

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Az S-metilmethionin hatása kukorica sóstressz elleni védekezésére

Szerző: Felde Orsolya
Szak: Biológus MSc, 2. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Témavezetők: Rudnóy Szabolcs dr. (adjunktus)
Ludmerszki Edit (PhD hallgató)



Budapest, 2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezető	5
1.1. Stressz, sóstressz	5
1.2. Az antioxidáns védekezés	7
1.3. S-metilmetionin	9
2. Célkitűzés	10
3. Anyagok és módszerek	11
3.1. A növénynevelés körülményei	11
3.2. SMM-kezelés	11
3.3. Sókezelés	11
3.4. Klorofill-a fluoreszcencia indukció	12
3.5. Enzimkinetikai vizsgálatok	12
3.5.1. Gvajakol-peroxidáz	13
3.5.2. Aszkorbát-peroxidáz	13
3.5.3. Glutation-reduktáz	13
3.6. Génexpresszió vizsgálata kvantitatív real-time PCR technikával	13
3.7. Statisztikai vizsgálatok	14
4. Eredmények	15
4.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció eredménye	15
4.2. Enzimkinetikai vizsgálatok eredménye.....	16
4.2.1. Aszkorbát-peroxidáz	16
4.2.2. Gvajakol-peroxidáz	17
4.2.3. Glutation-reduktáz	19
4.3. Génexpressziós vizsgálatok eredménye	20

4.3.1. Az aszkorbát-peroxidáz enzim génje	20
4.3.2. A glutation-reduktáz enzim génje	21
5. Eredmények értékelése	22
5.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció eredményének tárgyalása	22
5.2. Enzimkinetikai és génexpressziós vizsgálatok eredményének tárgyalása	23
5.2.1. Aszkorbát-peroxidáz	23
5.2.2. Glutation-reduktáz	25
5.2.3. Gvajakol-peroxidáz.....	27
6. Összefoglalás	29
7. Summary	31
Irodalomjegyzék	33
Nyilatkozat	

Rövidítések jegyzéke

AdoMet	S-adenozilmetionin
APX	aszorbát-peroxidáz
ASH	aszorbinsav
DMSP	dimetil-szulfopropionát
DTNB	5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoészav)
ETC	elektron transzportlánc
F_v	változó klorofill fluoreszcencia
F_m	maximális klorofill fluoreszcencia
F₀	minimális/kezdeti fluoreszcencia
GPX	glutathion-peroxidáz
GR	glutathion-reduktáz
GSH	redukált glutathion
GSSG	oxidált glutathion
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz
PSI, PSII	első és második fotorendszer
qRT-PCR	kvantitatív real-time polimeráz láncreakció
ROS	reaktív oxigénformák
SMM	S-metilmetionin
SOS	Salt Overly Sensitive útvonal

1. Bevezető

1.1. Stressz, sóstressz

A növények optimális körülményeket biztosító élőhelyen képesek a legkönnyebben túlélni, a leginkább növekedni, fejlődni és a leghatékonyabban szaporodni. Ilyen optimumot könnyen megfigyelhetünk például vízellátottság vagy fényintenzitás tekintetében. Az optimum értékei között a növény fejlődése és szaporodása elérheti a genetikai állományában kódolt maximális értékeket. Azonban természetes körülmények között nem létezik minden szempontból optimális környezet. Egy telítési görbe segítségével ábrázolva az optimum mindig a görbe maximumát magába foglaló tartomány. Az optimális tartománytól bármely irányba történő eltérés stressznek minősül. A stressz a szervezet túlterhelt, túlerőltetett állapota, a test aspecifikus reakciója mindenfajta igénybevétellel szemben (Selye, 1936).

Sóstressz során a talajoldat ozmotikus nyomása meghaladja a növényi sejten belül uralkodó ozmotikus nyomást a gyökérzónában felhalmozódó sók miatt. Ennek következtében a növény képtelen lesz vízfelvételre. A kialakuló ozmotikus stressz mellett felborul a növény ionháztartása is. Mindkét primer hatás csökkenti a növény növekedését és a szaporodását, azaz a terméshozamát. A sóstressz miatt szárazságstressz is kialakul a növényben, mert nem áll rendelkezésre megfelelő termodinamikai állapotú víz, a talaj erős ozmotikus vízkötése miatt. A vízhiány miatt lecsökken a turgor, záródnak a sztómák és gátlódik a fotoszintézis. Szárazság hatására a klorofillok degradációja is fokozódik, károsítva a PSII-t, és a fénygyűjtés mechanizmusát. A fotoszintézis károsodásának következménye, hogy oxidatív stresszt szenved a növény. Sóstressz hiányában, fiziológiásan is termelődnek reaktív oxigénformák (ROS), amik igen fontos szignálmolekulák. De a stressz hatására termelődő többlet ROS-t az antioxidáns rendszer már nem tudja korlátok között tartani (Gill és Tuteja, 2010).

A sóstresszéért felelős nátriumion a természetben nagy mennyiségben előforduló elem. Eloszlása nem egyenletes, megtalálható szinte mindenütt a földfelszínen, a felszín alatti víztestekben és természetesen nagy mennyiségben van jelen a tengerekben és óceánokban. Magas sókoncentráció kialakulhat a talajban természetes úton, helyi geológiai sajátosságok vagy a tengerpart közelsége miatt. Azonban létrejöhet mesterségesen is magas sókoncentráció, például rossz vízgazdálkodás, magas evaporáció vagy túlzott műtrágyahasználat miatt (Tuteja, 2007). A magas sókoncentráció legtöbbször Na^+ és Cl^- ionokra vonatkozik, de a sóterhelt talajok egyéb szervesetlen ionokat is tartalmazhatnak, így Ca^{2+} iont, szulfátiót, és bikarbonátiót (Maathuis, 2014).

A növények számára alacsony koncentrációban a nátrium pozitív hatású. Hogyha figyelembe vesszük, hogy a növények elsődleges termelők, akik felelősek a tápelemek eljuttatásában a fogyasztó szintek felé, akkor a nátrium jelenléte a növényekben a fogyasztók számára is fontos. A nátrium pozitív hatását főként káliumhiány esetében figyelték meg. Azokban a talajokban, ahol kevés a kálium, a nátriumtrágyázás helyettesítheti a költséges kálium-karbonáttal történő trágyázást. Ez azért lehetséges, mert a nátrium hidratált formája hasonlít a káliuméhoz, mind kémiaiilag, mind pedig szerkezetét tekintve (Amtmann és Sanders, 1999). Ebből fakadóan a nátrium pótolhatja a sejten belül a káliumot egyes metabolikus folyamatokban (Maathuis, 2014).

A legtöbb enzim működésére azonban negatívan hat a nátrium jelenléte. Ennek oka a nátrium- és a káliumionok közti méretkülönbség, ami befolyásolja a kötési energiákat és a koordinációt az enzimen belül. A nátrium erőlyes vízelvonó, ezért rossz hatással van a fehérjék natív szerkezetére. Megakadályozhatja bizonyos enzimek működését a szerkezetük károsításán keresztül. A nátrium toxicitása nem csak a citoszolban gyakorolt negatív hatásán alapul, hanem a kálium-homeosztázis felborításán is (Conde és mtsai, 2011).

Összességében véve a túl sok nátrium a legfontosabb abiotikus stresszorok közé tartozik, ami a mezőgazdasági növények hozamát csökkentheti. A környezetben nagy koncentrációban jelenlévő ionok, így a nátrium- és kloridion is, lokálisan lecsökkentik a vízpotenciált és ozmotikus stresszt váltanak ki a növényben, emellett felborítják annak ionháztartását.

A sóstressz elősegíti a reaktív oxigénformák képződését (Miller és mtsai, 2010). Habár a reaktív oxigénformák toxikus hatásukról ismertek, sokszor jelmolekulaként is fontos szerepet töltenek be (Maathuis, 2014). A legtöbb stressz hatására képződik ROS, ezért specifikálása sóstressz esetén kérdéses. A sóstressz következménye egy azonnal kialakuló, átmeneti kalciumszint-növekedés a citoplazmában, ami egyszerre több útvonalat aktivál (SOS, MAPK). Ezek az útvonalak hatással vannak ioncsatornák aktivitására, enzimikus aktivitások szabályozására és a génexpresszióra (Conde és mtsai, 2011). A sóstressz és az ozmotikus stressz által indukált kalciumhullám rövid életű, és a citoplazma kalciumszintje 1-2 percen belül helyreáll. Elképzelhető, hogy általános válaszról van szó, az ionerősség változására (Maathuis, 2014).

A növényi sejten belül felhalmozódott nátriumot a növénynek kezelnie kell. Kompartmentalizálhatja sejtservecskébe, tovább transzportálhatja a hajtásba, vagy kiszoríthatja a gyökérkörnyezetbe. Ehhez azonban aktiválnia kell a megfelelő szignalizációs utakat. A legtöbb jelátviteli útvonal a növényekben valamilyen Ca^{2+} -hullámmal kezdődik. Ennek megfelelően a nátriumtöbblet kezelését célzó útvonal, a Salt Overly Sensitive (SOS)

útvonal egy sóindukált Ca^{2+} -hullámmal kezdődik, és az antiporter megnövekedett aktivitásával végződik, csökkentve a sejtplazma Na-tartalmát (Maathuis, 2014). Az SOS1, SOS2 és SOS3 funkcionális modult alkotó fehérjék, melyben az SOS1 egységet foszforilálja az SOS2/SOS3 kináz komplex (Quintero és mtsai, 2002). Az SOS1 kódolja a nátrium effluxért felelős Na^+/H^+ antiportert (Quintero és mtsai, 2002).

A nátrium könnyen toxikus szintig halmozódik fel a citoszolban és több mechanizmus is létezik ennek kivédésére. A nátrium vakuólumba történő szállítása feltehetőleg minden szövetben megtörténik, és ez az egyik fő stratégia a nátrium-toxicitás kivédésére, miközben „olcsó” ozmolitként a vízpotenciál alacsonyan tartását szolgálja (Maathuis, 2014).

