

A projekt eredményeinek összefoglalása

A szalicilsavas (SA) előkezelés hatásos kémiai edzési módszernek bizonyult nemcsak biotikus stresszhatásokkal, hanem abiotikus stresszorokkal, mint például az alacsony hőmérséklet, a só- és szárazságstressz, az UV-B sugárzás, valamint a nehézfémek által kiváltott stresszhatásokkal szemben. Ennek az alapját elsősorban az SA által kiváltott oxidatív stressz jelentette, amely az utóbbi időben az SA-indukált reaktív nitrogénformák (RNF), elsősorban a nitrogén oxid (NO) által kiváltott hatásokkal is bővült. Biotikus stressz esetén az SA kellően magas koncentrációi által indukált reaktív oxigénformák (reactive oxygen species, ROS) hatására inkompatibilis gazda-kórokozó kapcsolatban a kórokozó körül kialakuló hiperszenzitív reakció (HR) következtében a sejtek elhalnak. Az ilyen gyors sejthalál genetikailag programozott (programmed cell death, PCD), és megvédi a növényt a biotróf kórokozók kolonizációjától. Nekrotróf kórokozók esetén a HR inkább a fertőzést segíti elő. A fertőzés helyétől távol eső szövetekben szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) indukálódik, amely keretében az SA-indukált jelátviteli folyamatokban a kórokozók elleni védekezést szolgáló patogenezissel kapcsolatos gének (pathogenesis-related, PR) és növényi antibiotikumok, fitoalexinek szintézise indukálódik. A nem kórokozó talajlakó mikrobák is indukálnak a növényekben immunválaszt, amelyet az etilén/jázmonsav (ET/JA) jelátvitel közvetít. Ennek során szintén aktiválódnak olyan gének, amelyek a növények védekezési reakcióit erősítik (pl. a *PDF1-2*, a defenzin; tioninok, vegetatív raktározott proteinek, VSP stb.) A lokális válasz mellett ez a jelátvitel is áttevődhet távoli szövetekre, amit indukált szisztémikus rezisztenciának (ISR) nevezünk.

Az említett folyamatokban résztvevő hormonális jelátviteli utak, a szalicilsav, etilén és a jázmonsav által indukált jelátvitel sok ponton kapcsolódhat, és eredménye is a szinergizmustól a kölcsönös gátlásig sokféle lehet (Pieterse et al. 2009). Régóta ismert, hogy a SA és a JA jelátviteli út több pontján alakulhat ki kölcsönös blokkolás (pl. TGA, WRKY és a MYC2 transzkripciós faktorok szintjén), viszont az ET és a JA kölcsönösen serkenti a másik jelátviteli folyamatait többek között az ERF, ORA59 transzkripciós faktorok szintjén. Ugyanakkor a korábbi ismeretekhez más jelátviteli utakkal való kapcsolatok is társultak, így pl. az abszcizinsav ABA-SA vagy az auxin-SA antagonizmus.

Mivel a pályázat megírásakor egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a ROS által kiváltott válaszreakcióknak, az ún. ROS szignálnak a hormonokhoz hasonló jelentősége van a stressz akklimatizációban, vizsgálataink egy része arra irányult, hogy megismerjük a különböző reaktív oxigénformák jelentőségét a szalicilsav által indukált akklimatizációban illetve programozott sejthalál iniciációjában. A ROS szignál származhat az endogén, a metabolikus folyamatokban keletkező ROS mennyiségének és minőségének megváltozásából valamint a külső tényezők hatására indukálódó ROS jellegéből. Mindez többféle ROS generálódásához vezet, ami a kioltó mechanizmusok kapacitása és aktiválódásának mértéke szerint sikeres akklimatizációhoz vagy a PCD indukációjához vezethet. Mittler és mtsai (2011) szerint az egyes sejtekben keletkező reaktív oxigénfészeségek hullámszerűen terjednek sejtről sejtre a szövetekben, amely hullámok egymással interferálva bizonyos sejtekben ROS robbanást idézhetnek elő. Ugyanígy információként szolgál a stressz hatására *in situ* újonnan kialakuló

redoxpotenciál változás, amelyet az ismert, legnagyobb poollal rendelkező redox párok (NAD(P)⁺/NAD(P)H, GSSG/GSH, DHASC/ASC) redukáltsága határoz meg elsősorban.

