

Szalicilsavas kémiai edzés hatása a paradicsom sóstressz toleranciájára

Tari Irma¹, Borbély Péter, Csiszár Jolán, Horváth Edit, Poór Péter, Szepesi Ágnes, Takács Zoltán

SZTE Növénybiológiai Tanszék, 6726 Szeged, Közép fasor 52.

¹e-mail: tari@bio.u-szeged.hu

Absztrakt

Patogéninfekció után, egyes gyökérközegben élő, nem patogén mikroorganizmusok jelenlétében illetve speciális kémiai kezelések hatására a növények sajátos fiziológiai paraméterekkel jellemezhető státuszt, ún. edzett állapotot alakítanak ki. Ilyen edzett, készenléti állapotban lévő növények a következő patogénfertőzés során képesek emlékezni a korábbi fertőzésre vagy abiotikus stresszhatásra, és jóval gyorsabban és erőteljesebben aktiválják védelmi rendszereiket. Az utóbbi években vált ismertté, hogy a különböző stresszhatások által kiváltott edzés, a „priming”, más stresszorokkal szemben is indukálja a védekezési reakciókat. Így például a gazdanövényt megtámadó, biotróf kórokozók körül kialakuló sejtelhalásban, a hiperszenzitív reakcióban kulcsszerepet játszó szalicilsav (SA) abiotikus stresszhatásokkal, így a sóstresszel szemben is növeli a növények toleranciáját. Az SA tehát kiválóan alkalmazható kémiai edzés indukciójára. Az SA által kiváltott edzési folyamatokban döntő szerepe van a reaktív oxigénformák, elsősorban a H₂O₂ által előidézett oxidatív stressznek, valamint az ezek hatására indukálódó antioxidáns rendszereknek. Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a 10⁻⁴ M-os SA az előkezelési szakaszban a paradicsom növényekben (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Fuego) átmeneti H₂O₂ akkumulációt okozott, és a szövetekben átmenetileg aktiválódtak az antioxidáns enzimek, a szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), aszkorbát peroxidáz (APX), dehidroaszkorbát redukáz (DHAR), monodehidroaszkorbát redukáz (MDHAR) és a glutation redukáz (GR). A 100 mM NaCl-dal kiváltott sóstressz hatása alatt az edzett növényekben szignifikánsan kisebb H₂O₂ akkumuláció volt detektálható, ennek következtében a szövetek megőrizték életképességüket. Az edzett növényekben, a gyökerek redox homeosztázisának fenntartásában legfontosabb szerepe az aszkorbát peroxidáz, a dehidroaszkorbát redukáz és glutation redukáz aktivitás emelkedésének volt, amihez hozzájárult a sikeres edzést kiváltó szalicilsav kezelés hatására sóstressz jelenlétében megemelkedő aszkorbinsav és glutation pool is.

Kulcsszavak: antioxidáns enzimek; aszkorbát; glutation; paradicsom; sóstressz; szalicilsav

1. Bevezetés

1.1 A sóstressz kialakulása

A sóstressz a jelenleg művelés alatt álló területek legalább egyharmadát érinti. Ez a Föld felszínének 6 %-ára terjed ki több, mint 100 országban [21], és ezeken a területeken a termesztett növények termésmennyiségének legfontosabb korlátját jelenti. Magas sótartalmú területek természetes élőhelyeken is találhatóak, így az ár-apály által érintett tengerparti zónák, sós mocsarak, száraz, félsivatagi vidékeken kialakuló, visszahúzódó felszíni vizek parti zónái (Kaspi-tenger, Holt-tenger) és a mérsékelt égövi szikes területek növényei is magas sókoncentrációnak vannak kitéve.

Magyarországon a nem meszes szolonyec talajok a Nagyalföld 26,7 %-át fedik, a szódás szoloncsákok és a meszes réti szolonyec talajok az Alföld 1,5%-át borítják [11; 24]. Vannak azonban olyan talajok is hazánkban, amelyek jelenleg nem szikesek, de az öntözés következtében és az átlag hőmérséletek növekedésével járó klímaváltozás hatására azok lehetnek.

A talajt magas sótartalmúnak tekintik, ha a telített talajból kinyert talajoldat elektromos vezetőképessége 4 dS m⁻¹-nél magasabb. Sóstressz akkor alakul ki a növényekben, ha a környezet sókoncentrációja meghaladja a növények optimális növekedéséhez szükséges koncentrációértéket. A talajoldatokban lévő ionok közül a Mg²⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻ és a Cl⁻ ionok járulnak hozzá leginkább a teljes szalinitáshoz, természetesen ehhez társul a Na⁺ ion is, amely, ha önmagában okozza a sóstresszként ható magas sókoncentrációt legtöbbször klorid anionnal, akkor szodicitásról beszélünk. A talajokat akkor tekintik magas szodicitásúnak, ha a Na⁺ ion a talaj kationcserélő kapacitásának több, mint 15%-át adja. A talaj magas sótartalmának kialakulása tehát komplex folyamat, ami függ a levegőből történő depozíciótól, a talajoldatban lévő ásványi sók koncentrációjától, a kistályos és szilárd formában található ionok

mennyiségétől. A talajok sótartalmának változása tehát komplex folyamat, ami évszakos ciklusokat mutathat, mivel a csapadékvíz valamint a talajvíz az ionok oldódásának és eloszlásának megváltozását okozhatja a nedvesebb és a száraz periódusokban.