1.2. Az antioxidáns védekezés

A növények a nátrium eltávolításával és kompartmentekbe zárásával igyekeznek megvédeni magukat az oxidatív károsodásoktól. Az oxidatív károkat a reaktív oxigénformák okozzák, melyek termelődése stressz hatására fokozódik. A ROS fogalma magában foglalja nem csak a reaktív oxigéngyököket, hanem bizonyos reaktív, nem gyök oxigénszármazékokat is (Halliwell, 2006). A ROS emelkedett szintje stressz közben jelátviteli utak aktiválása miatt fontos, mert szignálmolekulaként génexpressziós változásokat indukálhat (Gratao és mtsai, 2005). A többlet ROS azonban káros, mert oxidálja a fehérjéket, károsítja a membránokat lipidperoxidáción keresztül és mert reakcióba léphet a sejt genetikai állományával, és végeredményben a sejt halálát okozhatja. Nem csupán sejtszinten okozhatnak károkat a reaktív oxigénformák, toxikusak lehetnek a növény teljes egészére, csökkentve annak terméshozamát (Mittler, 2002), ezért belátható, hogy mezőgazdasági szempontból is fontos a ROS kezelése. Fiziológias körülmények között a reaktív oxigénformákat az antioxidáns rendszer eliminálja. A stresszfolyamatok során, így sóstressz esetében is, felborul az egyensúly a ROS képződése és semlegesítése között (Gill és Tuteja, 2010).

Az erős metabolikus aktivitású sejtszervecskék, melyekben intenzív elektronáramlás zajlik, a növényi sejtek legfőbb ROS-forrásai is egyben (Gill és Tuteja, 2010). ROS képződhet a sejtanyagcsere melléktermékeként több sejtorganelumban is. A növényi mitokondriumok, az energiatermelés fő szervecskéi, a kloroplasztisz és a peroxiszómák mellett a legfőbb ROS-képzők (Gill és Tuteja, 2010).

A kloroplasztiszban található fő ROS-képző helyek a triplet állapotú klorofill, az elektrontranszportlánc (ETC), a PSI és PSII (Gill és Tuteja, 2010). A fotoszintézis során termelt oxigén elektronokat foghat el a PSII-ből, és szuperoxid aniongyökké alakulhat (Gill és

Tuteja, 2010). Az ETC túltöltöttsége esetén az elektronok egy része elvezetődik a ferredoxinról molekuláris oxigénre, szuperoxid gyökké redukálva azt a Mehler reakción keresztül (Wise és Naylor, 1987). Az ETC PSII-be eső része is tartalmaz elektronszivárgáshoz megfelelő helyet (Qa, Qb), ahol a molekuláris oxigénből ROS keletkezhet.

A nem megfelelő körülményeknek, pl. sóstressznek kitett növényekben a ROS képződése a fiziológiás szint fölé emelkedik (Gill és Tuteja, 2010). Az evolúció során kialakult az antioxidáns rendszer, mely enzimekkel (aszorbát-peroxidáz, gvajakol-peroxidáz, glutation-reduktáz) és nem enzimikus elemekkel (aszkorbinsav (ASH), glutation (GSH)) igyekszik csökkenteni a reaktív oxigénformák számát (Mittler és mtsai, 2004). Azok a transzgénikus növények, melyekben magasabb szinten expresszálják az aszorbát-peroxidáz (APX), a gvajakol-peroxidáz (GPX) és a glutation-reduktáz (GR) enzimeket, szignifikánsan jobb stressztoleranciát mutattak só és szárazság esetén (Roxas és mtsai, 1997).

A növények többféle peroxidáz enzimmel rendelkeznek. Ezekben az enzimekben az a közös, hogy a H_2O_2 -ot eliminálják egy kosubsztrát oxidációja közben.

Az aszorbát-peroxidáz (APX) a kloroplasztisban és a citoszolban semlegesíti a H_2O_2 -ot aszorbát (C-vitamin) felhasználása mellett (Mano és mtsai, 2001). Szerepe esszenciális a ROS kioltásában és a sejtvédelemben, amit az is mutat, hogy tagja az ASH-GSH ciklusnak. Megnövekedett APX expresszió figyelhető meg a különböző stresszfolyamatok alatt (Gill és Tuteja, 2010). Sóstressz hatására magasabb aszorbát-peroxidáz aktivitás figyelhető meg kukoricában (Azevedo Neto és mtsai, 2006).

A gvajakol-peroxidáz enzim (GPX) olyan elektrondonorokat preferál, melyek aromásak, mint maga a gvajakol. Aktivitása függ a stressz körülményeitől és a növény fajtájától. Fontos szerepet játszik a stressz kezelésén kívül is, például a lignin bioszintézise során (Gill és Tuteja, 2010). Hosszú távú sóstressz mellett emelkedik a GPX aktivitása (Azevedo Neto és mtsai, 2006).

A glutation-reduktáz enzim (GR) egy flavo-protein oxidoreduktáz, mely része az ASH-GSH ciklusnak és esszenciális szerepet játszik a ROS elleni védelemben (Gill és Tuteja, 2010). A GR katalizálja a GSH redukcióját, ami szükséges a ciklus fenntartásához. Mivel alapvető szerepet játszik a stressztoleranciában, a GR meghatározó a növény toleranciája tekintetében. Vizsgálatok során *Cicer arietinum* L. cv. Göcke levélszövetében sóstresszt követően emelkedett glutation-reduktáz aktivitást írtak le (Eyidogan és Oz, 2005), valamint *Anabaena doliolum*ban is az enzim aktivitásának emelkedése volt megfigyelhető sóstressz következtében (Srivastava és mtsai, 2005). A GR aktivitását növelte a sóstressz kukoricában is (Azevedo Neto és mtsai, 2006).

Az antioxidáns rendszer enzimei mellett igen fontos szerepet töltenek be a változatos összetételű nem enzimátikus tagok. Az antioxidánsok esszenciális információkat hordoznak a sejt redox állapotáról, és génexpressziós változásokat befolyásolnak a sejt védelme érdekében (Gill és Tuteja, 2010).

1.3. S-metilmetionin

Az S-metilmetionin (SMM) egy kéntartalmú, természetes, nem proteinogén aminosav, ami fontos szerepet tölthet be a reaktív oxigénformák által okozott károk csillapításában. Először káposztafélékben mutatták ki (McRorie és mtsai, 1954), melyekről köztudott, hogy jól tolerálják a hidegstresszt. Azóta az összes növény családban sikerült kimutatni az SMM jelenlétét. Az SMM a kénanyagcsere igen jelentős komponense. A kén asszimilációja az aminosavak szintéziséhez és a növény növekedéséhez elengedhetetlen (Cys, Met), de emellett fontos a glutation szintéziséhez is (Jander és Joshi, 2010). A felsorolt molekulák fontos alkotói a kéntranszportnak, akárcsak maga az SMM (Bourgis és mtsai, 1999). A növényi kén- és nitrogén-anyagcsere szorosan összefüggnek.

Az S-metilmetionin az SMM-ciklus során metioninból szintetizálódik az érett levelekben. Szerepet játszik a metionin-, és S-adenozil-metionin-szintek szabályozásában, valamint fontos a metilációs folyamatokban, emellett jelentős eleme a kéntranszportnak és -raktározásnak (Bourgis és mtsai, 1999). Az SMM és AdoMet megfelelő aránya fontos a növény védekezési folyamataiban (Szegő és mtsai, 2007; Rácz és mtsai, 2008; Ludmerszki és mtsai, 2011). Az SMM különböző metilálási folyamatokban is hasznosul. Igen fontos szerepe van raktározott kénvegyületként, valamint a kén szállításában (Bourgis és mtsai, 1999). Az exogén SMM javítja a membránstabilitást és a reaktív oxigénformák eliminálásáért felelős enzimek aktivitását (Kósa és mtsai, 2011). Enyhíti az abiotikus stressz által okozott károkat azáltal, hogy elősegíti a dimetil-szulfopropionát (DMSP) szintézisét. A DMSP fontos ozmoregulátor és krioprotektáns, mely védi a sejtet és a membránokat, mint például a kloroplasztisz membránt (Kocsis és mtsai, 1998, Trossat és mtsai, 1998). Az SMM emellett stimulálja a poliaminok bioszintézisét, melyek védik a makromolekulákat (nukleinsavak, proetinek) (Lásztity és mtsai, 1992; Kissimon és mtsai, 1994; Gyetvai és mtsai, 2002). Megelőzi a lipidperoxidációt és javítja a membránstabilitást (Rácz és mtsai, 2008). Az SMM növeli az antioxidáns enzimek aktivitását (Kósa és mtsai, 2009) és elősegíti a hidegstressz által a fotoszintézisben bekövetkezett károk semlegesítését (Kósa és mtsai, 2011).

2. Célkitűzés

A magas sókoncentrációval sújtott területeken csökkent termés várható, mert a sóstressz rontja a növény fejlődését és rossz hatással van annak terméshozamára (Chen és mtsai, 2012). Több mint 800 millió hektárt érint a magas sókoncentráció az egész Föld tekintetében (FAO, 2008). Ennek fényében fontosnak tartom a sóstresszre irányuló vizsgálatokat. Az SMM-kezelést már más abiotikus stressz kivédésében is sikerrel alkalmazták (Rácz és mtsai, 2008; Kósa és mtsai, 2011, Páldi és mtsai, 2014), és természetes vegyület révén a környezetet sem károsítja.

Mivel a legtöbb növényi stresszfolyamat során fellépő oxidatív hatás egyik jól ismert velejárója, hogy károsítja a fotokémiai rendszereket, céljaim közt szerepelt F_v/F_m arány meghatározásával vizsgálni a PSII maximális kvantumhatékonyságát, hogy felmérjem a sóstressz és az SMM-kezelés hatásait a PSII működésére. A fotoszintézis hatékonyságán keresztül képet kapunk a növény általános élettani állapotáról is.

- Ennek érdekében klorofill fluoreszcencia indukciós méréseket végeztem.

Célom volt leírni az exogén SMM-kezelés hatását az antioxidáns enzimek aktivitására sóstressz körülményei között, illetve összevetni ezen értékeket a stresszmentes körülmények között nevelt növények enzimaktivitásával.

- Spektrofotométer segítségével megmértem az aszkorbát-peroxidáz (APX), gvajakol-peroxidáz (GPX) és glutation-reduktáz (GR) enzimek aktivitását.

Célom volt ezen felül az APX és a GR enzimek kifejeződéséért felelős gének expresszióváltozását összevetni az általam mért enzimkinetikai változásokkal.

- Ennek érdekében kvantitatív real time PCR (qRT-PCR) technikát alkalmaztam.

