

kolzsu_21_22

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A nitrogén-monoxid növekedésszabályozó,
toleranciafokozó és nitro-oxidatív stresszt kiváltó szerepei
elemtöbbletek hatására növényekben**

Ördögné Kolbert Zsuzsanna

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

2022

kolzsu_21_22

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 1 |
| 1. BEVEZETÉS..... | 3 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 5 |
| 2.1. A KÉTSZIKŰ GYÖKÉRRENDSZER FEJLŐDÉSE ÉS STRESSZINDUKÁLT MORFOGENIKUS VÁLASZA .. | 5 |
| 2.2. ELEMTOBBLETEK (Cu, Zn, Ni, Se) MINT A GYÖKÉRFEJLŐDÉST (IS) BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI HATÁSOK | 6 |
| 2.2.1. A réz (Cu)..... | 6 |
| 2.2.2. Cink (Zn)..... | 8 |
| 2.2.3. Nikkel (Ni) | 10 |
| 2.2.4. Szelén (Se)..... | 11 |
| 2.3. A GYÖKÉRNÖVEKEDÉST SZABÁLYOZÓ BELSŐ FAKTOROK | 13 |
| 2.3.1. Auxin..... | 13 |
| 2.3.2. Citokininek | 14 |
| 2.3.3. Etilén | 16 |
| 2.3.4. Strigolaktonok | 17 |
| 2.3.5. Karrikinek..... | 18 |
| 2.4. A NITROGÉN-MONOXID (NO) ÉS A REAKTÍV NITROGÉNFORMÁK (RNF)..... | 19 |
| 2.4.1. A NO metabolizmusa a növényekben | 19 |
| 2.4.2. A NO-kapcsolt jelátvitel a növényekben..... | 23 |
| 2.4.3. A NO mint gyökérfejlődési regulátor..... | 23 |
| 2.4.4. A NO és a stresszválaszok: nitro-oxidatív stressz versus toleranciafokozás..... | 26 |
| 3. KUTATÁSI CÉL | 30 |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 31 |
| 4.1. NÖVÉNYI ANYAG ÉS NEVELÉSI KÖRÜLMÉNYEK A KÜLÖNBÖZŐ RENDSZEREKBE..... | 31 |
| 4.1.1. Astragalus fajok nevelése és szelenátkezelése táptalajos rendszerben..... | 31 |
| 4.1.2. Odontarrhena lesbiaca növények nevelése és nikkelkezelése rizotronrendszerben | 31 |
| 4.1.3. Arabidopsis thaliana nevelése és réz-, cink-, szelenit-, szelenátkezelése táptalajos rendszerben..... | 32 |
| 4.1.4. Brassica juncea és Brassica napus nevelése és cinkkezelése tápoldatban..... | 33 |
| 4.1.5. Brassica juncea és Brassica napus nevelése és cink-oxid nanorészecske-kezelése szűrőpapíron | 33 |
| 4.1.6. Brassica juncea nevelése és szelénformákkal való kezelése tápoldatban..... | 34 |
| 4.1.7. Brassica juncea és Arabidopsis thaliana nevelése és nikkelkezelése táptalajban..... | 34 |
| 4.2. A CSÍRÁZÁS, BIOMASSZA-PRODUKCIÓ ÉS GYÖKÉRNÖVEKEDÉS VIZSGÁLATA.. | 34 |
| 4.3. ELEMARTALOM-ANALÍZIS | 35 |

| | |
|--|-----|
| 4.4. MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK..... | 35 |
| 4.4.1. Nem fluoreszcens mikroszkópos technikák | 35 |
| 4.4.2. Fluoreszcens mikroszkópos technikák | 36 |
| 4.4.3. Konfokális lézerszenning-mikroszkópia | 38 |
| 4.5. S-NITROZOTIOL (SNO) KONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE | 39 |
| 4.6. ETILÉNKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL | 39 |
| 4.7. RSNO-RAC ANALÍZIS AZ S-NITROZILÁCIÓ KIMUTATÁSÁRA..... | 39 |
| 4.8. SPEKTROFOTOMETRIÁS MÉRÉSEK..... | 40 |
| 4.9. GÉNKIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATA KVANTITATÍV VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓVAL (qRT-PCR)..... | 41 |
| 4.10. IZOENZIMEK AZONOSÍTÁSA ÉS AKTIVITÁSVIZSGÁLATA NATÍV GÉLELEKTROFORÉZISSSEL..... | 42 |
| 4.11. WESTERN BLOT ANALÍZISEK | 43 |
| 4.12. STATISZTIKAI ANALÍZIS | 44 |
| 5. EREDMÉNYEK | 46 |
| 5.1. A SIMV MEGJELENÉSE KÜLÖNBÖZŐ KÍSÉRLETI RENDSZEREKBE..... | 46 |
| 5.2. A SIMV ÖSSZEFÜGGÉSE AZ ELEM-HIPERAKKUMULÁCIÓVAL ÉS -TŰRÉSSSEL | 48 |
| 5.3. A NO ÉS A HORMONOK KAPCSOLATA AZ ARABIDOPSIS GYÖKÉRNÖVEKEDÉSI VÁLASZAI SORÁN | 51 |
| 5.3.1. Auxin-NO jelkapcsolat rézterhelt lúdfűben..... | 51 |
| 5.3.2. A NO kapcsolata az auxinnal, citokininnel és etilénnel szelénterhelt lúdfűben | 54 |
| 5.3.3. A NO kapcsolata a strigolaktonokkal és karrikinekkel a lúdfű gyökérnövekedése során stresszmentes körülmények között | 65 |
| 5.4. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEM-TÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKULÁSÁBAN | 68 |
| 5.4.1. A NO részvétele az réztöbblettel szembeni toleranciában | 68 |
| 5.4.2. A NO és a fitohormonok részvétele a szelennel szembeni tolerancia kialakulásában | 72 |
| 5.4.3. A NO-jelátvitel szerepe a cinktolerancia kialakításában lúdfűben..... | 74 |
| 5.5. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV STRESSZ KIALAKÍTÁSÁBAN ELEM-TÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN..... | 79 |
| 5.5.1. Cink- és cink-oxid nanorészecske-kezelések által okozott nitro-oxidatív stressz a Brassicaceae növény családban | 80 |
| 6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA | 108 |
| 6.1. A SIMV MEGJELENÉSE KÜLÖNBÖZŐ KÍSÉRLETI RENDSZEREKBE..... | 108 |
| 6.2. A SIMV ÖSSZEFÜGGÉSE AZ ELEM-HIPERAKKUMULÁCIÓVAL ÉS -TŰRÉSSSEL | 109 |
| 6.3. A NO ÉS A HORMONOK KAPCSOLATA AZ ARABIDOPSIS THALIANA GYÖKÉRNÖVEKEDÉSI VÁLASZAI SORÁN..... | 110 |
| 6.4. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEM-TÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKULÁSÁBAN | 117 |

| | |
|---|-----|
| 6.5. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV JELÁTVITEL KIALAKÍTÁSÁBAN ELEMTÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN..... | 121 |
| 7. ÖSSZEFOGLALÁS | 132 |
| 7.1. A NO FITOHORMONOKKAL ÉS NEM FITORHORMON JELLEGŰ NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓKKAL VALÓ KAPCSOLATA ELEMTÖBBLETNEK KITETT GYÖKÉRZETBEN | 132 |
| 7.2. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEMTÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKÍTÁSÁBAN | 133 |
| 7.3. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV JELÁTVITEL KIALAKÍTÁSÁBAN ELEMTÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN..... | 134 |
| 8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK..... | 137 |
| 9. FELHASZNÁLT IRODALOM | 138 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 149 |
| FÜGGELÉK..... | i |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACC: 1-aminociklopropán-1-karbonsavvá
ACO: ACC-oxidáz
ACS: ACC-szintáz
APF: aminofenil-fluoreszcein
APX: aszkorbát-peroxidáz
AVG: aminoetoxivinilglicin
BA: 6-benzilaminopurin
CKX: citokinin-oxidáz/dehidrogenáz
COPT: copper transporter
cPTIO: 2-(4 karboxifenil) 4,4,5,5 tetrametilimidazolin 1 oxil 3-oxid)
D14: DWARF14
DAF-FM DA: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetát
DHE: dihidroetidium
DHR: dihidrorodamin
DLK2: DWARF14-LIKE2
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB: 5,5'-ditio-bisz-(2-nitro-benzoészav)
EDTA: etilén-diamin-tetraecészav
EIN2: ETHYLENE INSENSITIVE2
ER: endoplazmatikus retikulum
ERF1: ETHYLENE RESPONSE FACTOR
ETR: ETHYLENE RECEPTOR
FDA: fluoreszcein-diacetát
FGY: főgyökér
FITC: fluoreszcein-izotiocianát
GSNO: S-nitrozoglutation
GSNOR: GSNO-reduktáz
GUS: β -glükuronidáz
H₂O₂: hidrogén-peroxid
HAST: high affinity sulphate transporter
hROF: highly reactive (nagy reaktivitású) reaktív oxigénformák
HRP: horseradish peroxidase
IES: indol-3-ecészav
IPT: adenzin foszfát-izopentiltranszferáz
KAI2: KARRIKIN-INSENSITIVE2
KAT: kataláz
MAX2: MORE AXILLARY GROWTH2
MES: 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav

MeSeCys: metil-szelenocisztein
NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NBT: nitro-kék-tetrazólium
NO: nitrogén-monoxid
NO₂-BSA: nitrált marhaszérum albumin
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz
NP: nanopartikulum
NPA: naftilftálsav
NR: nitrát-reduktáz
NTR: NADPH-függő tioredoxin-reduktáz
O₂[•]: szuperoxid gyökanion
•OH: hidroxil gyök
OGY: oldalgyökér
ONOO⁻: peroxinitrit
PBS: phosphate buffered saline
PIN: PIN-FORMED
QC: quiescent centre (nyugalmi centrum)
RNF: reaktív nitrogénformák
ROF: reaktív oxigénformák
RSNO-RAC: resin-assisted capture of SNO proteins
SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SeCys: szelenocisztein
SeMet: szelenometionin
-SH: tiol-csoport
SIMV: stresszindukált morfogénikus válasz
SNAP: S-nitroso-N-acetil-penicillamin,
SNO: S-nitrozotiol
SNP: nátrium-nitroprusszid
SOD: szuperoxid-dizmutáz
SZT: száraz tömeg
TBST: Tris-buffered saline 0.1% Tween® 20 detergenssel
TIR1/AFB: TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX1
Tris: trisz(hidroximetil)-aminometán
ZIP: Zinc Regulatory Transporter – Iron Regulatory Transporter-like proteins

1. BEVEZETÉS

A gyökérzet a növények életében több szempontból is nagy jelentőségű szerv. A talajban való rögzítésen túl a gyökérzet fő feladata a víz és az ásványi anyagok felvétele a talajból, és azok továbbítása a hajtás felé. Könnyen belátható tehát, hogy a jól fejlett gyökérzet alapvetően fontos a hajtás megfelelő víz- és tápanyagellátásában, így végső soron részben meghatározója a növényi produktivitásnak. A gyökérzet fejlődését olyan abiotikus környezeti körülmények szabályozzák, mint a talaj vízellátottsága, sókoncentrációja, tápanyagtartalma, és ezek befolyásolásán keresztül, közvetett módon a globális klímaváltozás is hatással van a gyökérrendszer növekedési folyamataira. A tápanyagok hiánya mellett azok (pl. nitrogén, foszfor, réz, cink, nikkel) többlete és a nem esszenciális elemek (pl. szelén, ólom, kadmium) felhalmozódása a talajban szintén gyökérfejlődést befolyásoló tényezők. Továbbá természetes folyamatok vagy a nanoipari tevékenység révén a talajba kikerülő nanorészecskék (pl. nano cink-oxid) szintén hatnak a gyökérzet növekedésére. A fent említett környezeti tényezők (stresszhatások) hatással vannak a gyökérzet endogén folyamataira, melyek között kiemelendő a fitohormonok (pl. auxin, citokinin, etilén, strigolakton) és a nem fitohormon jellegű növekedésszabályozó jelek (pl. nitrogén-monoxid, karrikinek) metabolizmusa, eloszlása, jelátvittele. Az elmúlt két évtized aktív kutatásai felvetették, hogy a nitrogén-monoxid és reakciótermékei, a reaktív nitrogénformák részei a gyökérrendszer fejlődését reguláló jelátviteli hálózatnak, melyben fitohormonok és nem fitohormon jellegű növekedésszabályozó jelek közötti komplex interakciók révén valósul meg a szabályozás. A nitrogén-monoxid élettani funkciói azonban nem korlátozódnak a gyökérrendszer fejlődésének szabályozására. Kétarcú molekulacsaládként a reaktív nitrogénformák elsősorban reaktív oxigénformákkal való interakciók révén, másodlagos (nitro-oxidatív) stressz kialakításán keresztül fokozhatják a károsodások mértékét, vagy éppen hozzájárulhatnak a kedvezőtlen hatások mérsékléséhez abiotikus stressz esetén.

A növények abiotikus stressztűrésének fokozása a klímaváltozás tükrében is kiemelt feladat, ezért az alkalmazkodást segítő molekulák – mint amilyen a nitrogén-monoxid is – részletes, feltáró vizsgálata időszerű. A jelen munkában a nitrogén-monoxid fitohormonokkal és nem fitohormon jellegű komponensekkel való kapcsolatait és ezek szerepét tártuk fel az elemtöbbletek által befolyásolt gyökérfejlődés során. Továbbá tanulmányoztuk a nitrogén-monoxid reaktív oxigénformákkal való kapcsolatát az elemtöbbletekkel szembeni tolerancia kialakításában és a nitro-oxidatív stresszjelátvitel kialakításában.

Úgy gondolom, hogy felhalmozott eredményeink beleilleszkednek a nemzetközi kutatási trendekbe, azokat kiegészítve új lehetőségeket tárnak fel, és új irányt mutatnak a növényi stresszválaszok megértésében. Az eredményeink gyakorlati hasznosíthatóságát abban látom, hogy a feltárt összefüggések alapján alapot szolgáltathatnak jobb ellenállóságú haszonnövények előállításához, valamint toleranciafokozó mezőgazdasági kezelések és a károsodás mértékét detektáló biomarker-alapú eljárások kidolgozásához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A KÉTSZIKÚ GYÖKÉRRENDSZER FEJLŐDÉSE ÉS STRESSZINDUKÁLT MORFOGENIKUS VÁLASZA

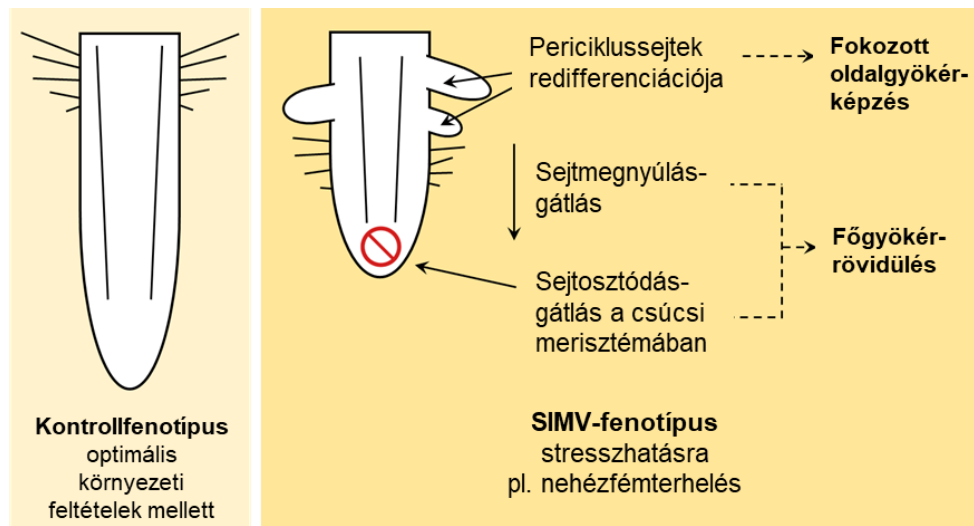
A gyökér a növényi szervezet mechanikai és fiziológiai szempontból is alapvető fontosságú része, hiszen rögzíti a növényt és biztosítja a tápanyag felvételét a talajból. Továbbá a gyökérzet részt vesz biotikus és abiotikus stresszválaszok kialakításában, hiszen környezeti stressz során mutatott figyelemreméltó fejlődési plaszticitása kedvez a növény túlélésének és a terméshozam stabilitásának.

Egy kétszikű növény gyökérrendszerét kezdetben a főgyökér (FGY) alkotja, ami az embriogenezis során képződik, és osztódó sejteket tartalmaz a csúcsi merisztémában. A csíranövény fejlődése során a FGY bizonyos sejtjei képessé válnak az osztódásra, és posztembrionálisan oldalgököreket (OGY) hoznak létre. Az újonnan megjelenő OGY-k növelik a gyökérzet felszívó felületét és mechanikailag támasztják a gyökérzetet. Az OGY-iniciálisok a FGY egy specializált sejtrétegéből, a periciklusból képződnek. Arabidopsisban és a legtöbb kétszikűben az OGY-k kizárólag azokból a periciklus sejtekből keletkeznek, melyek a fejlődő xilémszövetek szomszédságában helyezkednek el (De Smet és mtsi. 2006). Az OGY-fejlődés négy kulcsfontosságú szakaszát különítjük el: (i) a periciklus sejtek indukciója és dedifferenciációja; (ii) az oldalgökök-primordium megjelenése a periciklus sejtek sejtciklusba való belépése és aszimmetrikus sejtosztódása révén; (iii) az OGY-primordium megnyúlásos növekedése; (iv) az OGY-merisztéma aktiválódása (Malamy és Benfey 1997).