Ezekon a területeken gyakran az öntöző víz is magas sókoncentrációjú (900 mg l^{-1}). Az öntöző víz által okozott sóstressz olyan esetben okoz problémát, ha az ionok nagy része a kimosódás hiányában a gyökérszónában marad, ami a szárazság miatt bekövetkező erős párologás következtében bekonzentrálódik és károsítja a növényt. Máshol a magas sótartalmú talajvíz kerül kapcsolatba a gyökérközeggel. Az öntözéssel kialakuló sóstressz nagy múltú és ősi kultúrák pusztulásához is vezetett, mint például a Tigris és az Eufrátesz medencéjében, Dél-Mezopotámiában.

Így rendkívül fontos a sótolerancia mechanizmusának megismerése, valamint olyan növények szelekciója esetleg biotechnológiai úton történő előállítás, amelyek ilyen területeken megélnek, gazdasági növényként természetők vagy fitoremediációs célokkal egy terület helyreállítására használhatók.

A továbbiakban a sóstressz fogalmát a NaCl magas koncentrációi által okozott stresszre használjuk.

1.1.1 A sóstressz tolerancia mechanizmusa növényekben

A növények a sótolerancia tekintetében több csoportba sorolhatók. A halofita, sókedvelő növények csoportja 200 és 500 mM NaCl koncentráció mellett is képes növekedésre. Ezen csoporton belül az euhalofiták optimális növekedésükhöz magas, akár 300 mM-os NaCl koncentrációt is igényelnek. A második csoportba több halofita és néhány glikofita genusz tartozik, ezek közös jellemzője az erőteljes növekedésgátlás 200 mM-os NaCl oldaton, illetve a növekedés megszűnése ezen koncentráció fölött, de még mindig képesek külső tünetektől mentes vegetatív fejlődésre és termésképzésre. A harmadik csoportba tartozó glikofita növények számára a 80 mM-os vagy annál nagyobb NaCl koncentráció mérgező, citoplazmájukban felborul az ioneqyensúly, súlyos stressztüneteket mutatnak, illetve e fölött a koncentráció fölött el is pusztulnak [14].

A sóstressz által kiváltott **primér hatás** a Na^+ ionok citoplazmába való belépése után az **ioneqyensúly** felborulása [26]. A magasabbrendű növények citoplazmája $100\text{--}200 \text{ mM K}^+$ -ot és $1\text{--}10 \text{ mM Na}^+$ -ot tartalmaz, amely 200 mM-os külső Na^+ koncentrációnál 80 mM-ig is emelkedhet. A Na^+ ionok mérgezőek a sejt számára, megbontják a fehérjék szorosan kötött hidrátburkát, ezáltal azok elvesztik natív konformációjukat, helyettesítik az enzimek kofaktoraként szolgáló K^+ ionokat, és legtöbbször enzimaktivitás gátlást idéznek elő. A Ca^{2+} -ra vonatkozó ioneqyensúly felborulása pedig a K^+/Na^+ felvétel szelektivitását csökkenti azáltal, hogy megszünteti a Ca^{2+} gátló hatását a Na^+ citoplazmába történő belépésére. Az akklimatizáció során tehát elsődleges a citoplazma ioneqyensúlyának a helyreállítása. Ez a Na^+ transzport szabályozásán keresztül valósul meg.

A Na^+ belépése a gyökérsejtek citoplazmájába történhet az ún. nem szelektív kationcsatornán keresztül, de a nagy affinitású K^+ transzporter fehérje is szállít Na^+ ionokat. A Na^+ kizáródik a citoplazmából, ha a transzporterek K^+/Na^+ szelektivitása nagy, és a káliumiont részesítik előnyben a nátriummal szemben. A citoplazma nátriumion tartalmát csökkentik azok a transzporter molekulák is, amelyek a sejtkompartmentumok, így a vakuólum illetve sejtfa felé, aktív transzporttal pumpálják ki a Na^+ iont.

További lehetőség a gyökér terhelésének mérséklésére a Na^+ hajtásba irányuló transzportja a xilémén keresztül. Az így hajtásba kerülő Na^+ a levél fotoszintetizáló, mezofillum sejteiben hasonló transzporter fehérjék közvetítésével kompartmentizálódhat, mint a gyökérben. Ez egyben azt is eredményezi, hogy a vakuólumban felhalmozódó Na^+ ion szervesen ozmotikumként is szolgál. Ez különösen a halofitákra jellemző, míg olyan glikofita növényben, mint a paradicsom, a hajtásban sok nátriumot felhalmozó, természetett fajták inkább szenzitívnek bizonyultak [2; 9]. Ebben az esetben a nátrium akkumuláció az oxidatív stressz következtében a plazmamembrán szelektivitásának csökkenésével, ezt követően vízvesztéssel és vízpotenciál csökkenéssel, majd a levél öregedési folyamatainak beindulásával járt. A vad paradicsomfajok között, azonban kifejezetten halofita karakterű, Na^+ -ot szervesen ozmotikumként akkumuláló fajokat is találunk, mint amilyen például a *Lycopersicon peruvianum* és a *L. pennellii* [9].

A sóstressz hatására az egyik elsőként kialakuló változás a turgornyomás csökkenése miatt bekövetkező sejtmegnyúlás gátlás, amelyhez kapcsolódik a sztómák záródását követően a fotoszintézis hatékonyságának csökkenése és a csökkent széndioxid asszimiláció. A Calvin-ciklus enzimeit és a fotofoszforyláció folyamatait is sóérzékenyek [16].