Munkám célja, hogy megvizsgáljam, és lehetőség szerint alátámasszam az SMM stressztoleranciára gyakorolt pozitív hatását sóstressz esetén.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A növénynevelés körülményei

Kísérleteim során kukoricát (*Zea mays* L., hibrid Norma) használtam. A magokat fertőtlenítés céljából 6 %-os H_2O_2 -oldatban áztattam 2 órán át, majd további 2 órán keresztül desztillált vízben duzzasztottam, gyakori kevergetés mellett. Ezt követően 3 napig, sterilizált, desztillált vízzel átitatott, szűrőpapírral bélelt Petri-csészében csíráztattam, sötétben. 3 nap elteltével a kicsírázott magokat 800 ml-es főzőpoharakban rácsra ültettem. Ezután $\frac{1}{4}\times$ Hoagland-tápoldaton neveltem tovább a növényeket fitotron kamrában, melynek körülményei: 14 óra megvilágított ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 10 óra sötét periódus, 23°C állandó hőmérséklet, ~75% relatív páratartalom.

3.2. SMM-kezelés

Az SMM-kezelést a csíráztatás fázisában végeztem. A H_2O_2 -os fertőtlenítést követően a csíráztatás során elkülönítettem két fő csoportot. Az egyik kapott SMM-kezelést, a másik (kontroll csoportok) nem. Az SMM-kezelt csoportoknál a fent leírt duzzasztás desztillált víz helyett $0,001 \text{ g dm}^{-3}$ SMM-oldatban történt, majd a csíráztatás is ugyanilyen oldattal átitatott szűrőpapíron, Petri-csészében történt. Minden egyéb nevelési körülmény ezt követően megegyezett a csoportok közt.

3.3. Sókezelés

A sókezelést 40 mM és 60 mM NaCl tartalmú $\frac{1}{4}$ Hoagland-oldattal végeztem a csíráztatástól számított 14. naptól, folyamatosan a kísérlet végéig. Vizsgálati csoportjaim a következők voltak.

- K:** kontroll csoport, nem részesült sem SMM-kezelésben, sem sókezelésben;
- Na40:** nem részesült SMM-kezelésben, de a csíráztatástól számított 14. naptól kezdve 40 mM NaCl-koncentrációjú Hoagland-tápoldaton neveltem tovább,
- Na60:** nem részesült SMM-kezelésben, de a csíráztatástól számított 14. naptól kezdve 60 mM NaCl-koncentrációjú Hoagland-tápoldaton neveltem tovább;
- S:** SMM-kezelést kapott a csíráztatás során, de sókezelésben nem volt része;
- SNa40:** SMM-kezelést kapott a csíráztatás során, majd a csíráztatástól számított 14. naptól kezdve 40 mM NaCl-koncentrációjú Hoagland-tápoldaton neveltem tovább;

SNa60: SMM-kezelést kapott a csíráztatás során, majd a csíráztatástól számított 14. naptól kezdve 60 mM NaCl-koncentrációjú Hoagland-táppoldaton neveltem tovább.

A mintavételezések a sókezelés kezdetét követő 3., 6., 9. és 12. napon történtek.

3.4. Klorofill-a fluoreszcencia indukció

A klorofill fluoreszcenciát pulzus amplitúdó modulációs készülékkel (PAM 101-102-103 Chlorophyll Fluorometer, Waltz, Effeltrich, Németország) vizsgáltam. A kivágott levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltam, hogy a PSII reakciócentrumok nyitott állapotban legyenek. Ebben a formában képesek maximálisan redukálni a Qa molekulát. Ez azért fontos, mert csak így mérhető a maximális fluoreszcencia (F_m). A mintákat nem-aktinikus fénnel rövid ideig megvilágítottam, mely során az F_m és F_0 (minimális fluoreszcencia) adatokat regisztrálja a műszer. Ezekből a paraméterekből számolható ki az F_v/F_m hányados (F_v =variábilis fluoreszcencia), mely kifejezi a PSII maximális kvantumhatékonyságát.

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

3.5. Enzimkinetikai vizsgálatok

A kinyeréshez 0,5 g levelet folyékony nitrogén segítségével dörzsmozsárban eldörzsöltem. A porított növényi anyagot centrifugacsőben 2,5 ml jéghideg 0,5 mM Tris pufferrel (pH 7,4), 3 mM $MgCl_2$ -dal és 1 mM EDTA-val alaposan vortexeltem, majd centrifugáltam (15000 g, 20 perc, 4 °C). A felülúszót Eppendorf-csövekbe tettem, majd további felhasználásig pillanatszerűen megfagyasztottam folyékony nitrogénnel és -80 °C fokon tároltam. Felhasználás előtt újra lecentrifugáltam, majd a tiszta, növényi maradéktól mentes felülúszót vizsgáltam. Az aszkorbát-peroxidáz (APX), a gvajakol-peroxidáz (GPX) és a glutation-reduktáz (GR) enzimek aktivitását mértem. Az enzimaktivitásokat fotometriásan határoztam meg (PerkinElmer, Lambda25 UV/VIS spektrométer). Mérésig a mintákat jégen tartottam, a méréseket pedig szobahőmérsékleten végeztem. A műszer segítségével megmértem az adott minta optikai denzitását 280 és 260 nm hullámhosszokon. Majd a Warburg és Christian-féle egyenlet segítségével következtettem a minta fehérjetartalmára.

$$[\text{Protein}] \text{ (mg/mL)} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$$

Az enzimaktivitásokat 1 g fehérjetartalomra vonatkoztatva 1 perc alatt okozott abszorbancia változásban adtam meg.

3.5.1. Gvajakol-peroxidáz

A gvajakol-peroxidáz enzim (EC 1.11.1.7) aktivitásának vizsgálata során, a gvajakol oxidációja nyomán bekövetkező abszorbancia növekedést 470 nm-en mértem spektrofotométer segítségével (Ádám és mtsai, 1995). A módosított reakcióelegy összetétele: 0,1 M foszfát puffer (pH 7), 45 μ M gvajakol, 15 mM H_2O_2 , 0,1 μ M EDTA és 18,75 μ l növényi minta, 750 μ l végtérfogatra számítva. A reakciót a minta hozzáadásával indítottam.

3.5.2. Aszkorbát-peroxidáz

Az aszkorbát-peroxidáz enzim (EC 1.11.1.11) aktivitását az aszkorbinsav fogyását keresztül spektrofotométer segítségével 290 nm hullámhosszon vizsgáltam (Janda és mtsai, 1999). A módosított reakcióelegy összetétele 750 μ l végtérfogatra: 0,2 M Tris puffer (pH 7,8), 0,5 mM aszkorbinsav, 0,1 μ M EDTA, 1 mM H_2O_2 és 50 μ l minta. A reakciót a minta hozzáadásával indítottam el.

3.5.3. Glutation-reduktáz

A glutation-reduktáz enzim (EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározásakor az 5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoésav) (DTNB) redukcióját mértem 412 nm-en a Smith és munkatársai (1988) által leírtak alapján. Összetétele 1 ml végtérfogatra: 75 mM Na-foszfát puffer (pH 7,5), 0,15 mM dietiléntriamin-pentaecetsav, 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG. A reakciót 100 μ l minta hozzáadásával indítottam.

3.6. Génexpresszió vizsgálata kvantitatív real-time PCR technikával

Az aszkorbát-peroxidáz enzim és a glutation-reduktáz enzim kódoló (*APX*, *GR*) géneket vizsgáltam. A primerek tervezése a primer3 (Rozen és Skaletsky, 2000) és az Oligo Analyzer 1.1.2 (© 2000-2002 Teemu Kuulasmaa) primertervező programok alkalmazásával, illetve saját kezűleg történt. Az RNS kinyeréséhez Thermo Scientific™ MagJET™ Kitet használtam. A kit segítségével össz-RNS-t nyertem ki 0,1 g növényi anyagból, a gyártó leírása alapján. A kinyerő folyamat közben végeztem DNázos emésztést. Ezt követően cDNS-t szintetizáltam 1500 ng RNS-ből kiindulva RevertAid™ M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas/Thermo) használatával. A mérés során Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) kit

felhasználásával relatív génexpressziót vizsgáltam ABI StepOne Plus (Life Technologies) készülékkel. A génexpressziós arányok meghatározására a $\Delta\Delta Ct$ módszert alkalmaztam. Két referenciagént alkalmaztam: *aktin* és *MEP* (membrane protein PB1A10.07c) (Manoli és mtsai, 2012). A Ct -értékeik mértani közepéhez viszonyítottam a vizsgált génekkel kapott Ct -értékeket.

A génexpressziós változásokat $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számoltam ki, ahol a változás mértéke $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct_{\text{kontroll}} = Ct_{\text{vizsgált gén kontroll}} - Ct_{\text{referencia gén kontroll}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kezelt}} = Ct_{\text{vizsgált gén kezelt}} - Ct_{\text{referencia gén kezelt}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{kontroll}} - \Delta Ct_{\text{kezelt}}$$

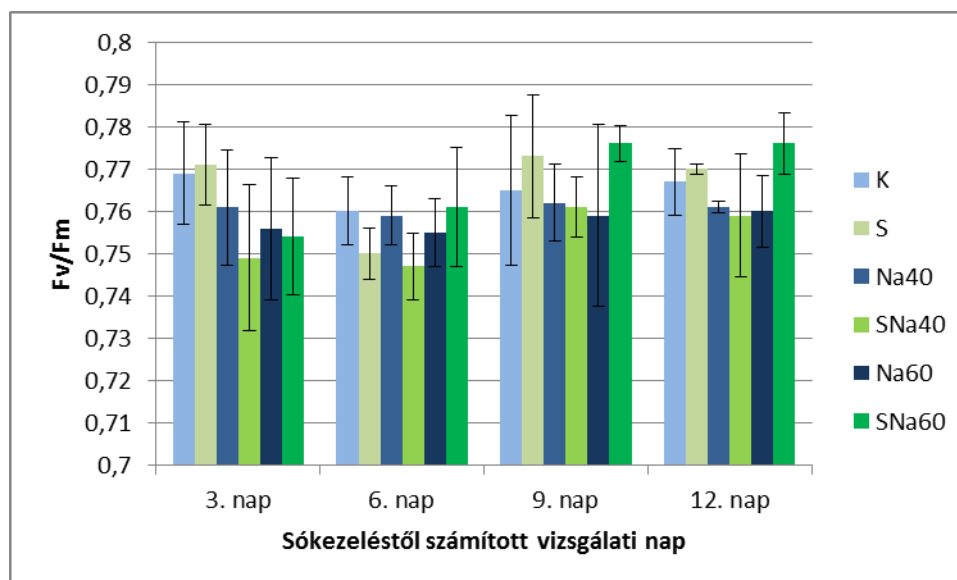
3.7. Statisztikai vizsgálatok

A statisztikai vizsgálatokhoz Student-féle T-próbát alkalmaztam. A szignifikanciaszintet (α) 5 %-ban határoztam meg. Az adatsorokat Excel 2010 programban vettem össze a t.eloszlás függvényt használva, melyhez t-táblázatból néztem ki a függvénybe illesztendő paramétert. A t.eloszlás függvény segítségével az elsőfajú hiba valószínűsége számítható ki (p). Ha p értéke meghaladja az 5 %-ot, akkor a két adatsor között szignifikáns különbség mutatható ki.

