in salt stress-and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma*, *250*, 273-284.
- Pospíšil, P. (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1787*(10), 1151-1160.
- Pospíšil, P. (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1950.
- Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., Corpas, F. J. (2021). Nitric oxide (NO) and salicylic acid (SA): A framework for their relationship in plant development under abiotic stress. *Plant Biology*, *23*, 39-49.
- Prasad, R., Gupta, N., Kumar, M., Kumar, V., Wang, S., Abd-Elsalam, K. A. (2017). Nanomaterials act as plant defense mechanism. *Nanotechnology: Food and Environmental Paradigm*, 253-269.
- Prodhan, M. Y., Issak, M., Nakamura, T., Munemasa, S., Nakamura, Y., Murata, Y. (2017). Chitosan signaling in guard cells requires endogenous salicylic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(8), 1536-1541.
- Qiu, C., Ji, W., Guo, Y. (2011). Effects of high temperature and strong light on chlorophyll fluorescence, the D1 protein, and Deg1 protease in *Satsuma mandarin*, and the protective role of salicylic acid. *Acta Ecologica Sinica*, *31*(13), 3802-3810.

- Rajalingam, N., Lee, Y. H. (2018). Effects of green light on the gene expression and virulence of the plant pathogen *Pseudomonas cichorii* JBC1. *European Journal of Plant Pathology*, 150(1), 223-236.
- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, 141(3), 910-923.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P., Watkins, C. B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*, 115(1), 137-149.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 439-463.
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B. J. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany*, 66(4), 369-373.
- Reape, T. J., Molony, E. M., McCabe, P. F. (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 435-444.
- Reddy, A. B., Rey, G. (2014). Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 165-189.
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., ... Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498-502.
- Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338.
- Roberts, M. R., Paul, N. D. (2006) Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist*, 170(4), 677-699.
- Robson, C. A., Vanlerberghe, G. C. (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and-independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology*, 129(4), 1908-1920.
- Roden, L. C., Ingle, R. A. (2009). Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *The Plant Cell*, 21(9), 2546-2552.
- Rocha, J., Nitenberg, M., Girard-Egrot, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M. A., Breton, C. (2018). Do galactolipid synthases play a key role in the biogenesis of chloroplast membranes of higher plants?. *Frontiers in Plant Science*, 9, 126.
- Roháček, K., Barták, M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica*, 37, 339-363.
- Rossard, S., Roblin, G., Atanassova, R. (2010). Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1807-1816.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141(2), 336-340.
- Saijo, Y., Loo, E. P. I. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 225(1), 87-104.
- Saini, R. K., Harish Prashanth, K. V., Shetty, N. P., Giridhar, P. (2014). Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2695-2704.
- Saleem, M., Fariduddin, Q., Castroverde, C. D. M. (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168, 381-397.
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., ... Dong, X. (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host Microbe*, 18(2), 169-182.
- Santamaría-Hernando, S., Rodríguez-Herva, J. J., Martínez-García, P. M., Río-Álvarez, I., González-Melendi, P., Zamorano, J., López-Solanilla, E. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. tomato exploits light signals to optimize virulence and colonization of leaves. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4261-4280.
- Sarowar, S., Lee, J. Y., Ahn, E. R., Pai, H. S. (2008). A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. *Journal of Plant Biology*, 51, 341-346.