A kétszikű gyökérrendszert alkotó fő- és oldalgökök hossza, száma, térbeli elhelyezkedése határozza meg a gyökérarchitektúrát, ami a gyökérzet térbeli elrendeződése a növekedési közegben (Lynch 2022). A gyökérzet fajonként, sőt fajon belül is változó szerkezetű, vagyis genetikailag meghatározott, de a környezet, melyben a növény él, jelentős hatást gyakorol a gyökérzet architektúrájára (Osmont és mtsi. 2007, Kochian 2016, Lynch 2022).

A növények helyhez kötött életmódjukból adódóan ki vannak téve a környezet változásainak, melyekhez dinamikusan kell alkalmazkodniuk. Ennek az alkalmazkodásnak a növekedés szintjén való megnyilvánulása a stresszindukált morfogénikus vagy morfológiai válasz (SIMV) (Potters és mtsi. 2007, 2009), amely legszembetűnőbb módon a gyökérrendszerben jelenik meg. Sejtszinten három tünetről beszélhetünk: a főgyökérmerisztéma-sejtek osztódásának, megnyúlásának gátlása és a periciklus sejtek redifferenciációja. E sejtek működésében bekövetkező változások szervszintű hatásai a FGY

megnyúlásának gátlása és a fokozott OGY-képződés, vagyis egy sajátos növekedésgátlási és -indukciós folyamatokat is magába foglaló válasz alakul ki (Potters és mtsi. 2007, 1. ábra). Ennek eredményeképpen egy kevésbé mélyre hatoló, sokkal inkább oldalirányban elterülő gyökérstruktúra alakul ki, megváltoztatva a genetikailag meghatározott gyökérarchitektúrát. A SIMV-gyökérzetben való megjelenését elsőként réztöbblet mellett növekedő *Arabidopsis thaliana* esetén írták le (Pasternak és mtsi. 2005), majd számos esszenciális és nem esszenciális fémion jelenlétében megfigyelték (Kolbert 2016).



1. ábra: A stresszindukált morfogénikus választ (SIMV) mutató gyökérfenotípus kialakulásáért felelős sejtszintű folyamatok és azok szervszintű hatásai (saját ábra Potters és mtsi. 2007 alapján).

2.2. ELEM TÖBBLETEK (Cu, Zn, Ni, Se) MINT A GYÖKÉRFEJLŐDÉST (IS) BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI HATÁSOK

A növények számára esszenciális és nem esszenciális elemek nagy koncentrációban való jelenléte a növekedési közegben környezeti stresszt jelent, ami részben olyan mezőgazdasági aktivitásokból származhat, mint pl. a tápanyagok túlzott mértékű használata vagy a szennyvíz és a szennyvíziszapok újrahasznosítása, még ha a felhasználás feltételei szabályozottak is (Tóth és mtsi. 2016). Az elemek emelt koncentrációjának növényekre gyakorolt hatása nagyban függ azok kémiai karakterétől és mobilitásától, valamint bioakkumulációjától a talaj-víz-növény rendszerben.

2.2.1. A réz (Cu)

A növények számára az esszenciális réz egy redoxaktív, kevésbé mobilis elem, amely Cu^{2+} és Cu^+ oxidációs állapotokban fordul elő a növényi sejtekben. Számos fiziológiai

folyamatban vesz részt, mint pl. a fotoszintetikus elektrontranszport, a mitokondriális légzés, a sejtfal-metabolizmus és számos hormonális jelátviteli útvonal, mint például az etilénérzékelés (Cohu és Pilon 2010). Több mint 30 növényi fehérjében szerepel a réz strukturális elemként, melyek között számotartjuk a plasztocianint, a citokróom c-oxidázt, a Cu/Zn szuperoxid-dizmutázt, a lakkázt, az aszkorbát-oxidázt, az amin-oxidázt, a fitocianint és a polifenol-oxidázt (Cohu és Pilon 2010, Rather és mtsi. 2020). A réz enzimekkel kölcsönhatásba lépve részt vesz redoxreakciókban, ezáltal reverzibilisen képes oxidálódni Cu^+ -ból Cu^{2+} formává. Példaként említhetjük meg a plasztocianint, amely a fotoszintézis fény reakciója során az elektrontranszferben vesz részt (Rather és mtsi. 2020).

A magasabbrendű növények a rézet főként Cu^{2+} formájában veszik fel a rizoszférából, ahol kötődése a szerves és szervetlen talajrészecskékhez limitálja a hozzáférhetőségét (Welch és mtsi. 1993). A növények számos réztranszporter fehérjét (copper transporter, COPT; *COPT1-6*) fejeznek ki, melyek közül a gyökérsejtek plazmamembránjához kötött COPT1 a külső közegből a gyökérsejtbe juttatja a réziont (Printz és mtsi. 2016). Az *Arabidopsis thaliana*-ban a réz- és a vasfelvételi rendszerek szoros együttműködését feltételezik (Ryan és mtsi. 2013), mivel a talajban található Cu^{2+} -t a vas-kelet-reduktáz Cu^+ -vá redukálja, ami a COPT szállítófehérjék működése révén a sejtekbe jut. A felvett réz nagy része a gyökérsejtekben olyan ciszteinben és glutationban gazdag fémkomplexek formájában raktározódik el, mint a metallothioneinek és a fitokelatinok, melyek puffereklik a sejt rézkoncentrációját rézkitettségek esetén. A réznek a gyökérből a hajtás felé szállítása erősen szabályozott folyamat; nikociánamin-komplexek formájában történik a xilémben (Ryan és mtsi. 2013). A réz sejten belüli szállításában specifikus rézchaperonok, metallochaperonok, vagy fémchaperonok vesznek részt (Yruela 2005, Kumar és mtsi. 2021).

A növényi szövetek átlagos réz tartalma 5–30 $\mu\text{g/g}$ száraz tömeg (SZT) között változik, és ha meghaladja a 20 $\mu\text{g/g}$ SZT-értéket, az a legtöbb esetben toxikus a növény számára (Burkhead és mtsi. 2009, Kumar és mtsi. 2021). A fent említett mezőgazdasági tevékenységeken túl a réznek az ökoszisztémában egyre nagyobb koncentrációban való megjelenéséhez a bányászat, a kohászat, valamint számos iparág (pl. vegy-, papír-, textilipar) is hozzájárul (Nagajyoti és mtsi. 2010, Kumar és mtsi. 2021). Hazánkban a környezet rézterhelése az ipari területekre és a vegyipari üzemek körzetére korlátozódik (Ötvös és mtsi. 2003, European Environment Agency 2019).

Nagy koncentrációjú rézkitettségek esetén a növények szervein olyan toxicitási tünetek jelennek meg, mint a satnyulás, a hajtás és gyökér növekedésének gátlása, a levelek bronzosodása, a klorózis és nekrozis (Marschner 1995, Reichman 2002, Lange és mtsi. 2017).

A klorózis a vasfelvétel gátlásának, valamint a lipidperoxidációnak és az ebből adódó membrándezorganizációnak az együttes következménye. A réz képes akkumulálódni számos növényi szervben, közvetlenül okozva ezáltal a fotoszintetikus aktivitás csökkenését vagy a szénhidrát-tartalom növekedését (Shao és mtsi. 2010). Molekuláris szinten a toxicitás oka a fehérjékben a réz -SH (tiol) csoportokhoz való kötődése, ami megakadályozza a fehérjék működését, tápanyaghiányt indukál, károsíthatja a sejt transzportfolyamatait, és másodlagos, oxidatív stressz kiváltásával a sejt redox-homeosztázisában zavart okoz (Rather és mtsi. 2020). A réz redoxaktív jellegéből adódóan a Fenton- és a Haber–Weiss-reakciókon keresztül, közvetlenül képes katalizálni a reaktív oxigénformák (ROF), főként a hidroxil gyök ($\bullet\text{OH}$), a szuperoxid gyökion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződését, ami a fehérjék, nukleinsavak és lipidek oxidatív károsodását okozva sejthalálhoz vezet (Halliwell és Gutteridge 1984, Al Mahmud és mtsi. 2019). A toxikus rézkoncentrációk oldal- és főgyökérmegnyúlás-gátlást és biomassza-csökkenést okoznak. A gyökér növekedését és élettani folyamatait a réztöbblet súlyosabban károsítja, mint a hajtás működését, ami a felvett réz gyökérbéli felhalmozódásának és gyenge hajtásirányú transzlokációjának a következménye (Adrees és mtsi. 2015).

2.2.2. Cink (Zn)

Az élőlényekben a cink jellemzően a második leggyakoribb fém a vas után. Esszenciális tápelemként olyan alapvető biokémiai folyamatokban vesz részt, mint a szénhidrát-anyagcsere, a sejtmembránok integritásának fenntartása, a fotoszintézis, a fitohormon-metabolizmus és -jelátvitel, a lipid- és nukleinsav-metabolizmus, a génexpresszió szabályozása, a fehérjeszintézis vagy a klorofillképződés (Noulas és mtsi. 2018). A cink az egyetlen fém, amely mind a hat enzimosztályban jelen van kofaktorként (Broadley és mtsi. 2007), és az eukarióta proteom körülbelül 9%-a tartalmaz cinket, ami jelzi e fém jelentőségét az élő szervezet számára (Andreini és mtsi. 2009).

A cinket a gyökérzet elsősorban Zn^{2+} formában vagy szerves savkelátok formájában (Palmgren és mtsi. 2008) veszi fel a ZIP-családból (Zinc Regulatory Transporter – Iron Regulatory Transporter-like proteins) származó nehézfém transzporterek működése révén, melyekből *Arabidopsis thaliana*-ban tizenegyet azonosítottak (Milner és mtsi. 2013). Ezek a transzporterek a központi henger sejtjeiben, a plazmamembránokban és a vakuólumok tonoplastjában lokalizálódnak, és kevésbé specifikusak, ugyanis a cinken kívül a réz-, vas- és a mangánszállításban is közreműködnek (Milner és mtsi. 2013).

A növényi szövetekben általában 15–20 µg/g SZT a cink koncentrációja, toxicitási tünetek pedig 100–300 µg/g SZT-cinktartalom felett jelentkezhetnek (Marschner 1995). A környezetben felhalmozódó cinknek több természetes és mesterséges forrása van; az utóbbiak között a bányák vízvezetését, az ipari hulladékokat, a széntüzelésű erőműveket kell kiemelni (Broadley és mtsi. 2007, Noulas és mtsi. 2018). Magyarországon a cinkterhelt talajok főként az ipari tevékenységhez kapcsolatosan, pontszerűen vannak jelen (Reimann és mtsi. 2014, Tóth és mtsi. 2016).

A növények által mutatott cinktoxicitási tünetek lehetnek például a csökkent föld feletti és alatti biomassza, a levelek klorózisa, nekrozisa. Ami a molekuláris folyamatokat illeti, a cink megzavarja a víztranszportot, más mikro- és makrotápelemek (pl. vas, foszfor) homeosztázisát, gátolja a transzportjukat, ezáltal hiánytüneteket alakítva ki (Kaur és Garg 2021). Súlyosan érinti a növényeket a cinktöbblet által okozott genotoxicitás, ami kromoszómaaberrációk, kromatinkondenzáció és a sejtmagi membrán destabilizációja révén a normális kromoszómaműködés zavarában nyilvánul meg (Oladele és mtsi. 2013, Sidhu 2016). Sejtszinten a cinktöbblet egyik további negatív hatása a lipidek oxidációja következtében kialakuló membrádestabilizáció. Ez a mitokondrium összetett membránstruktúráinak esetén az energiatermelő folyamatok megzavarását és a tilakoidmembrán esetén a fotoszintetikus aktivitás csökkenését okozza (Kaur és Garg 2021). A cink supraoptimális koncentrációinak fitotoxikus hatása abban is megnyilvánul, hogy kulcsfontosságú funkcionális csoportok blokkolása révén (a rézzel ellentétben nem közvetlenül) oxidatív stresszt vált ki (Morina és mtsi. 2010). Nagy affinitással kötődik többek között kénatomokhoz, így a ROF-metabolizmusban szereplő enzimeket a cisztein aminosavaikhoz kötődve képes inaktiválni (Nieboer és Richardson 1980), emellett képes más, esszenciális fémionok helyettesítésére is az enzimek katalitikus helyein (Schützendübel és Polle 2002).

A nanoformátumú cink, mint amilyenek a cink-oxid nanorészecskék, speciális tulajdonságokkal rendelkeznek. Ilyen nanorészecskékre vonatkozó jellemzők többek között a kis méret, a nagy felület, a sajátos optikai, mágneses és elektromos tulajdonságok, a stabilitás és az antimikrobiális hatások (Kolbert és mtsi. 2022). E kedvező tulajdonságaik miatt az ipar nagy mennyiségben állítja elő (Piccinno és mtsi. 2012), és elkerülhetetlenül juttatja a környezetbe a cink-oxid nanorészecskéket. A növényekkel kontaktusba kerülve cinkiont szabadíthatnak fel, amit a gyökérzet felvesz. A sejtfal pórusméreténél kisebb nanorészecskék bejuthatnak a gyökér sejteibe, és ez megtörténhet a nagyobb méretű nanorészecskék lebomlása után is (Kurczyńska és mtsi. 2021). A növények nanorészecskékre adott válaszai diverzek, és függenek a nanorészecske jellemzőitől (pl. típus, méret, koncentráció), a növény jellemzőitől (pl. faj,

fém-tolerancia, fejlődési stádium) és a kitétség jellemzőitől (pl. időtartam, kezelés módja) (Kolbert és mtsi. 2022).

2.2.3. Nikkel (Ni)

A nikkelt is esszenciális elemnek tekintik a növények növekedése és fejlődése számára, bár a széles körű szerepet betöltő rézzel és cinkkel ellentétben a nikkelt kisszámú élettani folyamatban érintett (Dalton 2019). Az ureáz enzim kofaktora és a hat alegységes enzim alegységként két nikkelatomot tartalmaz (Polacco 1977). Az ureáz szintéziséhez nem szükséges a nikkelt, de az enzim szerkezetének kialakításához és a működéséhez elengedhetetlen (López és Magnitski 2011). A nikkelt indukálja a glioxaláz enzimet, és szabályozza a sejtbeli glutationállományt, ami segíti a kedvező hatásait a növényekben (Fabiano és mtsi. 2015, Dalton 2019).

A nikkeltionok a talajoldatból passzív módon bejuthatnak a gyökérsejtekbe, de az aktív felvételi folyamatok jelentősebbek a növények nikkelt-hozzájuttatásában. Az aktív felvétel a kevésbé szelektív ZRT/IRT-szerű családba tartozó, a cinket és rézet is szállító kation transzporterekkel keresztül valósul meg (Van der Pas és Ingle 2019). A gyökérbe felvett nikkelt a transzspirációs árammal a xilémen keresztül a hajtásba szállítódik, majd a floémában retranszlokálódik, ami a növényen belüli mobilitására utal (Shahzad és mtsi. 2018).

A nem szennyezett területeken növő növények levélbéli nikkeltkoncentrációja 0,05 és 5 µg/g SZT között változik (Welch 1981); toxicitás az érzékeny fajokban 10 µg/g SZT felett jelentkezik (Kozlow 2005). Olyan antropogén aktivitások, mint a bányászat, fémfeldolgozás vagy a szén és az olaj elégetése, dokumentált módon megnövelik a nikkeltkoncentrációját a környezetben (Hassan és mtsi. 2019), mindez környezetvédelmi kérdéseket vet fel világszerte.

A nikkelt emelt koncentrációban növekedésgátlást, klorózist, nekrotizist, hozamcsökkenést valamint a sztómazárás és a klorofilltartalom redukálása révén fotoszintetikus aktivitásvesztést okoz (Shahzad és mtsi. 2018, Hassan és mtsi. 2019) az érzékeny növényfajokban. Továbbá ismeretes, hogy a nikkelt többlete a sejtfalak plaszticitásának csökkentése és az auxintranszport megzavarása révén gyökérrövidüléssel jár (Lešková és mtsi. 2020). A nikkelt többlet molekuláris szinten egyrészt az ionegyensúly és -transzport megzavarása, másrészt a membránok ROF általi oxidatív károsítása révén hat. A nikkelt a ROF túltermelését okozza közvetett módon, számos antioxidáns enzimmel és nem enzimikus antioxidánssal interferálva (Maheshwari és Dubey 2009, Kumar és mtsi. 2012, Georgiadou és mtsi. 2018, Amjad és mtsi. 2020).

A nagy nikkeltartalmú szerpentin talajokon előfordulnak nikkelt-hiperakkumuláló növényfajok, melyek 2018-ig ismert száma 523 (Reeves és mtsi. 2018). Ezekre jellemző, hogy hajtásukba kb. 1000 mg/kg nikkelt képesek felhalmozni toxicitási tünetek megjelenése nélkül. A Délkelet-Európában és a Közel-Keleten honos *Odontarrhena* génusz 61 faja nikkelt-hiperakkumuláló és -tűrő képességet mutat (Reeves és mtsi. 2021). Az *Odontarrhena* fajok egyik toleranciamechanizmusa az, hogy a levélfelületükön található csillagszőrökbe kompartmentalizálják a nikkelt nagy részét, így védve a levélsejteket (Küpper és mtsi. 2001).