4. Eredmények

4.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció eredménye

Biotikus és abiotikus stressz hatására károsodik a fotoszintetikus apparátus, és romlik a növény általános állapota. Klorofill-a fluoreszcencia indukciós vizsgálat segítségével meghatározhatók az F_0 és F_m értékek, melyekből számíthatjuk az F_v értékét. Az F_v/F_m érték a PSII maximális kvantumhatékonyságát jellemzi, azaz a fotoszintetikus apparátus állapotáról, a fotoszintézis fényszakaszának hatékonyságáról tájékoztat, ami egyben a növény fontos élettani jellemzője. Az F_v/F_m értékek változása számos stresszhatásnál jól jellemzi a károsodás mértékét (Lichtenthaler és mtsai, 2005). A vizsgálataim során tapasztalt változásokat az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: F_v/F_m arányok változása a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon.

Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressztől mentes; SNa40: SMM-kezelt, 40 mM NaCl sóstressz; SNa60: SMM-kezelt, 60 mM NaCl sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

A 60 mM NaCl-koncentrációjú tápoldattal kezelt főcsoport az utolsó mérés során szignifikáns eltérést mutatott, a sókezeléstől számított 12. napon. Az SMM-kezeletlen tag szignifikánsan alacsonyabb értéket mutat az SMM-kezelt párjához képest. 60 mM NaCl koncentráció hosszú távú alkalmazása során az SMM-kezelés jótékony hatással van a növény fotorendszerének állapotára. Az SMM-kezelésben részesült tag magasabb F_v/F_m értéket mutat, ami jobb

állapotú fotorendszerre enged következtetni az ugyanolyan sóstresszt átélő, SMM-kezeletlen párjához képest.

A mérések során nem tapasztaltam más szignifikáns különbséget az SMM-kezelt és az SMM-kezeletlen párok között, az azonos sókoncentrációjú tápoldaton nevelt főcsoportokon belül.

Megfigyelhető azonban, hogy bár statisztikailag nem egyértelműen, de növekvő tendenciát mutatnak az SMM-kezelésben részesült növények. Szignifikáns a növekedés a már említett 60 mM NaCl-koncentrációval kezelt csoport SMM-kezelt tagjánál a 3. és 12. napok között mért értékek esetében.

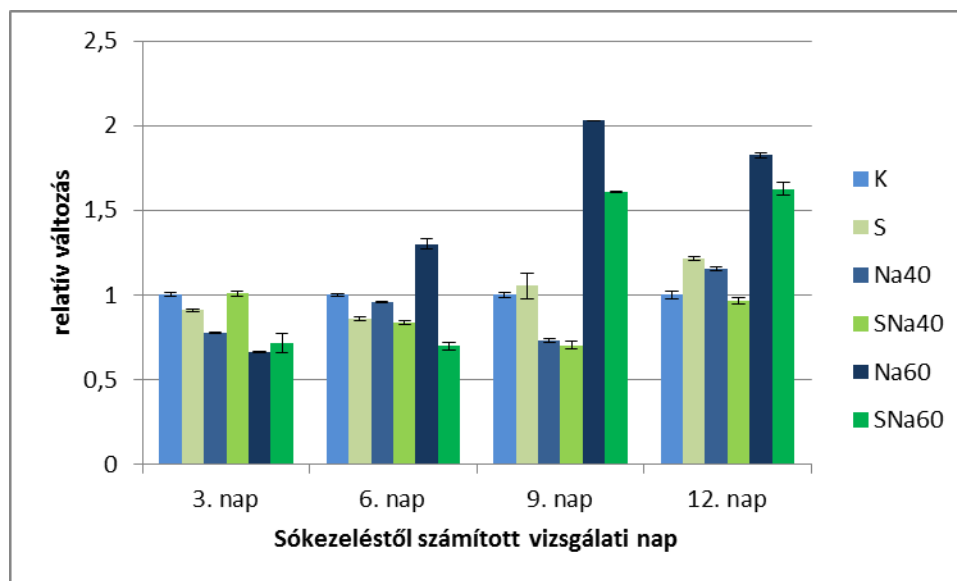
4.2. Enzimkinetikai vizsgálatok eredménye

Sóstressznek kitett növényekben a ROS képződése a fiziológiai szint fölé emelkedik (Gill és Tuteja, 2010). A képződő reaktív oxigénformák semlegesítésére és a károsodás kivédésére a növény összetett védekezési rendszerrel rendelkezik. Ez az antioxidáns rendszer, melynek fontos alkotói az antioxidáns enzimek, mint az aszkorbát-peroxidáz, a gvajakol-peroxidáz és a glutathion-reduktáz enzimek. A peroxidázok (APX, GPX) sejtszerte megtalálhatóak, és a H_2O_2 redukcióját katalizálják vízzé, miközben egy koszubsztrátot (aszkorbinsav, gvajakol) oxidálnak.

Az enzimaktivitás vizsgálata során elsősorban az SMM-kezelt és -kezeletlen mintapárok összehasonlítását végeztem, illetve az aktivitás időbeli változását követtem a sóstressz alatt.

4.2.1. Aszkorbát-peroxidáz

Az aszkorbát-peroxidáz enzim (APX) antioxidánsként szerepet játszik a stressz során képződött reaktív oxigénformák kioltásában és ebből kifolyólag a sejtvédelemben. Feltehetőleg ez a legfontosabb peroxidáz a növényekben, mely a H_2O_2 -eliminációban részt vesz. Az aszkorbát-peroxidáz enzim tagja a Halliwell-Asada-Foyer ciklusnak, mely során a ROS semlegesítéséhez aszkorbinsavat (ASH) használ koszubsztrátként. A sóstressz és SMM-kezelés hatására bekövetkező változásokat a 2. ábrán tüntettem fel.



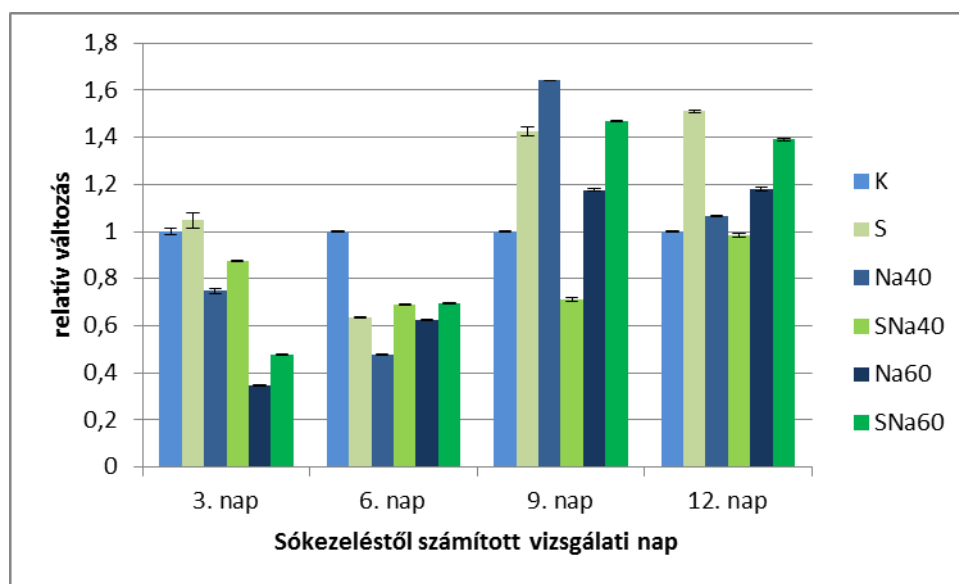
2. ábra: Az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitásának változása a kontrollhoz viszonyítva, a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon. Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

Szignifikáns különbségeket láthatunk az azonos sókezelésben részesült csoportok SMM-kezelt és SMM-kezeletlen párpai között. Az SMM-kezelés és a sókezelés hatására eleinte a kontrollhoz viszonyított alacsonyabb enzimaktivitási értékeket tapasztaltam. A kezelés során azonban kifejeződésre kerül az SMM hatása, amit a sókezelésben nem részesült kontroll csoporton és SMM-kezelt csoporton a 12. mintavételezési napon jól láthatunk.

A 9. vizsgálati napon jól látható különbséget figyelhetünk meg a 40 mM és 60 mM NaCl-sókoncentrációjú tápoldattal kezelt főcsoportok között. Amíg az enyhébb sóstressz hatása a vizsgálat végén a kontrollhoz hasonló eredményt ad, addig az erősebb stresszhatás jóval a kontroll értéke fölé emeli az enzim aktivitást. A 60 mM NaCl-koncentráció önmagában, SMM-kezelés nélkül is az APX enzim aktivitásának növekedését okozza. Ezt az emelkedést mérsékli az SMM-kezelés 40 mM és 60 mM NaCl által kiváltott sóstressz esetében.

4.2.2. Gvajakol-peroxidáz

A gvajakol-peroxidáz (GPX) szerepe többek közt a stresszfolyamatok ellensúlyozása azáltal, hogy felemésztí a keletkezett hidrogén-peroxidot. A gvajakol-peroxidáz enzim olyan elektron-donorokat preferál, melyek aromásak, mint a gvajakol. A GPX aktivitása meglehetősen függ a stressz körülményeitől és a növény fajától. (Gill és Tuteja, 2010). A GPX az egyik legfontosabb H₂O₂-kioltó enzim, ami számos vízinövény sótoleranciájáért felel (Rout és Shaw, 2001). A kukoricán végzett vizsgálataim adatai a 3. ábrán láthatók.



3. ábra: A gvajakol-peroxidáz enzim aktivitásának változása a kontrollhoz viszonyítva, a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon. Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressztől mentes; SNa40: SMM-kezelt, 40 mM NaCl sóstressz; SNa60: SMM-kezelt, 60 mM NaCl sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

Adott vizsgálati napokon az aktivitási különbségek szignifikánsnak bizonyultak az azonos sóstresszben részesült csoportok tagjai között és egymás közt is.