- Saruhan, N., Saglam, A., Kadioglu, A. (2012). Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 97-106.
- Schmelz, E. A., LeClere, S., Carroll, M. J., Alborn, H. T., Teal, P. E. (2007). Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiology*, 144(2), 793-805.
- Scott, I., Logan, D. C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis. *New Phytologist*, 177(1), 90-101.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., ... Choi, Y. D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4788-4793.
- Serek, M., Woltering, E. J., Sisler, E. C., Frello, S., Sriskandarajah, S. (2006). Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnology Advances*, 24(4), 368-381.
- Seyfferth, C., Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 5, 697.
- Shah, R., Pathak, G., Drepper, T., Gärtner, W. (2016). Selective photoreceptor gene knock-out reveals a regulatory role for the growth behavior of *Pseudomonas syringae*. *Photochemistry and Photobiology*, 92(4), 571-578
- Sharma, A., Kohli, S. K., Khanna, K., Ramakrishnan, M., Kumar, V., Bhardwaj, R., ... Zheng, B. (2023). Salicylic acid: A phenolic molecule with multiple roles in salt-stressed plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-25.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012(1), 217037.
- Shepherd, R., Reader, S., Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14, 535-542.
- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q., Qian, Q. (2006). Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation*, 48, 127-135.
- Shimazaki, K. I., Doi, M., Assmann, S. M., Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 219-247.
- Shugaev, A. G., Butsanets, P. A., Andreev, I. M., Shugaeva, N. A. (2014). Effect of salicylic acid on the metabolic activity of plant mitochondria. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61, 520-528.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J. P., Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice (biosynthesis, conjugation, and possible role). *Plant Physiology*, 108(2), 633-639.
- Simoni, E. B., Oliveira, C. C., Fraga, O. T., Reis, P. A., Fontes, E. P. (2022). Cell Death Signaling From Endoplasmic Reticulum Stress: Plant-Specific and Conserved Features. *Frontiers in Plant Science*, 13, 835738.
- Sims, D. A., Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81(2-3), 337-354.
- Sinha, V. B., Grover, A., Ahmed, Z., Pande, V. (2014). Isolation and functional characterization of DNA damage repair protein (DRT) from *Lepidium latifolium* L. *Comptes Rendus. Biologies*, 337(5), 302-310.
- 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). *Analytical Biochemistry*, 175(2), 408-413.
- Soares, C., Carvalho, M. E., Azevedo, R. A., Fidalgo, F. (2019). Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 4-25.
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137(5), 860-872.
- Spoel, S. H., van Ooijen, G. (2014). Circadian redox signaling in plant immunity and abiotic stress. *Antioxidants Redox Signaling*, 20(18), 3024-3039.

- Srivastava, N., Gonugunta, V. K., Puli, M. R., Raghavendra, A. S. (2009). Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta*, 229, 757-765.
- Suetsugu, N., Takami, T., Ebisu, Y., Watanabe, H., Iiboshi, C., Doi, M., Shimazaki, K. I. (2014). Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in Arabidopsis. *Plos one*, 9(9), e108374.
- Sun, J. L., Li, J. Y., Wang, M. J., Song, Z. T., Liu, J. X. (2021). Protein quality control in plant organelles: current progress and future perspectives. *Molecular Plant*, 14(1), 95-114.
- Sun, J., Li, L., Liu, M., Wang, M., Ding, M., Deng, S., ... Chen, S. (2010). Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K⁺/Na⁺ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103, 205-215.
- Sun, L., Shukair, S., Naik, T. J., Moazed, F., Ardehali, H. (2008). Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), 1007-1017.
- Szabados, L., Savaouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Bajkán, Sz., Gémes, K., Horváth, F., Erdei, L., Deér, A., L., Simon, M., L., Tari I. (2005). Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt-and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 123-125.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., Tari, I. (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology*, 166(9), 914-925.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., ... Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), 952-956.
- Takács, Z., Poór, P., Tari, I. (2016). Comparison of polyamine metabolism in tomato plants exposed to different concentrations of salicylic acid under light or dark conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 266-278.
- Takács, Z., Poór, P., Szepesi, Á., Tari, I. (2017). *In vivo* inhibition of polyamine oxidase by a spermine analogue, MDL-72527, in tomato exposed to sublethal and lethal salt stress. *Functional Plant Biology*, 44(5), 480-492.
- Takahashi, S., Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition?. *Trends in Plant Science*, 13(4), 178-182.
- Takahashi, S., Milward, S. E., Fan, D. Y., Chow, W. S., Badger, M. R. (2009). How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in Arabidopsis?. *Plant Physiology*, 149(3), 1560-1567.
- Talapka, P., Berkó, A., Nagy, L. I., Chandrakumar, L., Bagyánszki, M., Puskás, L. G., ... Bódi, N. (2016). Structural and molecular features of intestinal strictures in rats with Crohn's-like disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(22), 5154.
- Tari, I. (2002). Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4), 55-56.
- Tari, I., Csiszár, J., Horváth, E., Poór, P., Takács, Z., Szepesi, Á. (2015). The alleviation of the adverse effects of salt stress in the tomato plant by salicylic acid shows a time-and organ-specific antioxidant response. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 57(1), 21-30.
- Thomma, B. P., Nürnberger, T., Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23(1), 4-15.
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., Weng, J. K. (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(12), 1577-1586.
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 419-441.
- Toum, L., Torres, P. S., Gallego, S. M., Benavides, M. P., Vojnov, A. A., Gudesblat, G. E. (2016). Coronatine inhibits stomatal closure through guard cell-specific inhibition of NADPH oxidase-dependent ROS production. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1851.