2.2.4. Szelén (Se)

A szelén egy nemfémes elem, amely nélkülözhetetlen a baktériumok, bizonyos algatorzszek és állatok számára, de magasabbrendű növényekben nincs bizonyítva az esszencialitása (Schiavon és Pilon-Smits 2017). A szelén nagyfokú kémiai hasonlóságot mutat a kénnel, így élettani folyamatokban (beleértve a felvételi folyamatokat is) versengés alakulhat ki a kettő között (White és mtsi. 2004).

A gyökerek a szelént szervetlen szelenát (SeO_3^{2-}) vagy szelenit (SeO_4^{2-}) formájában, illetve szerves formákban veszik fel a talajoldatból. A szelenát gyökérbe való bejutása szulfát transzporterekkel keresztül történik. A nagy affinitású szulfáttranszporterek (high affinity sulphate transporter, HAST), mint az *Arabidopsis thaliana*-ban az AtSultr 1:1, AtSultr 1:2, AtSultr 1:3 katalizálják a szelenátfelvétel nagy részét. A szelenit felvétele a foszfát transzporterekkel történik (Li és mtsi. 2008, Zhang és mtsi. 2014). Megemlítendő továbbá, hogy szelenitre permeábilis egy szilícium influx transzporter is, az OsNIP2;1, amely az aquaporinok nodulin 26-szerű belső membránprotein-alcsoadójához tartozik (Zhao és mtsi. 2010). Továbbá lehetséges a szelenit nem specifikus, passzív felvétele is. A szerves szelénformák, mint a szelenometionin (SeMet) és szelenocisztein (SeCys) felvétele aminosav-permeázokon keresztül valósul meg. A kénasszimilációs útvonalat használva a növénybe jutott szelenát és szelenit végül szerves SeMet-ná és SeCys-né alakul (összefoglalva Kolbert és mtsi. 2019a, Trippe és Pilon-Smits 2021 által).

A szelénterhelés elsődleges, antropogén forrásai között említhető az ipar (főként a barnaköszén és az olaj égetése), a mezőgazdaság (a szennyvíziszap felhasználása) és a közlekedés (Kádár 1998).

A fentebb bemutatott mikroelemekhez hasonlóan a szelén alacsony koncentrációban kedvező hatást fejt ki a növények növekedésére, fejlődésére, nagy koncentrációban azonban toxikus. A nem akkumuláló növényfajokban a szelén koncentrációja alacsony (0,01–0,02 $\mu\text{g/g}$

SZT, Yang és mtsi. 2022), és *Arabidopsis thaliana* esetében 2 µg/g SZT szelénkoncentrációnál jelentkezik a toxicitás (Mikkelsen és mtsi. 1989). Az akkumuláció mértékétől függően a növény maradhat tünetmentes, amikor csupán a biomassza-termelés csökken, vagy jelentkezhetnek tünetek, mint a klorózis, nekrózis és a levelek elhalása (Terry és mtsi. 2000). A legjellemzőbb toxicitási tünet a főgyökér rövidülése, ami közvetlenül utal a növény szeléntoleranciájára (Fisher és mtsi. 2016). A toxicitás molekuláris folyamatainak egyike a szelenoproteinek létrejötte. Az asszimiláció során képződő SeCys és SeMet a fehérjeszintézis során képesek beépülni a cisztein és a metionin helyére, megváltoztatva a fehérjék másodlagos szerkezetét, enzim esetében az aktív centrum működési kinetikáját vagy kofaktor kötését, és végeredményben funkcióképtelen fehérjék keletkeznek (összefoglalva Kolbert és mtsi. 2019a által). A szelén felboríthatja a növények természetes hormonháztartását és a makro- és mikroelemek felvétele és asszimilációs útvonalai is károsodást szenvedhetnek a szelénterhelt növényben (Kolbert és mtsi. 2016). A szelén többféle mechanizmus révén képes prooxidánsként fokozni az oxidatív stresszjelátvitelt. A citoplazmában a szelenit gyorsan reakcióba lép a glutationnal, és szeleniddé alakul, s a reakció során $O_2^{\bullet-}$ szabadul fel (Chen és mtsi. 2007). Ez a folyamat aktiválja az antioxidáns védelmi rendszert fehérje- és génszinten is (Dimkovikj és Van Hoewyk 2014). A nagy mennyiségű szelén képes kimeríteni a glutationrendszert, és így megváltoztatni a sejt redoxállapotát (Grant és mtsi. 2011). A szelén által hosszú távon okozott oxidatív károsodásokat jól leírja a szakirodalom (pl. Freeman és mtsi. 2010, Grant és mtsi. 2011); ezek nem különböznek jelentősen más abiotikus stressz által okozott hatásoktól. A szelénterhelés növeli a mitokondriális $O_2^{\bullet-}$ -tartalmat, ami kihat az elsődleges metabolizmusra (Vallentine és mtsi. 2014), és a szelén hatással lehet a kloroplasztiszban található vas-kén komplexeket tartalmazó proteinekre is (Fisher és mtsi. 2016).

A növények között szeléntűrő képességük alapján megkülönböztetünk elsődleges hiperakkumulálókat, melyek a hajtásukba több mint 1000 mg/kg szelént tudnak felhalmozni, magas szelénkoncentrációk mellett is növekednek, és nem mutatnak károsodást. Ilyen faj az Észak-Amerika középső és nyugati részén honos, nagy szeléntartalmú területeken növő *Astragalus bisulcatus* (Trippe és Pilon-Smits 2021). A toleráns és hiperakkumuláló növényfajok tűrése azon alapszik, hogy képesek a szelént intracellulárisan elkülöníteni és nem fehérjeépítő aminosavak szintézisében felhasználni. Ennek a folyamatnak a kulcsenzime a szelenocisztein-metiltranszferáz, ami a SeCys metil-SeCys-né (MeSeCys) való átalakítását katalizálja. Mivel a MeSeCys nem tud fehérjékbe épülni, így a szelén ilyen formában való tárolása a tolerancia fontos eleme (Barillas és mtsi. 2012, Sabbagh és Van Hoewyk 2012).

Továbbá a hiperakkumuláló fajok gázneművé alakítva volatilizálják a MeSeCys-t, ami szintén egy lényeges toleranciamechanizmus (Trippe és Pilon-Smits 2021).

2.3. A GYÖKÉRNÖVEKEDÉST SZABÁLYOZÓ BELSŐ FAKTOROK

Az, hogy az enyhe környezeti stressz által indukált főgyökér-rövidülést oldalgökér-indukció kíséri, arra utal, hogy a sejtosztódási folyamatok a periciklusban toleránsabbak a sejtmegnyúláshoz képest. Ennek oka lehet az endodermisz mint gát jelenléte és a központi henger jellegzetes szerveződése. Mindenesetre ezeket a környezeti jelek által kiváltott gyökérmorfológiai változásokat endogén jelek (fitohormonok és növekedési jelmolekulák, mint a nitrogén-monoxid) hálózata koordinálja.

2.3.1. Auxin

A fő természetes auxinforma, az indol-3-ecetsav (IES) növekedési folyamatok széles skáláját szabályozza, beleértve olyan folyamatokat, mint az OGY-iniciáció, a FGY-megnyúlás, a gyökérszörképződés vagy a gravitropikus görbülés (Roychoudhry és Kepinski 2022). Képződése nem teljesen tisztázott, valószínűleg az összetett útvonalak és a bioszintézis enzimek működésbeli sokszínűsége miatt. Több, az IES szintézisét katalizáló triptofánfüggő és -független útvonalat írtak le, mégis a növényekben az előbbieket tekintik a leginkább lényegesnek az endogén auxintartalom kialakításában (Blakeslee és mtsi. 2019).

A gyökérrendszer endogén auxinegyensúlya alapvető fontosságú a szerkezet kialakulásában. A gyökér apikális merisztémájában az auxin bioszintézisében szereplő gének fokozott kifejeződést mutatnak, ami lehetővé teszi az IES nagymértékű, lokális képződését. A gyökércsúcsban fennálló auxingrádiens kialakításában a lokális szintézis mellett a poláris transzport is részt vesz (Grieneisen és mtsi. 2007). A poláris és a floém alapú transzport serkenti az oldalgökér-primordiumok fejlődését, de a lokális auxin bioszintézise is nagy hatással van ezek iniciációjára (Cavallari és mtsi. 2022).

Az IES steady-state szintje lecsökkenhet a konjugáció és a degradáció által. Az IES konjugálódhat aminosavakkal vagy cukrokkal, elraktározódhat a magokban, és felhasználódhat a korai csíranövény-fejlődés során. A közelmúltban kiderült, hogy az IES főként a GH3-ILR1-DAO útvonalon keresztül inaktiválódik (Hayashi és mtsi. 2021).

Az IES transzlokációja a növényi testben egy szigorúan szabályozott és irányított, növény-specifikus folyamat, a poláris auxintranszport révén valósul meg, mely a gyökérnövekedést lehetővé tevő ún. auxin grádiens hozza létre. Az AUXIN

RESISTANT1/LIKE AUX1 családba tartozó fehérjék és a PIN-szerű fehérjék auxin influxot valósítanak meg; ez utóbbiak a citoplazma és az endoplazmatikus retikulum (ER) között szállítják az auxint. A sejtből kifelé irányuló auxintranszportban a szállítómolekulák két csoportja vesz részt: PIN-FORMED (PIN) fehérjék és különböző ABC transzporter-szerű foszfolipoproteinek (Naramoto 2017, Geisler és Murphy 2006).

Auxin hiányában az AUX/IAA represszor gátolja az auxin indukálta gének transzkripcióját a MYC2/ARF koaktivátorhoz való kötődése által, hiszen így egy inaktív állapot alakul ki. Megfelelő auxinszint mellett a hormon egy molekuláris ragasztóként működik az AUX/IAA és a TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX1 (TIR1/AFB) között, mivel általa tud kapcsolatba lépni a represszor és a receptor. Arabidopsisban 29 AUX/IAA válaszgént és 23 ARF-et találtak. A represszor és a koaktivátor igen nagy száma utal arra, hogy az auxinválasz meglehetősen komplex, mely függ az auxinszinttől és a specificitástól, valamint attól, hogy milyen erős a kapcsolat a TIR1-AUX/IAA-AUX/IAA-ARF között. A növényi hormon jelátvitel során a leucinban gazdag TIR1 F-box auxinreceptor köti meg az auxint. Az IES közvetlenül lép kapcsolatba az F-box fehérje TIR1-gyel, és elősegíti az AUX/IAA transzkripcionális represszor degradációját azzal, hogy aktiválja a különböző auxinválaszgéneket. Az auxin által aktivált SCFTIR1 komplex a kötődés után ubiquitin molekulákat kapcsol az AUX/IAA korepresszorhoz, amely ezután leválik a receptorról, és degradálódik a 26S proteoszóma által. A folyamat következményeképp a MYC2/ARF transzkripciós aktivátorok aktív állapotba kerülnek, majd beindul az auxinindukált gének transzkripciója, a gének expressziója. Létezik egy proteoszóma-független auxin-jelátvitel is, melyhez a receptor (ABP1) az ER-ben és a sejt falban lokalizálódik, és fontos szerepe van a sejtosztódás és a sejtmeinyulás során (Gallei és mtsi. 2020).

2.3.2. Citokininek

A gyökérrendszer architektúrájának kialakításában az auxin mellett a citokinin fitohormonnak is lényeges szerepe van, hiszen a gyökérsüvegben található nagy mennyisége kompenzálja az auxin OGY-iniciációra kifejtett pozitív hatását, így segít fenntartani a gyökér apikális dominanciáját, vagyis az optimális gyökérzetstruktúrát (Kuderová és mtsi. 2008, Li és mtsi. 2021). A *de novo* szintézis, katabolizmus, influx és efflux, továbbá a konjugátumok képződése és lebomlása a citokinin biológiai aktivitásának fontos regulátorfolyamatai. A citokinineknek négy típusát különböztetik meg növényekben: ezek a transz-zeatin (tZ), N⁶-adenin, cisz-zeatin és a dehidrozeatin (Mok és Mok 2001). Arabidopsisban a citokinin jelátviteli

mechanizmusa különböző stressz- és tápanyagválaszokat mediál pl. ozmotikus stressz, nitrátérzékelés és -asszimiláció, szulfát- és foszfátasszimiláció vagy vasfelvétel kapcsán (Werner és Schmölling 2009).

A citokinin-bioszintézis kezdő lépéseit az adenzin foszfát-izopentiltranszferáz (IPT) katalizálja, és a reakció során keletkezett termékek átalakítását a citokróm P450 mono-oxigenáz (CYP735A1, CYP735A2) végzi. A ribozidvegyületek aktív formává történő átalakítása két eltérő útvonalon mehet végbe, és végül aktív citokininvegyület alakul ki (összefoglalva Li és mtsi. 2021). A citokininnek inaktivációja konjugáció (pl. *N*-glikoziláció, Pokorná és mtsi. 2021) vagy a citokinin-oxidáz/dehidrogenáz (CKX) által katalizált degradáció révén valósulhat meg. A CKX enzimek a citokinin oxidatív oldallánchasisítással degradálják. Arabidopsisban eddig 7 CKX gént azonosítottak, melyek megváltozott expressziója növekedésbeli változást okoz. Mindez arra utal, hogy a citokinineknek fontos szabályozó szerepük van a sejtciklusban: befolyásolják a sejt képzés sebességét és a sejt differenciációt a merisztémákban és a képződő szervekben (Werner és mtsi. 2006).

Arabidopsisban a citokinin jelérzékelését és jelátvitelét egy kétkomponensű szabályozórendszer végzi. A citokinin jelátvitelével kapcsolatos ismeretek megszerzését az Arabidopsis-citokininreceptorok (Arabidopsis-hisztidinkinázok; AHKs: CRE1/AHK4, AHK2 és AHK3), a downstream transzmitterek (Arabidopsis hisztidin-foszfotranszfer proteinek; AHP) és az Arabidopsis-válaszregulátorok (A- vagy B-típusú ARR-ok; Arabidopsis response regulators) felfedezése tette lehetővé (összefoglalva Li és mtsi. 2021). A régi hipotézissel ellentétben, mely szerint a citokininnek csak a gyökérben szintetizálódnak, és xilémtranszporttal kerülnek fel a hajtásba, az újabb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a citokininnek a növény különböző szerveiben képződhetnek. Míg Arabidopsisban az IPT gének számos szervben (pl. levelekben, szárban, virágokban, gyökerekben) expresszálódnak (Miyawaki és mtsi. 2004, Takei és mtsi. 2004a), addig a CYP735A gének főként a gyökerekben fejeződnek ki (Takei és mtsi. 2004b).

A citokininnek mobilis hormonok, ezért valószínűleg létezik egy olyan export-import rendszer, ami a plazmamembránon keresztüli szállításukat végzi. Jelenleg két transzporter családról feltételezik, hogy részt vesz a hormon szállításában: a purin permeáz és az equilibratív nukleozid transzporter család (Nedvöd és mtsi. 2021). A citokininnek hosszú távú transzlokációja xilém és floémeleken keresztül valósulhat meg. A xilémnedvben főként a citokinin tZR formája, még a floémelekekben a legfőbb izopentenil-típusú citokininnek, az izopentenil-ribozidok és -ribotidok fordulnak elő. A citokininnek xilémeleken keresztül transzportját környezeti és endogén szignálok egyaránt befolyásolják (Kudo és mtsi. 2010).

Gyökérben a citokininek elsődlegesen a merisztéma és a megnyúlási zóna közötti átmeneti zónában található sejtek differenciálódását segítik elő, viszont drasztikusan csökkentik a sejtosztódási rátát a merisztematikus zónában (Ioio és mtsi. 2007).

2.3.3. Etilén

A gyökérzet fejlődését befolyásoló egyik további hormon az etilén, egy gáznemű messenger. A fokozott etilén-jelátvitel olyan változásokat idéz elő, mint a gyümölcsérés, levelek és virágok szenescenciája vagy a csíranövény hármass válasza (Abeles és mtsi. 1992, Pattyn és mtsi. 2021). Az Arabidopsis gyökerének nyugalmi centrumában (quiescent centre, QC) az etilén elősegíti a sejtosztódást, amit az etiléntúltermelő *eto1* mutáns QC sejtjeinek számszerű sejtosztódásai bizonyítanak. A CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) mutáns – melyben az etilén jelátvitel folyamatosan zajlik – szintén mutatja az *eto1* fenotípusát. Ezek alapján elmondható, hogy az etilén olyan jelátviteli hálózatok tagja, melyek a QC mitotikus aktivitásának kialakításáért felelősek a posztembrionális gyökérfejlődés során (Takatsuka és Umeda 2014). Továbbá az etilénről felismerték, hogy negatívan szabályozza az OGY-iniciációt, -növekedést és -megnyúlást Arabidopsis-ban (Ivanchenko és mtsi. 2008, Negi és mtsi. 2008).

Az etilén szintézise más fitohormonokéhoz képest meglehetősen egyszerű. A prekursor az S-adenozilmetionin, ami 1-aminociklopropán-1-karbonsavvá (ACC) alakul az ACC-szintáz (ACS) enzim katalizációjával. ACS enzim aktivitásának másik terméke metil-tioadenozin, ami metioninná alakul vissza a Yang-ciklusban azért, hogy a sejtben egy optimális metioninszint fenn tudjon maradni. Az ACC-t egy oxidáz enzim (ACO) vas(II), oxigén és aszkorbát jelenlétében etilénné oxidálja szén-dioxid és hidrogén-cianid felszabadulása közben. Az ACS és ACO enzimeket multigén családok kódolják, és az mRNS szintjeiket és aktivitásukat endogén faktorok (pl. auxin) és környezeti faktorok (pl. ársztás, nehézfémek) különbözőképpen szabályozzák (Pattyn és mtsi. 2021).