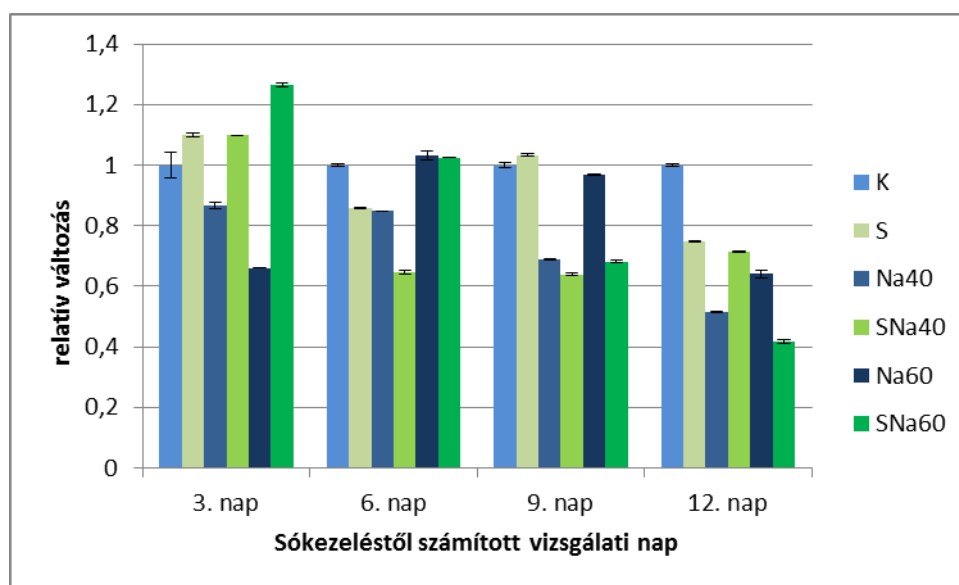
A sókezelés és az SMM-kezelés eleinte csökkenő értékeket váltott ki a növények GPX-aktivitásának tekintetében. Ez a csökkenés a vizsgálat folyamán növekvő tendenciára változott a vizsgálati idő előrehaladtával. Az SMM-kezelés sóstressz hiányában különösen növelte a GPX aktivitását.

Hosszú távon különbséget tapasztaltam a 40 mM és 60 mM NaCl segítségével kiváltott stressznek a GPX aktivitására gyakorolt hatásában. Az enyhébb stressz a kontroll értékéhez hasonló eredményeket adott, míg az erősebb stresszhatás meghaladta a kontroll értékét.

Az SMM-előkezelés különbözőképpen változtatta meg az enzim aktivitását 40 mM és 60 mM NaCl jelenléte esetén. A 40 mM sóval kezelt növényeknél a 3. és 6. mintavételezési napon az SMM növelte az enzim aktivitását, de a továbbiakban csökkentette azt. A 60 mM sóval kezelt csoport tagjainál minden esetben magasabb értékeket mértem SMM-előkezelés hatására.

4.2.3. Glutation-reduktáz

A glutation-reduktáz (GR) egy flavoprotein-oxidoreduktáz enzim. Része az aszkorbát-glutation (Halliwell-Asada út) ciklusnak és esszenciális szerepet játszik a ROS elleni védelemben, többek közt azzal, hogy katalizálja a GSH redukcióját, ami szükséges a ciklus fenntartásához. Mivel alapvető szerepet játszik a stressztoleranciában, ezért meghatározó a növény általános védekezésében. A GSH segít a fotoszintetikus rendszereket megvédeni az oxidatív károsodással szemben (Gill és Tuteja, 2010). A sóstressz és SMM-kezelés által kiváltott aktivitásváltozás a 4. ábrán látható.



4. ábra: A glutation-reduktáz enzim aktivitásának változása a kontrollhoz viszonyítva, a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon. Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressztől mentes; SNa40: SMM-kezelt, 40 mM NaCl sóstressz; SNa60: SMM-kezelt, 60 mM NaCl sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

Az egyes vizsgálati napon mért értékek szignifikáns eltéréseket mutattak adott SMM-kezelt és SMM-kezeletlen párok között.

A csíráztatáskor alkalmazott SMM-kezelés az első mintavételezés során emelkedett glutation-reduktáz aktivitásról árulkodott, mind a kontrollhoz képest, mind pedig adott csoport SMM-kezeletlen tagjához viszonyítva. Hosszú távon azonban a vizsgált minták mindegyike a kontrollhoz képest alacsonyabb enzimaktivitást produkált.

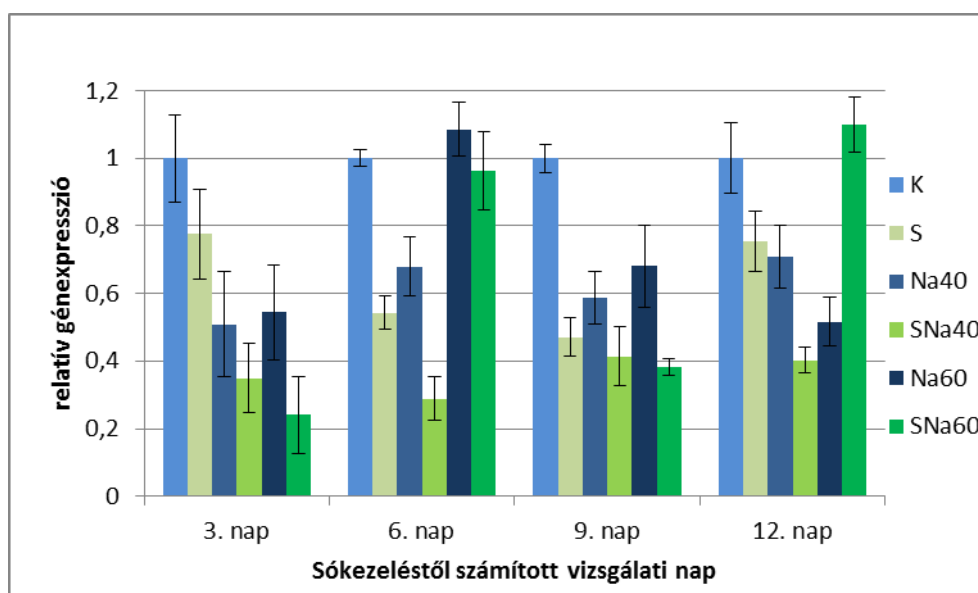
Nem találtam olyan feltűnő különbséget a 40 mM és 60 mM NaCl-kezelésben részesült csoportok között, mint a peroxidáz enzimek esetében.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok eredménye

Munkám során igyekeztem összefüggéseket találni az irodalomban fellelhető, illetve az általam leírt enzimaktivitás és az enzimet kódoló génexpressziós változásai között. A külső jelek érzékelésétől a válaszig nagyon hosszú és bonyolult folyamatok játszódnak le a sejtben. Az enzim aktivitásának növekedését és csökkenését nem biztos, hogy hasonlóan emelkedő vagy csökkenő génexpresszió előzi meg. Nem szabad figyelmen kívül hagyni például a poszttranszkripció és poszttranszláció módosulások lehetőségét a rendszer szabályozásában.

4.3.1. Az aszkorbát-peroxidáz enzim génje

Az aszkorbát-peroxidáz enzim génjének (APX) sóstressz és SMM-kezelés következtében tapasztalt változásait az 5. ábra mutatja be.



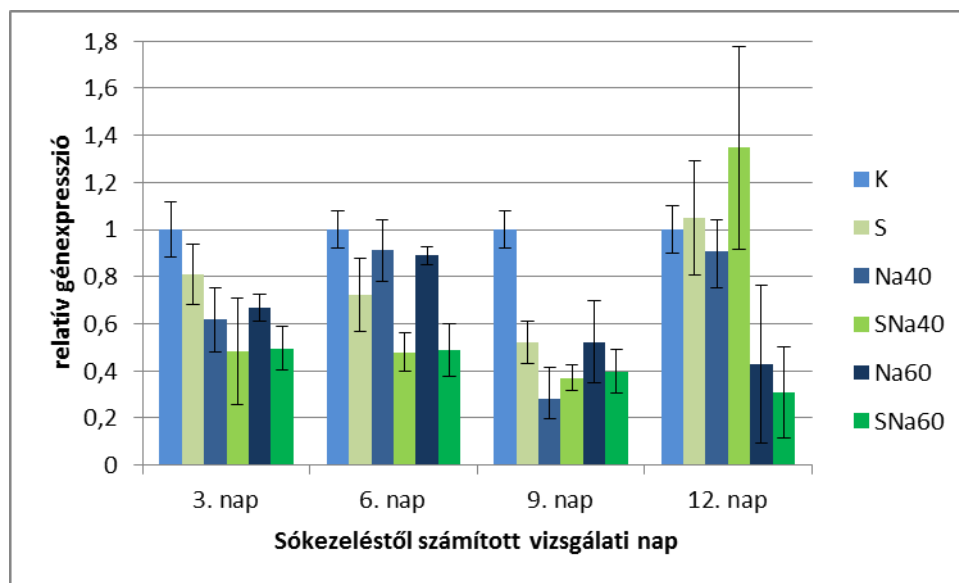
5. ábra: Az aszkorbát-peroxidáz enzim génjének (APX) expresszióváltozása a kontrollhoz viszonyítva, a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon. Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressztől mentes; SNa40: SMM-kezelt, 40 mM NaCl sóstressz; SNa60: SMM-kezelt, 60 mM NaCl sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

Csökkenést tapasztaltam a sókezelés és az SMM-kezelés következtében a kontroll csoporthoz képest. Végig a kontroll csoport APX kifejeződését jelző értékei bizonyultak a legmagasabbnak. Az SMM-kezelt csoport, amely nem szenvedett sóstresszt, végig szignifikánsan alacsonyabb génexpressziót mutatott a kezeletlen kontrollhoz képest. A legalacsonyabb értéket az első vizsgálati napon a 60 mM NaCl-koncentrációjú tápoldaton nevelt és SMM-kezelést is kapott növények esetében figyeltem meg (a kontroll értékének 1/5-e). Hosszabb távon azonban ez a kezelés erőteljes növekedést mutat.

Megfigyelhetjük a fő sókezelési csoportok (40 mM, 60 mM) közti szétválást, de ez ingadozó, és nem olyan egyértelmű, mint az enzimkinetikai vizsgálatok során.