- Triantaphylidès, C., Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14(4), 219-228.
- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., ... Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148(2), 960-968.
- Turk, H. (2019). Chitosan-induced enhanced expression and activation of alternative oxidase confer tolerance to salt stress in maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 415-422.
- Ullah, C., Tsai, C. J., Unsicker, S. B., Xue, L., Reichelt, M., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. (2019). Salicylic acid activates poplar defense against the biotrophic rust fungus *Melampsora larici-populina* via increased biosynthesis of catechin and proanthocyanidins. *New Phytologist*, 221(2), 960-975.
- Umbach, A. L., Fiorani, F., Siedow, J. N. (2005). Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, 139(4), 1806-1820.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., Turkan, I. (2017). Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in Arabidopsis. *Functional Plant Biology*, 45(2), 284-296.
- Uzunova, A. N., Popova, L. P. (2000). Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica*, 38, 243-250.
- Van Aken, O., Van Breusegem, F. (2015). Licensed to kill: mitochondria, chloroplasts, and cell death. *Trends in Plant Science*, 20(11), 754-766.
- van den Burg, H. A., Takken, F. L. (2009). Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance?. *Trends in Plant Science*, 14(5), 286-294.
- van Doorn, W. G. (2008). Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels?. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 1963-1972.
- Van Gelder, K., Forrester, T., Akhtar, T. A. (2020). Evidence from stable-isotope labeling that catechol is an intermediate in salicylic acid catabolism in the flowers of *Silene latifolia* (white campion). *Planta*, 252, 1-11.
- Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., He, S. Y. (2018). Plant-pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology*, 28(10), R619-R634.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. J. P. S. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59-66.
- Venugopal, S. C., Jeong, R. D., Mandal, M. K., Zhu, S., Chandra-Shekara, A. C., Xia, Y., ... Kachroo, P. (2009). Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS Genetics*, 5(7), e1000545.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.
- Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., ... Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229(3), 1234-1250.
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., Dong, X. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, 308(5724), 1036-1040.
- Wang, J., Xu, G., Ning, Y., Wang, X., Wang, G. L. (2022). Mitochondrial functions in plant immunity. *Trends in Plant Science*.
- Wang, M., Rui, L., Yan, H., Shi, H., Zhao, W., Lin, J. E., ... Wang, G. L. (2018). The major leaf ferredoxin Fd2 regulates plant innate immunity in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1377-1390.
- Wang, Y., Zhang, H., Hou, P., Su, X., Zhao, P., Zhao, H., Liu, S. (2014). Foliar-applied salicylic acid alleviates heat and high light stress induced photoinhibition in wheat (*Triticum aestivum*) during the grain filling stage by modulating the psbA gene transcription and antioxidant defense. *Plant Growth Regulation*, 73, 289-297.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., Jiang, W. (2015). The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae*, 181, 113-120.