A képet tovább árnyalja, hogy a stressz hatására keletkező nitrogénmonoxid szintén reagálhat különböző reaktív oxigénformákkal, így a környezet kémiai paramétereitől függően mind a szuperoxid gyökionnal, mind a hidrogénperoxiddal peroxinitritet képez. Mivel a peroxinitrit csak magas koncentrációban káros a növények szöveteire, ez a folyamat egy ideig csökkentheti az oxidatív stressz mértékét.

Mind az oxidatív, mind az RNF által indukált nitrozatív stressz a fehérjék poszttranszlációs módosulásához vezethet. Ennek hatására specifikus pozícióban lévő cisztein aminosavak –SH csoportjai S-nitrozilálódhatnak (S-NO képződésével), S-szulfenálódhatnak (–SOH képződésével), S-tiolálódhatnak (GSH-val vagy fehérjékkel diszulfid híd keletkezése közben) vagy S-szulfinalódnak (S₂OH képződésével). A peroxinitrit a fehérjékben lévő, specifikus környezettel rendelkező tirozin aminosavak és a DNS-ben lévő guanin nitrációját idézheti elő. Ezek a nitrooxidatív stressz közben indukálódó folyamatok tovább finomíthatják a jelátviteli utak aktivitását, illetve vezethetnek közvetlenül a PCD indukációjához (Kocsy et al. 2013).

Korábban sikerült kimutatnunk, hogy az exogén SA-val előidézett kémiai edzés sikeresen fokozta paradicsom növények (*Solanum lycopersicon* cv. Rio Fuego) sóstressz akklimatizációját. Ezt a hatást az előkezelés hatására indukálódó ozmotikus adaptáció (Poór et al. 2011), az előkezelés során átmenetileg aktiválódó antioxidáns mechanizmusok (Tari et al. 2011; Tari et al. 2015), az abszcizinsav bioszintézisének fokozódása segítette elő (Szepesi et al. 2009; Horváth et al. 2015a), amely az előkezelést követő sóstressz során a gyökérben kialakuló ionikus stressz csökkenését (Szepesi et al. 2009), megnövekedett fotoszintetikus aktivitást és ennek következtében egyes kompatibilis ozmotikumok (cukrok, szorbitol) akkumulációját (Poór et al. 2011; Tari et al. 2010) és az oxidatív stressz mérséklődését eredményezte (Gémes et al. 2011; Tari et al. 2015).

A pályázatban az abiotikus stressz reprezentánsának tekintett sóstressz és a biotikus stresszt reprezentáló exogén szalicilsav által kiváltott folyamatokat vizsgáltuk szubletális (100 mM NaCl, 10⁻⁴ M SA) és letális koncentrációk (250 mM NaCl és 10⁻³ M SA) esetén. A mutánsokkal végzett kísérletek kivételével a munkát *Solanum lycopersicon* cv. Rio Fuego paradicsom fajtával végeztük.

A pályázat egyik fontos céljaként tűztük ki annak feltárását,

1. hogy a ROS és RNF homeosztázisban bekövetkező változások mennyiben határozzák meg azt, hogy a növények alkalmazkodnak a stresszorhoz vagy iniciálódnak a PCD folyamatai. Részletesen vizsgáltuk a poliamin akkumuláció és a poliaminok oxidációja által indukált ROS és NO szerepét az akklimatizációban és a PCD indukcióban.
2. A jelátviteli utak lehetséges kapcsolódásának vizsgálatát abszcizinsav bioszintézis mutáns *sitiens*, etilén receptor mutáns *Never ripe* és jázmonsav jelátviteli mutáns *jai1-1* paradicsom növényekben vizsgáltuk. A *sitiens* mutáció az ABS bioszintézisének utolsó lépését katalizáló ABS-aldehid oxidáz gén mutációját hordozza *Solanum lycopersicum* L. cv. Rheilands háttérben. A *Never ripe* mutációt, ami a vegetatív szövetekben is érinti a *Arabidopsis* ETR3-mal homológ etilén receptort, Ailsa Craig háttérbe vitték be. A *jai1-1* mutáció az *SLCOII* (*coronatine insensitive-1*) gént érinti

Micro-Tom háttérben, a növények mindenféle JA-Ile válaszban deficiensek. Választ szerettünk volna arra is kapni, hogy elképzelhető-e a jelátviteli utak kölcsönhatása ROS és RNF szinten.

