



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

37. OTDK Biológia Szekció

AZ α -PINÉN ÉS AZ ETILÉN KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PARADICSOM NÖVÉNYEK VÉDEKEZÉSE SORÁN

Kovács Klára Terézia

biológia III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Poór Péter, Dr. Czékus Zalán

egyetemi docens, tudományos munkatárs

Tartalmi összefoglaló

A kulcsfontosságú illékony szerves vegyületek közül az α -pinénről bizonyították, hogy szabályozza (SA) által indukált növényi védekezési válaszok kialakulását. Mivel a SA a növényi stresszhormonok hálózatába ágyazottan fejti ki hatását, megvizsgáltuk, a szintén gáz halmazállapotú etilénnel (ET) kölcsönhat-e az α -pinén? Továbbá, hogy a különböző hosszúságú α -pinén előkezelés hogyan hat a vad-típusú (*Solanum lycopersicum* L. Ailsa Craig) és az ET-receptor mutáns (*Never ripe*, *Nr*) paradicsomnövényekben, és ez az előkezelés hogyan befolyásolja a *Botrytis cinerea* és *Pseudomonas syringae* fertőzés kimenetelét a két genotípus levelében? Méréseink során 24-48-72 óráig kezeltük az intakt paradicsom növényeket az α -pinénnel, melynek hatására már 24 órára szignifikáns H_2O_2 szintnövekedést kaptunk. A reaktív oxigénformák közül a szuperoxid-produkció szintén fokozódott a 72 órás α -pinén kezelés hatására. A főbb antioxidáns enzimek közül a szuperoxid-dizmutáz aktivitása megemelkedett az *Nr* levelekben, míg a H_2O_2 -ot elbontó kataláz enzim aktivitása lecsökkent 72 óra elteltével mindkét genotípusban. Míg az aszkorbát-peroxidáz enzimaktivitása nem változott szignifikánsan, addig a gvajakol-peroxidázé fokozatosan nőtt a három nap alatt. Az alkalmazott α -pinén koncentráció nem befolyásolta a levelek életképességét sem az ionkieresztés, sem a malondialdehid mérés alapján. RT-qPCR technikával megvizsgáltuk a védekezésben szerepet játszó főbb védekezési hormonok válaszgénjeinek transzkript szintjeit. Az ET markergén *ERF1* expressziója szignifikánsan magasabb szinteket mutatott a kezelés első két napjában, mely azonban nem függött az aktív ET jelátviteltől. Ezzel szemben a SA markergén *PR1* expressziós szintje az α -pinén hatására a vad-típusú növények levelében már 24 h elteltével négyszeresére növekedett, míg az *Nr* növényekben szintje nem változott jelentősen. A jázmonsav markergén *DEF1* transzkript szintje szignifikánsan megnőtt mindhárom időpontban, és magasabb volt az *Nr*, mint a vad-típusú növények leveleiben, utalva az ET szerepére az α -pinén által indukált védekezési folyamatokban. Végül az α -pinén előkezelés *Botrytis cinerea* és *Pseudomonas syringae* fertőzésekre gyakorolt hatását Evan's blue festéssel követtük nyomon, összehasonlítva a nekrotikus léziók területét a vad-típusú és *Nr* növényekben, ahol csökkent az elhalt területek mérete az α -pinén előkezelést követően. Összességében megállapíthatjuk, hogy az α -pinén előkezelés kismértékű oxidatív stresszt okozott a paradicsom növények leveleiben és aktiválta a védekezési hormonok jelátvitelét, mely eltérően alakult az aktív ET jelátvitel hiányában.

Kulcsszavak: α -pinén, etilén, patogének, reaktív oxigénformák, VOC

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	4
1.1. A biotikus stressz.....	4
1.2. A növények védekezésének főbb folyamatai.....	5
1.3. Az illékony szerves vegyületek (VOC) szerepe a növények védekezésben.....	8
1.4. Az α -pinén.....	10
1.5. A monoterpének és az etilén kapcsolata	12
2. Célkitűzések.....	13
3. Anyagok és módszerek	14
3.1. Növénynevelési körülmények	14
3.2. Az α -pinén előkezelés és a fertőzés menete	14
3.3. A sztómazáródás vizsgálata.....	15
3.4. A reaktív oxigénformák (ROS) produkciójának vizsgálata.....	15
3.5. A főbb antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata	16
3.6. A redukált aszkorbát (AsA) és glutation (GSH) tartalom meghatározása	16
3.7. A nitrogén-monoxid (NO) produkció meghatározása	17
3.8. Génexpressziós vizsgálatok.....	17
3.9. A lipidperoxidáció meghatározása	19
3.10. Az életképesség meghatározása az ionkieresztés (EL) mérése alapján	19
3.11. A sejthalál detekciója	19
3.12. Az adatok statisztikai kiértékelése.....	20
4.1. Az α -pinén előkezelés növényekre gyakorolt hatása.....	20
4.2. Az α -pinén előkezelés mikrobiális kórokozókra gyakorolt hatása	26
6. Irodalomjegyzék.....	32
7. Köszönetnyilvánítás	37

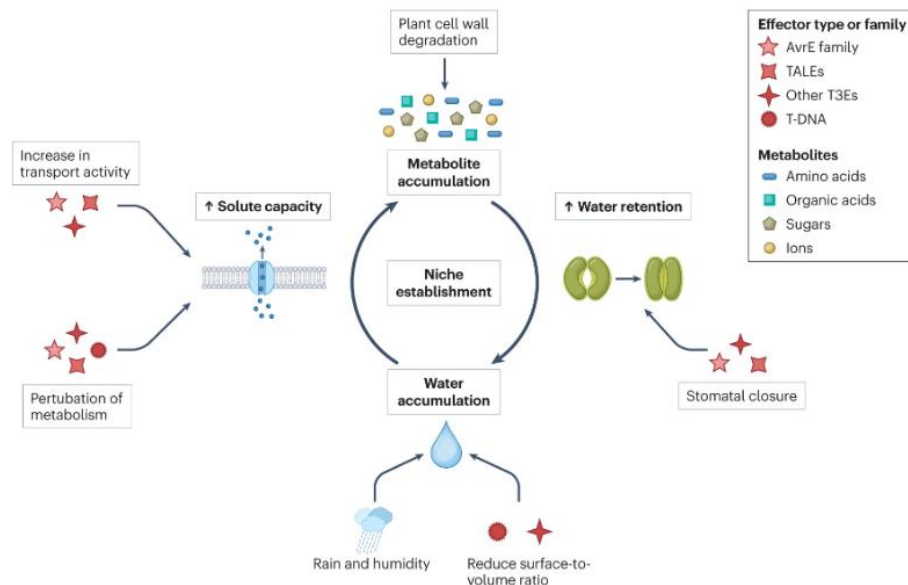
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A biotikus stressz

A növények belső homeosztázisát folyamatosan veszélyezteti a dinamikusan változó környezetből érkező számtalan inger (Lamers és mtsai. 2020). Az élettelen környezet szuboptimális paraméterei mellett a közeli élőlények is folyamatos kihívások elé állítják a növényeket, mely a védekezésük különböző molekulákkal történő gyors és hatékony aktivációját igényli (Atkinson és Urwin, 2012). Ezek a veszélyforrások például az erőforrásokért folyó küzdelemben vagy éppen potenciális táplálék gyanánt megtámadhatják és parazitálhatják a növényeket. Az egyensúlyt felborító biotikus faktorok lehetnek szomszédos kompetitor növényfajok és paraziták, herbivór gerincesek és gerinctelenek vagy mikrobiális és virális patogének. Ugyanakkor a mikrobiális patogének elleni védekezés fontos feltétele, hogy ne aktiválódjon szimbionta fajokkal szemben. (Zipfel és Oldroyd, 2017).

A behatoló mikrobiális patogének már a sejtfelszínre jutva, az extracelluláris térben számtalan élettani és anyagcsere folyamatot átalakíthatnak a növényekben, ami káros lehet a növények számára, de növeli a patogének behatolási esélyeit. Többek között effektorok segítségével érik el a sejtfal vízpotenciáljának emelkedését, az apoplasztban az anyagcseretermékek koncentrációjának növekedését és a sejtfal komponensek lebontását (Pfeilmeier és mtsai. 2016; Roussin-Léveillé és mtsai. 2024). (1. ábra) A sejtekbe juttatva az effektorok és fungális fitotoxinok megváltoztathatják a növényekben az anyagcserét, a különböző jelátviteli utakat, az anyagtranszportot, az RNS transzportot és átírást, egyes fehérjék stabilitását és konformációját (He és mtsai. 2020). Ugyanakkor csak addig zajlanak kontrollálatlanul ezek a fitnesscsökkentő folyamatok, ameddig a növényi gazdasejtek fel nem ismerik a behatolót. A receptoros (pl. leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptor-szerű kinázok, RLK) felismerést szignáltranszdukciós folyamatok követik, és elsőik között aktiválódik a MAPK-kaszád, valamint nő meg a citoplazmatikus szabad Ca^{2+} szint, ami indukálja az ilyenkor elengedhetetlen sztómazáródást, meggátolva további patogének bejutását. Továbbá fokozza a védekezési hormonok (pl. szalicilsav, jázmonsav, etilén) szintézisét, a reaktív oxigénformák (ROS) keletkezését, a védekezésben szerepet játszó gének aktivitását (pl. patogenezissel kapcsolatos PR gének), a sejtfal megerősítését, vagy éppen a hiperszenzitív válaszreakciót (HR) (Meng és mtsai. 2013; Saijo és Loo, 2020). (3. ábra) Csakhogy a védekezés is jelentős költségekkel jár, elkerülni, hogy a fitness rovására menjen, feltételezi a nem effektív védekezési mechanizmusok hatékony inaktiválódását (He és mtsai.

2022). Ez a folyamat szabályozottan zajlik, különböző szinteket létrehozva a növények védekezésében (Pieterse és mtsai. 2012). (2.ábra)



1. ábra: A patogének kolonizációját támogató pozitív visszacsatolós folyamatok a sejtfelszínen: a sejtfal a lezajló folyamatok kapcsán gyorsan egy vízben és tápanyagban gazdag környezeté válik a baktériumok számára (Roussin-Léveillé, 2024).

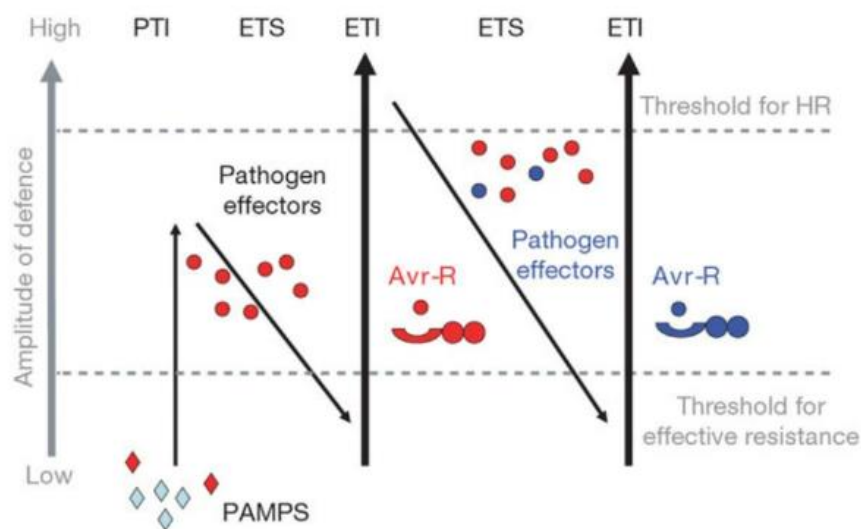
1.2. A növények védekezésének főbb folyamatai

A növényi védekezés összetettségét magyarázza a patogének különböző támadási stratégiája. A növényi kártevőket az életmódjuk alapján több csoportba sorolhatók. A nekrotróf patogének elpusztítják a növényi sejtet, és a maradványaikat felhasználva terjednek. Ezzel szemben a biotróf patogének az élő sejteket parazitálják és használják a növekedésükhöz és terjedésükhöz (Gazelbrook, 2005). Ennek a felismerése a sejt részéről kulcsfontosságú, mert a nem megfelelően aktivált védekezési mechanizmusok fokozhatnák a támadó sikerességét. A programozott sejthalál (PCD) példáján: míg a szalicilsav (SA)-függő védekezés és az indukált HR hatékony lehet elsősorban a biotróf patogénekkal szemben, addig a védekezés következtében elhalt sejtek egy nekrotróf patogén számára kedvező feltételeket biztosítanak a gyors tovább terjedéshez (Kliebenstein és Rowe, 2008). A nekrotróf patogénekkal szembeni védekezést elsősorban a jázmonsav (JA) és az etilén (ET) hormon koordinálja (Ghozlan és mtsai. 2020).