Az **elődleges hatások** másik eleme a megnövekedett külső sókoncentráció következtében kialakuló **ozmotikus stressz**. Az ozmotikus stressz káros hatásainak kivédését az ozmotikus homeosztázis helyreállítása jelenti. Ennek egyik eleme lehet a szervesen ozmotikumok koncentrációja, de rendkívül fontos az ún. kompatibilis ozmotikumok, mint például az alacsony molekulású szénhidrátok (szacharóz, glükóz, fruktóz, trehalóz), cukoralkoholok (mannitol, szorbitol, ononitol, pinitol), szerves savak, aminosavak (pl. prolin), quaterner ammónium származékok (glicinbetain, β -alaninbetain, prolinbetain stb.) szintézisének aktiválódása és akkumulációja. A kompatibilis ozmotikumok olyan kompartmentumokban szolgálnak ozmotikumként, ahol a fehérjék szerkezete megőrzendő, így a citoplazmában, kloroplasztisban, mitokondriumban. Gyakran ozmoprotektív szerepük is van,

tehát elősegítik a makromolekulák natív térszerkezetének fennmaradását azáltal, hogy helyettesítik a szorosan kötött vízmolekulákat a makromolekulák felszínén és antioxidánsként is funkcionálhatnak [23].

A **másodlagos folyamatok** között fontos elem az abiotikus stresszorok nem-specifikus hatásaként jelentkező **oxidatív stressz**. A reaktív oxigénformák elsősorban azokban a redox folyamatokban keletkeznek, ahol az elektrontranszport túl gyors a természetes elektronakceptoroként szereplő biológiai molekula reoxidációjához képest. Ilyenkor megfelelő redoxpotenciálú donor esetén az elektront a molekuláris O_2 is felveheti, ami szuperoxid gyökönion ($O_2^{\cdot-}$) képződéséhez vezet. A folyamat olyan redox reakciók sorozatát indítja el, ami hidrogénperoxid (H_2O_2), hidroxil gyök (OH^{\cdot}), vagy protonáció után hidroperoxil gyök (OH_2^{\cdot}) keletkezését eredményezi [5; 25].

A reaktív oxigén formák (ROS) egyik legfontosabb forrása a fotoszintetikus és a mitokondriális elektrontranszport lánc, ami elektronokat adhat át a molekuláris oxigénnek, generálva ezáltal a szuperoxid gyökönion, majd az ebből keletkező H_2O_2 képződését. Keletkeznek azonban aktív oxigénformák, $O_2^{\cdot-}$ majd H_2O_2 a plazmamembránhoz kapcsolt folyamatokban és az apoplasztban (NADPH oxidáz, peroxidázok, aminoszázok), az endoplazmatikus retikulumban egyes citokróm P_{450} -dependens monooxigenázok működésének eredményeképpen és a citoplazmában is. Bizonyos fémionok, így az Fe^{2+} és a Cu^+ ion a H_2O_2 közvetlen redukciójával generálják a hidroxilgyökök keletkezését, majd az ennek következtében kialakuló oxidatív stresszt (Haber-Weiss/Fenton reakció). Ez utóbbi fémionok erőteljes stresszhatásra a fehérjék degradációjakor, a sejtorganellek dezintegrációjakor is felszabadulhatnak.

A membránokat, nukleinsavakat, fehérjéket degradáló és inaktíváló reaktív oxigénformák eltávolítása a sikeres akklimatizáció egyik legfontosabb feltétele. A membránlipidek peroxidációját, a proteinek oxidációját, az enzimgátlást valamint a DNS és RNS károsodást okozó, a kioltó mechanizmusokat túllépő oxidatív stressz a sejtek halálához, a szövetek dezintegrációjához vezet.

A ROS inaktíválásában enzimatis és nem enzimatis folyamatok is szerepelnek. Az enzimatis inaktíváló mechanizmusok talán elsőként említhető lépése a $O_2^{\cdot-}$ -t protonfelvétellel H_2O_2 -dá és O_2 -né alakító szuperoxid dizmutáz (SOD). Az enzim csaknem minden sejt-kompartimentumban, így a kloroplasztisban, mitokondriumban, a citoszolban és a peroxisómában is előfordul [1]. A kloroplasztisban, peroxisómában és a citoszolban keletkező H_2O_2 -ot közvetlenül alakítja vízzé redukált aszkorbinsav (AsA) felhasználásával az aszkorbát peroxidáz (APX), miközben a monodehidroaszkorbát (MDA) és dehidroaszkorbát (DHA) keletkezik. Ezeknek a lépéseknek fontos szerepe van a kloroplasztis antioxidatív védőmechanizmusában, valamint a kloroplasztisban, a mitokondriumban, a peroxisómában és a citoszolban egyaránt megtalálható aszkorbát-glutation ciklus folyamataiban.

A Halliwell-Asada-Foyer ciklusnak is nevezett aszkorbát-glutation ciklus több sejt-kompartimentumban is működik [5; 15]. Itt a monodehidroaszkorbát redukciójára végső soron a NADPH koenzim redukáló ekvivalensei használnak fel az MDA redukált enzim katalizálta reakcióban (MDAR). Az MDA aszkorbát és dehidroaszkorbát (DHA) diszproporcionálódhat, amelyet a dehidroaszkorbát redukált (DHAR) redukál vissza glutationtól (GSH) függő reakcióban. Az oxidált glutation (GSSG) redukcióját a glutation redukált (GR) végzi NADPH koenzimmel. Az aszkorbát pool redukáltsági fokának fenntartásában tehát döntő szerepe van a glutation pool nagyságának és redukáltsági fokának. A hidrogénperoxidot közvetlenül bontja vízzé és molekuláris oxigénné a peroxisómában lokalizálódó kataláz (CAT). Bár az APX és a CAT egyaránt képes a H_2O_2 eltávolítására, funkciójuk nem teljesen azonos, mivel az APX sokkal nagyobb affinitást mutat a szubsztráthoz (μM -os nagyságrend), míg a CAT, amely mM-os szubsztrát koncentrációnál működik hatékonyan, inkább stresszfolyamatokban válik jelentőssé [12].