3. A folyamatokat sejtszinten a *Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Fuego növényekből készített sejtszuspenzióban vizsgáltuk.
4. Mivel a növényi PCD-k morfofiziológiai osztályozásában nincs teljes konszenzus, ezért a sóstressz és az SA által kiváltott sejthalál típusát aszerint vizsgáltuk, hogy megfelel-e az ún, autolitikus vagy nem autolitikus típusnak (van Doorn, 2011). Ebben a folyamatban kulcsszerepe van a különböző proteázoknak, elsősorban a cisztein proteázok egyes osztályainak, a proteáz inhibitoroknak és olyan PCD-t gátló antiapoptotikus fehérjéknek, mint a Bax Inhibitor-1.

Eredmények:

1. Annak igazolására, hogy az SA-indukált **ROS és az RNF interakciója** szabályozhat bizonyos fiziológiai válaszokat, a sztómaműködés vizsgálatát választottuk. Megállapítottuk, hogy paradicsom abaxiális epidermisz nyúzatokon az emelkedő szalicilsav koncentráció függvényében változik a sztómák nyitottsága. A várttal ellentétben, a légrés alacsony (10^{-7} M) SA koncentrációnál zárul, majd nyitottsága 10^{-4} M koncentrációig újból növekszik, amit egy második záródás követ 10^{-3} M-nál. A záródás a zárósejtekben jelátviteli intermediereként szereplő H_2O_2 és NO koncentráció változásával összhangban következik be. Emelkedő H_2O_2 és NO koncentrációnál a légrés zárul, csökkenő koncentrációknál, aminek minimuma 10^{-4} M-os SA-nál mérhető, nyitódik. A légrés átmérője hasonló tendenciájú változásokat mutat abban az esetben is, ha az SA mellett ROS vagy NO kioltókat alkalmazunk ugyanebben a rendszerben. A ROS és az NO minimuma, ami a fiziológiai válaszhoz, a légrés nyitódásához vezet, a reaktív oxigén- és nitrogénformák interakciójának következményeként áll elő, amit specifikus inhibitorokkal bizonyítottunk.

A 10^{-3} M SA koncentráció az alacsonyabb koncentrációkkal ellentétben a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának gátlásához is vezet, ami a PCD indukciójának egyik korai jele (Poór et al. 2012a).

2. Megállapítottuk, hogy az SA-val történő kémiai edzés után a **sikeressé sóstressz akklimatizációs folyamatokban** a stressz-indukált ROS hatásainak glutation peroxidázok általi kontrollálása (Horváth et al. 2015b) és a gyökerek redox homeosztáziájának fenntartása elsődleges jelentőségű (Tari et al. 2015). A sóstressz akklimatizációban rendkívül fontos tényező az abszcizinsav koncentráció a kontrollénál kissé magasabb értéken tartása és az etilénprodukciónak mérséklése (Horváth et al. 2015).

3. **Exogén H₂O₂ előkezelés rontotta, exogén NO generátor** (100 μM-os nitroprusszid nátrium, SNP) kezelés javította a gyökércsúcsok sejtjeinek életképességét szubletális sóstressz esetén, míg mindkét előkezelés gyorsította a PCD indukcióját letális sóstressznél. Ennek háttérében az exogén H₂O₂ hatására a stressz alatt megnövekedett szuperoxid gyökánion, azonos H₂O₂ valamint átmeneti és elégtelen NO akkumuláció áll, ami az első 24 órában nem járt együtt a proteolitikus aktivitás szignifikáns növekedésével. A proteázokat zselatin-SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel elkülönítve megállapítottuk, hogy a sóstressz hatására indukálódik az összes proteáz aktivitás, amely proteázok közül jóacetamiddal, a cisztein proteázok gátlószerevel több sáv blokkolható a két előkezelés után a gyökérekből kivont mintákban (Borbély 2014a), ebben a rendszerben azonban nemcsak a cisztein proteázok aktiválódtak.