Az etilén esetében az oxidáció általi inaktiváció fiziológiailag nem releváns a steady-state etilénszintek szabályozásában, aminek oka az etilén gyors eldiffundálása a szövetekből. Az etilén rövid távú mozgása a sejtől az intercelluláris gáztérbe való diffúziójával valósul meg, míg hosszú távon ACC formájában szállítódik (Park és mtsi. 2017).

Az etilén érzékelése az ER membránban lokalizálódó receptorkomplex segítségével valósul meg, ami a prokarióta kétkomponensű szabályozórendszer hisztidin protein-kináz receptorához hasonló. Arabidopsis-ban öt etilénreceptort azonosítottak (ETR1, ETR2, ERS1,

ERS2, EIN4). A receptorok N-terminális transzmembrán doménje köti az etilént rézkofaktor jelenlétében. Etilén hiányában a receptorok aktiválják a CTR1 szerin/treonin protein kinázt, ami negatívan szabályozza a downstream etilén-jelátvitelt. Etilén kötése esetén a receptorok inaktíválódnak, a CTR1 deaktiválódik, ami hozzájárul, hogy az ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2) pozitív regulátorként működjön, és indukálja a sejtmagi lokalizációjú EIN3 transzkripciós faktort. Az EIN3 az ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF1) gén promóterhez köt, és etilénfüggő módon aktiválja a génátírást. Az ERF1 transzkripciós faktor és más etilén válaszleletet kötő fehérjék a célgének promóterében lévő GCC box motívummal interakcióba lépve aktiválják a downstream etilénválaszokat. Ezen a lineáris jelátviteli útvonalon kívül feltételezik nemlineáris etilén-jelátviteli elemek működését is, melyek feed-forward és feedback mechanizmusokat foglalnak magukba (összefoglalva Binder 2020).

2.3.4. Strigolaktonok

A strigolaktonokat az 1960-as években mint parazita növények csírázási induktorait azonosították (Cook és mtsi. 1966). Azóta kiderült, hogy szerteágazó növekedésszabályozó hatásaik miatt a magasabbrendű növények egy újabb fitohormonsoportjának tekinthetők (Bouwmeester és mtsi. 2019).

A terpenoid laktin szerkezetű strigolaktonokat az ABC gyűrűrendszer megléte avagy hiánya alapján két csoportba lehet osztani: kanonikus és nem kanonikus strigolaktonok (Waters és mtsi. 2017). A strigolaktonok karotinoidokból szintetizálódnak a kloropasztiszokban olyan enzimek részvételével, mint a β -karotin-izomeráz (D27), két karotinoidhasító dioxigenáz (CCD7/MAX3 és CCD8/MAX4), a citokróm P450 (MAX1), és a LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE. A képződött karlakton a citoplazmába szállítódik, ahol karlaktonsavvá alakul, ami a természetes strigolaktonoknak a közös prekuzora (Yoneyama és Brewer 2021). A strigolaktonokkal kapcsolatos aktív, gyorsan fejlődő kutatást jelzi, hogy a közelmúltban leírták a karlaktonsav közvetlen átalakulását orobanhollá (Wakabayashi és mtsi. 2019), azonosították a strigolaktonszintézisben részt vevő citokróm P450 and a 2-oxoglutarátfüggő dioxigenáz géneket *Lotus japonicus*-ban (Mori és mtsi. 2020), valamint kimutattak hidroxil-karkalton származékokat mint a strigolaktonszintézis intermediereit Arabidopsisban (Yoneyama és mtsi. 2020). Mindezek ellenére a karlaktonot követő szintézislépések nagyrészt még ismeretlenek. A strigolaktonszintézis a gyökérben és a hajtásban is zajlik, és a strigolaktonjel a gyökérből a hajtásba terjed (Foo és mtsi. 2001).

A strigolakton-jelérzékelés a α/β hidroláz aktivitást mutató DWARF14 (D14) receptorral valósul meg oly módon, hogy az intakt strigolaktonmolekula aktiválja a D14-et, ami viszont deaktiválja a bioaktív strigolaktonokat a jeltranszmissziót követő hidrolitikus bontás révén. Következésképp az aktivált D14 kötődni tud a MORE AXILLARY GROWTH2 (MAX2/D3) F-box típusú fehérjéhez, ami kijelöli a DWARF53 és SMXL represszorokat proteasómális lebontásra, és a génátírás indukálódik (Wang és mtsi. 2022). Újabban a MAX2 fehérjéről feltételezik, hogy a karrikin-jelátvitel (lásd később) szabályozója (Wang és mtsi. 2022), és a MAX2 downstream célpontjai felelősek a strigolakton- és a karrikinszignál transzdukciós útvonalainak megkülönböztetéséért (Swarbreck és mtsi. 2020). A strigolakton- és a karrikin-jelátvitel átfedését alátámasztja az is, hogy a rac-GR24 (GR24 sztereoizomerek racemér keveréke) mindkét jelátviteli utat aktiválja (Scaffidi és mtsi. 2014, Li és mtsi. 2016). A strigolaktonindukált génexpresszió olyan fiziológiai hatásokban nyilvánul meg, mint a gyökérarchitektúra kialakítása optimális és tápanyaghiányos körülmények között (Marzec és Melzer 2018). A strigolakton- és a karrikin-jelátvitel együttesen járul hozzá az oldalgökérsűrűség és az epidermális sejthossz szabályozásához (Villaécija-Aguilar és mtsi. 2019).

2.3.5. Karrikinek

A karrikineket elsőként a vegetáció részleges égése következtében képződő füst olyan összetevőiként azonosították, amik csírázást indukálnak (Flematti és mtsi. 2004). A karrikinek abiotikus módon a szénhidrátok, pl. a cellulóz elégetése során képződnek, és specifikus receptorral (KARRIKIN-INSENSITIVE2, KAI2) rendelkeznek a növényi sejtekben (De Cuyper és mtsi. 2017). A strigolaktonokhoz hasonló szerkezetük van (butenolid gyűrű), és ahogyan az előbb utaltam rá, a strigolaktonok és a karrikinek jelátvite kapcsolódik, és részben hasonló növekedésszabályozó szerepük van a gyökérzetben (Villaécija-Aguilar és mtsi. 2019), bár a gyökérszőr-fejlődés és a gyökérnövekedés orientációja karrikinszabályozott folyamatok (Villaécija-Aguilar és mtsi. 2019). A legújabb eredmények szerint a KAI2 az auxintranszporterek lokális akkumulációján keresztül elősegíti a gyökérszörmegnyúlást foszfáthiányos környezetben (Villaécija-Aguilar és mtsi. 2022). Továbbá a karrikinek fokozzák a magok és a csírák érzékenységét a fényel szemben, amiből arra következtettek, hogy a karrikinek adaptációs kémiai jelként javíthatják a csírafejlődést tűzeseményeket követően (Yao és Waters 2020).

2.4. A NITROGÉN-MONOXID (NO) ÉS A REAKTÍV NITROGÉNFORMÁK (RNF)

Vizsgálataink középpontjában a NO és az abból származó nitrogéntartalmú RNF-molekulák álltak, ezért ezeket részletesen, egy külön fejezetben mutatom be. Ezt az is indokolja, hogy a NO növekedésszabályozó szerepén túl stressztoleranciát fokozó vagy a stressz általi károsodásokhoz hozzájáruló molekula is, tehát bemutatása e szempontok mentén is szükséges.

2.4.1. A NO metabolizmusa a növényekben

A NO az elsőként felfedezett gáz halmazállapotú jelátviteli molekula (Palmer és mtsi. 1987). A szerepét és sokszínűségét jól bizonyítja, hogy 1992-ben a Science folyóirat az év molekulájává választotta, valamint Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad élettani és orvostudományi Nobel-díjat kapott 1998-ban az élettani hatásainak és jelátvitelének felfedezéséért.

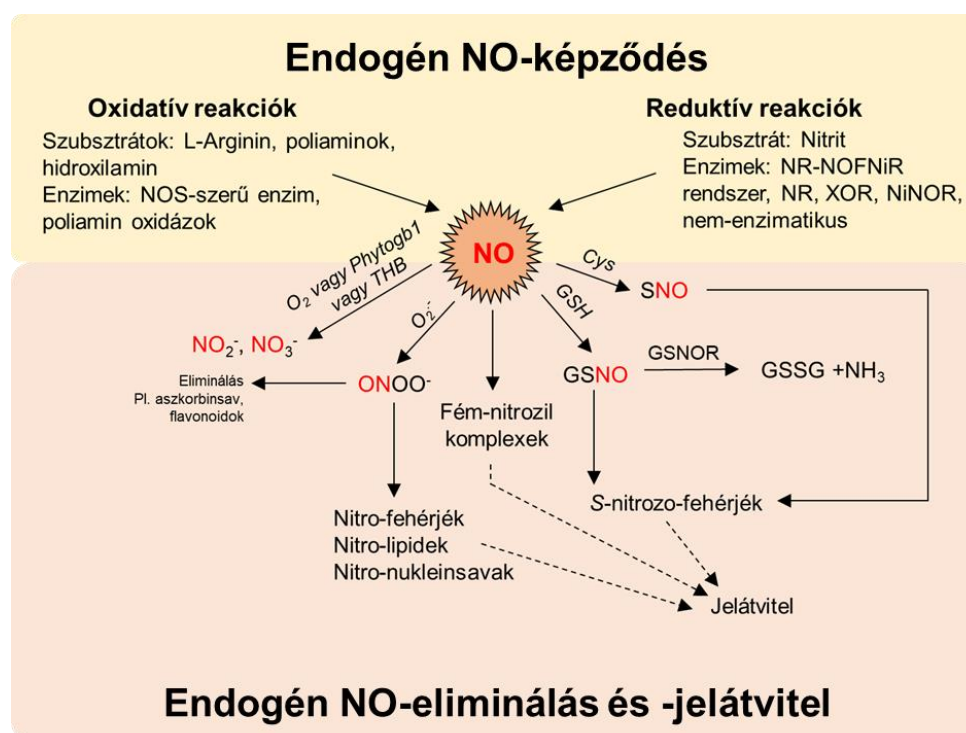
A NO egy kisméretű, kétatomos szabad gyök. Erősen lipofil, így igen jó diffúziós értékekkel rendelkezik a plazmamembránokon keresztül (Goretski és Hollocher 1988). Az átlagos féléletideje 2–30 s között változik (Habib és Ali 2011), de kis koncentrációban ez számottevően megnőhet (Stöhr és Ullrich 2002), ami ideális jelátviteli molekulává teszi. A kémiai tulajdonságát tekintve az atomok közötti kettős kötés egy páratlan elektront eredményez a π pályán. Ezen elektron eltávolításával nyerhető a nitrozónium kation, míg egy elektron felvétele nitroxil aniont eredményez. A biológiai rendszerekben a NO-gyök és a redox formái mellett számos nem gyökös származék is megtalálható, mint például a peroxinitrit (ONOO^-), S-nitrozoglutation (GSNO), dinitrogén-trioxid, dinitrogén-tetroxid stb., melyeket együttesen reaktív nitrogénformáknak nevezünk.

A légkörben természetes vagy antropogén hatásokra keletkező NO a hajtásrendszeren, valamint a talajban a bakteriális tevékenység révén keletkező NO a gyökérrendszeren keresztül bejuthat a növénybe. A növényi testben endogén keletkező NO le is adódhat a légkörbe és a talajba, ami azt jelenti, hogy a növény és a környezete között folyamatos a NO kicserélődése (Ma és mtsi. 2020). A magasabbrendű növényekben az endogén NO-képződésnek oxidatív, redukzív, enzimikus és spontán útvonala lehetséges. Állati rendszerekben főként az argininfüggő NO-szintáz (NOS, E.C. 1.14.13.39) izoformákkal történik a NO szintézise az erekben, az ideg- és immunsejtekben. Az enzim L-argininből NADPH jelenlétében képes a citrullin és a NO szintézisére (Groves és Wang 2000). Ilyen, állatihoz hasonló NOS-enzimaktivitás a magasabbrendű növényekben kérdéses, miután Jeandroz és mtsi. (2016) nem találtak az állatival homológ NOS-szekvenciát több mint 1300 szárazföldi növényfaj

genomjában. Az enzimaktivitást több korai munkában kimutatták (összefoglalva Corpas és Barroso 2017), de a genomban mindmáig nem találták meg a hozzá illő proteint kódoló gént (Hancock és Neill 2019). Habár NOS-szerű enzimet felfedeztek az *Ostreococcus tauri* zöldalgában (Foresi és mtsi. 2010), majd később *Synechococcus* PCC 7335 cianobaktériumban (Correa-Aragunde és mtsi. 2018), a magasabbrendű növényekben valószínűleg inkább proteinek együttműködéséből eredeztethető az argininfüggő NO-termelés (Corpas és Barroso 2017). A poliaminok, mint redukált nitrogénvegyületek oxidatív lebontása is eredményezhet NO-képződést, és ebben a folyamatban a réz-amin-oxidázok szerepét feltételezik, de a pontos mechanizmus nem tisztázott (Wimalasekera és mtsi. 2011, Groß és mtsi. 2017). Az oxidált nitrogénvegyületek redukciója is vezethet NO-képződéshez a növényi sejtekben, és ezek a folyamatok a nitrogénasszimilációhoz kötődnek (Sanz-Luque és mtsi. 2013). A nitrát-reduktáz (NR, EC 1.7.1.1) katalizálja a nitrit NO-dá alakítását, bár ez az aktivitás az enzim nitrát-redukciós aktivitásának csupán kb. 0,5–1%-a (Rockel és mtsi. 2002). A NR közvetett módon is hozzájárulhat a NO keletkezéséhez, mivel képes NAD(P)H-ről elektronok átvitelére egy NO-formáló nitrit-reduktáz enzimre, amit *Chlamydomonas reinhardtii* algában írtak le (Chamizo-Ampudia és mtsi. 2016). Ez az enzim nitritet alakít át NO-dá, de a szerepét magasabbrendű növényekben még vizsgálni kell. A gyökérben a nitrit:NO-reduktáz enzim katalizálja a NO keletkezését nitritből, de erre a mechanizmusra vonatkozóan is kevés az ismeretünk (Stöhr és mtsi. 2001). A xantin-oxidoreduktáz anaerob közegben, nitrit vagy NADH jelenlétében a nitritet NO-dá redukálja (Harrison 2002). Ezt a reakciót állati rendszerekben jellemezték, növényekben egy hasonló mechanizmus meglétét feltételezik (del Río és mtsi. 2004). A nem enzimatis NO-képződés speciális körülmények között jöhet létre. A nitrit spontán redukciója savas kémhatású környezetben NO-ot eredményez árpa (*Hordeum vulgare* L.) magvak táplálósövetének aleuron sejtjeiben (Bethke és mtsi. 2004). A karotinoidok képesek *in vitro* nitrogén-dioxid redukciójára fény hatására, ami NO-felszabadulással járt (Cooney és mtsi. 1994), továbbá a nitritből való NO-képződést feltételeztek aszkorbát jelenlétében (Archer és mtsi. 1975), valamint a hidroxilamin oxidációja során is képződhet NO a növényi sejtekben (Rümer és mtsi. 2009), azonban e folyamatok élettani jelentősége nem tisztázott.