Molekuláris szempontból a felismerés sejtenként önállóan, sejtfelszíni patogén felismerő receptorokkal („pathogen recognition receptor”, PRR) történik. Ezek a transzmembrán receptorok a támadók konzervált molekuláinak felismerése után immunválaszt indukálnak a koaktiválódó molekulákon keresztül. A jelátvitel következtében foszforilációs

kaszkádok aktiválódnak, amik végül ROS képződéshez, Ca^{2+} influxhoz és transzkipciós változásokhoz vezetnek (Couto és Zipfel, 2016). A mikrobáktól származó intracelluláris molekulák felismerésben fontos szerepet töltenek be az *R* gének termékei, a nukleotid-kötő/leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptor (NLR) fehérjék. Ezek az intracelluláris receptorok specifikusan ismerik fel a mikrobák effektor molekuláit, és a védekezés újabb szintjét indukálják (Ma és mtsai. 2020). Lúdfű modellnövényben az intracelluláris receptorok önálló aktiválásával bizonyították, hogy a membránba ágyazott és a citoplazmatikus receptorok szoros kölcsönhatásban állnak egymással. Az extracelluláris receptorok a NADPH-oxidázt (RBOH) és protein kinázokat aktiválnak. Az intracelluláris receptorok megnövelik a membránba ágyazott PRR-ok denzitását, így az intracelluláris receptorok által aktivált folyamatokat intenzívebb NADPH-oxidáz aktivitás és fehérje foszforilációs folyamatok kísérik (Ngou és mtsai. 2021). A NLR-ok párbeszédet kezdeményeznek a különböző védekezési válaszokért felelős jelátviteli útvonalak között, hogy a támadó életstílusának legmegfelelőbb védekezési folyamatok játszódjanak le (Jones és Dangl, 2006). A veleszületett („plant innate immunity”) immunitást két ágra bontotta a szakirodalom. A széles körben elfogadott ún. cikk-cakk modellben a kártevők megjelenését követően a támadók evolúciósan konzervált molekuláit a sejtfelszíni PRR receptorokkal észleli a növény, ami mintázat-felismerő immunitást („pathogen related molecular pattern triggered immunity”, PTI) indukál és sikeresen visszavetheti a fertőzés terjedését. (2. ábra) A PRR-ok lehetnek kinázok, vagy kináz doménnel nem rendelkező fehérjék. Utóbbi esetben a receptornak a jel továbbításához adaptor molekulára (pl.: SOBIR) van szüksége. (2. ábra) A ligand kötést követően a receptorok citoplazmatikus kinázokat toboroznak (pl.: BAK1, CERK1), komplexet képeznek, és kölcsönösen foszforilálják egymást. (3. ábra) Ennek eredményeként lokálisan ROS keletkezik, a citoplazmába szabad Ca^{2+} áramlik be, bezáródnak a sztómák, aktiválódik a MAPK-kaszkád és a védekezési hormonok szintetizálódnak (Yuan és mtsai. 2021). A cikk-cakk modell szerint a védekezés második fázisban a PTI-t szabotáló patogének effektorokat juttatnak az apoplastba vagy a citoplazmába, a baktériumok elsősorban a III-as típusú szekréciós rendszereken keresztül (Thomma és mtsai. 2011; Alfrano és mtsai. 2004). Ezt a fajta időszakos felülkerekedést effektor-indukált fogékonyságnak nevezzük (Naveed és mtsai. 2020). A harmadik fázisban a bejutott effektort sikeresen felismerik az NLR fehérjék, és az ellenálló növényekben effektor indukált immunválaszt („effector triggered immunity”, ETI) indukálnak (Nguyen és mtsai. 2021). Az *R* gének termékei robosztus válasszal reagálnak a támadók jelenlétére: gyors ROS produkció indukálódik, SA keletkezik és halmozódik fel és HR játszódik le a megfertőzött sejtekben és a védekezésben szerepet játszó gének aktivitása

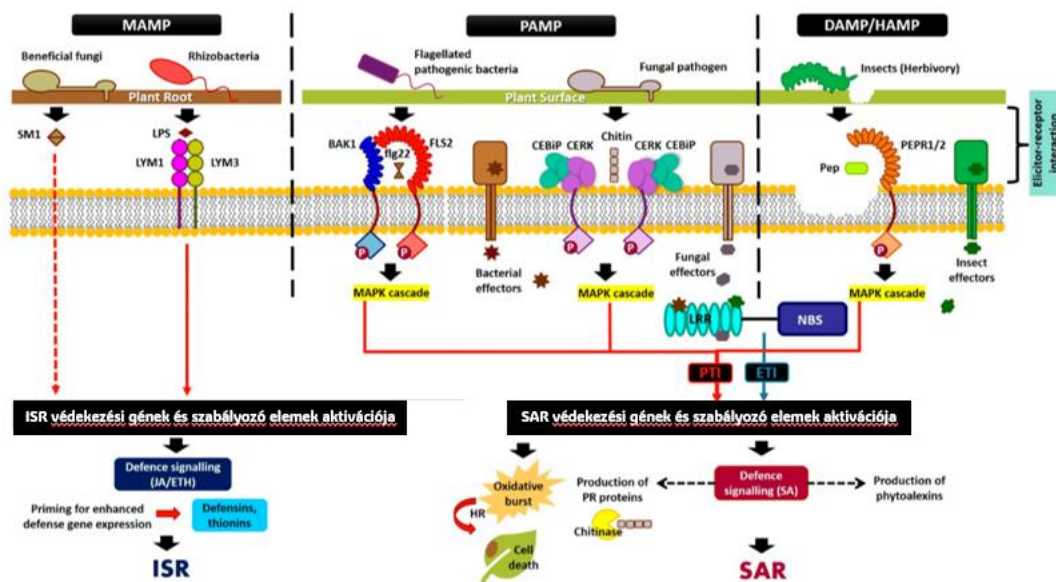
jelentősen megváltozik (Wu és mtsai. 2014). Újabb eredmények szerint, a PTI és ETI élesen nem elválasztható egymástól, sőt, akár egy egységnek is tekinthetők, mert azonos szignalizációs útvonalakat aktiválnak, a szabályozott transzkripciós faktorok és gének nagyban átfednek egymással, ligandjaik (az evolúciósan konzervált elicitorok és az effektorok) nem választhatóak el élesen egymástól, és hiánytalan kifejeződésük kölcsönösen a másik immunválasz szabályozásán is múlik. Az ETI felerősíti a PTI-t a PRR receptorok denzitásának növelésével, míg az ETI kialakulásához nélkülözhetetlenek a PTI mechanizmusai (Thordal-Christensen, 2020; Yuan és mtsai. 2021; Tena, 2021).



2. ábra: A védekezés cikk-cakk modellje: a patogének konzervált evolúciós minázatainak felismerésén alapuló immunválaszt az effektorok megjelenését követően az intenzívebb effektor felismerő immunválasz aktiválódik. A változatos effektorok a védekezés újabb és újabb hullámaint aktiválják, és a folyamat velejárója a hiperszenzitív válaszreakció (HR), a programozott sejthalál speciális típusa (Sharma és mtsai. 2019).

A lokális védekezési mechanizmusok a teljes növényre kiterjedő védettséghez, az ún. szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) kialakulásához vezethetnek (Vlot és mtsai. 2020). A PTI és ETI folyamán is átmeneti SA felhalmozódás történik, és a SA-markergén *PATHOGENESIS-RELATED1* (*PR1*) aktivitása fokozódik a nem fertőzött, távolabbi szövetekben (Spoel és Dong, 2012). A patogén támadást elszenvedett sejtekben az emelkedett koncentrációban jelenlévő SA a NPR3 sejtmagi receptorhoz köt, majd az NPR1-et is aktiválva a NPR3/NPR1 komplex beindítja a sejthalál folyamatait. Az ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 (*EDS1*) a SAR másik kulcsmolekulája. Több különböző jelátviteli útvonal csomópontja, transzkripciós faktorként szabályozza a *PR1* kifejeződését (Kuai és mtsai. 2015). A nem SA-függő SAR kialakulásához pipékolinsavra (Pip) és biológiailag aktív származékára a N-hidroxi-pipékolinsavra (NHP) is szükség van (Zeier, 2021). (5. ábra) A gyökerek mikrobiális kolonizációját követően ún. indukált szisztémikus rezisztencia (ISR)

alakulhat ki, amit a JA és ET szintje is modulál (Yu és mtsai. 2022). A SAR és az ISR a veleszületett immunitás részeként kialakuló, szervezet-szintű növényi védekezés ismert formái (Kamle, 2020). (3. ábra) A távoli szövetek sejtjeihez számtalan szignálúton keresztül jut el az információ. Specifikus nagy hatótávolságú SAR szignálnak bizonyult a AZI1/EARLY1, a monoterpének és a LEGUMINE LIKE PROTEIN1 (LLP1) molekula. A floémában transzportálódik a glicerín-3-foszfát (G3P) és származékai, a DIR1/DIR1-like proteinek (Vlot és mtsai. 2020). (6. ábra) A monoterpének, a metil-jazmonát és metil-szalicilsav (MeSA) légnemű molekulák, a növényi sejtekből felszabadulva gyorsan képesek a stressz-szignált a megtámadott növényi egyed távoli pontjára juttatni és védekezést indukálni. (Sah és mtsai. 2013; Vlot és mtsai. 2020)



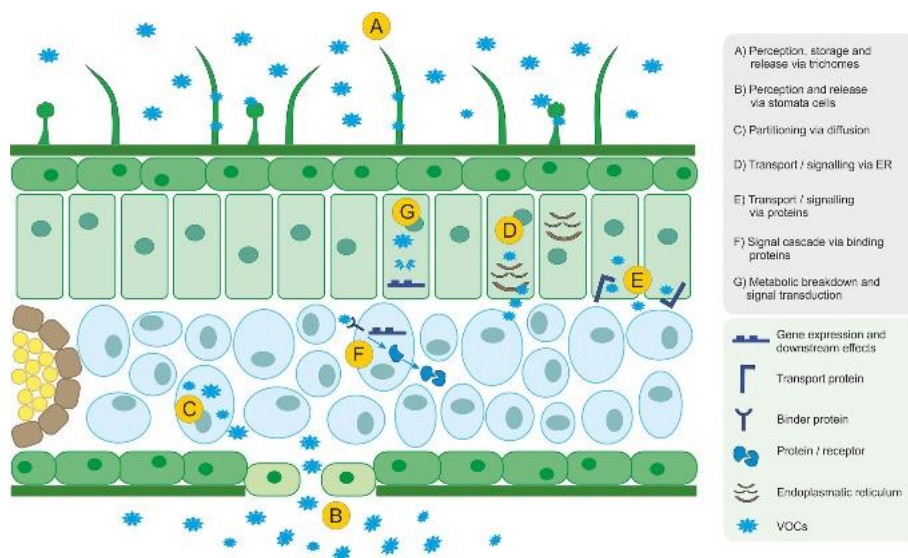
3. ábra: A mintázatfeismerő (PTI) és effektor felismerő (ETI) immunitás, és a távoli szövetekben kialakuló szisztémikus szerzett (SAR) és indukált (ISR) rezisztencia bemutatása az elicitor-receptor modellen keresztül, például: kitin-elicitor-kötő fehérje/kitin-elicitor receptor kináz (CEBIP/CERK), kitin, FLAGELLIN SENSITIVE2/BRI1-asszociált kináz (FLS2/BAK1), flg22, PEP receptor 1/2 (PEPR1/2), peptidek (Pep), lizin motívum 1/2 fehérje (LYM1/LYM2), LPS és hidrofobin-szerű kiváltó (SM1) (Malik és mtsai. 2020)..

1.3. Az illékony szerves vegyületek (VOC) szerepe a növények védekezésben

Az illékony szerves vegyületek (volatile organic compounds/VOC) másodlagos anyagcseretermékek, melyek több ezer típusát mutatták ki a növényekből (Abbas és mtsai. 2022). A VOC-ek felszabadulhatnak konstitutívan, szervenként eltérő összetételben is (Junker és mtsai. 2011). Ezek speciális információ többlettel bírnak, a megváltozott környezet miatt átalakul a növények VOC profilja (Ninkovic és mtsai. 2021). Hogy ezt az információ többletet is a termelés és a termés minőségének fokozására használhassák, többféle mezőgazdasági szenzort fejlesztettek, amit aztán hagyományos vagy AI-vezérelt adatelemzés követ. (Molinari

és mtsai. 2025) A technológiai potenciál a nagy mennyiségű VOC adat megértésén át a precíziós növényvédelem és a természetvédelmi károkozás mérséklésében rejlik. (Ye és mtsai. 2025)

VOC szignálok elsősorban az epidermiszben keletkeznek, ahonnan könnyen diffundálnak a légkörbe, nagyobb mennyiségben felhalmozódva pedig mirigyszőrőkben, és tárolóképletekben raktározódhatnak, mivel a citoplazmában akár toxikusak is lehetnek (Dudareva és mtsai. 2004). (4. ábra) Az apoláris molekulák elsősorban a sztómákon keresztül jutnak be a mélyebb szövetekbe és membrán feszültség-változást okoznak, az ionáramokban bekövetkezett változások pedig gyors alkalmazkodást biztosítanak a VOC felszabadulást kiváltó stresszel szemben (Yamane és Tani, 2024). Mivel a sejtkárosodás indikátoraként is felszabadulhatnak bizonyos VOC-ek, ezért a jelenlegi nézet szerint nagy hatótávolságú károsodáshoz-kötött molekuláris mintázatként tekint rájuk a szakirodalom (Meents és Minthöfer, 2020; Ninkovic és mtsai. 2021). Ezzel szemben, több, mint 30 VOC-ról kimutatták, hogy a jelátviteli utak közvetítő molekuláiként is viselkedhetnek, nem pedig független szignálként (Brosset és Blonde, 2022). A stressz szignálok kibocsátásának a célja a receptorokon keresztül a teljes szervezet felkészítése a védekezésre, a sejtek megfelelő „priming”-jén keresztül (Erb, 2019; Li és mtsai. 2020.). A biotikus stressz különböző típusai, például a herbivórok rágása nyomán vagy egy-egy vírusfertőzés során egyedi összetételű VOC keverék szabadul fel (Rosenkranz és mtsai. 2021). A mikroba indukált növényi illékony vegyületek (MIPV) összetételét befolyásolja a mikroba taxonómiai hovatartozása, a növény fajtája és a növény-mikroba interakció jellege (Sharifi és mtsai. 2018). A MIPV kémiai összetétele terpénekből, N-tartalmú molekulákból, aromás vegyületekből és zsírsav származékokból áll a legnagyobb mennyiségben (Hammerbacher, 2019).