Kimutatták, hogy a sótoleráns vad faj, a *L. pennellii* mind az enzimatis, mind a nem enzimatis antioxidáns kapacitását gyorsan és hatékonyan növelte a sókezelést követően [29]. Ennek egyik fontos eleme volt, hogy a sókezelés hatására a mitokondrium mátrixában kimutatható APX izoenzim aktivitása növekedett meg, és szemben a természet paradicsommal, a *Solanum lycopersicum*-mal, ahol a só hatására az enzim membránkötötté vált, a vad fajban a mátrixban maradt [13].

Az alacsony molekulásúlyú, nem enzimatis antioxidánsok között olyan lipidoldékony vegyületeket találunk, mint az α -tokoferol, a zeaxantin és egyéb karotinoidok, illetve vízdoldékonyakat, mint az aszkorbinsav, glutation, a különböző fenolos vegyületek, de az ozmotikus adaptációban szereplő kis molekulásúlyú szénhidrátok, a poliolok (pl. szorbitol), illetve a poliaminok is rendelkeznek szabad gyök kioltó hatással. Az aszkorbinsav és glutation esetén nemcsak a teljes koncentráció, hanem a redukált és oxidált forma aránya is fontos [5].

A ROS eltávolítása már önmagában is tekinthető **detoxifikációs mechanizmusnak**. Tágabb értelemben azonban ide soroljuk a stresszor hatása alatt felhalmozódó káros anyagcseretermékek eltávolítását és a sérült molekulák lebontását vagy javítását is.

A glutation nemcsak antioxidánsként tölt be fontos szerepet, hanem a detoxifikáló mechanizmusoknak is meghatározó tényezője. Jónéhány detoxifikáló enzim GSH-függő, ezek közül legnagyobb jelentősége talán a glutation S-transzferázoknak (GST) van. A GST-k elektrofil szubsztrátokhoz GSH-t kötnek, majd a glutationált metabolitot az ún. „ATP-kötő kazettával rendelkező”, ABC transzporterek a vakuólumba szállítják. A GST-k ily módon központi szerepet töltenek be a xenobiotikumok detoxifikálásában, természetes szubsztrátjaik közül az auxinokat, citokinineket, az antociánokat kell megemlíteni [3].

Ha az akklimatizáció sikeres, az új steady state egyensúlyok mellett a növény növekedni kezd a stresszor jelenlétében illetve a stresszor hatásának megszűnte után **helyreállítja metabolikus folyamatait és növekedését.**

1.2. A szalicilsav szerepe az abiotikus stresszorokhoz történő akklimatizációban: kémiai edzés

A szalicilsav (SA) elsősorban a biotikus stresszorok hatására a magasabb rendű növényekben kialakuló ún. hiperszenzitív reakcióban szereplő jelátviteli komponensként volt ismeretes. Szintézisére mikrobák is képesek. A *Mycobacterium smegmatitis* 3,6 mg (g száraz tömeg)⁻¹ nap⁻¹ mennyiségben szintetizálja az SA-t. A termesztett növények rhizoszférájában található mikroorganizmusok is képesek az SA szintézisére, és megtalálható a hormon a növények gyökérzetének exudátumában is. A kukorica és a mungó bab rhizoszférájában 31 és 141 µg SA-t találtak 100 g száraz talajban [18].

Mivel a szalicilsav és más benzoésav származékok erőteljesen befolyásolják a növények növekedését, allelopatikus anyagnak is tekintendők. A növekedésgátló hatást részben annak tulajdonították, hogy az SA hat a növények vízháztartására. Szalicilsavval kezelt paradicsom növények a kontrollnál alacsonyabb vízpotenciált és kisebb sztómakonduktanciát mutattak [16].

A vízháztartás mellett az SA hat a fotoszintézisre is. Árpában 100 µM-os SA kezelés csökkentette a levél növekedését, a klorofill és fehérjetartalmakat, a fotoszintézis maximális sebességét, és a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz, a karboxiláló enzim aktivitását [8].

Fontos szerepe van a szalicilsavnak az oxidatív stresszel kapcsolatos folyamatokban. Az egyik első enzim, amellyel kapcsolatban bizonyították az SA gátló hatását, a H₂O₂-t bontó kataláz volt, bár később kiderült, hogy ez a gátlás csak egyes izoenzimok esetében érvényesül [7]. Részben az SA kataláz gátló hatásával magyarázták a H₂O₂ szintjének megemelkedését és az oxidatív stresszt indukáló hatást, amely a biotikus stresszfolyamatokban a hiperszenzitív reakcióhoz vezet. A H₂O₂ koncentrációjának megnövekedéséhez *Arabidopsis*-ban a SOD aktivitás fokozódása is hozzájárul, míg ugyanebben a növényben az SA az ugyancsak H₂O₂-t bontó aszkorbát peroxidáz (APX) is gátolta a hajtásban [17].