4.3.2. A glutation-reduktáz enzim génje

A glutation-reduktáz enzim génjének (GR) kifejeződésében leírt változásokat a 6. ábrán tüntettem fel.



6. ábra: A glutation-reduktáz enzim génjének (GR) expresszióváltozása a kontrollhoz viszonyítva a a sókezelés kezdetétől számított 3., 6., 9. és 12. napokon. Elnevezések: K: kontroll; Na40: 40 mM NaCl sóstressz; Na60: 60 mM NaCl sóstressz; S: SMM-kezelt, sóstressztől mentes; SNa40: SMM-kezelt, 40 mM NaCl sóstressz; SNa60: SMM-kezelt, 60 mM NaCl sóstressz. A jelzett eltérés: *standard deviation*.

A vizsgálatok során egyik minta génexpressziója sem haladja meg szignifikáns mértékben a kontroll értékeit, inkább a génkifejeződés csökkenése figyelhető meg.

Az enyhébb és erősebb stresszhatás következményei nem egyértelműek, ingadozó értékeket tapasztaltam. Azonban szignifikáns különbséget találtam a hosszú távú erős sóstressz hatására az SMM-kezelésben részesült minták között. A 40 mM NaCl-koncentrációjú tápoldattal kezelt növények GR enzimet kódoló génjének aktivitása szignifikánsan magasabb értékeket mutatott, mint a 60 mM NaCl-dal kezelt növényeknél.

5. Eredmények értékelése

Vizsgálataim során szerettem volna megtudni, hogy SMM-előkezeléssel csillapítható-e a sóstressz miatt bekövetkező károsodás. Ennek érdekében vizsgáltam a növény fotoszintézisében, és az antioxidáns rendszert alkotó enzimek (aszcorbát-peroxidáz, gvajakol-peroxidáz és glutation-reduktáz) aktivitásában bekövetkező változásokat. Emellett megvizsgáltam az APX és GR enzimeket kódoló gének expressziójában bekövetkezett változásokat.

A kutatás során felhasznált kukorica hibrid sótoleranciája ismeretlen volt. Ezért vizsgáltam egy koncentrációsort 0, 40, 60 és 100 mM NaCl tartalmú tápoldattal. A 100 mM koncentráció – amelyet Azevedo Neto és munkatársai (2006) alkalmaztak – már letálisnak bizonyult, ezért választottam a 40 és 60 mM töménységeket. Meloni és mtsai, (2003) munkájával ellentétben, nem hozzászoktatás-szerűen adtam a tápoldathoz az egyre növekvő mennyiségű sót, hanem az első kezeléstől kezdve a megszabott 40 mM vagy 60 mM került felhasználásra.

5.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció eredményének tárgyalása

A mérések során kevés szignifikáns különbséget tapasztaltam a minták között, ahogyan az 1. ábra mutatja. Kósa és munkatársai, (2011) hasonló tapasztalatokat írtak le, azaz az SMM-kezelésben részesült csoport és a kezeletlen csoport F_v/F_m arányai átfednek egymással, hogyha nem érte a növényeket abiotikus stresszhatás. Az SMM-kezelésben részesült tagok (S, SNa40, SNa60) látszólag magasabb F_v/F_m értéke jobb állapotú fotorendszerre engedne következtetni.

Sóstressz hatására az F_v/F_m arány értéke valamelyest csökken, de a Kósa és munkatársai (2011) által alkalmazott abiotikus stressz hatására (hidegstressz) az F_v/F_m arány csökkenése nagyobb volt (0,1).

Az egyetlen kivételt az 1. ábrán, a 60 mM NaCl-koncentrációjú tápoldattal kiváltott sóstressz alkalmazása során figyeltem meg a 12. vizsgálati nap alkalmával. Szignifikánsan magasabb F_v/F_m arányt mértem az SMM-kezelésben részesült növények (SNa60) klorofill-a fluoreszcencia indukciós vizsgálata során, az SMM-kezeletlen (Na60) növényekhez képest. Ennek hátterét képezheti, hogy hosszú távú, erős stressz mellett az SMM megelőzi a lipidperoxidációt és javítja a membránstabilitást (Rácz és mtsai, 2008), ami a fotoszintézisnek teret adó kloroplasztisz szempontjából kardinális. Hidegkezelt kukoricában is megfigyelhető

volt a fotoszintetikus aktivitás javulása SMM adása esetén (Kissimon és mtsai, 1994, Kósa és mtsai, 2011, Páldi és mtsai, 2014).

Korábban már leírták az SMM sótoleranciára gyakorolt jótékony hatását (Trossat és mtsai, 1998). Ennek háttérében az állhat, hogy az SMM részt vesz a dimetil-szulfopropionát (DMSP) szintézisében. Ez a molekula azért kulcsfontosságú, mert ozmoprotektáns funkciója (Trossat és mtsai, 1998) mellett gyökkioltó hatással is bír, tehát ozmotikus és oxidatív stressz kivédése során is hasznos (Gyetvai és mtsai, 2002).

Megfigyelhető, hogy statisztikailag ugyan nem egyértelműen, de jól láthatóan növekvő tendenciát mutatnak az SMM-kezelésben részesült növények (S, SNa60) F_v/F_m értékei. Ennek oka lehet, hogy az SMM stimulálja a poliaminok bioszintézisét, melyek védik a makromolekulákat (nukleinsavak, proetinek) (Lásztity és mtsai, 1992; Kissimon és mtsai, 1994; Gyetvai és mtsai, 2002).

5.2. Enzimkinetikai és génexpressziós vizsgálatok eredményének tárgyalása

A szakirodalom leginkább az antioxidáns enzimek aktivitásával foglalkozik, kevés az olyan, kukoricával foglalkozó tanulmány, ahol az aszkorbát-peroxidáz vagy a glutation-reduktáz enzimeket kódoló gének expressziójának változásáról is írnának.

5.2.1. Aszkorbát-peroxidáz

A sóstressz hatására az első vizsgálati napon (az első sókezeléstől számított 3. napon) a kontrolléhoz képest alacsonyabb enzimaktivitási értékeket mértem (2. ábra). Ahogy vártam, az enyhébb stressz (Na40) mérsékeltebb csökkenést eredményezett, mint a magasabb sókoncentráció (Na60).

A további kezelés során az eleinte tapasztalt csökkenés egy hosszú távon megfigyelhető növekvő tendenciát mutatott (Na40, Na60). Ez alátámasztja az Azevedo Neto és munkatársai (2006) által leírt emelkedést az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitásában sóstressz hatására. A peroxidáz enzimek aktivitás növekedésének mértéke függ a stressz erősségétől és időtartamától (Sudhakar és mtsai, 2001), amit az eredményeim jól mutatnak. A kezdeti enyhe csökkenéshez gyengébb növekedés párosul (Na40), míg a Na60 minta az utolsó vizsgálatok alkalmával a kontroll enzimaktivitásának kétszeresét mutatja.

Az enzimaktivásban tapasztalt különböző mértékű válasz (Na40 és Na60 között) oka lehet, hogy a 40 mM NaCl-koncentráció még nem jelentős stressz a Norma hibrid számára. Ezt alátámasztja az utolsó vizsgálat során tapasztalt, a kontrolléhoz igen hasonló érték. Ezzel

szemben a 60 mM NaCl-sótartalmú tápoldattal kiváltott stressz markánsabb választ indukált a kukoricában.

A legtöbb enzimkinetikai vizsgálat során azonban legtöbbször szenzitív és toleráns növények összehasonlítását végzik és a peroxidáz aktivitás általában a toleráns típusban jelentősebb növekedést mutat (Azevedo Neto és mtsai, 2006). Korábban leírták már a toleráns és a szenzitív típusok különböző reakcióját sóstressz alatt. Meloni és munkatársai (2003) megfigyelték, hogy a toleráns típusban nőtt a peroxidázok aktivitása, míg az érzékeny típusban nem változott az aktivitás a kontrollhoz képest. Hernandez és mtsai, (2000) által végzett vizsgálatok során sem változott meg az érzékeny növény aszkorbát-peroxidáz aktivitása.

Szignifikáns különbségeket láthatunk az azonos sókezelésben részesült főcsoportok SMM-kezelt és SMM-kezeletlen párpai között (2. ábra). Az első vizsgálatok alkalmával azt tapasztaltam, hogy az SMM-kezelt növények aszkorbát-peroxidáz aktivitása a kontrollhoz képest alacsonyabb értékeken marad, függetlenül a sóstressztől. A kukorica APX enzimaktivitása alapján enyhe stresszként élte meg az SMM-kezelést, akár a hidegstressz-toleranciájának vizsgálata során (Rácz és mtsai, 2008). Az SMM-kezelésben részesült növények (S, SNa40, SNa60) enzimaktivitásának csökkenése enyhébb volt SMM-kezeletlen (Na40, Na60) párjukhoz képest. Az SNa40 minta aktivitásának változása nem olyan nagy, mint a 60 mM NaCl-tartalmú tápoldaton nevelt és SMM-előkezelésben részesült csoporté.

A hosszan tartó, erős stressz következtében kimutatható aszkorbát-peroxidáz aktivitás növekedést a csíráztatáskor alkalmazott SMM-előkezelés kissé enyhítette. Ennek hátterében az is lehet, hogy az SMM megelőzi a lipidperoxidációt és javítja a membránstabilitást (Rácz és mtsai, 2008), valamint elősegíti a DMSP szintézisét (Trossat és mtsai, 1998). Ezek következtében a növényt kisebb károsodás éri, hiszen a DMSP ozmoprotektáns és gyökkioltó hatással is bír (Gyetvai és mtsai, 2002), ezért a növény alacsonyabb enzimaktivitás-növeléssel is kezelni tudja a sóstresszt.

Ahogy az adatok vitatása során megfigyelhető, a szakirodalom bővelkedik enzimkinetikai vizsgálatokban, melyek a stresszhatások hátterét kutatják. Azonban meglepően kevés szakirodalom szól az enzimkinetikai változások hátterében rejlő génexpressziós és egyéb szabályozásbeli módosulásról. Ennek érdekében erre irányuló vizsgálatokat is végeztem.

Az első génexpressziós vizsgálat során a kontroll értékéhez képest csökkenést tapasztaltam minden kezelési típusnál (5. ábra). Az első szembetűnő különbség az enzimkinetikai adatokhoz képest, hogy a 40 mM és 60 mM NaCl-sókoncentráció hatására a génexpressziós csökkenés az első vizsgálati napon nem mutat arányosságot a sóstressz mértékével (Na40,

Na60). Az aszkorbát-peroxidáz enzimkinetikai vizsgálata során az erősebb stresszhatás az első vizsgálat során nagyobb csökkenést vont maga után.