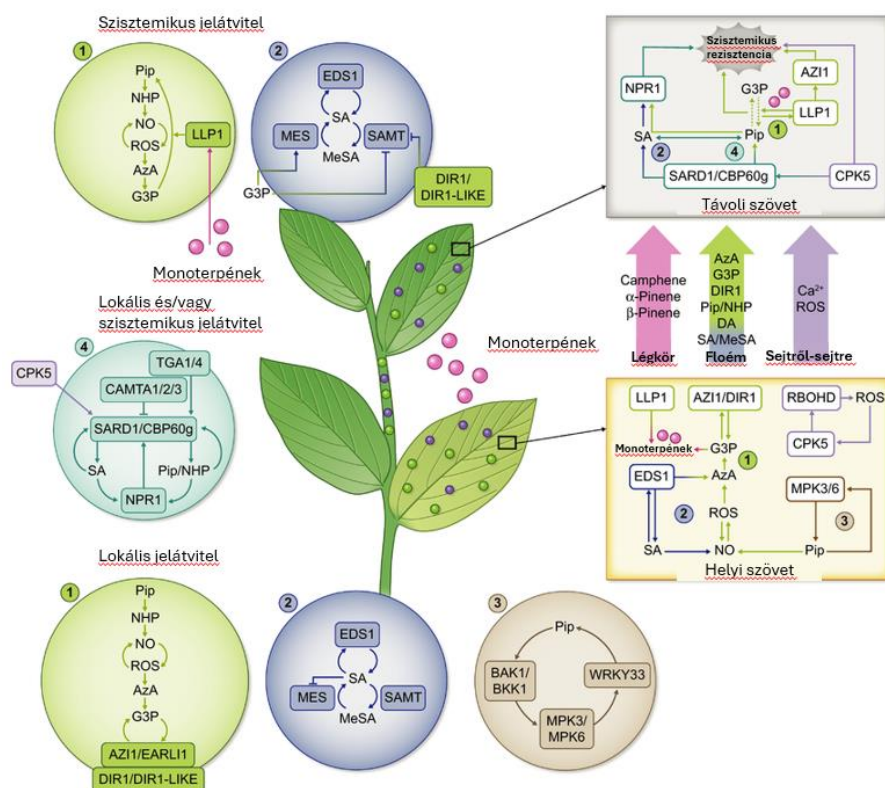
4. ábra: A VOC szignálok érzékelésének mechanizmusai a levelekben: A) a VOC-ek tárolása mirigyszőrökben B) VOC felvétel és felszabadulás a gázcsere nyílásokon keresztül C) a VOC-ek kétirányú szállítása diffúzióval D) lipofil szállítás az ER-on keresztül, a sejtfallal közvetlen kapcsolatban E) VOC szállítás specifikus transzport fehérjékkel F) receptoros érzékelés, jelátvitel és genexpressziós változások (Ninkovic és mtsai. 2020).

A filloszféra évente több, mint 1000 Tg/év terpéntermeléssel járul hozzá a globális VOC kibocsátáshoz, izoprénből, monoterpénből és metanolból szabadul fel a legtöbb (Guenther és mtsai. 1995). A terpének közé a szeszkviterpének, diterpének és monoterpének tartoznak. A mevalonát vagy metil-erithritol-foszfát útvonalhoz tartozó terpén szintázoknak konstitutív és indukálható termelést mutató izoformáik is vannak a levelekben (Junker és Tholl, 2013). A JA a VOC-ok szintézisének egyik fő szabályozója (Arimura és Perase, 2017), hatását a biotróf patogének képesek elnyomni a SA-útvonalon *PR1* génjének fokozott expressziójával (Sharifi és mtsai. 2018). Leírták, hogy a stressz-indukált monoterpéneket érzékelő növényekben SA-függő SAR indukálódott (Weing és mtsai. 2019). A folyamat kulcsszabályozója a LLP1 molekula, ami képes a környezetből származó monoterpén jelet átalakítani és az AZEALIC ACID INDUCED1 (AZI1) fehérjére hatva immunválaszt generálni. Központi jelentősége van a Pip-nek, ami befolyásolja a nitrogén-monoxid (NO) és a H₂O₂ szintjét, és a hasonló szerepű G3P-t, a nyomán keletkező AzA-val. A Pip és G3P pozitív visszacsatolással serkentik a SAR indukciót, kölcsönösen emelik egymás koncentrációját és fokozzák a monoterpén felszabadulást a patogéntámadás helyén. (5. ábra) A monoterpének között felszabaduló α - és β -pinén a támadás helye és a szisztémikus szövetek közötti köztes szignál. Lúdfű SA és SAR szabályozó ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 (EDS1) fehérje hiányos mutánsban a monoterpén szintézis gátolt (Riedelmeier és mtsai. 2017). Az LLP mutáns *llp1-1* és *RNAi:LLP1-3* mutáns vonalak fertőzött vad típusú (VT) növények VOC-eivel indukálva nem mutattak *PR1* expressziós növekedést, ahogy az *llp1-1* fertőzött növények által kibocsátott VOC keverékkel sem lehetett hasonló hatást elérni VT növényeken, holott fertőzött VT VOC-ek SAR indukciót idéztek elő a VT célnövényekben. A monoterpének a SAR indukálása mellett a veszületett immunválasz előkészítését is kiváltják a szomszédos növényekben is. A mikróba támadás hatására keletkező Pip és G3P pozitívan szabályozzák egymás koncentrációit, és közvetlenül hatnak a monoterpének szintézisére. A monoterpének közvetítte ellenállást a LLP1 közvetíti az AZI1 fehérje felé, ami SA-függő mechanizmusokon keresztül indukál védekezési válaszokat a sejtben (Weing és mtsai. 2019).

1.4. Az α -pinén

Az α -pinén biciklikus szénhidrogén, monoterpén molekula, a növényekben megtalálható mindkét (+, -) enantiomere. Tisztán színtelen, vízben oldhatatlan, jellegzetes illatú, etanolban és olajokban oldódó illékony folyadék, forráspontja 163-166°C. Számos izomere létezik, például a β - és δ -pinén (da Silva és mtsai. 2012). A növényekben az α -pinén bioszintézise két izoprén egység (C₅) fej-farok kondenzációjával megy végbe, a dimetil-allil-pirofoszfát (DMAPP) és az izopentenil-pirofoszfát (IPP) összekapcsolódásával geranil-pirofoszfát (C₁₀) keletkezik. Az α -pinénné történő ciklizálást a pinén-szintáz enzim katalizálja (Saria és mtsai. 2014). Jelentős forrásai a HPLC és GC-MS vizsgálatok alapján 60%-ot is meghaladó α -pinén

tartalommal rendelkezhetnek a magas illóolaj tartalmú növények, például számos gyógynövény, a fenyőfélék és citrusfélék (Rguez és mtsai. 2024)



5. ábra: A monoterpének útja és jelátvittele a fertőzés helyétől a disztális szövetekig: A monoterpének szignálúzában kulcsfontosságú a LLP1 molekula, a G3P és a Pip pozitív visszacsatolási jelátviteli útnak mindkettő kulcsmolekulája (Vlot és mtsai. 2020).

Az α -pinén többek között a herbivórok ellen az egyik legfontosabb szignálmolekula, HAMP-ként régóta számontartják, ugyanakkor rovar-csalogató képessége is ismert (Elzen és mtsai. 1983). Emellett azonban fontos antimikrobiális, antifungális és antivirális tulajdonságú anyag is. Az antimikrobiális érvényesülése foszfolipáz- és észterázgátló hatásán alapul. A különböző enantiomer koncentrációk különböző hatékonyságú antimikrobiális hatással rendelkeznek. A természetes, tiszta α -pinén enantiomer elegyek hasonló vagy magasabb koncentrációban tartalmazzák a (+), mint a (-) enantiomert is (Ložienė és mtsai. 2018).

Riedlmeier és mtsai. (2017) elsőként írták le, hogy az α - és β -pinén kezelés után szisztémikus növényi immunválasz alakul ki lúdfű növényekben. A kezelést követően a ROS produkció jelentősen megemelkedett, növekedett a SA koncentráció, és fokozódott a SA és SAR-hoz köthető gének aktivitása, mint például az *AZI1* és a *PR1*. Wenig és mtsai. (2019) (5. ábra) Később leírták, hogy az 1:1 arányú α - és β -pinén kezelés hatékonynak bizonyult a *Pseudomonas syringae* ptv. *Tomato* baktérium törzs fertőzése ellen. Mind a Pip kezelés, mind

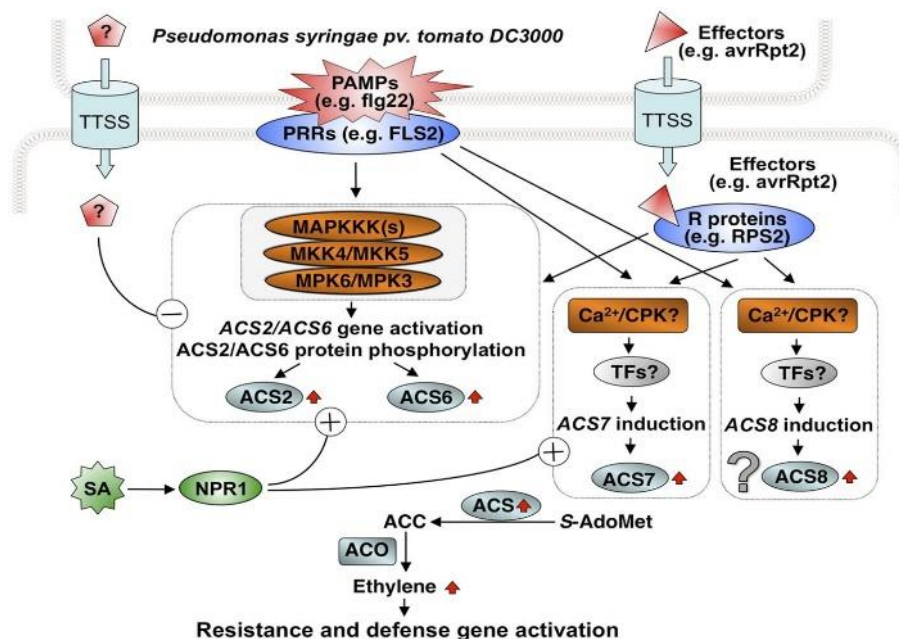
a pinén kezelés hatása a SAR kialakítására elmaradt az *llp1-1* mutánsokban, ami arra enged következtetni, hogy a pinén és a Pip párhuzamos, vagy azonos jelátviteli utakon indukálja a SAR-t (Wenig és mtsai. 2019).

Az α -pinén szerepe a védekezés során, és kapcsolata a stresszválaszokat szabályozó más növényi hormonokkal azonban még nem kellően ismert. Az ETI folyamán α - és β -pinén keletkezik és a SAR kiváltásában pedig elengedhetetlennek bizonyultak (Weing és mtsai. 2019). Kezdetben a SAR kialakítás hosszú távú jelének a SA-t tartották számon, mivel koncentrációja az indukált védekezésnél a floémában jelentősen megnövekedett (Uknes és mtsai. 1992) Majd levéllevélasztásos kísérletekben kimutatták, hogy SA nem a jeltovábbításához szükséges, hanem a távoli, nem fertőzött szövetekben a priming során játszik szerepet (Rasmussen és mtsai. 1991). Lokálisan a fertőzés helyén monoterpének keletkeznek, és a receptorként viselkedő LLP1 percepciója után a SA jelátviteli útvonalon aktiválnak SA-függő SAR-t. A nem SA-függő SAR útvonalat a Pip szabályozza, a két típus viszont összekapcsolódik a SARD1/CBP60g fehérjéken keresztül és pozitív visszacsatolással erősítik egymást a szisztémikus válaszok. A fertőzött növényi szövetekben geranil-foszfát prekursorból pinén és kamfén szabadul fel, az LLP1 pozitív visszacsatolással válaszol a monoterpén szignálra: emeli a Pip és a G3P koncentrációit is, ami hosszú távon még több VOC keletkezését eredményezi (Vlot és mtsai. 2021). A pinén jelátvitel fontosabb komponenseinek pótolhatatlanságát Riedelmeier és mtsai. (2019) bizonyították *gly1-3*, *ald1*, és *llp1-1* lúdfű mutánsokkal, ahol mindegyik genotípusban sérült a (+)- α -pinén kibocsátás. Ugyanakkor más védekezéssel kapcsolatos hormonok (pl. etilén) szerepe és kapcsolata a monoterpének szintézisével és jelátvitelével, kevésbé kutatott maradt.