Az SNP előkezelés szubletális sóstressznél szignifikánsan megemelte az NO akkumulációt és növelte a letális sóstressznek kitett gyökerekben a szuperoxid gyökánion mennyiségét valamint csökkentette a H₂O₂ tartalmakat. Szubletális sóstressz hatására csak átmenetileg, letális sókoncentráció hatására gyorsan és jelentősen indukálódott az összes proteázaktivitás, amely nagymértékben a cisztein proteázok aktiválódásából származott. Az SNP szubletális sóstressznél csökkentette, letálisnál növelte a cisztein proteázok aktivitását, amely teljes kivonatban E-64-es gátlással, a cisztein proteázok másik specifikus gátlószereinek alkalmazásával kimutatható volt (Borbély, 2014b). A méréseket Borbély Péter Biológus MSc-s hallgató diplomamunkájában és TDK dolgozatában foglaltuk össze.

A kísérletek során igény merült fel arra, hogy a cisztein proteázok aktivitásának meghatározását a zselatin-SDS-poliakrilamid gélelektroforézisnél hatékonyabb módszerrel végezzük el. Ennek megvalósítására Kovács Judit PhD hallgató, aki a pályázat első három évében vett részt a munkákban, többször is lehetőséget kapott a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program' keretében először Kölnben, majd Oxfordban, Professor Renier van der Hoorn laboratóriumában a cisztein proteázok aktivitás alapú profilírozásának (activity-based protein profiling) elsajátítására. A továbbiakban tanszékünkön is kialakítottuk a módszer alkalmazásának lehetőségét az aktív cisztein proteázok kimutatására. Így sikerült bizonyítani a sóstresszel kezelt növényekben egyes papain típusú cisztein proteázok aktiválódását. A munkából készülő cikk közlésre kész állapotban van (Judit Kovács, Péter Poór, Farnusch Kaschani, Balakumaran Chandrasekar, Tram Ngoc Hon, Irma Tari and Renier A.L, van der Hoorn: Lethal salt stress induces papain-

like cysteine proteases and alteration in proteosome in tomato roots), a munka Kovács Judit PhD dolgozatának részét képezi.

4. Vizsgáltuk a **poliamin akkumulációt és a poliaminok oxidációja által indukált ROS és NO szerepét** a stressz akklimatizációban és a PCD indukcióban. A poliaminokról köztudott, hogy mint polikationok, fontos szerepük van a membránok stabilizálásában, a K^+ hiány kompenzálásában és a kötött formák antioxidáns hatását is leírták. A poliaminok a diamin- (DAO) és poliaminoxidáz (PAO) általi apoplasztikus végoxidációjának fontos szerepe lehet a sóstressz indukált illetve az SA-indukált oxidatív robbanásban.

Bizonyítottuk, hogy a letális sóstressz hatására az idő függvényében megnövekedő H_2O_2 koncentráció és a gyökerek NO akkumulációja korrelációt mutat mind a gyökérben, mind a levelekben a DAO és PAO aktivitás maximumaival, míg mindez a tolerálható, 100 mM-os NaCl koncentrációnál nem alakul ki. Mindez gátolható a PAO aktivitás specifikus inhibitorával, az MDL-72,527-tel. Ez arra utal, hogy a poliaminok katabolizmusa hozzájárul a PCD ROS és RNF általi indukációjához sóstressz esetén. A szubletális sóstressz mellett megemelkedett a spermidin és a spermin koncentrációja a szövetekben, míg ez sokkal kisebb mértékű a letális sóstressz esetén. A témából készült cikk (Takács Z, Poór P, Szepesi Á, Tari I: “*In vivo* inhibition of polyamine oxidases by a spermine analogue MDL-72,527 results in distinct changes during sublethal and lethal salt stress in polyamine pattern, in the activity of diamine and polyamine oxidases and in the accumulation of H_2O_2 in tomato plants”) benyújtásra került és jelenleg elbírálás alatt van.

A sóstresszel ellentétben a H_2O_2 tartalom és az NO akkumuláció nem mutatott szoros korrelációt a PAO és DAO aktivitással a PCD-t kiváltó SA koncentrációval kezelt növényekben, bár a gyökerekben a PAO aktivitás, a H_2O_2 és NO szintje megemelkedett a kezeletlen kontrollhoz és a szubletális SA-hoz képest. Ez arra utal, hogy a PA katabolizmusnak elsődlegesen kevésbé jelentős szerepe lehet az SA-indukált PCD kezdeti szakaszában. Mivel az aminoguanidin, a DAO inhibitora mind a ROS, mind az NO akkumulációját gátolta ezekben a szövetekben, ebben a rendszerben is megállapítható, hogy egy gyökös reakciólánc tetszőleges ponton történő gátlása csökkenti a láncreakciót. A szabad poliamin szintekben nem találtunk lényeges különbséget a kezelések első három órájában (Szepesi et al. 2014).