Részben a szubletális oxidatív stressz generálásával és ennek következtében a redox-regulált, antioxidáns enzimek expressziójának fokozásával hozzák összefüggésbe az SA-nak azon hatásait, amelyeket az abiotikus stresszorok hatásainak mérséklése kapcsán tapasztalhatunk. A SA előkezelés fokozta a növények rezisztenciáját az UV-B sugárzással, az ózonnal, a paraquattal, a hőstresszel, a hidegstresszel, a vízhiánnyal valamint nehézfém stresszel szemben (összefoglalva Horváth és mtsai által, 2007).

A biotikus stressz során, az inkompatibilis gazda-növény kapcsolatban kialakuló hiperszenzitív válasz és a kórokozót lokalizáló sejtelhálás mellett az SA hatása a fertőzéstől vagy az SA kezeléstől távoli szövetekben is aktiválódik, szisztemikussá válik, ami a szisztemikus szerzett rezisztencia (SAR) kialakulásához vezet. Az SA tehát kiválóan alkalmazható kémiai edzés céljaira. Az SA által kiváltott edzési folyamatokban döntő szerepe van a reaktív oxigénformák, elsősorban a H₂O₂ által előidézett oxidatív stressznek, valamint az ezek hatására indukálódó antioxidáns rendszereknek. Ez azonban nem egyszerűen az oxidatív stressz által indukált antioxidáns mechanizmusok tartós aktíván tartását jelenti. Talajlakó mikrobák, patogénfertőzés illetve egyes kémiai anyagokkal történő kezeléseket után figyelték meg először, hogy az első stressz hatása először lecseng, ez az ún. edzett ("primed") állapot, ami után a második stresszor hatására a védekezési reakciók sokkal gyorsabban és erőteljesebben indukálódnak távoli szövetekben is.

Ilyen kémiai edzést kiváltó anyag például a β-aminovajsav (BABA), 2,6-diklór-izonikotinsav (INA), γ-aminovajsav (GABA), a lignoszulfonátok, a benzo(1,2,3)tiadiazol-7-karbotionsav S-metilészter (BTH) vagy olyan növényi hormonok, mint az abszcizinsav, az etiléngenerátor Ethrel, illetve maga a sóstressz is [6].

Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy hosszútávú előkezelésként alkalmazott SA védőhatást gyakorol paradicsom növényekben sóstresszel szemben [22]. A talajban lévő SA koncentrációk nagyságrendekkel alacsonyabbak az irodalmi áttekintésben felsorolt hivatkozások nagy részében használt koncentrációkhoz képest (5·10⁻⁴-10⁻³ M). A növényekben azonban környezeti stresszhatásra kialakulhat olyan SA koncentráció, ami a 10⁻⁴ M-os exogén SA oldatból felvételre kerül [4]. Ezért kísérleteinkben az SA-t jóval alacsonyabb koncentráció intervallumban is használtuk (10⁻⁷-10⁻⁴ M), és hosszú időtartamú előkezeléseket végeztünk.

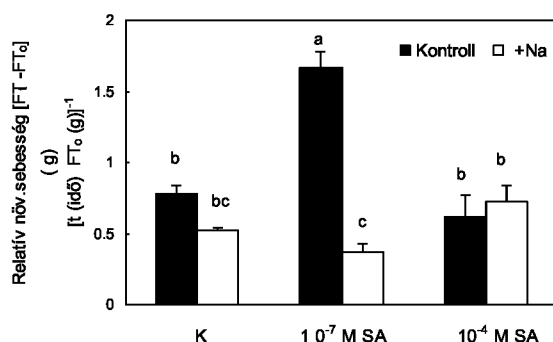
Kíváncsiak voltunk arra, hogy az SA-előkezelt növények magas sókoncentráció által kiváltott antioxidáns válasza hogyan alakul a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, melyek azok az enzimek és nem enzimikus antioxidánsok, amelyek döntő szerepet játszanak a sóstressz káros hatásainak kivédésében. Mivel az emberi táplálkozásban is fontos gazdasági növényről van szó, ezért jelen dolgozatunkban a kezeléseknél a szöveti aszkorbinsav tartalomra gyakorolt hatását emeltük ki.

Az allelopatikus hatást kiváltó szalicilsav tehát hozzájárulhat a növények általános stresszrezisztenciájának fokozódásához.

2. Eredmények és értékelésük

Kísérleteinkben *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar. Rio Fuego paradicsom növényeket használtunk. A csíráztatás három napon keresztül sötétben, 26 °C-on történt. Ezt követően a növények két hetes korukig perlitben, majd vízkultúrában, üvegházi körülmények között növekedtek [16]. Az SA kezelést a növények 4 hetes korától 7 hetes koráig végeztük, 10^{-8} - $5 \cdot 10^{-4}$ M-os koncentráció intervallumban, amiből előkísérletek után a részletes vizsgálatokra a 10^{-7} és 10^{-4} M-os koncentrációkat választottuk ki. A sókezelés 7 hetes korban történt 100 mM-os NaCl alkalmazásával.

Megállapítottuk, hogy az SA előkezelés megnyúlás és tömeggyarapodás gátlást csak 10^{-4} M koncentrációban okozott. A relatív növekedési sebesség változása azt mutatja, hogy a sóstressz önmagában jelentős növekedésgátlást eredményezett a kontroll és a 10^{-7} M-os SA-val előkezelt növényekben, a 10^{-4} M-os koncentrációnál azonban nem tapasztaltunk további növekedésgátlást a 100 mM-os NaCl jelenlétében (1. ábra), ami az akklimatizáció sikerességének első jele lehet.