1.5. A monoterpének és az etilén kapcsolata

A szintén gáz halmazállapotú etilén (ET) az egyik legfontosabb stresszhormon a növényi szervezetekben, a védekezésben betöltött szerepe mellett kulcsfontosságú a növekedési és fejlődési folyamatokban játszott szerepe is (Wang és mtsai. 2013). Gyors felszabadulását korábbi kutatások egyértelműen összefüggésbe hozzák a patogéntámadást követő nekrotikus léziók méretével és a hervadással (Elad és mtsai. 1990). Lokálisan a fertőzést övező ép sejtekben az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav-szintetáz (ACS) és ACC-oxidáz (ACO) ET szintézisben szerepet játszó enzimek aktivitása fokozódik, ami a patogén támadásban betöltött jelentőségére utal. Az ET inszenzitív (*Never ripe*, *Nr*) mutáns növényekben még kifejezettebb

ez a hatás, mivel ET- érzékelés hiányában az autoinhibíció elmarad (Lund és mtsai. 1998). Hagyományosan az ET a nekrotróf patogénekkal szembeni növényi ellenállás ágáért felelős a JA-val együtt (Shu és mtsai. 2024). Hatása a biotrófokkal szemben hatékony SA-asszociált védekezési folyamatokkal általában ellentétes (Jones és Dangl, 2006).



7. ábra: A *Pst*-indukált etilén bioszintézisének szabályozását ábrázoló modell lúdfüben: PTI, EDS, ETI, és SA priming követi egymást, aminek függvényében MAPK és Ca^{2+} -dependens módon aktiválódnak a részt vevő 1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintetáz (ACS) izoformák (Guan és mtsai. 2015).

Kísérleteink során célul tűztük ki az α -pinén növényi ellenállóképességet fokozó és védekezői válaszokat indukáló hatásának optimalizációját paradicsom növényeken. Ennek érdekében

különböző időpontokban (24, 48 és 72 óra elteltével) vizsgáltuk meg az α -pinén kezelés fiziológiás és molekuláris hatásait. Az α -pinén szerepe a növényi stresszhormonokkal kapcsolatban még nem teljesen tisztázott, ezért kísérleteink középpontjában az állt, hogy kiderítsük, a szintén légnemű ET védekezési hormon szerepet játszik-e és ha igen hogyan az α -pinén indukált védekezési folyamatok sikerességében? Kísérleteinkhez éppen ezért a VT paradicsom növények mellett ET-receptor mutáns *Never ripe (Nr)* paradicsom növényeket is felhasználtunk. Az α -pinén növényekre gyakorolt hatása kapcsán azt vizsgáltuk, milyen hatással van a ROS produkciójára és metabolizmusukban szerepet játszó főbb antioxidáns enzimekre és nem-antioxidánsokra és mindez hogyan függhet az ET-től? Hogyan befolyásolja a levelek NO produkcióját? Az α -pinén hatására vajon az ET-től függően indukálódnak-e, és hogyan más, védekezésben szerepet játszó hormonok válaszgénjei? Az α -pinén kezelés hatással van-e a növények alap fiziológiai folyamataira és életképességére? Végül az α -pinén előkezelés hatékony-e és függ-e az ET-től a *Botrytis cinerea* gomba és a *Pseudomonas syringae* pv. tomato baktérium fertőzéssel szemben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Növénynevelési körülmények

Vad típusú *Solanum lycopersicum* L. cv. Ailsa Craig és ET receptor mutáns *Never ripe (Nr)* paradicsom növényeket használtunk a kísérleteink során. 3 napos csíráztatás után 26°C-on, sötétben, a kikelt növényeket 2 hétre perlitbe, majd hidropónikus kultúrába helyeztük át. A tápoldat 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 0,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM KCl, mikroelemek (0,001 mM MnSO_4 , 0,005 mM ZnSO_4 , 0,0001 mM CuSO_4 , 0,0001 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,01 mM H_3BO_4) és 0,02 mM Fe (III)-EDTA pH 5,8 tartalmú volt (Poór és mtsai., 2011), melyet hetente kétszer cseréltük. A növényeket szabályozott körülmények között, 12 órás nappali/12 órás éjszakai periódus, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitás (fehér LED, 5700 K) megvilágítás, 24/22°C nappali/éjszakai hőmérséklet és 55-60%-os relatív páratartalom mellett neveltük.

3.2. Az α -pinén előkezelés és a fertőzés menete

A kezelés idejére 5 hetes fiatal, 3-4 kifejlett levélemelettel rendelkező növényeket átlátszó falú műanyag dobozba helyeztünk, és a növények között elhelyezett szűrőpapírra hexánban oldott 0,6 $\mu\text{mol/}$ 2,6 ppm mennyiségű (+)- α -pinén (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatot csepegtettünk 3 ml végtérfogatban (Riedlmeier és mtsai. 2017). A kontroll növényeket 3 ml

hexánnal kezeltük. A dobozt légmentesen lezártuk, a kezelést 24 h-ként 3 napig megismételtük. A kezelés minden nap 9 órakor történt, egyforma ideig tartó szellőztetés mellett.

A 72 órás α -pinén előkezelést követően teljesen kifejlődött leveleket levágtunk és *Botrytis cinerea* gombával fertőztünk illetve más esetben az intakt növényeken a kifejlett leveleket *Pseudomonas syringae* ptv. Tomato baktériummal fertőztünk, a fonák felőli oldalon a baktériumkultúrába mártva.

3.3. A sztómazáródás vizsgálata

A mintavétel időpontjában az epidermiszt csipesz segítségével nyúztuk le a levelek abaxiális felszínéről. A nyúzatokat azonnal műanyag petri csészére cseppentett inkubációs pufferbe (10 mM MES és 10 mM KCl, pH 6,15 TRIS-sel pH-zva) helyeztük (Zhang és mtsai. 2001). A mintákat fedőlemezzel rögzítettük és azonnal megvizsgáltuk fénymikroszkóp (Nikon Eclipse TS-100, Nikon Instruments, Tokió, Japán) alatt (Melotto és mtsai. 2006). A rögtön elkészített fotókon a légrések átmérőjét az Image-Pro Plus 5.1 szoftver (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) segítségével mértük meg. Az azonos időpontban, azonos kezelést kapott 3 különböző növényről származó nyúzatokon 40-60, véletlenszerűen kiválasztott sztóma átmérőjét mértük, és összesen 3 biológiai ismétlést végeztünk (Melotto és mtsai. 2006),.

3.4. A reaktív oxigénformák (ROS) produkciójának vizsgálata

A levelek szuperoxid gyökanion 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 inhibitort tartalmazott. A mintákat ezután lecentrifugáltuk (18890 g, 15 perc, 4°C), majd 300 μ l felülúszót 650 μ l jéghideg 0,1 M nátrium-foszfát puffer (pH 7,2) és 50 μ l 12 mM nitrokék-tetrazólium-kloridot (NBT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó 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 gyökanion produkciót a $\Delta A_{540} = AS - A0$ formula alapján határoztuk meg, majd az eredményeket friss tömegre (FT) vonatkoztatva adtuk meg $\Delta A_{540} \text{ (min}^{-1}\text{gFT}^{-1}\text{)}$ (Chaitanya és Naithani, 1994).

A levelek H_2O_2 szintjeinek meghatározásához 200 mg mintát homogenizáltunk 1 ml jéghideg 0,1% triklórecetsavval (TCA), majd lecentrifugáltuk őket (13400 g, 10 perc, 4°C) és 250 μ l felülúszót felhasználva, 250 μ l 50 mM kálium-foszfát puffer (pH 7,0) és 500 μ l 1 M kálium-jodid oldathoz adtuk őket. Tíz perc sötétben történő inkubációt követően 390 nm hullámhosszon mértük meg a minták abszorbanciáját spektrofotométer (KONTRON, Milánó,

Olaszország) segítségével (Velikova és mtsai. 2000). A H_2O_2 szinteket H_2O_2 oldatból (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) készített hígítási sort felhasználva, standard kalibrációs egyenes alapján határoztuk meg, majd az eredményeket $\mu\text{mol gFT}^{-1}$ formátumban adtuk meg.

3.5. A főbb antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata

A főbb antioxidáns enzimek meghatározásához 200 mg paradicsom levelet homogenizáltunk el jégen 2X500 ml 100mM-os foszfátpufferban (pH 7.0), amely tartalmazott 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF), és 1 % polivinilpolipirrolidont (PVPP), ezután a homogenizátumot lecentrifugáltuk 12000 rpm-en 20 percig, 4°C-on. A felülúszót felhasználtuk fel a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (KAT) és gvajakol peroxidáz (POD) enzimek aktivitásának meghatározására. Az aszkorbát peroxidáz (APX) meghatározásához a homogenizátum készítése 1 mM aszkorbát (AsA) jelenlétében történt. A minták abszorbanciáját spektrofotométerrel (KONTRON, Milánó, Olaszország) detektáltuk (Tari és mtsai. 2015). Az összfehérje tartalmat Bradford (1976) módszere alapján mértük meg.

A SOD (EC 1.15.1.1) aktivitását annak a képességének a segítségével mértük, hogy az enzim gátolja a nitrotetrazólium-kék (NBT) fotokémiai redukcióját, riboflavin jelenlétében fényben. A SOD egy enzimegysége (U) annak az enzim mennyiségnek felel meg, ami 50%-os NBT redukció inhibíciót fejt ki. Az enzimaktivitásokat 560 nm-en mértük és az eredményeket U mg^{-1} fehérjében adtuk meg.

A POD enzimaktivitás (EC 1.11.1.7) mérése során az enzimkivonatot tartalmazó felülúszót 50 mM-os kálium-foszfát puffer (pH 7,0) és 1%-os gvajakolt tartalmazó reakciópufferbe mértük össze (Horváth és mtsai. 2015). A reakció során 1%-os H_2O_2 oldatot adtunk a rendszerhez, majd 1,5 percig mértük a minták abszorbanciáját 470 nm hullámhosszon spektrofotométer segítségével ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A KAT (EC 1.11.1.6) aktivitást a H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) felhasználást figyelve határoztuk meg 240 nm-en 3 percig 25°C-on mérve. Egy CAT enzimegység az az enzimmennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy 1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ -t semlegesítsen.

Az APX (EC 1.11.1.11) aktivitását a csökkenő aszkorbát (AsA) mennyiségéből határoztuk meg 290 nm-en ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 3 percig mérve 25°C-on. Egy APX enzimegység az az enzimmennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy az APX oxidáljon 1 $\mu\text{mol perc}^{-1}$ AsA-t.

3.6. A redukált aszkorbát (AsA) és glutation (GSH) tartalom meghatározása

A főbb nem enzimatisz antioxidánsok méréséhez 250 mg levelet hűtött mozsárban eldörzsöltünk 1 ml 5% (w/v) TCA-val. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (12000 g, 20 perc, 4°C). A teljes AsA méréséhez, 10 mM ditiotreitolt (DTT) adtunk az extraktumhoz, a felesleges

DTT-t pedig 0,5% (w/v) N-etilmaleimid (NEM) hozzáadásával távolítottuk el. Az AsA koncentrációt spektrofotométerrel (KONTRON, Milánó, Olaszország) határoztuk meg 525 nm-en. A reakcióelegy tartalma: 10% (w/v) TCA, 43% (w/v) H₃PO₄, 4% bipiridil, 3% (w/v) FeCl₃ (Tari és mtsai. 2015).

A GSH tartalom meghatározása enzimátikus próba segítségével történt. A reakcióelegy 100 mM foszfátpuffert (pH 7,5), 1 mM 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesavat (DTNB), 1 mM NADPH-t, 1 U GR enzimet (sütőélesztő) és 20 µl sejtkivonatot tartalmazott. A GSH koncentrációt spektrofotométerrel (KONTRON, Milánó, Olaszország) mértük 412 nm-en (Tari és mtsai. 2015).

3.7. A nitrogén-monoxid (NO) produkció meghatározása

A kontroll és (+)- α -pinénnel kezelt növények leveléből 1 cm² levélkorongokat vágunk és 10 µM 4-amino-5-metilamino-2,7-difluor-fluoreszcein-diacetáttal festettük őket (DAF-FM DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mM Tris-HCl pufferben oldva a festéket. (pH 7,4) (Czékus és mtsai. 2020). A festéket vákuum infiltrációval (10 min) juttattuk a sejtekbe. Ezt követően 10 mM Tris-HCl pufferoldattal (pH 7,4) mostuk a mintákat és tárgylemezre helyeztük a korongokat. A DAF-FM fluoreszcencia intenzitását nagy felbontású digitális kamerával (Axiocam HR, Carl Zeiss Inc., Jena) felszerelt Zeiss Axiowert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Inc., Jena, Németország) határoztuk meg a mintákban 10X-es objektívet használva. Az adatokat az AXIOVISION REL. 4.8 szoftverrel elemeztük ki (Carl Zeiss Inc., München, Németország).

3.8. Génexpressziós vizsgálatok

A kontroll és kezelt növények leveleiből történő RNS izolálás (Gallé és mtsai. 2009) első lépéseként a növényi mintákat folyékony nitrogénben, kvarchomok segítségével elporítottunk, majd kb. 100 mg mintához 1 ml TRI reagenst adtunk [1,82 M guanidinium 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 hozzájuk. 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. Az így keletkezett felülúszót 500 µl izopropanolba pipettáztuk át a következő lépés részeként, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. 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 34 µl molekuláris tisztaságú vizet 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 centrifugálását követően (16090 g, 15 perc, 4°C) a felülúszót tovább tisztítottuk 400 µl kloroform segítségével. Ismételt centrifugálást (16090 g, 15 perc, 4°C) követően a felülúszót 550 µl hideg 96%-os etanol és 20 µl 3 M-os Na-acetát elegyében inkubáltuk -20°C-on egy éjszakán át. Az inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltuk (16090 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 mértünk meg.