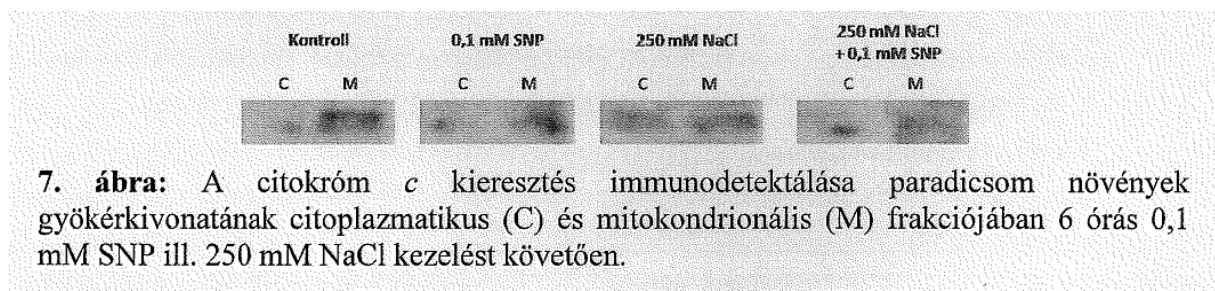
5. **Szuszpenziós kultúrát indítottunk a letális sóstressz- és az SA-indukált jelátviteli folyamatok feltérképezésére.** Megállapítottuk, hogy a sóstressz hatására etilénprodukciónak fokozódás figyelhető meg a szövetkultúra sejtjeiben, ami növeli az akkumulálódó ROS

menyiségét és hozzájárul egy mérsékelt NO akkumulációhoz. Ezzel szemben SA kezelés hatására nincs szignifikáns etilénprodukciónak fokozódás, jóval kisebb a ROS akkumuláció, viszont jelentősen megemelkedik az NO szintje a PCD iniciációjakor a sejtekben. Mindkét stresszor hatására megfigyelhetők apoptotikus morfológiai elemek, mint pl. a citoplazma zsugorodása, a sejtmagvak festődése TUNEL módszerrel, a DNS internukleoszómális fragmentációját azonban csak a sóstressz esetén tapasztaltuk. Mindkét stresszor hatására indukálódtak a ciszetin proteázok (Poór et al. 2013). Megállapítottuk továbbá azt is, hogy a sóstressz indukált PCD-ben az etilén meghatározó szereppel bír, míg nem játszik szerepet a szövetkultúrákban az SA-indukált folyamatokban.

A stresszorok hatására indukálódó iontartalom változásokat a Poór P, Szopkó D, Tari I (2012b) Ionic homeostasis disturbance is involved in tomato cell death induced by NaCl and salicylic acid. *In Vitro Cellular and Developmental Biol Plant* 48:377-382. című cikkben közzé tették.

A szuszpenziós sejt kultúrát eredetileg a gyökércsúcsok merisztématikus zónájában megfigyelhető sejt szintű folyamatok modellezésére szántuk. Kiderült azonban, hogy szövetkultúrákban a PCD iniciáció első 6 órájában teljesen más folyamatok játszódnak le, mint a gyökércsúcsokban, ahol a PCD-t indukáló 250 mM-os NaCl hatására az etilénprodukciónak gátlódik. Hasonlóan ellentétes tendencia figyelhető meg a két rendszer NO akkumulációjában. Megállapítottuk, hogy a szuszpenzióban növekvő sejtek nem modellezik a gyökerek osztódó zónájában mérhető változásokat a PCD iniciáció során (Poór et al. 2014). Ez eltérő ionakkumulációhoz vezet a gyökércsúcsokban és a szuszpenziós kultúra sejtjeiben, ami elsősorban a kalcium és a magnézium tartalmakban nyilvánul meg.