- Wasternack, C., Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058.
- Watanabe, N., Lam, E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3200-3210.
- Weaver, L. M., Amasino, R. M. (2001). Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, 127(3), 876-886.
- Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z., Klessig, D. F. (1998). Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*, 47(4), 651-657.
- White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99(2), 410-412.
- Whittaker, A., Bochicchio, A., Vazzana, C., Lindsey, G., Farrant, J. (2001). Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 961-969.
- Wi, S. J., Jang, S. J., Park, K. Y. (2010). Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Molecules and Cells*, 30, 37-49.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565.
- Wu, J., Zhu, W., Zhao, Q. (2023). Salicylic acid biosynthesis is not from phenylalanine in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(4), 881-887.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., ... Després, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports*, 1(6), 639-647.
- Wu, L., McGrane, R. S., Beattie, G. A. (2013). Light regulation of swarming motility in *Pseudomonas syringae* integrates signaling pathways mediated by a bacteriophytochrome and a LOV protein. *MBio*, 4(3), 10-1128.
- Xiang, X. L., Ning, S. J., Huang, Y. L., Zhang, Y. J., Zhu, R. L., Wei, D. Z. (2010). Effects of exogenous salicylic acid on protein expression level in *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek leaves. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 21(3), 689-693.
- Xie, Z., Chen, Z. (1999). Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiology*, 120(1), 217-226.
- Xing, F., Li, Z., Sun, A., Xing, D. (2013). Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. *FEBS Letters*, 587(14), 2164-2172.
- Xu, D., Li, H., Lin, L., Liao, M. A., Deng, Q., Wang, J., ... Xia, H. (2020). Effects of carboxymethyl chitosan on the growth and nutrient uptake in *Prunus davidiana* seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 661-668.
- Xu, E., Brosché, M. (2014). Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-17.
- Xu, Z., Song, N., Ma, L., Wu, J. (2019). IRE1-bZIP60 pathway is required for *Nicotiana attenuata* resistance to fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 263.
- Yan, Y., Pan, C., Du, Y., Li, D., Liu, W. (2018). Exogenous salicylic acid regulates reactive oxygen species metabolism and ascorbate–glutathione cycle in *Nitraria tangutorum* Bobr. under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24, 577-589.
- Yang, X., Lu, Y., Wang, F., Chen, Y., Tian, Y., Jiang, L., ... Yan, F. (2020). Involvement of the chloroplast gene ferredoxin 1 in multiple responses of *Nicotiana benthamiana* to Potato virus X infection. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 2142-2156.
- Yang, Z. T., Wang, M. J., Sun, L., Lu, S. J., Bi, D. L., Sun, L., ... Liu, J. X. (2014). The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004243.
- Yin, H., Li, Y., Zhang, H. Y., Wang, W. X., Lu, H., Grevsen, K., ... Du, Y. (2013). Chitosan oligosaccharides–triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia Sclerotiorum*. *International Journal of Plant Sciences*, 174(4), 722-732.