Egy µg tisztított RNS-t 200 U reverz transzkriptáz (RT) enzimet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) felhasználva, cDNS-t szintetizáltunk. A folyamat során a reakció 4 µl RT reakciós puffert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 0,5 µl random hexamer primert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 1 µl 25 mM-os 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 Primer 3 szoftver segítségével terveztünk primereket (*SIPR1* (Solyc01g106620): F: 5'-CATCCCGAGCACAAACTATG-3', R: 5'-CCCCAGCACCAAGGAATGAAT-3'; *SIDEF1* (Solyc07g007760): R: 5'-GGCACAATCCATTCGTTTCT-3', F: 5'-TTGGTCCCATTTCAGTAGCC-3'; *SIERF1* (Solyc05g051200): F: 5'-GGAACATTTGATACTGCTGAAGA-3', R: 5'-AGAGACCAAGGACCCCTCAT-3'), melyek génspecifitását az NCBI BLAST segítségével ellenőriztük vissza (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). 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 használtunk (Analytik Jena, Jéna, Németország) fel (Takács és mtsai. 2017). A génexpressziós adatok normalizálásához a növényekben mindvégig konstans módon expresszálódó paradicsom *Elongációs faktor 1α* (*SIEF1α*) gént használtuk fel referenciaként. A kontrollhoz képest a kezelések hatására bekövetkező relatív transzkript szintváltozásokat a $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ módszer alapján határoztuk meg (Livak és Schmittgen, 2001).

3.9. A lipidperoxidáció meghatározása

A lipidperoxidáció mérése érdekében meghatároztuk a levelek malondialdehid (MDA) tartalmát (Ederli és mtsai. 1997). 100 mg levélmintát folyékony nitrogénben összetörtünk, majd 1 ml 0,1%-os (w/v) TCA-t és 0,4%-os (w/v) butilezett hidroxitoluolt (BHT) adtunk hozzá, hogy megakadályozzuk a további lipidperoxidációt. Ezt követően a mintákat (12000 g, 20 min, 4°C) centrifugáltuk, majd 500 µl felülúszóhoz 2 ml 20%-os (w/v), 0,5% (w/v) tiobarbitursavat (TBA) tartalmazó TCA-t mértünk, és 30 percig 100 °C-on tartottuk. Ezt követően a mintákat lehűtöttük, és spektrofotométerrel (Kontron, Milano, Olaszország) 600 és 532 nm-en mértük abszorbanciájukat. A teljes MDA-tartalmat $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ moláris extinkciós együtthatóval határoztuk meg, és nmol g(FM)^{-1} -ként jelöltük.

3.10. Az életképesség meghatározása az ionkieresztés (EL) mérése alapján

A levélkorongokat (1 cm^2) 20 ml ultratiszta desztillált vízbe helyeztük, és 2 órán át szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. 2 óra elteltével először vezetőképesség-mérővel (HANNA Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA) határoztuk meg az elektrolit szivárgását (C1), majd a teljes vezetőképességet (C2) is megmértük 95 °C-on 30 percig tartó inkubálás után. Végül meghatároztuk a relatív EL-t $[(C1/C2) \times 100]$ %-ban (Sun és mtsai. 2010).

3.11. A sejthalál detekciója

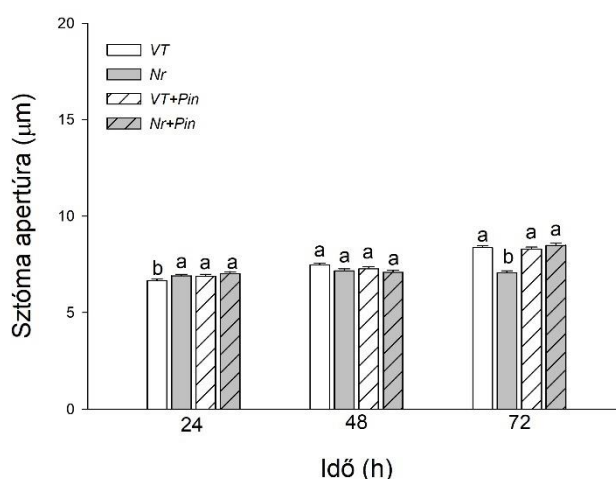
A fertőzött leveleket 1% (w/v) Evan's Blue-val (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) festettük 10 percig, majd desztillált vízzel öblítettük kétszer. Ezután a klorofilltartalmat 96%-os (v/v) etanolban 15 perces forralással eltávolítottuk. A leveleket glicerín:víz:alkohol (4:4:2) oldatban tároltuk, és Canon EOS 700D fényképezőgéppel (Tokió, Japán) fényképeztük. Az elhalt területek meghatározásához ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) szoftvert használtunk fel és az adatokat a területre vonatkozó pixelintenzitásban adtuk meg (Tóth és mtsai. 2020).

3.12. Az adatok statisztikai kiértékelése

Az adatok kiértékeléséhez a Microsoft Excel 2016 és SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) programokat használtuk. **4. Eredmények és értékelésük**

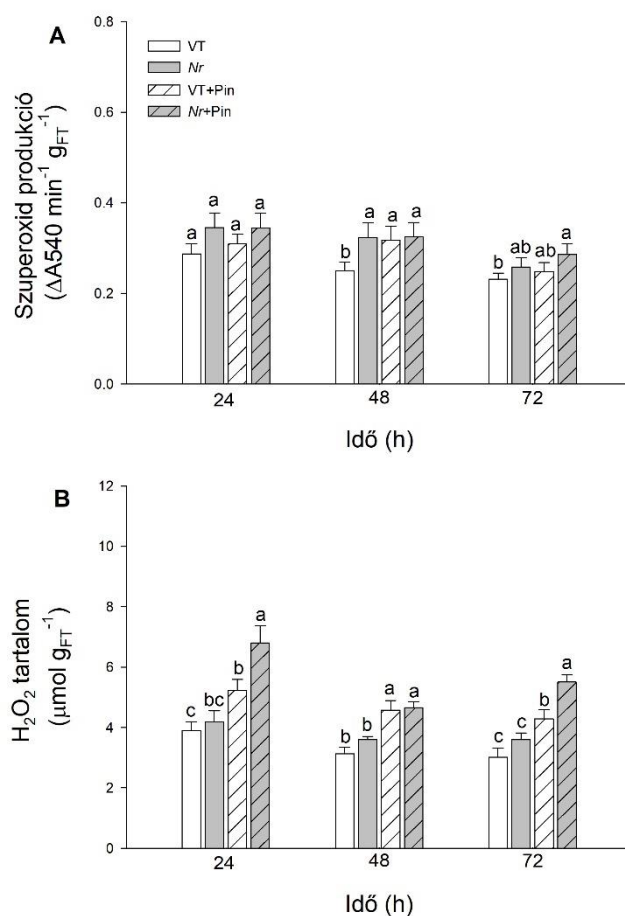
4.1. Az α -pinén előkezelés növényekre gyakorolt hatása

Kísérleteink során a stresszre adott fiziológiás válaszok közül elsőként az α -pinén sztómazáródásra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg. A sztómák zárásával ugyanis a növények hatékonyan védekezhetnek a behatoló mikrobákkal szemben. Ugyanakkor eredményeink alapján a 24, 48 és 72 órás kezelés egyik esetben sem indukált sztómazáródást a paradicsom növények levelében (8. ábra). A 72 órás α -pinén kezelés fokozta a sztómák nyitottságát az *Nr* növények leveleiben.



8. ábra: A sztómaapertúra változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=3). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

A ROS produkció fontos szerepet tölt be a növények védekezésének indukciójában és a mikrobális patogének elleni védekezésben is (Hasanuzzaman és mtsai. 2020). Elsőként a szuperoxid produkciót vizsgáltuk meg a levelekben. Az α -pinén kezelés hatására a 24 és a 48. órában nőtt meg a VT levelekben, majd a 72. órára az *Nr* levelekben a kontrollhoz képest a szuperoxid produkció (9. ábra A). Ezzel szemben a H_2O_2 szintek már a 24. órára nőttek az α -pinén kezelést követően mindkét genotípusban, a *Nr* levelekben jelentősebben (9. ábra B). Ez a tendencia minden mérési nap megfigyelhető volt a 72 óra során (9. ábra B).

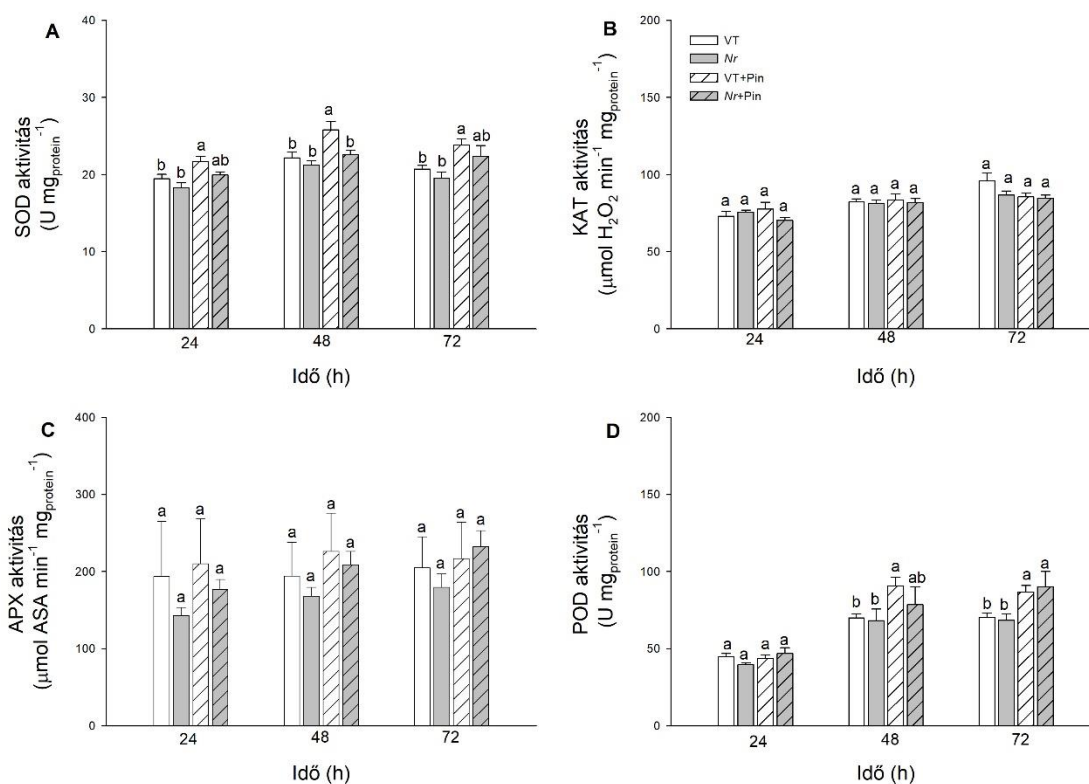


9. ábra: A szuperoxid produkció (A) és hidrogén-peroxid szintek (B) változása paradicsom növények kifejtett leveleiben 72 órás 6 μmol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=5). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

Kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk a ROS metabolizmusában szerepet játszó főbb antioxidáns enzimek aktivitását a 72 órás α -pinén kezelést követően. Elsőként a szuperoxid gyökkanion semlegesítésében szerepet játszó szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim aktivitását mértük meg, mely szignifikánsan nőtt a VT növények leveleiben az α -pinén hatására minden vizsgált időpontban. Az *Nr* levelekben az enzim aktivitása a VT-hoz minden időpontban alacsonyabb volt, és a kezelés hatására csak visszafogott változást tapasztaltunk 24 és 72 h-val az előkezelést követően (10. ábra A).