Végig a kontroll csoport APX kifejeződését jelző értékei bizonyultak a legmagasabbnak az 4. ábra szerint, azaz mindenfajta kezelés a génexpresszió csökkenését eredményezte. A legmagasabb értékek (Na60, SNa60) sem mutattak a kontrollénál szignifikáns mértékben nagyobb génkifejeződést.

Az SMM-kezelés hatására az enzimkinetikai vizsgálatok során tapasztalt pozitív hatás fényében alacsonyabb génexpressziós aktivitást vártam, mint a sóstresszelt csoportok vizsgálatánál. SMM antioxidáns védelmével kapcsolatban várt pozitív hatást igazolja, hogy csökken az aszkorbát-peroxidáz génjének expressziója. Ennek a hátterében lehet olyan mechanizmus, mely következtében a növény nem igényel ugyanolyan mértékű génátíródást hasonló fokú antioxidáns védelem eléréséhez, ilyen esetben előfordulhat, hogy nem a génexpresszió, hanem a rendelkezésre álló enzimek aktivitásának változása képezi a szabályozás fő módját.

Az SMM-kezelés hatására sóstressz mellett komoly csökkenést és (főként SNa60 esetében) ingadozást írtam le. Az utolsó vizsgálatok alkalmával azt találtam, hogy az SNa40 génexpressziós értékének változása megállt a kontroll értékének 40%-ánál.

A legalacsonyabb értéket az SNa60 minta mutatta (5. ábra), az első vizsgálat során, amikor a kontrollhoz viszonyítva körülbelül az ötödére csökkent az aszkorbát-peroxidáz génjének kifejeződése. Ugyanez a minta az utolsó vizsgálat alkalmával meghaladta a kontroll értékét, jelentős génexpressziós növekedést mutatva a kezdethez képest. SMM-kezeletlen párja (Na60) ekkor a kontroll mintában tapasztalt génexpresszió körülbelül 50 %-át mutatja.

5.2.2. Glutation-reduktáz

A sóstressz hatására a stressz mértékével egyenesen arányos csökkenést figyeltem meg a glutation-reduktáz aktivitásában (4. ábra: Na40, Na60).

A vizsgálatok során azt figyeltem meg, hogy 40 mM NaCl-os tápoldat mellett egyenletesebb az enzim aktivitásának csökkenése, míg 60 mM NaCl-os kezelésnél sokkal inkább ingadozó a leírt változás. A stressz mértékétől függetlenül (40 mM, 60 mM NaCl) megfigyeltem, hogy a vizsgálat végéig egyik minta aktivitása sem haladta meg tartósan a kontroll értékét (S, Na40, SNa40, Na60, SNa60). Nem találtam olyan feltűnő különbséget a 40 mM és 60 mM NaCl-kezelésben részesült csoportok között a 4. ábrát vizsgálva, mint a peroxidáz enzimek esetében.

Többen leírták, hogy a sótoleráns jelleg emelkedett GR-aktivitással párosul (Hernandez és mtsai, 2000; Sudhakar és mtsai, 2001; Meloni és mtsai, 2003). Ez alapján feltételezem, hogy a Norma hibrid érzékeny sóstresszre. Sóstressz során a toleráns növényben nagyobb GR-aktivitás volt megfigyelhető a kontrollhoz képest, míg a szenzitív növényben nem volt szignifikáns változás (Hernández és mtsai, 2000; Meloni és mtsai, 2003), azonban így felmerül a kérdés, hogy mitől csökkent az aktivitás a mérés során.

A mérések során feltűnt, hogy az SMM-kezelés szignifikánsan növelte a glutation-reduktáz aktivitását az első vizsgálati napon. Ez a kezdeti emelkedés azonban hamar csökkenő aktivitássá alakult, mindhárom SMM-kezelt típusnál (S, SNa40, SNa60).

Sudhakar és munkatársai (2001) leírták, hogy a GR aktivitásának növekedése GSH akkumulációt indukál és ebből kifolyólag toleranciát segít elő. Ez azért fontos, mert a GSH és GR közti kapcsolat mellett könnyen előfordulhat, hogy kapcsolat van az SMM és a GSH képződése között is. Mindketten fontos szerepet játszanak a növényi kénanyagcserében, akárcsak a hasonlóan fontos kénvegyület (DMSP). A DMSP vizsgálatait során korábban már leírták a kapcsolatot az SMM vegyülettel (Trossat és mtsai, 1998).

Hasonlóan az aszkorbát-peroxidáz vizsgálatához, a glutation-reduktáz enzim vizsgálata során is fontosnak tartottam a génexpressziós változások nyomonkövetését.

A vizsgálatok során egyik minta génexpressziója sem haladja szignifikáns mértékben a kontroll értékeit, inkább a génkifejeződés csökkenése figyelhető meg (6. ábra). Ez a csökkenő tendencia megegyezik azzal, amit az enzimkinetikai vizsgálatok is mutattak.

A glutation-reduktáz génexpressziós vizsgálata során az első mérésnél a kontroll értékéhez képest, alacsonyabb szintű génkifejeződést tapasztaltam minden mintánál a 6. ábrán. Ezzel szemben a 4. ábrán megfigyelhető növekedés az SMM-kezelt csoportoknál, ami a kezelés priming hatását sejteti. Feltételezem, hogy a génexpresszió növekedése, ami az enzimkinetikában történő növekedést okozta, időben korábban jelentkezett, ezért nem mutattam ki az adott vizsgálati időpontban. A vizsgálatok során látható, hogy a génexpressziós csökkenés időben eltolva megjelenik az enzimkinetikai változásokban is.

A sókezelésben részesült növények (Na40, Na60) GR expressziója többé-kevésbé együtt mozog, szignifikáns különbséget nem figyeltem meg közöttük. Az enyhébb és erősebb stresszhatás következményei nem egyértelműek, ingadozó értékeket tapasztaltam.

Azokban a növényekben, melyek SMM-kezelésben részesültek (SNa40, SNa60) kissé markánsabb csökkenést tapasztaltam a glutation-reduktáz génjének kifejeződése tekintetében. A sókezeléstől számított 12. napon azonban szignifikáns szétválás látható SNa40 és SNa60 minták között. SNa40 génexpressziós szintje körülbelül megegyezik a kontroll mintáéval, míg

SNa60 a legalacsonyabb értéket mutatja az egész vizsgálati csoportban. A fentiek tükrében azt feltételezhetjük, hogy későbbi időpontban végzett enzimkinetikai vizsgálatok igazolnák a génexpresszióban leírt változásokat. Az SMM-kezelés priming hatását sikeresen kimutattam az enzimkinetika során a 3. napon, továbbá a 40mM NaCl-dal kezelt csoport esetében SMM-kezelés hatására a 12. napon növekvő génexpressziót figyeltem meg. Ebből feltételezem, hogy az erősebb sóstressz hatására is növekedés következhet be hosszabb távon, tekintve az erősebb priming hatást, amit a 4. ábrán a 3. vizsgálati napon láthatunk. Ennek alátámasztására további vizsgálatokra van szükség.

Ha figyelembe vesszük, hogy a GR fontos szerepet tölt be az abiotikus stressz elleni védekezésben (Gill és mtsai, 2013) és ismert a szerepe rizsben a sóstresszre adott válaszban (Wu és mtsai, 2013), valószínűsíthető, hogy a kísérletben alkalmazott hibrid kukorica tulajdonságai közé tartozik az enzim alacsonyabb szintű kifejeződése, akár erős sóstressz esetén is.

5.2.3. Gvajakol-peroxidáz

A vizsgálat során arra figyeltem fel, hogy a sóstressz eleinte a kontroll értéke alá szorítja a mintákban mérhető gvajakol-peroxidáz aktivitást. A kontroll értékét meghaladó aktivitást csak a 9. vizsgálati naptól kezdve tapasztaltam (3. ábra: Na40, Na60). Korábbi eredmények szerint a GPX aktivitása nőtt sóstressz hatására kukorica levelében (Azevedo Neto és mtsai, 2006).

Az alacsonyabb sókoncentráció következtében leírt változások jelentősebb ingadozást mutatnak (Na40), ami végül a kontroll értékével megegyező aktivitást jelez. A magasabb sókoncentráció következtében a vizsgálati idő előre haladtával egy közel lineáris emelkedést figyeltem meg a gvajakol-peroxidáz aktivitásában (Na60), mely a kontrollhoz képes +20% növekedésnél stagnálni látszik. A növekedés mértéke függ a stressz erősségétől és időtartamától, hasonlóan Sudhakar és munkatársai (2001) eredményeihez.

A sóstressz vizsgálata során alkalmazott érzékeny és toleráns növényeknél ugyanaz a jelenség figyelhető meg gvajakol-peroxidáz enzim aktivitása tekintetében, mint az aszkorbát-peroxidáz enzimnél. E szerint a toleráns növények GPX aktivitását emeli a sóstressz, míg az érzékeny típusoknál ez nem mondható el. A szenzitivitás hátterében állhat az a tény, hogy nincs emelkedett peroxidáz általai sejtvédelme a növénynek (Meloni és mtsai, 2003; Azevedo Neto és mtsai, 2006).

A vizsgálat elején tapasztalt aktivitáscsökkenést enyhítette, ha csíráztatáskor SMM-kezelésben részesült a növény (3. ábra). Az SMM-előkezelés hatására sóstressz hiányában (S) a gvajakol-peroxidáz enzim hosszú távon növekedést mutat, ami a kontroll értékének a másfélszeresét éri el.

A 40 mM NaCl alkalmazásával kiváltott sóstressznél (Na40) leírt ingadozást csillapítja az SMM-kezelés (SNa40), és az enzim aktivitásának növekedését indukálja, elérve az utolsó mérés során a kontroll értékét.

Később az erősebb stresszhatás önmagában is a kontrollnál magasabb értékeket produkált (Na60), de SMM-előkezeléssel ez az aktivitásnövelés még nagyobb (SNa60).