- Yokoo, S., Inoue, S., Suzuki, N., Amakawa, N., Matsui, H., Nakagami, H., ... Katou, S. (2018). Comparative analysis of plant isochorismate synthases reveals structural mechanisms underlying their distinct biochemical properties. *Bioscience Reports*, 38(2), BSR20171457.
- Yu, X., Feng, B., He, P., Shan, L. (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual review of Phytopathology*, 55(1), 109-137.
- Zeier, J., Pink, B., Mueller, M. J., Berger, S. (2004). Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant–pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*, 219(4), 673-683.
- Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., ... Wu, G. (2015). Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. *BMC Plant Biology*, 15, 1-14.
- Zhang, G., Liu, Y., Ni, Y., Meng, Z., Lu, T., Li, T. (2014). Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. *PLoS One*, 9(5), e97322.
- Zhang, H., Zhou, C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 82, 539-545.
- Zhang, K., Halitschke, R., Yin, C., Liu, C. J., Gan, S. S. (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates Arabidopsis leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36), 14807-14812.
- Zhang, L., Xing, D. (2008). Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1092-1111.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D., Sheng, J. (2011). Methyl salicylate-induced arginine catabolism is associated with up-regulation of polyamine and nitric oxide levels and improves chilling tolerance in cherry tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9351-9357.
- Zhang, Y., Li, X. (2019). Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 29-36.
- Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, J., Li, Y., Wang, J., Guo, R., ... Zhang, K. (2017). S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiology*, 175(3), 1082-1093.
- Zhang, Z., Zhang, J., Chen, Y., Li, R., Wang, H., Ding, L., Wei, J. (2014). Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (*Zea mays* L.) hexokinase gene family. *Molecular Biology Reports*, 41, 6157-6166.
- Zhao, H. J., Zhao, X. J., Ma, P. F., Wang, Y. X., Hu, W. W., Li, L. H., Zhao, Y. D. (2011). Effects of salicylic acid on protein kinase activity and chloroplast D1 protein degradation in wheat leaves subjected to heat and high light stress. *Acta Ecologica Sinica*, 31(5), 259-263.
- Zheng, X. Y., Zhou, M., Yoo, H., Pruneda-Paz, J. L., Spivey, N. W., Kay, S. A., Dong, X. (2015). Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9166-9173.
- Zottini, M., Costa, A., De Michele, R., Ruzzene, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F. (2007). Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1397-1405.

10. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm egykori témavezetőm, Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanárnőnek minden javaslatát és tanácsát! Köszönöm, hogy szakdolgozó koromtól fogva fáradhatatlanul tanított és támogatott! Köszönöm iránymutatását és szüntelen segítségét!

Köszönöm Prof. Dr. Fehér Attilának minden támogatását és segítségét, valamint az inspiráló és biztosságot nyújtó légkört, amit a Növénybiológiai Tanszéken teremtett!

Köszönöm munkacsoportom tagjainak, közvetlen kollégáimnak, Dr. Czékus Zalán, Dr. Ördög Attila, és Bécs Attiláné Eta minden segítségét és állhatatos munkáját! Köszönöm a baráti és kreatív légkört, valamint a lelkes és lelkiismeretes munkavégzést!

Köszönöm Dr. Takács Zoltán, Dr. Kovács Judit, Dr. Borbély Péter Gábor, Dr. Nadeem Iqbal korábbi PhD hallgatóinknak barátságát, lelkesedését és rengeteg munkáját!

Köszönöm a tézisek alapjául szolgáló tanulmányok társszerzőinek, Dr. Bagyánszki Mária, Dr. Bela Krisztina, Dr. Bencsik Ottó, Dr. Bódi Nikoltett, Csíkos Orsolya, Prof. Dr. Aurelio Gómez Cadenas, Dr. Iqbal Khan, Koprivanacz Péter, Kukri András, Dr. Maria López-Climent, Martics Atina, Milodanovic Dávid, Pollák Boglárka, Dr. Szekeres András önzetlenségét, minden munkáját és segítségét!

Köszönöm a HUN-REN ATK Növényélettani és Metabolomikai Osztály munkatársainak és különösen is Prof. Dr. Szalai Gabriella minden támogatását, segítségét és tanácsát!

Köszönöm Dr. Cséplő Ágnes és Dr. Gallé Ágnes minden segítségét és tanácsát!

Köszönöm Dr. Ferhan Ayaydin minden segítségét!

Köszönöm egykori és jelenlegi PhD és szakdolgozóinknak a munkáját és minden segítségét!

Köszönöm Dóri Erika, Kispálné Szabó Ibolya, Kapásné Török Éva, Pál Erika, Porkoláb Erzsébet és Tandari Mária minden segítségét és munkáját!

Köszönöm az SZTE Növénybiológiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának, aki segítette a munkámat!

Köszönöm feleségem és családom lelkesítését és minden támogatását!

Végezetül szeretném megköszönni az NKFIH OTKA FK 138867, FK 124871, PD 112855 és az OTKA K 101243 pályázatok, valamint az Új Nemzeti Kiválósági Program és a MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj biztosította anyagi támogatást a kísérletek megvalósításához.