A kataláz enzim aktivitása a 3 nap folyamán fokozatosan növekedett, ám az előkezelés látszólag nem gyakorolt hatást az enzimaktivitásra (10. ábra B) Az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitása sem változott jelentősen az α -pinén előkezelés következtében. (10. ábra C)

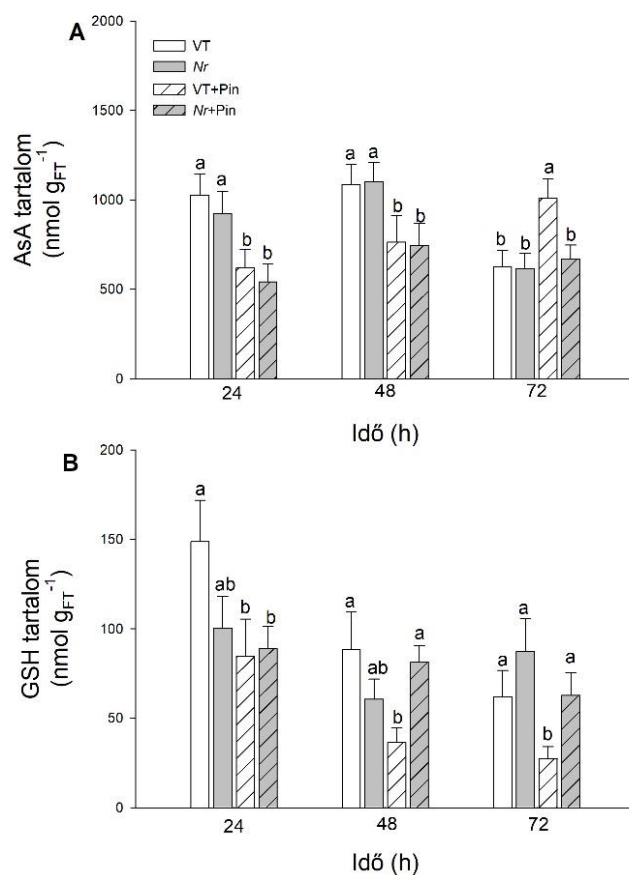
Ellenben a gvajakol-peroxidáz 48 és 72 h elteltével a VT-ban, 72 h elteltével a *Nr* levelekben is jelentősen megváltozott. (10. ábra D)



10. ábra: A szuperoxid-dizmutás (SOD, A), kataláz (KAT, B), aszkorbát peroxidáz (APX, C) és a gvajakol-peroxidáz (POD, D) enzimaktivitás változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μmol (+)-α-pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=5). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

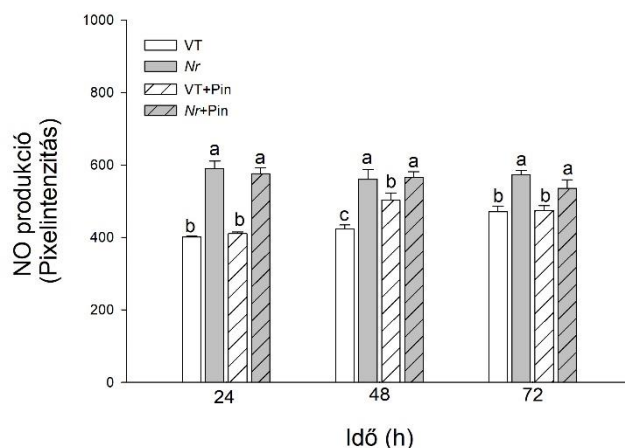
A főbb enzimatis antioxiidánsok mellett, a nem-enzimatis antioxiidánsok közül, elsőként megvizsgáltuk az aszkorbát (AsA) szintjét. Az α-pinén kezelés 24 és 48 óra elteltével szignifikánsan csökkentette az AsA szinteket a paradicsom növények leveleiben, az ET érzékeléstől függetlenül (11. ábra A), azonban 72 óra elteltével az AsA szintje szignifikánsan megemelkedett az α-pinén hatására a VT levelekben, míg az *Nr* növényekben 72 h elteltével nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest (11. ábra A).

A redukált glutation (GSH) szintje szintén szignifikánsan csökkent az α-pinén hatására, mind a három nap folyamán a VT levelekben, az *NR* növényekben a változás nem volt olyan jelentős (11. ábra B).



11. ábra: Az redukált aszkorbát (AsA, A) és glutation (GSH, B) szintek változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=5). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

A ROS produkció és metabolizmus mellett megvizsgáltuk az α -pinén kezelés hatását egy másik fontos jelátvivő molekula, a NO produkciójára a paradicsom növények leveleiben. A NO produkció az *Nr* növények leveleiben szignifikánsan magasabb volt a VT levelekben mértékhez képest (12. ábra), és nem változott szignifikánsan ebben a genotípusban az α -pinén hatására (12. ábra). Ugyanakkor a VT növények levelében az α -pinén kezelés szignifikánsan növelte a NO-szintet 48 h elteltével (12. ábra).

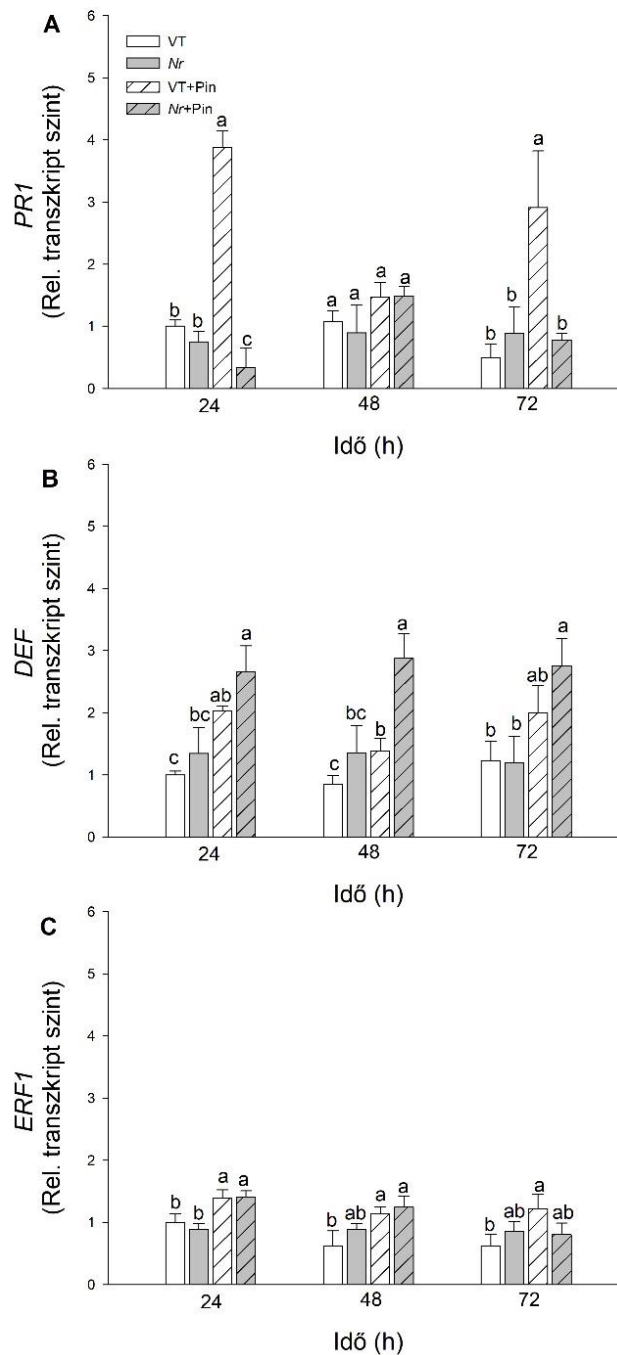


12. ábra: A nitrogén-monoxid (NO) produkció változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=4). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

Az α -pinén előkezelést követően kíváncsiak voltunk, hogy hat a főbb védekezésben szerepet játszó növényi hormonok válaszgénjeinek relatív transzkript szintjére (13. ábra). Elsőként az SA jelátvitelének markergénjét, a *PR1* kifejeződését vizsgáltuk. A *PR1* relatív transzkript szintje 24 és 72 óra leteltével szignifikánsan nőtt az α -pinén hatására a VT növények leveleiben (13. ábra A). Ezzel szemben a *PR1* expressziója a 24. órára lecsökkent az *Nr* levelekben (13. ábra A).

A JA markergén *DEF* expressziója fokozódott az α -pinén hatására mindkét genotípusban, mely a 24. 48. és 72. órában a *Nr* növények levelében szignifikánsan magasabb volt a VT növényeknél mértékhez képest (13. ábra B).

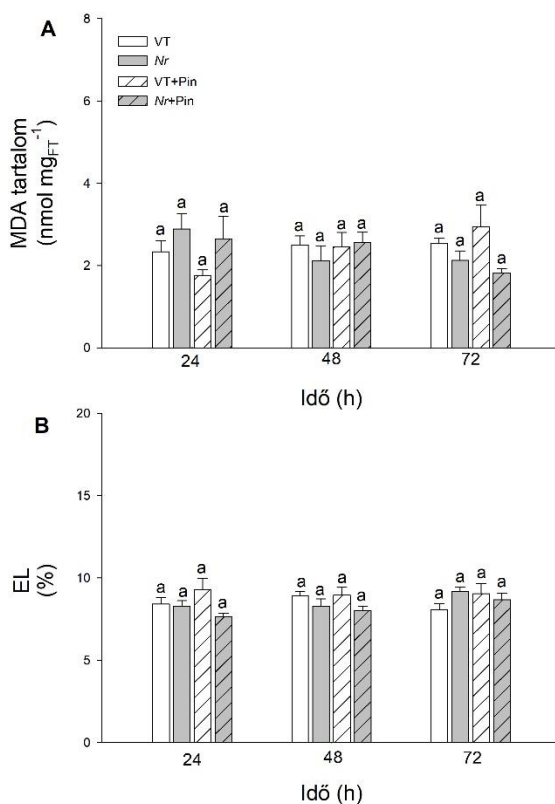
Az *ERF* gén szabályozásában elsősorban az ET vesz részt, de a JA is regulálja. Az *ERF* relatív transzkript szintjét szintén fokozta az α -pinén kezelés a 24 órától kezdődően a VT növények leveleiben (13. ábra C), mely azonban a vizsgált első két időpontban az *Nr* levelekben is szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest (13. ábra C).



13. ábra: A *PR1* (A), *DEF* (B) és *ERF1* (C) relatív transzkript szintjének változása paradicsom növények kifejtett leveleiben 72 órás 6 μmol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (*Nr*) növényekben (Átlag+SE, n=5). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

Végezetül az előkezelést követően megnéztük, hogy az α -pinén hatással van-e az oxidatív stressz által a lipidperoxidációra és a levelek életképességére, mint általános stresszfiziológiai paraméterekre. Méréseink alapján azonban az α -pinén nem változtat meg

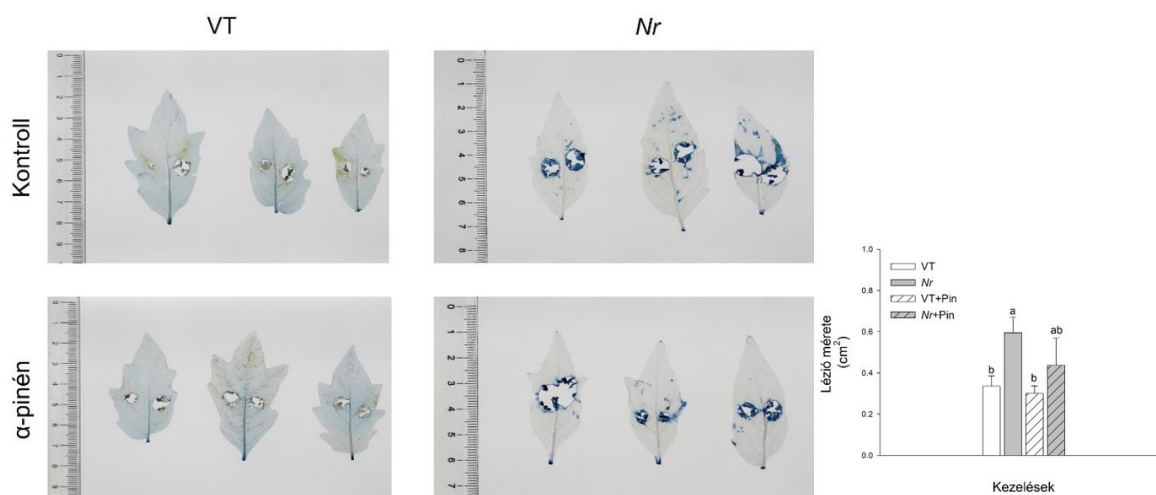
szignifikánsan egyik paraméter értékét sem a különböző genotípusokban, sem a vizsgált időpontokban (14. ábra).



14. ábra: A malondialdehid tartalom (MDA, A) és az ionkieresztés (EL, B) változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (Nr) növényekben (Átlag+SE, n=5). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

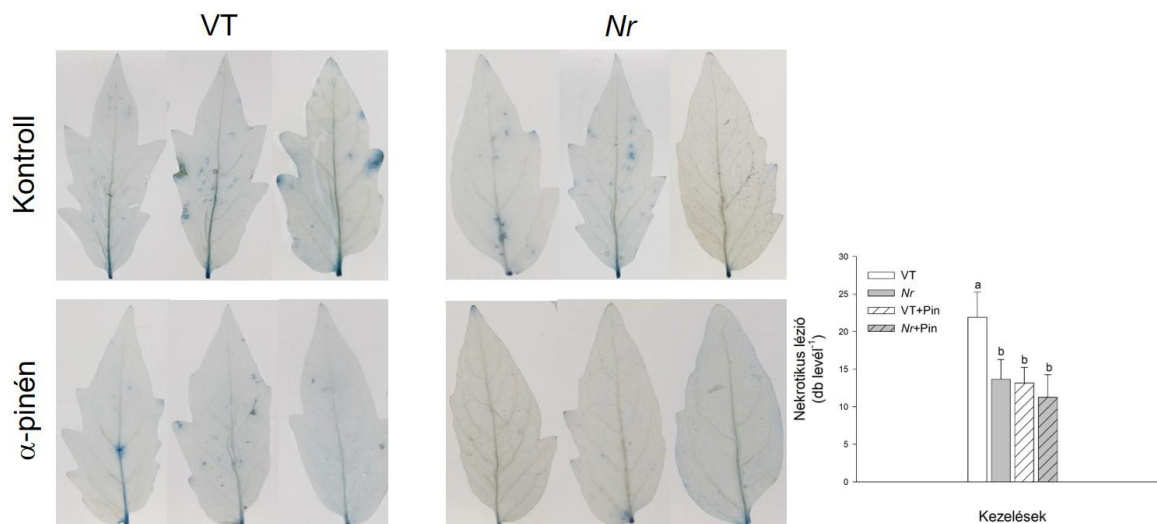
4.2. Az α -pinén előkezelés mikrobiális kórokozókra gyakorolt hatása

Kísérleteink részeként megvizsgáltuk, hogy a mikrobiális kórokozók közül a *Botrytis cinerea* fertőzés mértéke hogyan változik a 72 órás α -pinén előkezelést követő 3. napon. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a VT növények leveleiben nem változott szignifikánsan a fertőzés mértéke az α -pinén előkezelést kapott növényekben a hexánnal kezelt kontroll növényekhez képest (15. ábra). ugyanakkor az α -pinén előkezelés kismértékben mérsékelte a *Botrytis cinerea* fertőzés mértékét az Nr növények leveleiben (15. ábra).