A **mitokondrium szerepét a PCD indukációjában** többféle megközelítéssel vizsgáltuk. Sikerült megállapítani, hogy az SNP előkezelés csökkentette a sóstressz indukált citokróm *c* kieresztést a borítómembránok közötti térből a citoplazmába (Patyi Gábor Biológia BSc szakdolgozata, 2014), ami a PCD iniciáció egyik fontos ismérve.



6. A hormon jelátviteli utak akklimatizációban és a PCD indukcióban betöltött szerepét hormon bioszintézis vagy jelátviteli mutánsokban vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a várakozással és az irodalmi adatokkal ellentétben az etilén jelátvitel blokkolása a *Never ripe* mutáns paradicsomban nem csökkentette, hanem inkább növelte a ROS és RNF akkumulációt, megváltozott azonban az egyes reaktív oxigén és nitrogénformák minősége, és akkumulációjuk erősödött a szubletális sókoncentrációnál a mutáns növényekben. Különösen jellemző volt a mutánsban a szuperoxid gyökanyon akkumulációja a hidrogénperoxiddal szemben, valamint a peroxinitrit felhalmozódása magas NaCl koncentrációnál. Mindezek mellett a vad típus számára szubletális koncentrációnál a mutánsban emelkedett a cisztein proteáz aktivitás, és a mutáns alacsony sókoncentrációnál jelentős ionikus stresszt mutatott (Poór et. al. 2015), vagyis érzékenyebbé vált a sóstresszel szemben.

Az etiléntöbblet hatását az etilén prekursorával, az exogén 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC) kezeléssel megemelt etilénprodukción mutató, vad típusú növényekben vizsgáltuk. Ellentétben a szubletális sókoncentrációval kezelt növényekkel, az ACC is növelte a szuperoxid gyökanyon mennyiségét letális sóstressznél, viszont nem okozott szignifikáns H₂O₂ és NO akkumuláció emelkedést, ami nagyon hasonló a *Never ripe* válaszreakciójához. Az exogén ACC ugyanakkor javította, különösen rövid inkubációs idő után, a szubletális sóstressz mellett mért fotoszintetikus aktivitást, ami elsősorban a PSI hatékonyabb működésével magyarázható (Borbély et al. 2015).

Az ABS bioszintézis mutáns növények sokkal érzékenyebben reagáltak a sóstresszre, mint a vad típusúak, és a 100 mM NaCl-es kezelés után is elpusztultak, azt sugallva, hogy az ABS szintézis aktivációja elengedhetetlen tényezője a sóstressz akklimatizációnak (Horváth et al. 2015). A *Never ripe* mutánsokhoz hasonlóan a gyökércsúcsokban ez a szuperoxid és a peroxinitrit szint szignifikáns emelkedésével és a H₂O₂ és NO akkumulációt elmaradásával járt együtt a mutánsban szubletális sóstressznél, ami a szövetek elhalásához vezetett. A mutánsban szubletális sóstressznél már jelentősen nőtt a proteáz aktivitás, amelyek között cisztein proteázok is kimutathatók (Kovács et al. 2014).

A *sit* mutánsok fotoszintézise is erőteljesen gátlódott a vad típus számára szubletális sóstressz alatt, melynek során minkét fotoszisztéma károsodott. A CO₂ fixáció gátlódása a mutánsban a sztómakonduktancia drámai csökkenésének tudható be a sóstressz alatt, ami

egyébként a sztómazáródást kiváltó ABS hiányában alakult ki a mutáns növényekben. Az ABS hiánya tehát növelte a növények sóstressz érzékenységét (Czékus, 2015, BSc-s szakdolgozat és TDK dolgozat).

Az exogén abszcizinsav kezelés érdekes módon szintén oxidatív és nitrozatív stresszt okozott a gyökércsúcsokban, amelyre a szuperoxid gyök akkumulációja, a H₂O₂ és az NO szintek megemelkedésének elmaradása volt jellemző. Így az exogén ABS nem enyhítette a letális sóstressz hatását, szubletális sóstressznél pedig nem volt szignifikáns hatása. Ez arra utal, hogy az endogén ABS akkumuláció elegendő az akklimatizációhoz szubletális sóstressz esetén.