6. Összefoglalás

A kukorica (*Zea mays* L.) az egyik legfontosabb haszonnövény, amit az ember valaha termesztett. Nem csupán élelmezési célokra használjuk, hanem többek közt bioüzemanyag előállítására is. Azonban világszerte csökkentik a termésmennyiségét az abiotikus és biotikus stressz legkülönbözőbb formái, köztük a sóstressz, e növekvő jelentőségű stresszhatás. A sóstressz gátolja a növények fejlődését, növekedését és csökkenti a növények terméshozamát. Az abiotikus stressz kivédésére korábban sikerrel alkalmazták a S-metilmetionin (SMM) nevű természetes kénvegyületet. Felmerül a kérdés, hogy az SMM segítségével növelhetjük-e a kukorica sótoleranciáját?

A kérdés megválaszolása céljából, a sókezelést követően megvizsgáltam az SMM-kezelt és az előkezelésben nem részesült növények fotokémiai rendszerének állapotát, három antioxidáns enzim aktivitásában bekövetkező változásokat és két enzim esetében az őket kódoló gén expressziójában bekövetkező változásokat. A fotoszintetikus hatékonyság vizsgálatához klorofill-a fluoreszcencia indukciós vizsgálatokat végeztem. Az enzimek aktivitását fotometriásan vizsgáltam, míg a génkifejeződés méréséhez qRT-PCR technikát alkalmaztam. Eredményeim alapján a fotoszintézist csak hosszú távú, erős stresszhatás során befolyásolta az SMM, de akkor szignifikáns emelkedést mutatott a kezeletlen mintához képest.

A sóstresszt és az SMM-kezelést eleinte az APX és GPX enzimek aktivitásának csökkenése követte, de hosszú távon növekszik a peroxidázok aktivitása. Kontrollnál magasabb értékeket csak a 60 mM NaCl erősségű sóstressz váltott ki. Eleinte az SMM-kezelés emelte a GR enzim aktivitását, de a vizsgálat végére egyik minta GR aktivitása sem haladta meg a kontroll mintában mért enzimaktivitást. A különböző erősségű sóstresszek hatására nem találtam jelentősebb eltérést a GR aktivitásában.

A génexpresszióban eleinte jelentkezik az enzimkinetikai mérések során tapasztalt csökkenés, de végig a kontroll csoport APX kifejeződését jelző értékei bizonyultak a legmagasabbnak, azaz mindenfajta kezelés az APX kifejeződésének csökkenését eredményezte.

A legmagasabb értékek (Na60, SNa60) sem mutattak a kontrollénál nagyobb génkifejeződést. A GR génexpressziójának vizsgálata során egyik minta sem haladja meg szignifikáns mértékben a kontroll értékeit, inkább a génkifejeződés csökkenése figyelhető meg. Ez a csökkenő tendencia megegyezik azzal, amit az enzimkinetikai vizsgálatok is mutattak.

A sókezelésben részesült növények (Na40, Na60) GR expressziója többé-kevésbé együtt mozog, szignifikáns különbséget nem figyeltem meg közöttük.

A sókezeléstől számított 12. napon azonban szignifikáns szétválás látható az SNa40 és SNa60 minták között. Az SNa40 génexpressziós szintje körülbelül megegyezik a kontroll mintáéval, míg az SNa60 a legalacsonyabb értéket mutatja az egész vizsgálati csoportban.

Kutatásommal sikerült alátámasztanom, hogy az SMM erős stresszhatás esetén növeli a peroxidáz enzimek aktivitását, ami fontos a növény antioxidáns védelme céljából. Emellett a fotoszintetikus apparátus védelmét is sikerült kimutatnom hosszú távú sóstressz során.

7. Summary

Maize (*Zea mays* L.) is one of our most important crop plants. It is used not only as a food source but also for biofuel production, among others. However, its yield falls short of expectations worldwide due to different abiotic and biotic stressors including salt stress, which is of growing interest. Salt stress inhibits plants' development and decreases their growing and yield. Since S-methylmethionine (SMM) has been successfully applied for alleviation the symptoms of abiotic plant stress, the question was raised whether SMM could increase the stress tolerance of maize against salt stress, too?

Aiming to answer this question, I studied the state of the photochemical system, the activity of three important antioxidant enzymes and the expression of antioxidant enzyme genes of salt-stressed and control young maize plants, either SMM-pretreated or not. Chlorophyll a fluorescence induction was used for determining the photosynthesis efficacy, while photometric measurements and qRT-PCR experiments were applied for monitoring the activity and the gene expression of some important antioxidant enzymes, respectively.

According to my results, photosynthesis was positively affected by SMM only under a longer and strong salt stress, as significant increase was found in the SMM-pretreated plants' values in this condition. Salt stress and SMM-treatments were followed by activity decrease of APX and GPX enzymes in the first measurements points, though peroxidase activities increased in a longer time course. GR activity was initially increased by SMM but later all treatments, including stronger and weaker salt stress, caused a drop in the activity of GR enzyme, contrasting to the control.

During the gene expression studies I experienced low or equal activities in the treated plants in contrast to the untreated control. According to the APX gene activity, all treatments caused more or less decrease, during the whole experiment, including the values of SMM-pretreated and -untreated plants stressed with a higher concentration of salt.

The situation is similar in the gene expression study of GR, where the values of the treated plants rather lag behind the control similar to the GR enzyme activity results. Salt stressed plants showed more or less identical expression, without significant differences till the 12th day of experiment when a significant break appeared between the plants stressed with lower and higher salt concentration.

According to my results, SMM could increase the activity of some peroxidase enzymes and also could save the photosynthetic apparatus during a long and strong salt stress, what are crucial points in the antioxidant and general defence of plants.

Irodalomjegyzék

- Ádám A, Bestwick CS, Barna B, Mansfield JW (1995): Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta*. 197: 2410-2419.
- Amtmann A, Sanders D (1999): Mechanisms of Na⁽⁺⁾ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29: 75–112.
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Filho JE, Braga de Abreu CE, Gomes-Filho E (2006): Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 56(1): 87–94.
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Douglas AG, Hanson AD (1999): S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11: 1485–1498
- Chen J, Cheng T, Wang P, Liu W, Xiao J, Yang Y, Hu X, Jiang Z, Zhang S, Shi J (2012): Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*. *Journal of Proteomics* 75: 5226-5243
- Conde A, Chaves MM, Gerós H (2011): Membrane Transport, Sensing and Signaling in Plant Adaptation to Environmental Stress; *Plant Cell Physiol.* 52(9): 1583–1602
- Eyidogan F, Oz MT, (2005): Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 29: 485-493.
- FAO (2008): FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/>. (2014.)
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013): Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.
- Gill SS, Tuteja N (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA, (2005): Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32: 481-494.
- Gyetvai E, Rácz I, Lásztity D, Szalai G, Janda T, Marton L, Horváth E, Páldi E (2002): Effect of S-methylmethionine as a protective compound on the metabolism of agricultural plants at low temperature. *Acta Biologica Szegediensis*, 46: 3-4.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312-322.
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000): Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853–862.

- Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208: 175-180.
- Jander G, Joshi V (2010): Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Mol Plant* 3: 54–65
- Kissimon J, Lásztity D, Páldi E (1994): Effect of S-methylmethionine on cold tolerance of inbred maize lines. *Biol. Plant*. 36: 146.
- Kocsis MG, Nolte KD, Rhodes D, Shen TL, Gage DA, Hanson AD, (1998): Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora*. Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates. *Plant Physiol*. 117: 273-281
- Kósa E, Szegő D, Horváth E (2009): Relationship between the S-methylmethionine treatment and the activities of antioxidant enzymes in maize (*Zea mays* L.) leaves at chilling temperatures. *Acta Agron. Hung.* 57: 461-468.
- Kósa E, Szegő D, Horváth E, Rácz I, Szigeti Z, Lásztity D, Páldi E (2011): Effect of S-methylmethionine on the photosynthesis in maize at different chilling temperatures. *Cent. Eur. J. Biol.* 6(1): 75–83.
- Lásztity D, Rácz I, Páldi E (1992): Effect of DL-S-methyl methionine on polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant*. 85(A68): 389.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005): How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43:379-393
- Ludmerszki E, Rudnóy Sz, Almási A, Szigeti Z, Rácz I (2011): The beneficial effects of S-methylmethionine in maize in the case of Maize dwarf mosaic virus infection. *Acta Biologica Szegediensis* 55:109-112
- Maathuis FJM (2014): Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 65:3: 849–858
- Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K (2001): Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methyl viologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochim Biophys Acta* 504: 275–287
- Manoli A, Sturaro A, Trevisan S, Quaggiotti S, Nonis A (2012): Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* 169:807-815
- McRorie RA, Sutherland GL, Lewis GL, Barton MS, Glazener MR, Shive W (1954): Isolation and identification of a naturally occurring analog of methionine. *J Am Chem. Soc.* 76: 115-118.
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003): Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49: 69–76.
- Miller G, Suzuki N, Sultan CY, Mittler R (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33: 453–467.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004): Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.

- Mittler R (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends Plant Sci. 7: 405-410.
- Páldi K, Rácz I, Szigeti Z, Rudnóy Sz (2014): S-methylmethionine alleviates the cold stress by protection of the photosynthetic apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway. Biologia Plantarum 58(1): 189-194.
- Quintero F, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo J (2002): Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99: 9061–9066.
- Rácz I, Páldi E, Szalai G, Janda T, Pál M, Lásztity D (2008): S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. Journal of Plant Physiology 165:1483-1490
- Rout NP, Shaw BP (2001): Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. Plant Sci. 160, 415–423.
- Rozen S, Skaletsky H (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology 132:365-378
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD (1997): Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nature Biotechnol. 15: 988–991.
- Selye H (1936): A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 138: 32.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). Analytical Biochemistry. 175: 408-413.
- Srivastava AK, Bhargava P, Rai LC (2005): Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*. W.J. Microb. Biotechnol. 22: 1291-1298.
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001): Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Sci. 161: 613–619.
- Szegő D, Kósa E, Horváth E (2007): Role of S-methylmethionine in the plant metabolism. Acta Agronomica Hungarica. 55:1-18
- Trossat C, Rathinasabapathi B, Weretilnyk EA, Shen TL, Huang ZH, Gage DA (1998): Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-methylmethionine in chloroplasts. Plant Physiol. 116: 165-171
- Tuteja N (2007): Mechanisms of high salinity tolerance in plants. Methods in enzymology 428: 419-438
- Wise RR, Naylor AW (1987): Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakown of pigments and endogenous antioxidants. Plant Physiol. 83: 278-282.
- Wu TM, Lin WR, Kao YT, Hsu YT, Yeh CH, Hong CY, Kao CH (2013): Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. Plant Molecular Biology. 83 (4-5): 379-390.