A NO-szint precíz szabályozásához elengedhetetlen az eliminációs folyamatok aktiválódása. Ezen folyamatok magukba foglalják a NO molekuláris oxigénnel történő, nitritet és nitrátot eredményező reakcióját, valamint a NO reakcióját fitoglobinnal vagy csonka („truncated”) hemoglobinnal, mely reakciók során nitrát keletkezik, és ez a reakció főleg az

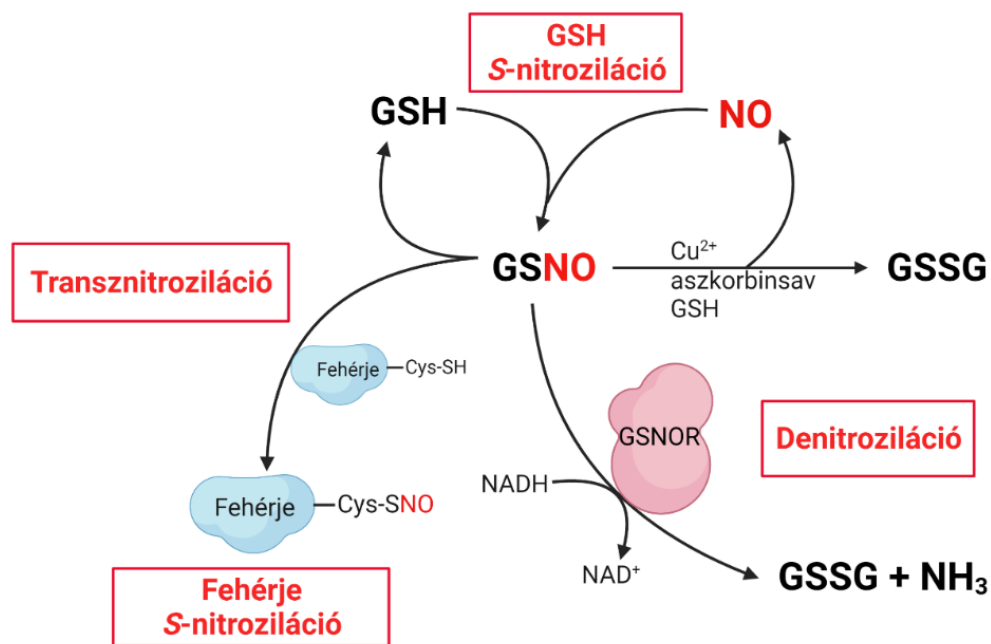
anoxia és hipoxia során játszik fontos szerepet (Cochrane és mtsi. 2017, Sanz-Luque és mtsi. 2015). Különböző ROF, mint például a $O_2^{\bullet-}$, szintén csökkentik a NO mennyiségét, s a reakció során $ONOO^-$ keletkezik, amely aszkorbinsav vagy flavonoidok jelenlétében eliminálódhat (Bartlett és mtsi. 1995, Haenen és mtsi. 1997). A steady-state NO-szintet befolyásoló további reakció, a glutation S-nitrozilációja NO által, ennek során vagy dinitrogén-trioxid és glutation, vagy glutionilgyök és NO reagál (Keszler és mtsi. 2009). A reakcióban egy glutationmódosulat, és GSNO képződik. A glutationon kívül a NO reakcióba léphet szabad cisztein tiollokkal is, és S-nitrozotiolok (SNO) képződnek. A NO képződésének és eliminációjának ismert útvonalait a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra: Az endogén NO-szintézis oxidatív és reduktív útvonalai, eliminációs reakciói valamint a NO-jelátvitelben fontos molekulák képződése növényekben. Rövidítések: NOS, nitrogén-monoxid szintáz; NR-NOFNiR rendszer, nitrát reduktáz-NO-formáló nitrit-reduktáz rendszer, XOR, xantin-oxidoreduktáz; NiNOR, nitrit-NO-reduktáz, Phytogb1, fitoglobulin1; NO_2^- , nitrit; NO_3^- nitrát; $O_2^{\bullet-}$, szuperoxid gyökkanion; $ONOO^-$, peroxinitrit; GSNO, S-nitrozoglutation; GSH, glutation; Cys, cisztein; SNO, S-nitrozotiol; GSNOR, S-nitrozoglutation-reduktáz; GSSG, glutation diszulfid; NH_3 , ammónia. (saját ábra).

A GSNO egy mobilis NO-raktár, amely spontán módon réz, aszkorbinsav vagy glutation jelenlétében NO-ot képes felszabadítani, valamint közvetíti az egyik fehérjemódosító jelátviteli folyamatot, az S-nitrozilációt. A sejtbeli GSNO-szint összemérhető az oxidált glutation mennyiségével (Airaki és mtsi. 2011), ami ily módon szintén kihat a sejt redox homeosztázisára. A NO-felszabadulás nélküli GSNO-bontásért a GSNO-reduktáz (GSNOR,

EC. 1.2.1.1) enzim a felelős, amely NADH-függő úton a GSNO-t GSSG-re és ammóniára bontja (Jahnová és mtsi. 2019). Ez a reakció közvetlenül befolyásolja a NO-szintet és a kapcsolt jelátvitelt (denitroziláció), valamint a redukált és oxidált glutation arányát, így a sejt redox homeosztázisát is (Jahnová és mtsi. 2019). Az enzim egy gén (At5g43940) által kódolt lúdfüben, és kimutatták a citoplazmában és a sejtmagban (Xu és mtsi. 2013). A GSNOR-protein homodimer, ciszteinben gazdag, az alegységekhez két-két cinkatom kapcsolódik (Lindermayr 2018). A GSNO metabolizmusát a 3. ábra mutatja be.



- 3. ábra:** Az *S*-nitrozoglutation (GSNO) metabolizmusa növényekben. A GSNO a nitrogén-monoxid (NO) és a glutation (GSH) *S*-nitrozilációs reakciójában képződik. A GSNO kétértékű fémion (pl. réz), aszkorbinsav vagy GSH jelenlétében GSSG-re bomlik NO felszabadulása mellett. A GSNO-t a GSNO-reduktáz (GSNOR) denitrozilálja egy NADH-függő reakcióban, mely során GSSG és ammónia (NH₃) képződik NO felszabadulása nélkül. A GSNO a célfehérjék cisztein (Cys) aminosavának tiol (SH) csoportjával reagálva *S*-nitrozotiol (SNO) csoportot alakít ki az *S*-nitrozilációs reakcióban. Transznitroziláció is történhet, melynek során a NO-csoport egyik fehérjéről a másikra kerül át (Leterrier és mtsi. 2011 nyomán).

2.4.2. A NO-kapcsolt jelátvitel a növényekben

A növényi sejtekben nincs NO-specifikus receptor, így a jeltovábbításért más folyamatok felelősek. A tudomány jelenlegi állása szerint a NO-szignál-transzdukció elsősorban a NO és a rokon molekulák fehérjékkel való közvetlen reakciói révén valósul meg. Ezek a NO/RNF-függő poszttranszlációs módosítások három típusúak: a fémnitroziláció, az *S*-nitroziláció és a tirozinnitráció. A fehérjetirozin-nitráció a nitro-oxidatív stressz egyik legáltalánosabb folyamata, így ennek tárgyalására a következő fejezet részben (2.4.4.) kerül sor.

A protein *S*-nitroziláció során a GSNO specifikus cisztein aminosavak tiol oldalláncaira NO-csoportot kapcsol. A reakció reverzibilis, és széleskörűen elterjedt a magasabbrendű növényekben, így a nitrozatív jelátvitel egyik kulcsreakciójáról beszélhetünk. Az érintett proteinek kimutatása folyamatosan zajlik, de elmondható, hogy mind fiziológiás, mind stresszhelyzetben jelentős folyamatról van szó (pl. Lindermayr és mtsi. 2005, Fares és mtsi. 2011, Gietler és mtsi. 2016, Pan és mtsi. 2021). Hu és mtsi. (2015) 926 *S*-nitrozilációs módosításra érzékeny fehérjét mutattak ki lúdfűben, melyek 28,96%-a az elsődleges anyagcseréhez volt köthető. A kimutatott proteinek között vannak a redox homeosztázisban fontos szerepűek is, mint például a kataláz (KAT1-3), az aszkorbát-peroxidáz (APX1), a dehidroaszkorbát-reduktáz 1 és 2 és a szuperoxid-dizmutáz (SOD2).

A NO másik jeltovábbító reakciója a fémnitroziláció, melynek során a NO-molekula metalloproteinek átmeneti fémjével hoz létre komplexet. A növényeknél ez a jelátvitelt módosító mechanizmus elvi lehetőség csupán, mert közvetlen kísérleti bizonyítékkal nem rendelkezünk. Állati rendszerekben hemproteinekben – mint a guanilát-cikláz vagy a citokróm-c-oxidáz – már bizonyították a szerepét (Hess és mtsi. 2001). A növényi sejtre a NO két, általánosabb jelátviteli útvonalon keresztül is hat. Kimutatták a NO- és kalcium-jelátvitel kölcsönhatásait. A kalciumszint növekedését indukálhatja a NO, valamint a kalcium is képes elősegíteni a NO-termelést, különösképp immunválasz során (Jeandroz és mtsi. 2013). Leírták továbbá a NO-nak a proteinkináz-jelátvitellel (mitogénaktivált és ciklinfüggő proteinkinázok) való interakcióját (összefoglalva Courtois és mtsi. 2008).

2.4.3. A NO mint gyökérfejlődési regulátor

A NO növekedési és fejlődési szabályozóként alapvető szerepet tölt be a magas növények életciklusának minden szakaszában (Sanz és mtsi. 2015). Szabályozza, illetve finomhangolja a magvak csírázását (Pandey S és mtsi. 2019), a sztómazáródást (Van Meeteren és mtsi. 2020), a virágzást (Zhang és mtsi. 2019), a pollentömlő növekedését (Shah és mtsi.

2019), a gyümölcserést (Corpas és mtsi. 2020) és az öregedést (Bruand és Meilhoc 2019). A gyökérrendszerben a legtöbb növekedési-fejlődési folyamatban – mint a főgyökérmegnyúlás, a gravitropikus válasz (Kruse és Wyatt 2022), az oldal- és járulékos gyökerek iniciációja (Yu és mtsi. 2014), a gyökérszőrök képződése (Lombardo és Lamattina 2018) – felismerték a szerepét. Ezeket a hatásokat a NO a növekedést-fejlődést elsődlegesen irányító fitohormonokkal kölcsönhatásban fejti ki.

Az auxin hatása sok esetben a NO közvetítésével nyilvánul meg. Pagnussat és munkatársai (2002, 2003) korai munkáikban megállapították, hogy a NO elengedhetetlen a gyökér fejlődéséhez, valamint a NO-szint auxinindukált növekedését figyelték meg a járulékos gyökerek fejlődése során, és a NO-nak a kalcium-, MAPK-, cGMP- és foszfatidsav-jelátvitellel való kapcsolatát is feltárták (Yu és mtsi. 2014). Később paradicsomban (*Solanum lycopersicum* L.) bizonyították a NO részvételét az auxin által kiváltott OGY-fejlődés során (Correa-Aragunde és mtsi. 2004, 2006), és ezt a felfedezést kiegészítették azzal, hogy a NO elősegíti az auxin által szabályozott sejtosztódás aktivációját, de nem befolyásolja a sejtciklus folyamatát lucernában (Ötvös és mtsi. 2005). Az Arabidopsis oldalgyökér-primordiumaiban az exogén auxinkezelés hatására NO-produkció történik, ami a NR enzim aktivitásától függ (Kolbert és mtsi. 2008a). Továbbá a NO szerepet játszik az ozmotikus stressz mint külső faktor, és az indol-3-vajsav mint belső faktor által szabályozott gyökérfejlődési folyamatokban (Kolbert és mtsi. 2008b). Az auxin NO-képződésre gyakorolt hatásai mellett maga a NO is befolyásolja az auxin metabolizmusát, transzportját és jelátvitelét. A NO képes gátolni az akropetális auxintranszportot Arabidopsis gyökerében a PIN1 csökkentésével proteoszóma-független poszttranszkripciós mechanizmusok révén (Fernández-Marcos és mtsi. 2011). További eredmények bizonyítékot szolgáltatottak a NO auxinjelátvitelt befolyásoló szerepére. Terrile és munkatársai (2012) kimutatták ugyanis, hogy a TIR1 auxinreceptor-fehérje 140-es és 480-as cisztein aminosava S-nitrozilálódni képes, ami elősegíti a TIR1 AUX/IAA represszor fehérjékkel való interakcióját. Az S-nitroziláció következtében a represszor lebomlik, így az auxinfüggő génexpresszió fokozódik (Terrile és mtsi. 2012).

Az utóbbi években egyre több tanulmány igazolja a citokinin és a NO közötti komplex és több szinten működő kapcsolatot. Növényfajtól és élettani válaszoktól függően mind szinergista, mind antagonistá interakciók megfigyelhetők (Freschi 2013). Az első megfigyelés, mely szerint a NO-nak szerepe van a citokinin szignalizációjában, az *Amaranthus caudatus* betalaintermelését vizsgáló kísérletről származik. Nemcsak a citokinin, hanem a NO-donorok is kiváltották a pigment akkumulációját, és a citokinin által indukált folyamatban a NO szükséges regulátornak bizonyult (Scherer és Holk 2000). Pozitív kapcsolat áll fenn a citokinin

és a NO között a levélszenescencia, a fotoszintézis, a programozott sejthalál, a differenciáció és a sejtosztódás szabályozása során (Mishina és mtsi. 2007, Carimi és mtsi. 2005, Shen és mtsi. 2012). Ezekkel ellentétben a két molekula közötti antagonista kapcsolatot figyeltek meg például módosított citokininszintet tartalmazó dohánynövényekben (Wilhelmová és mtsi. 2006). Bizonyítást nyert az is, hogy néhány citokinintípus, mint például a zeatin, reakcióba tud lépni a NO-dal vagy annak származékával, például a ONOO⁻-tel, és az interakció során inaktív citokininszármazékok keletkeznek. A citokinin adenin csoportjának nitrációja által a NO endogén szintje csökken, tehát a citokinineknek védő szerepe lehet a nitrozatív stresszel szemben (Liu és mtsi. 2013). Ezenfelül a NO negatív hatással lehet a citokinin-jelátvitelre is a hisztidintartalmú foszfortranszmitter 1 *S*-nitrozilációjával, amely kulcseleme a citokininszignáltranszdukció többlépcsős foszforilációs mechanizmusának (Feng és mtsi. 2013). Habár számos tanulmány igazolta, hogy az exogén citokininkezelés koncentrációfüggő módon NO-produkciót eredményez sejt kultúrákban és csíranövényekben (pl. Carimi és mtsi. 2005, Shen és mtsi. 2012), ellentétes eredmények is megjelentek mutáns vagy transzgenikus növényekről, amelyek módosított citokinintartalommal rendelkeztek, vagy külső citokininkezelést kaptak (Xiao-Ping és Xi-Gui 2006, Romanov és mtsi. 2008, Liu és mtsi. 2013). Ez arra utal, hogy a NO-citokinin interakció jellege a vizsgált élettani folyamat függvényében változó lehet.

Az etilén a levél, a virág és a termés öregedéséért felelős hormonként ismert, míg a NO az aktív növekedésben, a termésérés és a szenescencia késleltetésében vesz részt. A fiatal növények általában magas NO-szintet mutatnak, ami az öregedés során fokozatosan csökken, míg az etilén koncentrációja egyre nő, tehát a két molekula mennyisége ellentétes irányban változik, ami antagonizmust feltételez (Leshem és mtsi. 1998). Ennek egyik bizonyítéka, hogy a NO csökkenti az etilén emisszióját szintézisének befolyásolásával, még hozzá az ACO downregulációja révén. Emellett a NO csökkenti az ACS aktivitását és génexpresszióját is, és az enzimet *S*-nitroziláció révén is módosíthatja. Az etilén-bioszintézis prekursorára, az *S*-adenozil metioninra is negatív hatással lehet a NO csakúgy, mint a metilmetionin ciklus enzimeire (pl. metionin-szintáz, metionin-adenozil-transzferáz); ezek aktivitása felelős a homociszteináz, a metionin és a SAM képződéséért. Ezen enzimek is *S*-nitrozilálódhatnak. Az etilén szintézise tehát bizonyítottan erőteljesen NO-szabályozott (Palma és mtsi. 2019).

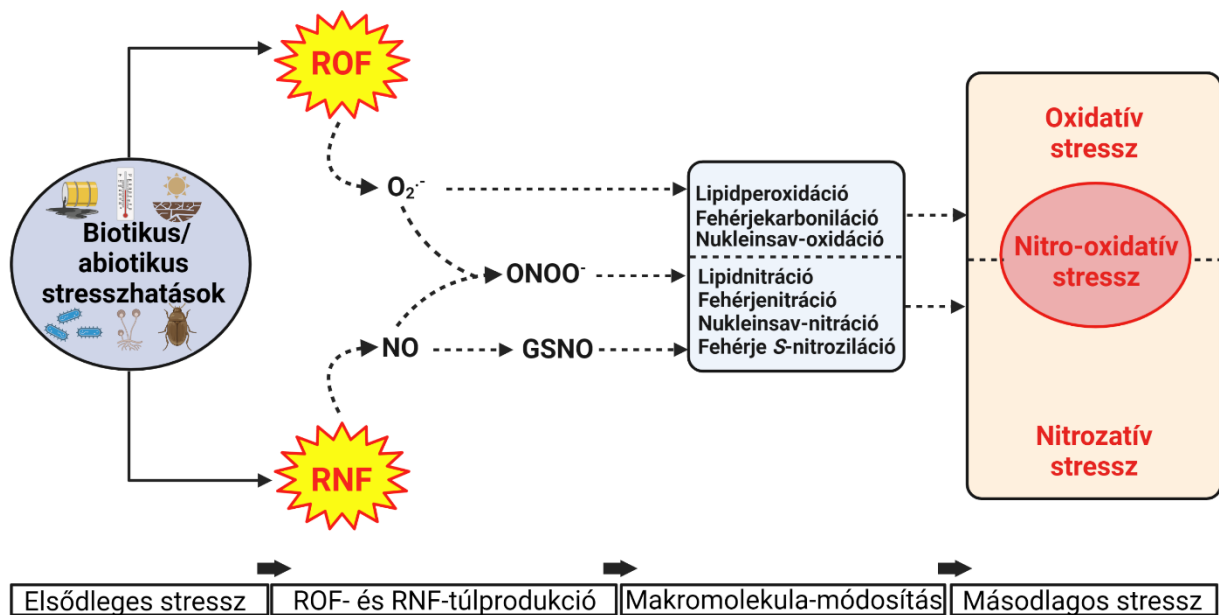
A strigolakton-jelátvitel és a NO közötti kapcsolatot ezidáig legfőképp a gyökérrendszerben tanulmányozták, és a munkák következtetései meglehetősen diverzek (Kolbert 2019). Úgy tűnik, hogy a NO a strigolakton-bioszintézis upstream szabályozója oldal- és járulékosgyökér-fejlődés során napraforgóban (Bharti és Bhatla 2015), valamint nitrátindukált gyökérmegnyúlás során kukoricában. Ez utóbbi folyamat során a képződő NO

csökkenti a strigolakton-bioszintézist (feltehetőleg a CCD enzim fémnitrozilációja révén), így megváltozik a PIN-szabályozott auxintranszport, és sejtmelegnyúlás történik. Az exogén strigolakton NO-szintézist indukál, ami a strigolaktonszintek negatív visszacsatolásos szabályozását teheti lehetővé (Manoli és mtsi. 2016). Egy másik rendszerben a NO a strigolaktonszintek upstream pozitív regulátora, hiszen a nitrogén- és foszforhiány szintén gyökérmegnyúláshoz vezet, s ebben a folyamatban a felhalmozódott NO-jel valószínűleg kiváltja a D53 fehérje proteaszómális lebontását, fokozva ezáltal a strigolakton-jelátvitelt és a megnyúlást (Sun és mtsi. 2016). Újabb közlemények a strigolaktonnak a NO-jelátvitel részvételével megvalósuló, stresszt enyhítő hatásairól számolnak be (pl. Qiu és mtsi. 2021, Liu és mtsi. 2022).