A *jai-1* jázmonsav jelátviteli mutáns paradicsomok gyökércsúcsában csak a 250 mM NaCl emelte meg a reaktív oxigénformák és az NO mennyiségét, szubletális sóstressznél ez elmaradt, és bár csökkent a gyökércsúcs sejteinek az életképessége, ez jóval kisebb mértékű volt, mint a *Never ripe* és a *sit* mutánsoknál hasonló kezelések esetén. Úgy tűnik, hogy a jázmonsav jelátvitel blokkolása mérsékelte leginkább a sóstressz indukált PCD-t.

A mutánsokban az exogén SA hatására indukálódó ROS és NO produkció is blokkolódott, ami a JA/SA interakció irodalmi vonatkozásainak ismeretében további érdekes kísérletek szükségességét vetíti előre.

7. **A sóstressz és az SA által indukált PCD-t összehasonlítva** megállapíthatjuk, hogy a magas sókoncentráció által kiváltott stressz során a membránok integritásának csökkenését jelző elektrolit kiáramlás időben jóval korábban kezdődött, ez a sóstressz esetén 6 illetve az SA kezelés után 24 óra után indukálódott a gyökerekben, és a sókezelt növényekben a levelekre is kiterjedt. Hasonlóan, sóstressz hatására korábban aktiválódtak a proteázok, amelyek között cisztein proteázok is találhatóak. Bár a levélben mindkét stresszor hatására gyorsan nőtt az SLCYP1 és az SLMCA-1 cisztein proteázokat kódoló gének expressziója, a gyökérben ezek elsősorban SA hatására expresszálódtak, a vakuoláris processzálozó enzim expressziójában csak a PCD-t indukáló SA hatására figyelhető meg növekedés. A cisztatinok, a cisztein proteáz inhibitorok expressziója szubletális stressz esetén mindkét stresszornál magasabb volt, így a proteáz inhibitorok hiánya vezethet a proteázok erőteljes aktiválódásához a PCD indukciója során. A Bax Inhibitor-1 expressziója szubletális sóstressznél magas marad mind a gyökérben, mind a levelekben, míg letális sóstressznél az expresszió lecsökken, ami szintén okozhatja a nagyobb mértékű protein degradáció kialakulását a sóstressznek kitett növényekben. A sóstressz tehát valóban nevezhető autolitikus PCD formának, míg a proteázok aktiválódását az SA letális koncentrációja mellett

is megfigyelhető proteáz inhibitor és Bax Inhibitor-1 expresszió is késleltetheti (Kovács et al. 2016).

8. Általánosságban megállapítható, hogy PCD indukció abban az esetben történt a legkülönbözőbb mutánsok és kezelések esetén, ha a szuperoxid gyökkanion és peroxinitrit koncentráció szignifikánsan megemelkedett, míg a H₂O₂ és NO mennyiségének emelkedése elmaradt. Ez a legkülönbözőbb kombinációknál kialakulhat, így a hormon bioszintézis és jelátviteli mutáns növények egyedi fiziológiai vizsgálata, és (amennyiben ez egyáltalán lehetséges) a ROS és RNF másodlagos hatásának a mutáció elsődleges hatásaitól történő elkülönítése valamennyi vizsgálati rendszerben nélkülözhetetlen. Mivel a ROS és RNF formái és ezek arányai egyedileg határozzák meg a génexpressziót és a redox rendszerek aktiválódását, a különböző módszerekkel előállított mutánsok és transzgenikus növények fiziológiai jellemzés nélküli használata fals következtetések levonását eredményezheti.

A pályázat 1 megvédett PhD (Poór Péter), 2 folyamatban lévő PhD dolgozat (Kovács Judit, Takács Zoltán), 2 BSc-s és egy MSc-s diplomadolgozat, két TDK dolgozat elkészítéséhez nyújtott pénzügyi alapot. A kísérletek anyagából 12 db folyóíratcikk (IF: 22,289), 1 db konferenciacikk, 31 db konferencia közlemény és 1 db angol nyelvű könyvfejezet született. Benyújtott illetve előkészített állapotban van további 3 cikk.