1. ábra. 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények relatív növekedési sebességére 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag \pm SE, n=10). Fekete oszlopok: kontroll és SA kezelt növények; szürke oszlopok: sóstresszelt növények. A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

A szalicilsavról közismert, hogy oxidatív stressz generálásával programozott sejthalált indukál a hiperszenzitív reakció során. Az abiotikus stresszorokkal szembeni védőhatást a szubletális SA koncentrációk az antioxidáns enzimrendszerek aktiválásával érik el.

Vizsgáltuk a legfontosabb, a reaktív oxigénformák eltávolítását katalizáló enzimek aktivitását az SA-val előkezelt növényekben és az előkezelésben nem részesült mintákban az egyhetes sókezelést követően (1. táblázat). Ezek a hatások a hajtásban és a gyökérben eltérnek.

1. táblázat. 10^{-7} M-os és 10^{-4} M-os szalicilsav (SA) előkezelés hatása 8 hetes paradicsom növények gyökérzetének és hajtásának szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), dehidroaszorbát redukáz (DHAR), monodehidroaszorbát redukáz (MDHAR) és glutation redukáz (GR) aktivitására (U mg⁻¹ protein) (Átlag \pm SD, n=3). A különböző betűvel jelzett átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Kezelés	SOD	CAT	APX	DHAR	MDHAR	GR
enzimaktivitás (U mg ⁻¹ protein)						
Gyökér						
Kontroll (K)	23,4 \pm 2,1 ^{cd}	4,1 \pm 0,0 ^a	6,1 \pm 0,2 ^d	490,0 \pm 10,1 ^b	40,1 \pm 1,2 ^b	11,1 \pm 0,7 ^a
K + Na	40,0 \pm 5,4 ^{bc}	2,7 \pm 0,0 ^b	14,2 \pm 0,1 ^c	501,0 \pm 21,0 ^b	52,0 \pm 0,2 ^a	2,8 \pm 0,4 ^c
10^{-7} M SA	10,4 \pm 2,9 ^d	1,3 \pm 0,6 ^c	17,3 \pm 0,1 ^b	375,2 \pm 31,8 ^c	53,4 \pm 1,5 ^a	3,7 \pm 0,1 ^c
10^{-7} M SA + Na	81,0 \pm 12,3 ^a	2,5 \pm 0,3 ^b	21,8 \pm 0,4 ^a	198,2 \pm 5,4 ^d	28,5 \pm 0,1 ^c	5,5 \pm 0,5 ^b
10^{-4} M SA	38,7 \pm 6,1 ^{bc}	2,7 \pm 0,1 ^b	13,8 \pm 0,0 ^c	580,7 \pm 11,6 ^a	52,6 \pm 1,1 ^a	8,9 \pm 0,5 ^a
10^{-4} M SA + Na	50,1 \pm 9,0 ^b	2,7 \pm 0,3 ^b	17,2 \pm 0,2 ^b	460,4 \pm 17,1 ^b	49,0 \pm 0,8 ^a	10,1 \pm 0,8 ^a
Levél						
Kontroll (K)	31,0 \pm 0,4 ^b	1,4 \pm 0,2 ^a	8,2 \pm 0,1 ^b	680,3 \pm 18,3 ^b	17,3 \pm 0,8 ^a	4,8 \pm 0,1 ^c

K + Na	96,8±11,4 ^a	0,7±0,1 ^b	11,4±0,2 ^a	712,8±21,5 ^b	20,1±0,7 ^a	7,6±0,6 ^b
10 ⁻⁷ M SA	54,6±31,8 ^b	1,1±0,3 ^a	3,6±0,1 ^d	560,2±7,4 ^d	10,4±0,4 ^b	6,4±0,5 ^b
10 ⁻⁷ M SA + Na	118,6±2,4 ^a	0,3±0,0 ^b	6,4±0,2 ^c	760,2±16,4 ^a	13,1±0,1 ^b	6,7±0,5 ^b
10 ⁻⁴ M SA	89,6±14,6 ^a	1,5±0,2 ^a	4,4±0,0 ^d	624,6±6,8 ^c	19,8±0,1 ^a	6,4±0,5 ^b
10 ⁻⁴ M SA + Na	92,0±16,4 ^a	0,7±0,1 ^b	6,3±0,1 ^c	640,1±16,5 ^c	9,5±0,3 ^b	10,1±0,7 ^a

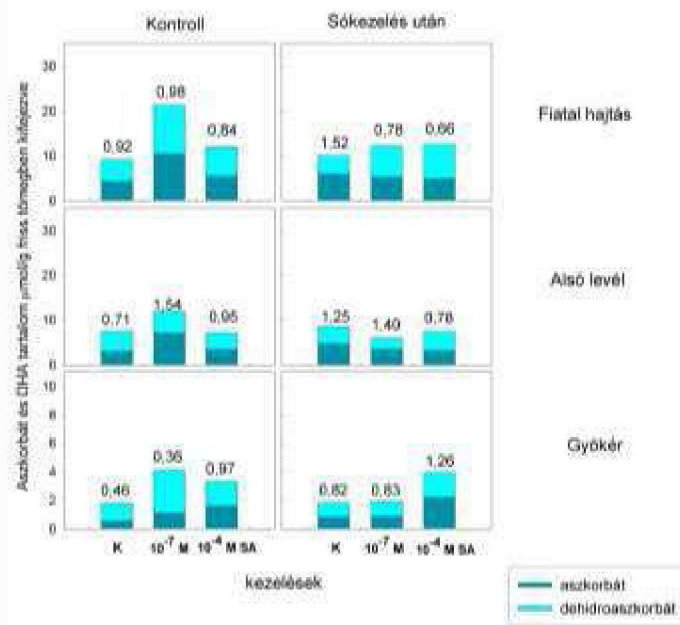
Az SA előkezelés a gyökérben szignifikánsan csökkentette a kataláz aktivitását, a hajtásban viszont nem okozott jelentős változást. A sóstressz az SA előkezelt növények gyökerei kivételével minden esetben tovább csökkentette a CAT aktivitást.