2.4.4. A NO és a stresszválaszok: nitro-oxidatív stressz versus toleranciafokozás

A nitro-oxidatív stressz a növénybiológiai szakirodalomban egy újabb kifejezés, melyet Corpas és Barroso (2013) javasolt először. A ROF- és RNF-metabolizmus nagymértékben átfedi, és általánosságban a legtöbb stresszfolyamat mindkét jelátvitelt módosítja. A nitrozatív stressz a RNF túlprodukciója következtében bekövetkező fehérje-, lipid- és nukleinsavnitrációt, valamint a fehérje S-nitrozilációját foglalja magában. Az oxidatív stressz a ROF túlprodukciója által kiváltott lipid- és nukleinsav-oxidációs, valamint fehérjekarbonilációs folyamatokat egyesíti. Ez utóbbi során karbonilcsoportok kapcsolódnak lizin, prolin és treonin oldalláncokhoz a Fenton-reakción keresztül. A ROF-függő fehérjekarboniláció másik lehetősége az, hogy α,β -telítetlen aldehidek karbonilcsoportokat alakítanak ki cisztein, hisztidin vagy lizin oldalláncokon egy nem enzimátikus folyamatban (Tola és mtsi. 2021). A módosulás eredményeképpen a fehérjék elveszítik aktivitásukat, és a 20S proteaszóma lebontja őket (Gili és mtsi. 2014), vagy az erősen karbonilált fehérjék aggregátumokat képezhetnek a citoplazmában citotoxicitást okozva (Nyström 2005).

A különböző stresszfolyamatok hatására az egy időben létrejövő nitrozatív és oxidatív stresszt (vagyis nitro-oxidatív stresszt) számos abiotikus faktor esetén leírták, ezek a szárazság (Signorelli és mtsi. 2013), a nehézfémterhelés (Georgiadou és mtsi. 2018) és az alacsony hőmérséklet (Begara-Morales és mtsi. 2019). A nitro-oxidatív stressz folyamatait a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A nitro-oxidatív stressz folyamatai. Rövidítések: ROF, reaktív oxigénformák, RNF, reaktív nitrogénformák; NO, nitrogén-monoxid; $O_2^{\bullet-}$, szuperoxid gyökianion; $ONOO^{\bullet-}$, peroxinitrit; GSNO, S-nitrozoglutation. Corpas és Barroso (2013) nyomán.

A ROF- és a RNF-molekulák közötti kapcsolat egy figyelemre méltó példája a glutation NO-függő S-nitrozilációja, amit a 2.4.1. fejezetben bemutatam. További érdekesség, hogy a GSNOR enzim a katalitikus helyén lévő cisztein aminosavakon keresztül képes reakcióba lépni a H_2O_2 -dal, ami cinkfelszabadítással és ennek következményeként az enzim inaktiválódásával jár (Kovács és mtsi. 2016). Megfigyelték továbbá a GSNOR S-nitrozilációját, mely szintén inaktiválja az enzimet (Guerra és mtsi. 2016). Továbbá a GSNOR enzim a redukált és oxidált glutation arányának megváltoztatásán keresztül közvetlenül befolyásolja a sejt redoxegyensúlyát (Jahnová és mtsi. 2019). Mindezek fényében a GSNO/GSNOR rendszer valószínűleg az egyik kulcspontja a ROF- és RNF-metabolizmus kapcsolódásának, s a szoros kölcsönhatásuk részben ezen a molekulán keresztül valósul meg.

A másik kapcsolódási pont a molekulacsaládok között a $ONOO^{\bullet-}$ képződése, ami a NO és $O_2^{\bullet-}$ reakciójának az eredménye. A $ONOO^{\bullet-}$ által katalizált reakció a nitráció, melynek során az különböző makromolekula-oldalláncokat nitro ($-NO_2$) csoporttal lát el. Ez létrejöhet lipidekben, nukleinsavakban, de a növényekben leginkább vizsgált folyamat a fehérjenitráció. Ez a reakció létrejöhet olyan aminosav-oldalláncokon, mint a tirozin, metionin, cisztein és triptofán. A legnagyobb fiziológiai jelentőségű ezek közül a tirozinnitráció, melyet régóta a nitrozatív jelátvitel markereként tartanak számon (Corpas és mtsi. 2007). A reakciósorozat biokémiaiilag két lépésre osztható: az első lépésben a tirozin *ortho* állású szénatomján oxidáció történik, és a molekula tirozilgyökké alakul. Ez a tirozilgyök a $ONOO^{\bullet-}$ -ből származó nitráló

ágenssel egy addíciós reakción keresztül 3-nitrotirozint alkot (összefoglalva Kolbert és mtsi. 2017 által). A módosítás a fehérjén megváltoztathatja annak térbeli konformációját, s legtöbbször inaktíválja az érintett fehérjét. A KAT, APX, a mitokondriális mangán SOD1, a peroxiszómális réz/cink SOD3, a kloroplasztikus vas SOD3 és a monodehidroaszorbát-reduktáz enzimekről bizonyították, hogy a nitráció inaktíválja őket, míg a glutation-reduktáz aktivitására a módosításnak nem volt számottevő hatása (Corpas és mtsi. 2021). A tirozinnitráció fiziológias körülmények között is lejátszódik a növényekben (Kolbert és mtsi. 2017), de a nitrációs mintázat megváltozik különböző abiotikus és biotikus stresszfaktorok hatására (Corpas és mtsi. 2021). Az így módosuló aktív fehérjeállomány számottevő toxicitást jelenthet a növények számára. Az irodalomban már több tanulmányban is azonosítottak a nitráció hatására módosuló proteineket (Corpas és mtsi. 2021), ezek listája folyamatosan bővül. A nitráció az inaktíváláson kívül megzavarhatja a fehérjék foszforilációját is, így a két poszttranszlációs módosítás közötti kompetíció sem kizárható (Souza és mtsi. 2008). A nitrált fehérjék hosszú távú sorsa a növényekben néhány folyamatot foglal magába. A nitro-csoport redukálódhat amino-tirozin gyökké, bár növényekben ezt még nem sikerült kimutatni. Állati rendszerekben beszámoltak már a denitrációról, vagyis a nitro-csoport távozásáról a tirozinról, de erre sincs bizonyíték növényi fehérjék esetén. A nitrált fehérjék eltávolítására vonatkozó legáltalánosabb, növényekben is valószínűsített folyamat a poliubikvitinációt követő proteaszómális degradáció (Castillo és mtsi. 2015, összefoglalva Kolbert és mtsi. 2017 által).

Egyenlőre kevésbé ismert folyamat a növényekben a nukleinsav-nitráció, ennek során a ONOO^- és a nukleotidok reakciója a 8-oxoguanin és a 8-nitroguanin képződését eredményezi. A 8-nitroguanin megjelenését dokumentálták már *Phytophthora infestans*-szal fertőzött burgonyában (Izbiańska és mtsi. 2018) és almamagvak csírázásakor (Andryka-Dudek és mtsi. 2019). A nitro-nukleotidok jelátvitelt szabályozhatnak, transzkripciót befolyásolhatnak, vagy mutagenikus hatás révén fokozhatják a károsodásokat (Petřivalský és Luhová 2020).

A RNF-indukált lipidnitráció folyamatában a zsírsavdalláncokhoz kapcsolódik a nitro-csoport. Ezidáig nitro-linolénsavat mutattak ki lúdfűben, borsóban (*Pisum sativum* L.) és rizsben (*Oryza sativa* L.), valamint nitro-olajsavat detektáltak paradicsomban és repce csíranövényekben (Vollár és mtsi. 2020). Érdeemes megemlíteni, hogy mindkét molekula képes NO felszabadítására, vagyis endogén NO-donorokként funkcionálhatnak (Begara-Morales és mtsi. 2021).

Amellett, hogy a NO és a RNF az elsődleges stresszfaktorok hatását súlyosbító nitro-oxidatív stressz kiváltásában vesznek részt, hozzájárulhatnak a toleranciafokozáshoz is. Vagyis a RNF kétarcú molekulák, és hatásuk függ a stressz erősségétől, ami meghatározza képződésük

mértékét. A nagymértékű stressz hatására tartósan megnövekedett RNF-mennyiség a széles körű makromolekula-módosítások révén nitrozatív stresszt okoz, míg tranziens, mérsékelt képződésük védekezési folyamatokat indíthat be. Ezek rendkívül sokrétűek a stressz jellegétől függően. Például a metalloidek jelenlétében a transzporterek NO általi alulszabályozásától egészen a szárazságstressznek kitett növényben a sztómazárásig terjednek. Egy közös mechanizmus azonban azonosítható a legtöbb stressz esetén, ami a ROF-metabolizmus alulszabályozása, vagyis az oxidatív stressz NO általi mérséklése. Ez több szinten megvalósulhat, hiszen a NO közvetlen reakcióban eliminálja a $O_2^{\bullet-}$ -t (Koppenol és mtsi. 1992), aktiválhatja az antioxidáns enzimek génjeinek kifejeződését (Grün és mtsi. 2006), a nem enzimátikus antioxidánsok szintézisét, és az antioxidáns enzimfehérjéket poszttranszlációsán is aktiválhatja S-nitroziláció révén (lásd 2.4.2. fejezet).

3. KUTATÁSI CÉL

Csoportunk a reaktív nitrogénformák szerepét tanulmányozza a növények környezeti stresszorokra adott válaszaik során, és a munka célja a következő tudományos kérdések megválaszolása:

(1) Milyen általános következtetések vonhatók le a SIMV-gyökérfenotípus megjelenésére vonatkozólag különböző kémiai elemek többlete esetén különböző növényfajokban?

A kérdés megválaszolása céljából réz-, cink-, szelén-, nikkel- és ólomkezelések mellett tanulmányoztuk a SIMV megjelenését táptalajon vagy tápoldatban nevelt *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* növényekben.

(2) Van-e összefüggés a SIMV megjelenése és az elem-hiperakkumuláció/tűrés között?

A kérdés megválaszolása céljából összehasonlítottuk a szelénrel kezelt hiperakkumuláló/tűrő *Astragalus bisulcatus* és a szelénérzékeny *Astragalus membranaceus*, valamint egy másik rendszerben a nikkellel kezelt hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* két ökotípusának gyökérnövekedési válaszait.

(3) Milyen jelkapcsolatok azonosíthatók a NO és a fitohormonok között az elemtöbblet által szabályozott gyökérfejlődés során?

Vizsgáltuk az auxin-NO jelkapcsolatot rézstressznek kitett lúdfűben, az auxin-NO, citokinin-NO és az etilén-NO kapcsolatot szelénkezelés mellett, és a strigolakton-NO, valamint karrikin-NO jelkapcsolatot stresszmentes körülmények között.

(4) Részt vesz-e a NO a növények elemtöbblettel szembeni toleranciájának kialakításában?

A NO stresszt enyhítő hatását tanulmányoztuk rézstressz, szelenitstressz valamint cinkterhelés esetén lúdfűben.

(5) Részt vesz-e a NO az elemtöbbletek által kiváltott nitro-oxidatív stressz kialakításában?

A nitro-oxidatív stressz folyamatait vizsgáltuk cink- vagy cink-oxid nanorészecske-kezelést kapott *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* fajokban, szelénrel kezelt *Brassica* és *Astragalus* fajokban, valamint nikkellel kezelt *Arabidopsis thaliana*-ban, *Brassica juncea*-ban és *Odontarrhena lesbiaca* ökotípusokban.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. NÖVÉNYI ANYAG ÉS NEVELÉSI KÖRÜLMÉNYEK A KÜLÖNBÖZŐ RENDSZEREKBEN

4.1.1. *Astragalus* fajok nevelése és szelenátkezelése táptalajos rendszerben

A szelénérzékeny *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge magjait Prof. Aaron Chang (Kaohsiung Medical University, Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung) bocsátotta rendelkezésünkre, a szelént hiperakkumuláló *Astragalus bisulcatus* L. (Hook.) A. Gray faj maganyagát a B&T World Seeds (Aigues-Vives, Franciaország) cégtől szereztük be. A magok felszínét 20 (v/v) %-os nátrium-hipoklorit oldatban sterilizáltuk 20 percig, amit négyszeri steril desztillált vizes öblítés követett 20 perc alatt. Ezután a magok felszínét steril fémrácsokon leszáritottuk, majd P400-as dörzspapírral eltávolítottuk a külső maghéjat a csírázás lehetővé tétele céljából. Szögletes, 12×12 cm oldalú, műanyag Petri-csészékben feles erősségű Murashige–Skoog-táptalajt készítettünk (0,8 (w/v) % agar, 1% szacharóz, Murashige és Skoog 1962), amit 0 (kontroll), 50 vagy 100 μM nátrium-szelenáttal (Na_2SeO_4) kiegészítettünk. Az előkészített magokat ezután a táptalajokra helyeztük úgy, hogy a megdörzsölt oldaluk érintkezzen a táptalaj felszínével. A növények az alábbi körülmények között nevelkedtek 14 napig: 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fényintenzitás, 12 órás nappali és 12 órás sötét periódus, 55–60% páratartalom, 25 ± 2 °C hőmérséklet.

4.1.2. *Odontarrhena lesbiaca* növények nevelése és nikkellezése rizotronrendszerben

Az *Odontarrhena lesbiaca* P. Candargy (= *Alyssum lesbiacum* (P. Candargy) Rech. f.) egy Lesbos szigetének serpentin talajain elő endemikus faj, melynek rendkívüli a nikkelfelhalmozási képessége. A sziget két geográfiaileg elkülönülő területéről (Ampeliko és Loutra) gyűjtöttek be egyedeket, és több mint 100 véletlenszerűen kiválasztott egyedről gyűjtöttek magokat. A maganyagot dr. Panayiotis G. Dimitrakopoulos (Department of Environment, University of Aegean, Mytilene, Leszbosz, Görögország) bocsátotta rendelkezésünkre. A magokat 72 óráig 26 °C-on, sötétben csíráztattuk, majd a talajjal töltött rizotron felszínére helyeztük (1 csíra/rizotron). A 15 cm széles, 30 cm magas és 1,6 cm vastagságú rizotronrendszer elülső oldalát egy teljesen átlátszó, tükröződésmentes, 3 mm vastag plexilap, a hátsó oldalát pedig egy nem átlátszó plexilap alkotta. A rizotronokat Klasman Potgrond P szubsztrát (finomszerkezetű 100% fekete tőzeg maximum 8 mm-es

részecskemérettel, pH 6,0; 210 mg N/L, 240 mg P₂O₅/L, 270 mg/L K₂O) és 20% homok keverékével töltöttük meg, és a kezdeti víztartalmat 70%-ra állítottuk be. A két lap közötti talajréteg vastagsága 1 cm volt. A kezelt rizotronok talajába 3000 mg/kg nikkel-kloridot (NiCl₂) adagoltunk. A rizotronokat kétnaponta öntöztük 10 mL desztillált vízzel. A növények 14 napig növekedtek ellenőrzött körülmények között (lásd előbb).

4.1.3. *Arabidopsis thaliana* nevelése és réz-, cink-, szelenit-, szelenátkezelése táptalajos rendszerben

Kísérleteink során minden esetben az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű L. Heynh.) Columbia-0 ökotípusát (Col-0) használtuk vad típusként. A különböző kísérleteinkben nagyszámú mutánsvonalat használtunk fel. Az alkalmazott hormonmutáns és transzgenikus vonalakat a Függelék 1. táblázatában, a NO-homeosztázisban érintett mutáns és transzgenikus vonalakat a 2. táblázatában, az aszkorbát-tartalomban érintett vonalakat pedig a Függelék 3. táblázatában tüntettem fel. Minden esetben a magokat 70% (v/v) etanollal 1 percig, majd 5% (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal 20 percig sterilizáltuk, majd ötször átmostuk steril desztillált vízzel, ezt követően pedig feles erősségű Murashige–Skoog-táptalajra (0,8% agar, 1% szacharóz) helyeztük azokat. A táptalajokat kiegészítettük az elemkezelésekkel. Minden esetben a növénynevelés függőlegesen elhelyezett, szögletes Petri-csészékben folyt ellenőrzött körülmények között (lásd előbb).

A réztöbblet vizsgálatokhoz a táptalajokba 0 (kontroll), 5, 25 vagy 50 µM réz-szulfátot (CuSO₄) adagoltunk, és a növények 7 napig növekedtek a táptalajokon. További kezelések: 100 µM nátrium-nitroprusszid (SNP), 100 µM [2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid] cPTIO, 10 µM naftilftálsav (NPA) vagy 50 µM cPTIO, 10 µM SNP. A kezeléseket a táptalajhoz adagoltuk a növények ültetése előtt.