15. ábra: A *Botrytis cinerea* okozta fertőzés mértékének változása paradicsom növények kifejlett leveleiben 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (Nr) növényekben (Átlag+SE, n=3). A *-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól $P < 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egy adott időpontban (ns: nem szignifikáns).

Hogy részletesebben megértsük a kórokozó életmódjának szerepét az előkezelés hatékonyságának függvényében, *Pseudomonas syringae* fertőzésnek is alávetettük az előkezelt paradicsomnövényeket. Ebben az esetben az előkezelést követő 2. napon a nekrotikus léziók száma szignifikánsan csökkent a VT paradicsom növények leveleiben, míg a Nr levelekben számuk nem változott jelentősen a hexánnal kezelt kontrollhoz képest.



16. ábra: *Pseudomonas syringae* fertőzés hatása *Solanum lycopersicum* leveleken 48 h-val a fertőzést követően. 72 órás 6 μ mol (+)- α -pinén (Pin) előkezelést követően vad típusú (VT) és etilén receptor mutáns *Never ripe* (Nr) növényekben (Átlag+SE, n=3). A kontrolltól való szignifikáns különbségeket egyutas ANOVA varianciaanalízist követően Duncan-féle teszttel állapítottuk meg, ahol a különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken, szignifikánsan különböznek egymástól.

5. Diszkusszió

A monoterpének közül az α -pinénről korábban már bizonyították, hogy részt vesz a SAR kialakításában, kapcsolódik az SA jelátviteléhez és ROS produkciót indukál a kezelt növények leveleiben (Wenig és mtsai. 2019; Vlot és mtsai. 2021). Ugyanakkor más védekezési hormonnal, például a szintén gáz halmazállapotú ET-nel kapcsolata nem ismert. Munkánk során elsőként vizsgáltuk meg az α -pinén kezelés hatását az idő függvényében VT és *Nr* növények levelében, hogy feltárjuk a két molekula lehetséges kapcsolatát. Mivel a SAR indukció, jelen esetben a „priming” kialakulását a szakirodalom 6-48 h időintervallumhoz köti, (Sah és Zeir, 2013) ezért, hogy a változásokat követni tudjuk 24, 48 és 72 h időpontokban végeztük el a vizsgálatokat, a szakirodalom alapján meghatározott α -pinén koncentrációval (Wenig és mtsai. 2019).

Vizsgálatunk első lépésében megnéztük, hogy az α -pinén kezelés hat-e a sztómák nyitottságára, melyek zárása a növények kórokozókkal szembeni védekezésének első védelmi vonalát jelenti (Jones és Dangl, 2006; Melotto és mtsai. 2006). Bár egyes monoterpénekről, például az izoprénről szőlőben kimutatták, hogy stresszes körülmények között gyors sztómazáródást eredményez (Bertamini és mtsai. 2021), a mi kísérleti elrendezésünkben nem volt sztómazáródás megfigyelhető. A kezelés ideje alatt a sztómák nyitottsága folyamatosan nőtt, mely betudható a kezelő dobozok hatásának, ugyanis a szellőztetés ellenére a dobozban 24 h elteltével jelentősen növekedett a páratartalom, ami sztómanyitódást indukál (Drisen és mtsai. 2020). Bár az ET szerepe a sztómaregulációban kérdéses, inkább sztómazáródás indukáló hatása az elfogadottabb (Desikan és mtsai. 2006), mely azonban ebben a kísérleti elrendezésben a páratartalom növekedése miatt pont a sztómanyitó hatása érvényesülhetett, mivel az ET fontos szerepet játszik a magasabb páratartalomhoz való alkalmazkodásban (Arve és Torre, 2005).

A kísérleteink következő lépésében megvizsgáltuk a jelátviteli folyamatokban is fontos szerepet játszó ROS produkciót (Foyer és Hanke, 2022) az α -pinén kezelést követően. Míg a szuperoxid produkció 48 óra elteltével fokozódott a VT levelekben, addig a H_2O_2 szintek már 24 óra elteltével nőttek mindkét paradicsom genotípusban, de az *Nr* levelekben jobban. Ez az eredmény jó összhangban van azzal az állítással, hogy α -pinén hatására, a védekezés részeként oxidatív stressz generálódik a növényekben (Singh és mtsai 2006). Ugyanakkor, ahogy azt a szuperoxid esetében látjuk, ez nem feltétlenül nyilvánul meg a ROS produkciójában a levelekben, ugyanis másodlagos védekezési mechanizmusként az α -pinén hatására az

antioxidáns enzimek és nem-enzimatis antioxiánsok mennyisége is változhat (Gill és Tuteja, 2010). A tapasztalt különbséget a szuperoxid és H_2O_2 szintekben okozhatja az eltérő szignalizációs jelentőségük is, ugyanis bizonyos ROS fontos szabályozói a monoterpén-indukálta védekezési válaszoknak (Vlot és mtsai. 2020).

A mért főbb antioxiáns enzimek közül a paradicsomnövények levelében a SOD aktivitását α -pinén szignifikánsan növelte a VT paradicsomnövények levelében, mely az *Nr* esetében változatlan maradt. Ezzel korrelál, hogy korábban azt találták, hogy az alacsony α -pinén koncentráció nem befolyásolta, míg magasabb koncentrációban már fokozta az enzimaktivitást (Zhou és mtsai. 2023). Az általunk mért SOD enzimaktivitás változás az α -pinén hatásának ET függésére utal. Ezzel szemben a H_2O_2 bontó KAT és APX aktivitás (Tari és mtsai. 2015) nem változott szignifikánsan a mérési időpontokban az α -pinén hatására. A POD aktivitás bár fokozatosan emelkedett a KAT enzimhez hasonlóan a három vizsgált nap alatt, de az α -pinén tovább fokozta aktivitását a kontroll VT növényekhez képest, ami az *Nr* levelekben elmaradt, utalva az ET jelentőségére a folyamatban. A kataláz aktivitása 72 óra alatt jelentősen nem változott.

A nem-enzimatis antioxiánsok közül az AsA és a GSH szintje szignifikáns csökkenést mutatott, majd az AsA szint 72 óra elteltével a VT növényekben ismét megemelkedett, ami az *Nr* növényekben elmaradt. A GSH csökkenése a VT levelekben jelentősebb volt az *Nr* levelekben mértékhez képest, mely az ET jelátvitel szerepére utal. Ugyanakkor a vizsgált nem enzimatis antioxiánsok mellett a monoterpének szerkezetéből adódóan szintén képesek a ROS semlegesítésére (Zhou és mtsai. 2023).

Az NO fontos szignálmolekula, közrejátszik a stresszhormonok (pl. ET) jelátvitelében, az oxidatív robbanás és az antioxiáns-rendszer szabályozásában, és a sztómazárás indukciójában (Acharya és Assmann, 2009; Fancy és mtsai. 2017). Az *Nr* növényekben az NO szintje alaptól magasabb volt, amire a szakirodalomban gyökércsúcs vizsgálatnál találunk példát (Tari és mtsai. 2011). Az α -pinén hatására azonban a VT növények levelében nőtt produkciója, mely az NO szerepét bizonyítja az az α -pinén hatására indukálódott SAR során, mely az *Nr* levelekben elmaradt. Ismert, hogy a NO a lokális immunválaszokért felel és közvetlenül károsítja a fertőzést okozó mikrobákat, de a SAR kialakításában is elengedhetetlen szerepet tölt be a növényekben (Scheler és mtsai. 2013).

Elsőként Riedlmeier és mtsai. (2017) írták le, hogy VT növényekben a *PR1* relatív génexpressziós szintje megemelkedik lokális és disztális szövetekben is az α -pinén hatására. Méréseink alapján szembetűnő eredmény volt, hogy 24 h elteltével az *Nr* növényekben a *PR1* gén relatív expressziós szintje mégis csökken, mely az α -pinén okozta védekezés jelentős ET

függésére utal. Ugyanakkor az α -pinén fokozta a JA-függő *DEF* gén expressziós növekedését, leginkább az *Nr* levelekben, mely eltérő jelátviteli útvonalra utal az ET érzékelés hiányában. Az ET markergén expressziója szintén megemelkedett az α -pinén hatására. A mezőgazdasági növényvédelemben is jelentős szerves illékony anyagok és monoterpének képesek aktiválni védekezéssel kapcsolatos *PR1*, *PR2* és *PR4* gének expresszióját a fogékony fajtákban, például árpa növényekben (Sharifi-Rad és mtsai. 2017). Ugyanakkor az ET potenciális reguláló szerepe ezidáig ismeretlen maradt.

Végül az MDA és EL eredmények igazolták, hogy az α -pinén kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a levelekben az oxidatív stressz mértékét (Tari és mtsai. 2015) és az életképességet (Czékus és mtsai. 2020). Emellett az előkezelés nem csökkentette a VT levelekben a *Botrytis cinerea* fertőzés mértékét, de kismértékben pozitívan befolyásolta azt az *Nr* levelekben.

Az eredmények jelentősek az α -pinén, mint mikrobiális növényvédőszer-jelölt vizsgálatoként. Rani és mtsai 2014-ben szilika nanorészecskékhez kötve tesztelték az α -pinén és linalol közös hatását. Nanorészecskékhez kötve a monoterpének akár 50%-kal csökkentették a rágási felületet a kontrollhoz képest. Habár a direkt alkalmazott 0,1%-os nanopartikulomhoz adszorbeáltatott α -pinén koncentráció hatékonyságából a rovar lárvákkal szemben, egyértelmű következtetést nem vonhatunk le, felveti a módszer tesztelésének igényét *Pseudomonas s.* és *Botrytis c.* törzsekkel szemben is.

A növényi esszenciális olajok (EO) komponensei komoly biológia inszekticidek lehetnek, köztük, a kis kukoricamollyal (*Tribolium castaneum*) szemben a (-)- α -pinén enyhén toxikus volt, a többi komponenshez viszonyítva. (Saad és mtsai. 2019) Az imént említett a kutatásban az EO komponenseinek szinergesztikus hatása miatt hatékonyabban voltak alkalmazhatók a komplex növényi kivonatok az egyes komponensekhez képest, amit cáfol Arantes és mtsai.-nak kullancsokon végzett kísérlete. Az α -pinén-t és a β -pinént tisztán, szubletális koncentrációkban alkalmazva hatékonyabban csökkentették a kullancsok szaporodási sikerét, mint a komplex kivonatokkal tesztelő Pereira és mtsai. Az α - és β -pinén biológiai aktivitása között szignifikáns különbséget írtak le, ami megerősíti a két molekula szeparált vizsgálatának jelentőségét. Gyógynövények EO antifungális hatékonyságát vizsgálták *Botrytis c.* micéliumnövekedésére vonatkoztatva. (Rguez és mtsai., 2024.) A magas α -pinén tartalmú zsálya, rozmaring és mirtusz-olaj hatékony antifungális szernek bizonyultak.

Összességében megállapíthatjuk, hogy az α -pinén előkezelés kismértékű oxidatív stresszt okozott a paradicsom növények leveleiben és aktiválta a védekezési hormonok jelátvitelét, mely eltérően alakult az aktív ET jelátvitel hiányában.

Az α -pinén előkezelés jó alternatívája lehet számos, a fogyasztókra nézve káros antifungális és antimikrobiális szernek. A mezőgazdasági felhasználás további pozitív indikátora, hogy a természetes eredetű molekula kevésbé stabil a szintetikus eredetű vegyszerekhez képest, ezért hatása a talajéletre és a környezetre várhatóan jóval visszafogottabb. (Rani és mtsai 2014)

Eredményeink újdonsága abban áll, hogy az α -pinén előkezelést egy eddigiekben közvetlenül nem vizsgált növényi hormon (ET) kapcsolatra teszteltük, illetve a gazdaságilag jelentős *Solanum l.* mikrobiális fertőzésével szemben vizsgáltuk, továbbá, hogy az idáig le nem írt legjelentősebb változásokat a nem-enzimatis antioxiidánsok aktivitásában mértük, az előkezeléseket követően. A nem-enzimatis antioxiidánsok további vizsgálata a monoterpének különböző koncentráció-változásainak tükrében, munkánk alapján indokolt.