Csökkenés figyelhető meg a SOD aktivitásban a gyökérben, 10⁻⁷ M SA előkezelésnél. A sóstressz mindenütt további SOD aktivitás növekedést eredményez. A 100 mM NaCl hatására a megnövekedett SOD aktivitás és a csökkent hidrogénperoxidot bontó katalázaktivitás, valóban kiindulópontja lehet reaktív oxigén formákat generáló reakciósornak. A H₂O₂ eltávolítását végezhetik a különböző peroxidázok, amelyek közül a kloroplasztisban, a mitokondriumban és a peroxisómákban kiemelt szerepe van az aszkorbát peroxidáznak (APX). Az APX aktivitás a gyökérben magasabb volt az SA-val előkezelt növényekben sóstressz alatt.

Az oxidatív stresszel szembeni akklimatizációban szereplő egyik kulcsenzim, az APX aktivitása a hajtásban lecsökkent az SA előkezelés hatására. Sóterhelésnél a hajtásban is fokozódik az APX aktivitás, ami az SA előkezelt mintákban magasabb értékeket eredményez (1. táblázat).

A dehidroaszkorbinsav glutationnal történő redukcióját végző glutation reduktáz aktivitása a hajtásban kisebb mértékben változik, a gyökérben inkább csökken az előkezelések hatására, bár 10⁻⁴ M-nál ez a változás minimális. A sóstressz a hajtásban emeli, a gyökérben gátolja az enzimaktivitást a kontroll növényekben. A 10⁻⁴ M-os SA előkezelésnél a hajtásban a 100 mM NaCl hatására a GR aktivitás szignifikánsan növekszik, a gyökérben pedig nem csökken a kontrollhoz képest (1. táblázat).

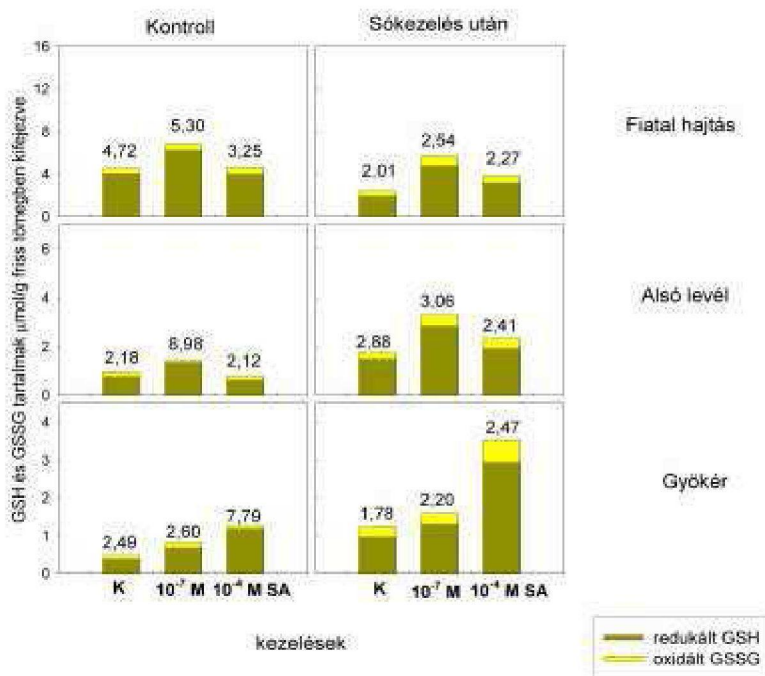
Mivel a magas NaCl koncentrációk elsősorban a gyökér szöveteit károsíthatják, ezért lényeges a gyökér akklimatizációs folyamatát kiemelten és elsődlegesen kezelni.



2. ábra. 10⁻⁷ és 10⁻⁴ M SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökerének aszkorbát és dehidroaszkorbát tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=9). Az oszlopokon található számok a redukált/oxidált aszkorbát (aszkorbát/dehidroaszkorbát) arányát mutatják a különböző növényi szövetekben.

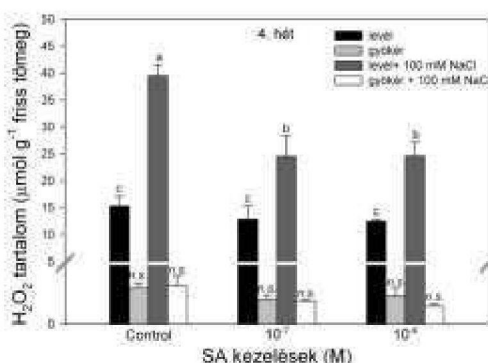
Megállapíthatjuk, hogy a gyökérben az előkezelések hatására csökkenő CAT aktivitás H₂O₂ akkumulációhoz vezethet, amit a jelentősen fokozódó aktivitású APX bonthat le. Az aszkorbát reciklizációját biztosító DHAR és GR aktivitásának jelentős csökkenése sóstressz alatt, illetve aktiválódásának elmaradása 10⁻⁷ M-os SA előkezelésnél, előidézheti az akklimatizáció sikertelenségét a 10⁻⁷ M-os SA-val előkezelt növényekben, ami magas aktivitás mellett a 10⁻⁴ M-os SA-val előkezelt növényekben nem következik be.