A szelén esetén a táptalajok 0 (kontroll), 10, 15, 20 vagy 40 µM nátrium-szelenitet (Na₂SeO₃) tartalmaztak, és a növények 2, 4 vagy 7 napig növekedtek azokon. További kezelések: 100 µM *S*-nitrozo-*N*-acetil-penicillamin (SNAP), 0,1 µM 6-benzilaminopurin (BA), 5 nM 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC), 1,5 µM aminoetoxivinilglicin (AVG), 250 µM GSNO, 800 µM cPTIO. A BA, AVG, ACC kezeléseket steril szűrővel ellátott fecskendővel adagoltuk az 50 °C-ra hűtött táptalajhoz. A NO-donor és gyökfogó kezeléseket a kész táptalaj felszínére cseppentettük steril szűrőn keresztül a növénynevelés 4. napján, így ezek a kezelések 72 óra időtartamúak voltak.

A strigolakton-NO vizsgálati rendszerben az *Arabidopsis* növények kezelés nélküli, kontroll, feles erősségű Murashige–Skoog-táptalajokon növekedtek 7 napig. Az 50 °C-ra hűlt

táptalajhoz adagoltuk, steril szűrővel ellátott fecskendővel a *rac*-GR24-et (2 μ M). A GSNO-t (250 μ M) a 4 napos csíranövényeket tartalmazó táptalaj felszínére cseppentettük (1 mL/Petri-csésze) steril szűrővel ellátott fecskendő segítségével, vagyis ebben az esetben a kezelés 72 óra időtartamú volt.

A cinktolerancia-vizsgálatához a lúdfüvonalakat 250 μ M cink-szulfát tartalmú vagy 15 μ M cinket tartalmazó, kontrolltáptalajon neveltük 7 napig. Négy nappal a csírázást követően 1 mM glutationt adtunk a táptalaj gyökereket tartalmazó felszínére steril szűrő és fecskendő segítségével (1 mL/Petri-csésze).

4.1.4. *Brassica juncea* és *Brassica napus* nevelése és cinkkezelése tápoldatban

A *Brassica juncea* L. Czern. (cv. Negro Caballo, indiai mustár) magjait a Gyógynövénykutató Intézet Kft.-től szereztük be (Budakalász, Magyarország), a *Brassica napus* L. (cv. GK Gabriella, olajrepcse) maganyagát pedig a Gabonakutató Nonprofit Kft. (Szeged, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A fajok magjait 70% (v/v) etanollal, majd 5% (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal sterilizáltuk, majd perlitel megtöltött Eppendorf-csővekbe helyeztük (1 mag/cső), melyek teljes erősségű Hoagland-tápoldat felszínén úsztak. A növényeket az első valódi levelek megjelenéséig (9 napig) előneveltük, majd a tápoldatot lecseréltük 50, 150 vagy 300 μ M cink-szulfátot (ZnSO_4) tartalmazó tápoldatokra. A kontrollnövények teljes Hoagland-tápoldaton növekedtek a teljes kísérleti periódus alatt, ami 5 μ M ZnSO_4 -ot tartalmazott. A növények ellenőrzött körülmények között növekedtek 7 vagy 14 napig (lásd előbb).

4.1.5. *Brassica juncea* és *Brassica napus* nevelése és cink-oxid nanorészecske-kezelése szűrőpapíron

A magokat az előzőekben leírtak szerint sterilizáltuk, majd 9 cm átmérőjű, üveg Petri-csészébe, szűrőpapírra helyeztük (30 mag/Petri-csésze). A szűrőpapírokat 5 mL desztillált vízzel (kontroll) vagy 25 mg/L vagy 100 mg/L koncentrációjú cink-oxid nanopartikulum (NP) oldattal nedvesítettük át a magok kihelyezése előtt. A NP-oldat készítése során a megfelelő mennyiséget kimértük, és feloldottuk desztillált vízben. A ~8 nm részecskeméretű NP-okat az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszéken állították elő, és jellemezték. Az aggregálódás elkerülése érdekében az oldatokat 45 percig ultrahangos szonikátorban kezeltük. Ezt követte a pH beállítása 5,7–5,8-as értékre. A csírázás ellenőrzött körülmények között történt 5 napig (lásd előbb).

4.1.6. *Brassica juncea* nevelése és szelénformákkal való kezelése tápoldatban

A *Brassica juncea* L. Czern. (cv. Negro Caballo) magok felszínét 5 (v/v) %-os nátrium-hipoklorit oldattal fertőtlenítettük, majd azok perlittel töltött Eppendorf-csövek felszínére kerültek. A csövek teljes erősségű Hoagland-tápoldat felszínén lebegtek, és a növények 9 napig előnevelkedtek, majd megtörtént a növények szelénkezelése a tápoldaton keresztül, amely 0 (kontroll), 20, 50 vagy 100 μM nátrium-szelenitet vagy nátrium-szelenátot tartalmazott. A mintavétel minden kezelés esetében 14 nap múlva történt. A növények ellenőrzött körülmények között nevelkedtek (lásd előbb).

4.1.7. *Brassica juncea* és *Arabidopsis thaliana* nevelése és nikkelkezelése táptalajban

A magvakat az előzőek szerint felületi sterilizálásnak tettük ki, majd 12×12 cm oldalú szögletes, műanyag Petri-csészékben elkészített 0 (kontroll), 25, 50, 75 vagy 100 μM nikkel-kloridot (NiCl_2) tartalmazó, feles erősségű Murashige-Skoog (0,8% agar, 1% szacharóz) felszínére helyeztük. Az *A. thaliana* esetén a kezelési periódus 7 napos volt, a *B. juncea* esetében 5 napos. A függőlegesen elhelyezett Petri-csészékben a növények ellenőrzött körülmények között nevelkedtek (lásd előbb).

4.2. A CSÍRÁZÁS, BIOMASSZA-PRODUKCIÓ ÉS GYÖKÉRNÖVEKEDÉS VIZSGÁLATA

A csírázási százalék megállapításához minden Petri-csészében összeszámoltuk a csírázott magok számát, majd elosztottuk az összes kiültetett mag számával. A gyökér és a hajtás friss tömegét analitikai mérleggel, milligrammban állapítottuk meg. A főgyökérhosszmérés az *Astragalus* fajok esetén vonalzóval történt, az *Odontarrhena lesbiaca* esetén a szkennelt rizotronokról készült digitális felvételeken a Fiji szoftver segítségével (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsi. 2012). Az *Arabidopsis* esetén a toleranciaindex kiszámításához a következő képletet használtuk:

$$\text{Toleranciaindex (\%)} = \frac{\text{Kezelt főgyökérhossz}}{\text{Átlagos kontroll-főgyökérhossz}} \times 100$$

A látható összes oldalgökérszám meghatározása az *Astragalus* fajok esetén a főgyökér teljes hosszában, manuálisan történt, az *Odontarrhena lesbiaca* esetén szoftveresen (lásd előbb). Az *Arabidopsis thaliana* esetén mikroszkópos vizsgálat segítségével elkülönítettük az oldalgökér-kezdeményeket (kisebb, mint VII. stádium, Malamy és Benfey 1997 szerint) és a

kifejlett oldalgyökereket (nagyobb, mint VII. stádium, Malamy és Benfey 1997 szerint). A megfigyeléshez a Zeiss Axiovert 200M mikroszkóp 20x objektívét (Carl Zeiss Jena, Németország) használtuk.

4.3. ELEM-TARTALOM-ANALÍZIS

A gyökér- és hajtásmintákat először lemostuk desztillált vízzel, amit 70 °C-on történő 72 órás szárítás követett. A száraz növényi anyagból 100 mg-ot porítottunk el, és 65 (v/v) %-os salétromsavval két órán át inkubáltuk. Ezután 30 (w/v) %-os H₂O₂-oldattal kezeltük a mintákat, majd és 200 °C-on 1600 W-on 15 percig roncsoltuk (Mars Xpress CEM zárt mikrohullámú roncsolókészülékkel). Ezután a mintákat megfelelő térfogatra hígítottuk desztillált vízzel, és induktív csatolású plazma-tömegspektrometriával (ICP) megállapítottuk a nikkel- és a szeléntartalmat. Az *Odontarrhena lesbiaca*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* minták a SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kerültek vizsgálatra (Agilent 7700 Series, Santa Clara, Egyesült Államok), míg az *Astragalus* mintákat az SZTE Növénybiológiai Tanszéken elemeztük (Thermo Scientific XSeries II, Asheville, USA). A nikkel- és a szelénkoncentrációkat µg/g száraz tömeg (SZT) egységben adtuk meg.

A cink-oxid nanorészecskével kezelt *Brassica* fajok esetén a transzlokációs faktort az alábbi képlet alapján számítottuk ki:

$$\text{Transzlokációs faktor} = \frac{\text{elemkoncentráció a hajtásban}}{\text{elemkoncentráció a gyökérben}}$$

4.4. MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

4.4.1. Nem fluoreszcens mikroszkópos technikák

A β-glükuronidáz (GUS) aktivitását a transzgenikus *Arabidopsis*-vonalakban (Függelék 4. táblázat) X-Gluc szubsztrátfestéssel tettük láthatóvá Zhong és mtsi. (2014) alapján. Teljes csíranövényeket inkubáltunk 90% (v/v) acetonban -20 °C-on 30 percig, majd háromszor mostuk 1× PBS pufferrel (pH 7,4). Ezután a csíranövényeket a festékoldatban inkubáltuk 8 órán át 37 °C-on. A festékoldat összetétele a következő volt: 1 mM K₃Fe(III)(CN)₆, 0,5 mM K₄Fe(II)(CN)₆, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mg/mL X-Gluc 1× PBS pufferben). Ezt követően a csíranövényeket 30, 70 és 90%-os (v/v) etanollal átmostuk, és 90% (v/v) etanolban tárgylemezre helyeztük őket. A vizsgálatuk Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal történt.

A cink-oxid nanorészecskék Brassica-gyökérszövetekben való internalizációját transzmissziós elektronmikroszkópiával detektáltuk. A főgyökér felszívási zónájából származó szegmenseket 3% glutáraldehid oldatban (PBS pufferben, pH 7,4) fixáltuk. A mintákat Embed812 (EMS, Hatfield, PA, USA) segítségével beágyaztuk, és 70 nm vékonyságú metszeteket készítettünk Ultracut S ultra-mikrotómmal (Leica, Bécs, Ausztria). Az uranil-acetáttal és ólom-citráttal történő festést követően a minták tanulmányozása Jeol 1400 plus készülék (Jeol Tokió, Japán) segítségével az SZTE ÁOK Patológiai Intézetében történt.

A lipidperoxidáció során keletkezett reaktív aldehideket Arasimowicz-Jelonek és mtsi. (2009) nyomán mutattuk ki. A gyökereket 20 percre Schiff-reagens oldatba helyeztük, majd ezt lecseréltük ismét 20 percre 0,5 (v/v) %-os $K_2S_2O_5$ oldatra a lilásrózsaszín szín stabilizálása érdekében. A vizualizációhoz a Zeiss Axiovert 200M mikroszkópot használtuk.

A növények sziklelevelében a $O_2^{\bullet-}$ detektálása nitro-kék-tetrazólium (NBT) festéssel történt. A sziklevelek 5 mL NBT oldatban (1 mg/mL, 10 mM foszfát pufferben, pH 7,4) 30 percig lettek festve fényen, majd ezután 80 (v/v) %-os etanolban 30 percig 70 °C-on való inkubáció révén kivontuk a pigmenteket, ami láthatóvá tette a lilás elszíneződést. A vizualizációhoz Zeiss Axiovert 200M mikroszkópot használtunk.

4.4.2. Fluoreszcens mikroszkópos technikák

A cinkszint kimutatására az *Arabidopsis thaliana* vonalak gyökérzetében alkalmaztuk a Zinquin [etil-(2-metil-8-*p*-toluénszulfonamid-6-kinoliloxid) acetát] próbát. Elsőként a teljes csíranövényeket $1 \times$ PBS (pH 7,4) pufferben mostuk, majd 25 μ M Zinquin oldatban (PBS-ben készítve) inkubáltuk 60 percig, szobahőn, sötétben (Sarret és mtsi. 2006).

A gyökércsúcsi merisztéma sejtjeinek életképességét fluoreszcein-diacetát (FDA) fluorofórral mutattuk ki. Az *A. thaliana* esetén a teljes csíranövényeket, a többi rendszerben a kb. 2 cm hosszú gyökércsúcsi szegmenseket 10 μ M-os FDA festékoldatban (10/50 mM 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav (MES)/KCl puffer, pH 6,15) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten, majd négyszeri pufferes mosást követően tárgylemezre helyeztük őket.

A NO-molekula jelölésére DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein-diacetát) oldatot használtunk 10 μ M-os koncentrációban 10 mM trisz(hidroximetil)-aminometán (Tris)-HCl pufferben (pH 7,4) készítve. Az *A. thaliana* esetén a teljes csíranövényeket, a többi rendszerben a kb. 2 cm hosszú gyökércsúcsi szegmenseket, vagy *Astragalus* fajok esetén kézzel készített sziklelevél-keresztmetszeteket 30 percen át

sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltunk a festékoldatban, majd kétszeri, pufferes mosás után tárgylemezen vizsgáltuk őket.

A ONOO⁻ detektálására dihidrorodamin (DHR) 123 próbát alkalmaztunk. A gyökérsúcsokat, teljes csíranövényeket vagy sziklelevél keresztmetszeteket 10 µM festékoldatban (10 mM Tris-HCl puffer, pH 7,4) inkubáltuk 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten; ezt követően kétszeri mosás következett pufferrel, majd a mintát mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Sarkar és mtsi. 2014). Néhány kísérletben alkalmaztuk az aminofenil-fluoreszcein (APF) fluorofórt a ONOO⁻ specifikusabb detektálása céljából. Az intakt növényi mintákat 10 µM APF oldatban (10 mM Tris-HCl puffer, pH 7,4) inkubáltuk 60 percig, sötétben, szobahőn, majd kétszer mostuk a pufferrel a mikroszkópos analízis előtt (Chaki és mtsi. 2009).

A gyökerek O₂^{•-}-szintjének kimutatására dihidroetídium (DHE) fluorofórt használtunk. A gyökérsúcsokat vagy teljes csíranövényeket 30 percre 10 µM festékoldatba merítettük, amelyet 10 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) készítettünk. A festési lépés után kétszer mostuk pufferrel a mintát, majd tárgylemezen vizsgáltuk.

A H₂O₂ jelölésre Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin, ADHP vagy Ampliflu™) reagenst használtunk. A festékanyagot 50 µM koncentrációban oldottuk 50 mM nátrium-foszfát pufferben (pH 7,5), majd a gyökereket 30 percig festettük benne. Ezt egyszeri mosási lépés és mikroszkópos vizsgálat követte.

A GSNO és a 3-nitrotirozin indirekt immunfluoreszcenciás detektálása Astragalus fajok gyökeréből és szikleleveléből készített keresztmetszetekben és Brassica fajok főgyökerének és levelének keresztmetszetében történt. A gyökér- vagy (szik)levélszegmenseket 4 (w/v) %-os paraformaldehid oldatban fixáltuk Barroso és mtsi. (2006) alapján. A minták mosása desztillált vízzel történt, majd 5 (w/v) %-os bakteriológiai agarba lettek ágyazva, Zelko és mtsi. (2012) módszerét enyhén módosítva. A mintákból 100 µm vastagságú metszetek készültek vibratómmal (VT 1000S, Leica, Bécs, Ausztria). A metszeteket 1:2500 arányban hígított, patkányból származó GSNO elleni antitesttel (VWR Chemicals, Poole, Anglia) jelöltük egy éjszakán át. Az antitestet TBSA-BSAT pufferben (pH 7,2) hígítottuk, amely tartalmazott: 5 mM Tris-t, 0,9 (w/v) % nátrium-kloridot, 0,05 (w/v) % nátrium-azidot, 0,1 (w/v) % borjúsérum-albumint, 0,1 (v/v) % Triton X-100-t. A metszeteket háromszor mostuk TBSA-BSAT pufferben 15 perc alatt, majd 1:1000 hígítású, nyúlból származó, patkány elleni fluoreszcein-izotiocianát kapcsolt antitesttel (Agrisera, Vännäs, Svédország) inkubáltuk egy órán keresztül. Ezt a minták mikroszkópos vizsgálata követte (Corpas és mtsi. 2008).