6. Irodalomjegyzék

- Abbas, F., O'Neill Rothenberg, D., Zhou, Y., Ke, Y., & Wang, H. C. (2022). Volatile organic compounds as mediators of plant communication and adaptation to climate change. *Physiologia Plantarum*, 174(6), e13840.
- Acharya, B. R., & Assmann, S. M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant molecular biology*, 69, 451-462.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42(1), 385-414.
- Allenspach, M., & Steuer, C. (2021). α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857.
- aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9750-9754.
- Arantes, A. C. S., Ribeiro, J. C. S., Soares, D. S., Reis, A. C., Cardoso, M. D. G., & Remedio, R. N. (2024). Alpha- and beta-pinene isomers act differently to control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 123(3), 164.
- Arve, L. E., & Torre, S. (2015). Ethylene is involved in high air humidity promoted stomatal opening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Functional Plant Biology*, 42(4), 376-386.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543
- Bertamini, M., Grando, M. S., Zocca, P., Pedrotti, M., Lorenzi, S., & Cappellin, L. (2019). Linking monoterpenes and abiotic stress resistance in grapevines. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 13, p. 01003). EDP Sciences.
- 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.
- Brosset, A., & Blande, J. D. (2022). Volatile-mediated plant–plant interactions: volatile organic compounds as modulators of receiver plant defence, growth, and reproduction. *Journal of experimental botany*, 73(2), 511-528.
- Casadevall, A. (2008). Evolution of intracellular pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62(1), 19-33.
- 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.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552.
- Czékus, Z., Csíkos, O., Ördög, A., Tari, I., & Poór, P. (2020). Effects of jasmonic acid in ER stress and unfolded protein response in tomato plants. *Biomolecules*, 10(7), 1031.
- da Silva Rivas, A. C., Lopes, P. M., de Azevedo Barros, M. M., Costa Machado, D. C., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., ... & Neill, S. J. (2006). Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *The Plant Journal*, 47(6), 907-916.

- Driesen, E., Van den Ende, W., De Proft, M., & Saeys, W. (2020). Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, 10(12), 1975.
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, 135(4), 1893-1902.
- 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.
- Elad, Y. (1990). Production of ethylene by tissues of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(4), 277-287.
- Erb, M. (2019). Plant biology: evolution of volatile-mediated plant–plant interactions. *Current biology*, 29(18), R873-R875.
- Fancy, N. N., Bahlmann, A. K., & Loake, G. J. (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, cell & environment*, 40(4), 462-472.
- Foyer, C. H., & Hanke, G. (2022). ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal*, 111(3), 642-661.
- 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.
- Ghozlan, M. H., Eman, E. A., Tokgöz, S., Lakshman, D. K., & Mitra, A. (2020). Plant defense against necrotrophic pathogens. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2122-2138.
- 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.
- Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., ... & Zimmerman, P. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 100(D5), 8873-8892.
- Hammerbacher, A., Coutinho, T. A., & Gershenzon, J. (2019). Roles of plant volatiles in defence against microbial pathogens and microbial exploitation of volatiles. *Plant, Cell & Environment*, 42(10), 2827-2843.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- He, Q., McLellan, H., Boevink, P. C., & Birch, P. R. (2020). All roads lead to susceptibility: the many modes of action of fungal and oomycete intracellular effectors. *Plant Communications*, 1(4).
- He, Z., Webster, S., & He, S. Y. (2022). Growth–defense trade-offs in plants. *Current Biology*, 32(12), R634-R639.
- Horváth, E., Csiszár, J., Gallé, Á., Poór, P., Szepesi, Á., & Tari, I. (2015). Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 183, 54-63.
- Hwang, H. S., Adhikari, P. B., Jo, H. J., Han, J. Y., & Choi, Y. E. (2020). Enhanced monoterpene emission in transgenic orange mint (*Mentha × piperita* f. *citrata*) overexpressing a tobacco lipid transfer protein (NtLTP1). *Planta*, 252, 1-12.

- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Junker, R. R., & Tholl, D. (2013). Volatile organic compound mediated interactions at the plant-microbe interface. *Journal of chemical ecology*, 39, 810-825.
- Junker, R. R., Loewel, C., Gross, R., Dötterl, S., Keller, A., & Blüthgen, N. (2011). Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biology*, 13(6), 918-924.
- Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., & Kumar, P. (2020). Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal biotechnology and bioengineering*, 457-470.
- Kliebenstein, D. J., & Rowe, H. C. (2008). Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science*, 174(6), 551-556.
- Kuai, X., MacLeod, B. J., & Després, C. (2015). Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Frontiers in plant science*, 6, 235.
- Lamers, J., Van Der Meer, T., & Testerink, C. (2020). How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology*, 182(4), 1624-1635.
- Li, Q., Wang, C., & Mou, Z. (2020). Perception of damaged self in plants. *Plant physiology*, 182(4), 1545-1565.
- Ložienė, K., Švedienė, J., Paškevičius, A., Raudonienė, V., Sytar, O., & Kosyan, A. (2018). Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. *Fitoterapia*, 127, 20-24.
- Lund, S. T., Stall, R. E., & Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell*, 10(3), 371-382.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L. I., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., ... & Chai, J. (2020). Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science*, 370(6521), eabe3069.
- Meents, A. K., & Mithöfer, A. (2020). Plant-plant communication: is there a role for volatile damage-associated molecular patterns?. *Frontiers in plant science*, 11, 583275.
- 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, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 245-266.
- Molinari, F. N., Marelli, M., Berretti, E., Serrecchia, S., Coppola, R. E., De Cesare, F., & Macagnano, A. (2025). Cutting-Edge Sensor Design: MIP Nanoparticle-Functionalized Nanofibers for Gas-Phase Detection of Limonene in Predictive Agriculture.

- Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., & Ali, G. S. (2020). The PTI to ETI continuum in Phytophthora-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 11, 593905.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H. K., Ding, P., & Jones, J. D. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110-115.
- Ninkovic, V., Markovic, D., & Rensing, M. (2021). Plant volatiles as cues and signals in plant communication. *Plant, cell & environment*, 44(4), 1030-1043.
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., & Malone, J. G. (2016). Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1298-1313.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28(1), 489-521.
- 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.
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R., & Zook, M. N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant physiology*, 97(4), 1342-1347.
- Rguez, S., Grati-Affes, T., Yeddes, W., Hammami, M., & Hamrouni-Sellami, I. Chemometric Analysis of essential oils from Tunisian Plants: Unravelling the Antifungal Potential against *Botrytis cinerea*.
- Riedlmeier, M., Ghirardo, A., Wenig, M., Knappe, C., Koch, K., Georgii, E., ... & Vlot, A. C. (2017). Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants. *The Plant Cell*, 29(6), 1440-1459.
- Rosenkranz, M., Chen, Y., Zhu, P., & Vlot, A. C. (2021). Volatile terpenes—mediators of plant-to-plant communication. *The plant journal*, 108(3), 617-631.
- Roussin-Léveillé, C., Mackey, D., Ekanayake, G., Gohmann, R., & Moffett, P. (2024). Extracellular niche establishment by plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 22(6), 360-372.
- Saad, M.M.G., El-Deeb, D.A. & Abdelgaleil, S.A.M. Insecticidal potential and repellent and biochemical effects of phenylpropenes and monoterpenes on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Environ Sci Pollut Res* 26, 6801–6810 (2019).
- Saijo, Y., & Loo, E. P. I. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 225(1), 87-104.
- Sarria, S., Wong, B., Martín, H. G., Keasling, J. D., & Peralta-Yahya, P. (2014). Microbial synthesis of pinene. *ACS synthetic biology*, 3(7), 466-475.
- Scheler, C., Durner, J., & Astier, J. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 534-539.
- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 4, 30.
- Sharifi, R., Lee, S. M., & Ryu, C. M. (2018). Microbe-induced plant volatiles. *New Phytologist*, 220(3), 684-691.
- Sharifi-Rad, J., Salehi, B., Schnitzler, P., Ayatollahi, S. A., Kobarfard, F., Fathi, M., ... & Sharifi-Rad, M. (2017). Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils

- of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. *Cellular and Molecular Biology*, 63(8), 42-47.
- Shu, P., Li, Y., Sheng, J., & Shen, L. (2024). Recent Advances in Dissecting the Function of Ethylene in Interaction between Host and Pathogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(9), 4552-4563.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, S., Arora, K., & Kohli, R. K. (2006). α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, 98(6), 1261-1269.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews immunology*, 12(2), 89-100.
- 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.
- Tari, I., Poór, P., & Gémes, K. (2011). Sublethal concentrations of salicylic acid decrease the formation of reactive oxygen species but maintain an increased nitric oxide production in the root apex of the ethylene-insensitive never ripe tomato mutants. *Plant signaling & behavior*, 6(9), 1263-1266.
- Tari, I.; Csiszár, J.; Horváth, E.; Poór, P.; Takács, Z.; Szepesi, Á. 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 Biol. Cracov. Bot.* 2015, 57, 21–30.
- Tena, G. (2021). PTI and ETI are one. *Nature plants*, 7(12), 1527-1527.
- 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.
- Thordal-Christensen, H. (2020). A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(20), 3963-3976.
- Timmermann, T., Poupin, M. J., Vega, A., Urrutia, C., Ruz, G. A., & González, B. (2019). Gene networks underlying the early regulation of *Paraburkholderia* phytofirmans PsJN induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 14(8), e0221358.
- Tóth, L., Boros, É., Poór, P., Ördög, A., Kele, Z., Váradi, G., ... & Galgóczy, L. (2020). The potential use of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, the designed variant PAFopt and its γ -core peptide Pyopt in plant protection. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1403-1414.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., ... & Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 4(6), 645-656.
- Usha Rani, P., Madhusudhanamurthy, J., & Sreedhar, B. (2014). Dynamic adsorption of α -pinene and linalool on silica nanoparticles for enhanced antifeedant activity against agricultural pests. *Journal of pest science*, 87, 191-200.
- 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.
- 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, F., Cui, X., Sun, Y., & Dong, C. H. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant cell reports*, 32, 1099-1109.

- Wang, H., Sun, Y., Chang, J., Zheng, F., Pei, H., Yi, Y., ... & Dong, C. H. (2016). Regulatory function of Arabidopsis lipid transfer protein 1 (LTP1) in ethylene response and signaling. *Plant Molecular Biology*, 91, 471-484.
- Wang, Y., Pruitt, R. N., Nuernberger, T., & Wang, Y. (2022). Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 20(8), 449-464.
- Wenig, M., Ghirardo, A., Sales, J. H., Pabst, E. S., Breitenbach, H. H., Antritter, F., ... & Vlot, A. C. (2019). Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature communications*, 10(1), 3813.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., & Fu, Z. Q. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, 5(7), 710-721.
- Yamane, M., & Tani, A. (2024). An absorption model of volatile organic compound by plant leaf: The most influential site in the absorption pathway. *Atmospheric Environment: X*, 100274.
- Ye, K., Hu, G., Tong, Z., Xu, Y., & Zheng, J. (2025). Key Intelligent Pesticide Prescription Spraying Technologies for the Control of Pests, Diseases, and Weeds: A Review. *Agriculture*, 15(1), 81.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11(3), 386.
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 62, 102030.
- Zeier, J. (2021). Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102050.
- Zhou, Y., Wang, J., Wang, X., Wang, F., & Li, X. (2023). Efficient production of α -pinene through identifying the rate-limiting enzymes and tailoring inactive terminal of pinene synthase in *Escherichia coli*. *Fuel*, 343, 127872.
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7645), 328-336.
- Zuo, Z., Weraduwege, S. M., Lantz, A. T., Sanchez, L. M., Weise, S. E., Wang, J., ... & Sharkey, T. D. (2019). Isoprene acts as a signaling molecule in gene networks important for stress responses and plant growth. *Plant Physiology*, 180(1), 124-152.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Fehér Attila tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy a Növénybiológiai Tanszéken készíthettem el TDK dolgozatomat.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Poór Péternek és Czékus Zalánnak a dolgozatom elkészítéséhez nyújtott minden segítségért.

Köszönöm Bécs Attiláné és a munkacsoportunk minden tagjának a munkámhoz nyújtott minden segítségért.

Köszönöm az NKFIH FK 138867 pályázat támogatását a kísérletek megvalósításához.

A 37. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Kovács Klára Terézia** nyilatkozom, hogy a 2024-es Őszi Helyi TDK-ra benyújtott **Az α -pinén és az etilén kölcsönhatásának vizsgálata paradicsom növények védekezése során** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

Részfeladat ²	A részvétel mértéke (százalékban kifejezve)
Növénynevelés	80
Az α -pinén előkezelés és fertőzés	80
A sztómazáródás vizsgálatához nyúzatkészítés és a képek szoftveres kiértékelése	100
Reaktív molekulák mennyiségi meghatározása a levelekben fluoreszcens festékkel	80
Fontosabb antioxidáns enzimek aktivitásának detektálása fotometriás vizsgálatokkal	60
Nem enzimátikus (AsA, GSH) mennyiségi meghatározása	70
A NO-produkció meghatározása	100
Génexpressziós vizsgálatok (RNS kivonás, cDNS írás, ellenőrző PCR elvégzésre, qRT-PCR)	60
A lipidperoxidáció mértékének meghatározása	100
Ionkieresztés mértéke ^{m3}	100
A fertőzések hatásának vizsgálata Evan's blue festékkel és a léziók mértékének szoftveres kiértékelése	100
Az adatok statisztikai feldolgozása ^{m4}	60

Kelt: Szeged, 2024.11.11.

Kovács Klára Terézia

Pályamunkát benyújtó hallgató

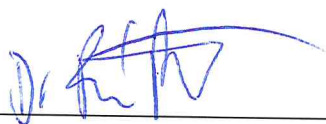
Kovács Klára Terézia

aláírása

¹ A kutatási projekt azon részfadatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.

² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.

A nyilatkozatban foglaltak helyességét
megerősítem:



Témavezető: *Dr. Poór Péter, SZTE TTIK*

Növénybiológiai Tanszék

aláírása



Témavezető: *Dr. Czékus Zsolt, SZTE TTIK*

Növénybiológiai Tanszék

aláírása