A nem enzimatisz antioxiidánsok szövetspecifikus akkumulációja nagy jelentőségű a sóstressz akklimatizációban. Vizsgáltuk az aszkorbinsav és oxidált formája, a dehidroaszkorbinsav koncentrációját az előkezelt és a kezeletlen paradicsom növényekben sóstressz alatt. Ennek alapján megállapítható, hogy a sóstresszhez jól alkalmazkodó növények a gyökereikben képesek magas aszkorbinsav (2. ábra) és glutation szintet tartani (3. ábra), és ez a 10^{-4} M-os SA-val előkezelt növényekben következik be. Más esetekben a nem enzimatisz antioxiidánsok akkumulációja elmarad a magas sókoncentráció jelenlétében a gyökerekben, ami a gyökércsúcsok életképességének csökkenéséhez, végső soron a növény elhalásához vezet.



3. ábra. 10^{-7} és 10^{-4} M SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökérének redukált glutation (GSH)/ oxidált glutation (GSSG) tartalmára 1 hetes, 100 mM-os NaCl kezelést követően (Átlag±SE, n=9). Az oszlopokon található számok a GSH/GSSG arányát mutatják a különböző növényi szervekben.

Az antioxiidáns mechanizmusok aktiválódásának eredményeképpen a sóstressz indukált hidrogénperoxid akkumuláció szignifikánsan csökkent az előkezelt növényekben az edzetlen növényekhez képest, ez a levelekben erőteljesebb, mint a gyökerekben. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy az edzett növények kisebb oxidatív stressznek vannak kitéve a kontrollhoz képest (4. ábra).



4. ábra: SA előkezelés hatása paradicsom növények levelének és gyökérének H₂O₂ tartalmára sóstressz alatt. Átlag±SE, (n=5). A különböző betűvel jelzett oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól P≤0.05 valószínűségi szinten, amit a Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

Összefoglalás

Az edzett növényekben, a gyökerek redox homeosztázisának fenntartásában legfontosabb szerepe az aszkorbát peroxidáz, a dehidroaszkorbát reduktáz és glutation reduktáz aktivitás emelkedésének volt, amihez hozzájárult a sikeres edzést kiváltó 10^{-4} M-os szalicilsav kezelés után a sóstressz jelenlétében megemelkedő aszkorbinsav és

glutathione pool is. Ez egyrészt biztosítja a redox homeosztázis fenntartását az edzett állapotban történő stressz alatt [10], másrészt kedvező feltételeket ad a megnyúlásos növekedés megindulásához a stresszelt növényekben. Az SA kémiai edzést aktiváló hatásának molekuláris biológiai folyamatai nemcsak a génexpresszió ki-be kapcsolásán alapulnak, hanem ez olyan kromatin újramodellezéssel kapcsolt epigenetikus változásokat is jelent, amely az akklimatizáció szempontjából fontos gének elérhetőségét biztosítja a transzkripció számára.

Köszönetnyilvánítás

A munkát a Országos Kutatási Alapprogramok (OTKA K101243 és OTKA PD112855) és az Európai Unió valamint a magyar állam által finanszírozott HUSRB/120/221/173 PLANTTRAIN IPA Fund támogatta. Köszönjük Bécsné Kozma Etelka kitűnő technikai segítségét.

Hivatkozott irodalom

- [1] Alscher RG, Erturk N and Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- [2] Ashraf MPJC and Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- [3] Csiszár J, Horváth E, Váry Z, Gallé Á, Bela K, Brunner S and Tari I (2014) Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* 78: 15-26.
- [4] Freemann JL, Garcia D, Kim D, Hopf A and Salt DE (2005) Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Physiology* 137: 1082-1091.
- [5] Foyer CH and Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- [6] Goellner K and Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121: 233-242.
- [7] Horváth E, Janda T, Szalai G and 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: 1129-1135.
- [8] Horváth E, Szalai G and Janda T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 290-300.
- [9] Juan M, Rivero RM, Romero L and Ruiz JM (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 54: 193-201.
- [10] Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P and Galiba G (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Science* 211: 77-91.
- [11] Kuti L, Tóth T, Pásztor L és Fügedi U (1999) Agrogeológiai térképek adatainak és a szikesedés elterjedésének kapcsolat az Alföldön. *Agrokémia és Talajtan* 48: 501-506.
- [12] Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- [13] Mittova V, Guy M, Tal M and Volokita M (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1105-1113.
- [14] Munns R and Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- [15] Nakano Y and Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiology* 28: 131-140.
- [16] Poór P, Gémes K, Horváth F, Szepesi Á, Simon ML and 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: 105-114.
- [17] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP and Watkins CB (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes, Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 137-149.
- [18] Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- [19] Rus AM, Panoff M, Perez-Alfocea F, Bolarin MC (1999) NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology* 155: 727-33.
- [20] Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M and Tal M (2001) Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress. The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* 112: 487-494.
- [21] Szabolcs I (1989) Salt-affected soils. Boca Raton, FL: CRC Press
- [22] Tari I, Csiszár J, Szalai G, Horváth F, Pécsváradi A, Kiss G, Szepesi Á, Szabó M and Erdei L (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 55-56.

- [23] Tari I, Kiss G, Deér AK, Csiszár J, Erdei L, Gallé Á, Gémes K, Horváth F, Poór P, Szepesi Á and Simon, LM (2010) Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum* 54: 677-683.
- [24] Várallyai Gy (1989) Szikesedési folyamatok a Kárpát-medencében. *Agrokémia és Talajtan* 48: 399-418.
- [25] Vranová E, Inze D and Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236
- [26] Zhou Y-K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-72.