Irodalmi hivatkozások

- Borbély P (2014a) A proteázaktivitás szabályozása és a fotoszintetikus folyamatok változása szubletális és letális sóstressz alatt. „Konvergencia-Eötvös Loránd Hallgatói Ösztöndíj-2013 (TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001) (Nemzeti Kiválósági Program) Záró beszámoló.
- Borbély P (2014b) A proteázaktivitás szabályozása és a fotoszintetikus folyamatok változása szubletális és letális sóstressz alatt. Diplomamunka, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék
- Borbély P, Poór P, Patyi G, Tari I (2015) Effect of ethylene precursor ACC pretreatment on photosynthesis under salt stress. In: Zhu J-K, Touraev A. (eds) (2015) Plant abiotic stress tolerance III: Programme and Abstracts, Vienna, Austria, 29.06.2015-01.07.2015. pp. 63.
- Czékus Zalán (2015) Abszcizinsav hiányának vizsgálata sóstressz alatt. TDK dolgozat, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék
- Horváth, E., Csiszár, J., Gallé, Á., Poór, P., Szepesi, Á., & Tari, I. (2015a). Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 183, 54-63.
- Horváth E, Brunner Sz, Bela K, Papdi Cs, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biol.* (<http://dx.doi.org/101071/FP15119>) 42, 1129-1140.

- Gémes K, Poór P, Horváth E, Kolbert Zs, 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 *Physiol Plant* 142:179-192.
- 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.
- Kovács J, Poór P, Patyi G, Borbély P, Szepesi Á, Takács Z, Tari I (2014) Investigation of salt stress-induced changes in cysteine protease activity in abscisic acid deficient *sitiens* tomato (*Solanum lycopersicum*) mutant. In: Tari I. (szerk) 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, Szeged, 27.08.2014-29.08.2014. Book of Abstract, pp. 45.
- Kovács J, Péter Poór, Szepesi Á, Tari I (2016) Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biologica Hungarica* 67(2) accepted
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16, 300-309.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5, 308-316.
- Patyi, G. (2014) Nitrogén-monoxid donor hatása a citokróm c kieresztésére sóstressz alatt. *Biológia BSc szakdolgozat, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék*
- Poór, P; Gémes, K; Szepesi, Á; Horváth, F; Simon, LM, Tari, I (2011) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with the stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato and decreases the harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology* 13, 105-114.
- Poór, P. and Tari, I (2012a) Regulation of stomatal movement and photosynthetic activity in guard cells of tomato abaxial epidermal peels by salicylic acid. *Functional Plant Biology*, 39, 1028-1032.
- Poór P, Szopkó D, Tari I (2012b) Ionic homeostasis disturbance is involved in tomato cell death induced by NaCl and salicylic acid. In *Vitro Cellular and Developmental Biol Plant* DOI: 10.1007/S11627-011-9419-7 48, 377-382.
- Poór P, Borbély P, Kovács J, Papp, A, Szepesi Á, Takács Z, Tari I. (2014) Opposite extremes in ethylene/nitric oxide ratio induce cell death in cell suspension culture and in root apices of tomato exposed to salt stress. *Acta Biologica Hungarica* 65, 428-43.
- 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.
- Szepesi Á, Csiszár J., Gémes K., Horváth E., Horváth F., Simon L.M., Tari I (2009) Salicylic acid improves the acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J. Plant Physiol.*, 166, 914-925.
- Szepesi Á, Borbély P, Gellert A, Hurton Á, Kovács J, Poór P, Takács Z, Tari, I (2014) Impact of aminoguanidine on NO content and polyamin catabolism in salicylic acid treated tomato plants. In: Jeremy Astier, Christian Lindermayr (eds) 5th Plant NO Club Meeting, Munchen, 24.07.2014-25.07.2014. pp. 50.
- Tari, I, Gy. Kiss, A.K. Deér, J. Csiszár, L. Erdei, Á., Gallé, K. Gémes, F. Horváth, P. Poór, Á. Szepesi, L.M. Simon (2010) Salicylic acid-induced increases in aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. – *Biol. Plantarum*. 54 (4):677-683.
- Tari I, Gémes K, Horváth E, Poór P, Szepesi Á, Csiszár J (2011) Regulation of antioxidant defence systems and abscisic acid biosynthesis by salicylic acid in tomato roots. 10th Abstracts International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, July 5-8, 2011, Budapest, Hungary pp. 37.
- Tari, I, Jolán Csiszár, Edit Horváth, Péter Poór, Zoltán Takács, and Ágnes 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.
- van Doorn, W. G. (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany* 62, 4749-4761.