A proteintirozin-nitráció láthatóvá tételére szintén immunjelölést használtunk Valderrama és mtsi. (2007) alapján. A metszeteket 3 napon keresztül 4 °C-on inkubáltuk 1:300-as hígítású, nyúlban termeltetett 3-nitrotirozin elleni antitesttel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Ezt háromszor ötperces mosási lépés követte TBSA-BSAT pufferben, ami után 1:1000 hígítású, kecskében termelt, nyúl elleni fluoreszcein-izotiocianát (FITC) kapcsolt másodlagos antitest (Agrisera, Vännäs, Svédország) oldatot mértünk a metszetekre. A metszetek egy óra szoba-hőmérsékletű inkubáció után tárgylemezre kerültek, és mikroszkóp alatt vizsgáltuk őket.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok a legtöbb esetben Zeiss Axiovert 200M inverz mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) történtek, amihez egy digitális kamera csatlakozik (AxioCam HR, HQ CCD, Carl Zeiss, Jena, Németország). A mikroszkóp különböző szűrőkombinációi különböző excitációs és emissziós tartománnyal rendelkeznek, így minden fluoreszcens molekulához a megfelelőt alkalmaztuk. A 49-es filterszett (excitáció: 365 nm, emisszió: 445/50 nm) az Zinquin-emisszió kimutatásra volt alkalmas. A filter 9 (excitáció: 450-490 nm, emisszió: 515-∞ nm) végtelenített emissziós tartomány a DHE festésekhez volt ideális. A filter 10 (excitáció: 450-490 nm, emisszió: 515-565 nm), ami a filter 9-hez képest végpontosított emissziós tartománnyal rendelkezik, az FDA, DAF-FM DA, DHR 123 és FITC kapcsolt immunjelölésekhez felelt meg. A filter 20 HE (excitáció: 546/12 nm, emisszió: 607/80 nm) pedig a vörös fluoreszkáló Amplex Red reagenshez volt kiváló. A fluoreszcens felvételeken az Axiovision Rel. 4.8 szoftver segítségével kvantifikáltuk a pixelintenzitásokat, ami arányos a jelölt molekula koncentrációjával.

4.4.3. Konfokális lézerszenkennung-mikroszkópia

Az analízist megelőzően a négynapos *ARR5::GFP* és *TCS::GFP* csíranövényeket 10 µg/mL propidium jodid próbával jelöltük 1 percig, majd egyszer mostuk desztillált vízzel. A mikroszkópos vizsgálat Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Németország) készülék segítségével az SZTE I. sz. Belgyógyászati Klinikán történt. A propidium jodidot 488 nm-es lézerdiódával gerjesztettük, az emissziót pedig 620 és 700 nm között detektáltuk. GFP-fluoreszcenciát 488 nm lézerdiódával gerjesztettük, és 555 nm hullámhossz alatt detektáltuk. A relatív pixelintenzitásokat a gyökércsúcsokban Zeiss Zen10 szoftverrel kvantifikáltuk.

4.5. S-NITROZOTIOL (SNO) KONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

Az SNO-koncentráció meghatározása Sievers 280i típusú NO analyzer készülék (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA) segítségével történt a müncheni Helmholtz Centrum Növénypatológiai Intézetében (Kovács és mts. 2016). 250 mg tömegű *Arabidopsis thaliana* csíranövényt kétszeres térfogatú 1× PBS (10 mM N-etilmaleimid, 2,5 mM EDTA, pH 7,4) pufferrel homogenizáltunk Fast Prep® készülékkel (sebesség: 5,5; 60 mp, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA). Ezt követően a mintákat kétszer 15 percig centrifugáltuk ($20\,000 \times g$, 4 °C). A felülúszóhoz 9:1 arányban 20 mM szulfanilamidot (1mM sósavban készítve) adtunk a nitrit eltávolítása céljából. Az ilyen módon előkészített mintákból 250 µL-t fecskendeztünk a készülék reakcióterébe, ami kálium-jodiddal volt megtöltve. Az SNO-koncentrációkat a NO Analysis (3.2-es verzió) szoftver segítségével határoztuk meg olyan módon, hogy a csúcs alatti területeket integráltuk, és kalibrációs egyenest használtunk. A kalibrációs egyenest ismert koncentrációjú nátrium-nitrit oldatok befecskendezésével készítettük.

4.6. ETILÉNKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL

Arabidopsis thaliana csíranövényeket (500 mg, 350-360 növényegyed) 0,5 mL desztillált vizet tartalmazó, gázzáró gumigyűrűvel lezárt üvegcsekben inkubáltunk 60 percig, sötétben. A gáztérből egy fecskendő segítségével 2,5 mL gázt távolítottunk el, és ezt gázkromatográfba (Hewlett-Packard 5890 Series II) injektáltuk (Poór és mtsi. 2015).

4.7. RSNO-RAC ANALÍZIS AZ S-NITROZILÁCIÓ KIMUTATÁSÁRA

Az S-nitrozilált fehérjék analízise céljából az RSNO-RAC (resin-assisted capture of SNO proteins) módszert adaptáltuk Thompson és mtsi. (2013) alapján. Teljes *Arabidopsis* csíranövényeket (2 g) dörzsöltünk el folyékony nitrogénben, majd homogenizáltunk HENT pufferben (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 1 mM EDTA, 0,1 mM neokuproin, 0,2% Triton X-100). A homogenizátumot $18\,000 \times g$ fordulattal 4 °C-on, 15 percig, majd 10 percig centrifugáltuk. A minták fehérjekoncentrációját Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg. Néhány mintát 1 mM GSNO-val kezeltünk 30 percig, többszöri keveréssel. A blokkolási lépés során a mintákat 25% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és 2M S-metil-metánეთioszulfonát jelenlétében inkubáltuk 50 °C-on, 300 rpm keverés mellett, 20 percig. Ezután a mintákat 100%-os jéghideg acetonnal kezeltük -20 °C-on, amit több 70%-os acetonnal való mosás és centrifugálási lépés (5 perc, $10\,000 g$) követett. A pelletet HENS pufferben (HEN+1% SDS)

újrászuszpendáltuk és az input kontrollmintákat Laemmli $2\times$ oldatban felvettük. Bizonyos mintákat 200 mM nátrium-aszkorbáttal kezeltünk 10 percig. Az előkészített tiopropilszefaróz 6B gyöngyöket (GE Healthcare Life Sciences) hozzáadtuk a mintákhoz, és a mintákat a gyöngyökkel inkubáltuk 2 órán át sötétben, állandó keverés mellett. A gyöngyöket ezután 4-szer 3 mL HENS pufferrel, majd 2-szer 2 mL HENS/10 pufferrel mostuk. A mintákat merkaptóetanollal eluáltuk, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézisnek (SDS-PAGE) vetettük alá (12%-os gélen), és a géleket Coomassie Brilliant Blue R-350-nel (input kontrollok) vagy ezüsttel (PierceTM Silver Stain Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). festettük meg.

A megfelelő mintaelőkészítést követően azok LC-MS/MS analízise egy nano-RSLC-vel kapcsolt (Ultimate 3000 RSLC, Dionex) Q Exactive HF tömegspektrométer készülékkel (Thermo Fisher Scientific) történt megbízás keretében, a müncheni Helmholtz Centrum fehérjeanalitikai részlegén (részleteket lásd: Kolbert és mtsi. 2019b).

4.8. SPEKTROFOTOMETRIÁS MÉRÉSEK

A fehérjekivonat készítése során a növényi anyagot (teljes csíranövény vagy gyökér, hajtás külön) kétszeres térfogatú extrakciós pufferrel (1 mM EDTA, 0,1% TritonX-100, 10% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,6-7,8) homogenizáltuk, majd centrifugáltuk ($9300 \times g$, 4 °C, 20 perc). A fehérjekivonatot 1% proteáz inhibitor koktéllal kezeltük, és -20 °C-on tároltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford (1976) módszere alapján határoztuk meg marhaszérum albumin, mint standard felhasználásával.

A SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitásának fotometriás vizsgálatára a Dhindsa és mtsi. (1981) által leírt módszert alkalmaztuk. 250 mg növényi mintát homogenizáltunk az előzőekben leírtak szerint. Az enzimaktivitást unit/g friss tömeg vagy unit/mg fehérje egységben adtuk meg, ahol egy egység az NBT fotokémiai redukciójának felét akadályozza meg.

Az APX (EC 1.11.1.11) enzim aktivitását az aszkorbáttartalom nyomon követésével határoztuk meg 265 nm hullámhosszon (Nakano és Asada 1981). 250 mg növényi anyagot homogenizáltunk 1,5 ml extrakciós pufferben, ami az alábbi komponenseket tartalmazta: 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 900 μ M aszkorbát, 1% polivinilpirrolidon. Az adatokat unit/g friss tömeg egységben fejeztük ki.

A KAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitását Kato és Shimizu (1987) módszere alapján detektáltuk. 250 mg növényi anyagot homogenizáltunk 10 mg polivinil-polipirrolidon

jelenlétében, 1 mL 50 mM foszfát pufferben (pH 7,0 1mM EDTA hozzáadásával). A reakciót 20 mM H₂O₂ hozzáadásával indítottuk. A mérés a H₂O₂ lebomlását kvantifikálja 240 nm-en, és 1 unit enzimaktivitás 1 perc alatt elbomlott 1 μmol H₂O₂-nek felel meg. Az adatokat unit/g friss tömeg egységben fejeztük ki.

A NADPH-függő tioredoxin-reduktáz (NTR, EC 1.8.1.9) enzim aktivitását Arnér és mtsi. (1999) módszere alapján, egy kit (Thioredoxin Reductase Assay Kit, Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, MO, USA) felhasználásával, a gyártó utasításait követve határoztuk meg. A mérés azon alapszik, hogy a 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoészav (DTNB) sárga színű 5-tio-2-nitrobenzoészavvá redukálódik NADPH-val. Specifikus NTR-gátlószert alkalmaztunk a módszer specifikitásának ellenőrzésére. Az eredményeket patkánymájából származó tioredoxin-reduktáz, mint pozitív kontroll felhasználásával validáltuk. Az adatokat unit/μg fehérjeegységben fejeztük ki.

A GSNOR aktivitását a NADH GSNO jelenlétében történő oxidációjának kimutatásával határoztuk meg 340 nm hullámhosszon (Sakamoto és mtsi. 2002). A homogenizátumot centrifugáltuk (14 000 × g, 4 °C, 2 perc), és 100 μg fehérjekivonatot inkubáltunk 1 ml reakció pufferben (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,2 mM NADH). A GSNOR aktivitását nmol NADH/perc/mg fehérje egységben fejeztük ki.

Az összes glutation mennyiségi meghatározását Griffith (1980) módszere alapján végeztük el. A növényi anyagot 5% triklórecetsavban eldörzsöltük, 20 percig, 4 °C-on, 9300 × g fordulaton centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk. A reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 25 μl minta, 0,1 M nátrium-foszfát puffer, 1 mM DTNB, 1 mM NADPH, 1 egység glutation-reduktáz enzim. A 412 nm-en regisztrált abszorbancia változása 1 perc alatt GSSG standard felhasználása mellett megfelel a glutation koncentrációjának. Az adatokat nmol/g friss tömeg egységben fejeztük ki.

Az aszkorbát/dehidroaszkorbát koncentrációk meghatározása céljából Law és mtsi. (1983) módszerét alkalmaztuk. A homogenizátum készítése megfelelt a glutationmérés meneténél leírtaknak. A minták fényelnyelését 525 nm-en mértük. Az adatokat nmol/g friss tömeg egységben fejeztük ki.

4.9. GÉN KIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATA KVANTITATÍV VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓVAL (qRT-PCR)

A qRT-PCR eljárást alkalmazva meghatározásra került néhány kiválasztott gén kifejeződése az Arabidopsis csíranövényekben. NucleoSpin RNA Plant mini spin kit (Macherey-Nagel) felhasználásával RNS-t tisztítottunk 90 mg növényi anyagból a gyártó

utasításai szerint. Egy további DNáz-os emésztést alkalmaztunk, majd RevertAid reverz transzkriptáz (Thermo Scientific) felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk. A primereket a Primer3 szoftver segítségével terveztük meg (Függelék 5. táblázat). A gének expressziós szintjét qPCR készülék (QTOWER 2.0, Jena Instruments) segítségével, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Mix) felhasználásával határoztuk meg Gallé és mtsi. (2009) alapján. Az adatokat qPCRsoft 3.2 szoftverrel (Jena Instruments) elemeztük. Az adatokat a kontrollmintákban mért transzkriptszintekre normáltuk, és *ACTIN2* (At3918780) és *GAPDH2* (At1913440) gének szolgáltak belső kontrollként (Papdi és mtsi. 2008).

4.10. IZOENZIMEK AZONOSÍTÁSA ÉS AKTIVITÁSVIZSGÁLATA NATÍV GÉLELEKTROFORÉZISSSEL

A NADPH-oxidáz (NOX, EC 1.6.3.1) izoenzimek vizsgálata López-Huertas és munkatársai 1999-es módszere alapján történt, kisebb módosításokkal. A növényi fehérjekivonatot 10 (w/v) %-os natív-PAGE eljárással elválasztottuk, majd a gélt reakciópufferbe helyeztük (10 mM Tris-HCl, amely tartalmazott 0,2 mM NADPH-t és 0,2 NBT-t) 20 percre, sötétben. A NOX enzim aktivitása lila szín formájában jelent meg a gélen. A NOX-aktivitás specifikitásának igazolására az enzimre specifikus gátlószert, difenilén-jodóniumot használtunk.

A SOD enzim aktivitását és izoformáit a fentiekhez hasonlóan 10 (w/v) %-os nem denaturáló, natív gélelektroforézis után határoztuk meg (Beauchamp and Fridovich 1971). Az elválasztott géleket először kálium-foszfát pufferben kétszer mostuk (50 mM, pH 7,5) majd sötétben 20 percig 2,45 mM NBT oldatban inkubáltuk. Ezt az oldatot cseréltük egy foszfátpufferben elkészített 28 mM tetrametil-etilén-diamint és 2,92 μ M riboflavint tartalmazó oldalra, melyben 15 percet inkubálódtak. A gélek ismételt kétszeri mosása után fény hatására láthatóvá váltak a SOD enzimek. Az izoformák detektálására az első mosási lépések után a géleket gátlószerekkel kezeltük: a kálium-cianid csak a réz/cink SOD gátlására képes, míg a H_2O_2 a réz/cink, valamint a vas kofaktossal rendelkező SOD izoformákat is inaktíválja, így csupán a mangán SOD lesz detektálható.

A GSNOR enzim aktivitását Seymour és Lazarus 1989-es módszere nyomán határoztuk meg, kisebb módosításokkal. A növényi mintát 6 (w/v) %-os Tris-borát-EDTA (8,9 mM Tris, 8,9 mM bórsav, 0,2 mM Na_2EDTA , pH 8,0) géleken választottuk el, majd 15 percre 100 mM nátrium-foszfát pufferben (pH 7,4) készített 2 mM-os NADH oldatba merítettük. Ezután 3 mM GSNO-oldatot vittünk fel a gélekre, majd géldokumentációs rendszerrel (Image System Felix

1000/2000, Biostep, Burkhardtsdorf, Németország) detektáltuk a NADH autofluoreszcencia eltűnését az enzimaktivitás függvényében.

4.11. WESTERN BLOT ANALÍZISEK

A fehérjetirozin-nitráció vizsgálatához a fehérjekivonat készítése az előzőekhez hasonlóan történt. A hajtásból vagy gyökérből származó vagy teljes Arabidopsis csíranövényből származó fehérjekivonatot 12 (w/v) %-os denaturáló PAGE-nek vetettünk alá. Az így szeparált fehérjéket az akrilamid gélből tanktranszfer segítségével transzfereltük polivinilidén-difluorid membránra (16 h, 25 mA). Az így kapott membránok először 5 (w/v) %-os tejfehérjeoldatban blokkolva lettek, ami TBST pufferben készült (20 mM Tris, 178 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, pH 7,8) a nem specifikus antitestkötés elkerülése végett, majd 1:2000 arányban hígított, nyúl 3-nitrotirozin elleni antitesttel (Sigma-Aldrich, katalógusszám: N0409) jelöltük őket. Három mosási lépés után 1:10 000 arányban hígított kecskéből származó nyúl IgG elleni antitestet (Sigma-Aldrich, katalógusszám: A3687) alkalmaztunk, amely alkalikus foszfatázt hordozott a detektáláshoz. A nitrált fehérjék láthatóvá tételére 2,6-diklórfenol-indofenol/NBT reakciót használtunk, ahol az antitesttel jelölt fehérjéknél fekete színű formazán keletkezik. A reakció pozitív kontrolljaként nitrált borjúsérum-albumint vittünk fel a géltre (Sigma-Aldrich, katalógusszám: N8159). Loading kontrollként a membránokat Coomassie R 250 festéssel vizsgáltuk Welinder és Ekblad (2011) alapján, kisebb módosításokkal. A membránokat kétszer mostuk TBST pufferben, majd festékoldatba (0,1 (w/v) % Coomassie R 250, 50 (v/v)% metanol) merítettük 1 percig. A membránok mosása 10 (v/v) % ecetsavat és 50 (v/v) % etanolt tartalmazó oldattal történt 10 percig. Néhány esetben loading kontrollként anti-aktin antitestet (Agrisera, katalógusszám: AS132640) és fehérjestandardként aktint (borjúizomból, Sigma-Aldrich) használtunk.

A fehérjekarboniláció tanulmányozására egy kitet használtunk fel (Abcam oxidized protein assay kit, katalógusszám: ab 178020) a gyártó utasításainak kismértékű módosítása mellett. A növényi anyagot 50 mM ditiotreitolt tartalmazó 1× extrakciós pufferben homogenizáltuk a további oxidáció megelőzése céljából. A mintákat 20 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk ($18\,000 \times g$, 4 °C, 20 perc), és meghatároztuk a proteintartalmat Bradford (1976) módszerével. A származékképzési reakcióhoz két 10 µl-es kivonatot használtunk. Az első kivonatot 10 µl 12%-os SDS-sel kezeltük, majd 20 µl 1× 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) oldatot adtunk hozzá. A reakciót 15 perc elteltével leállítottuk 20 µl neutralizációs oldat hozzáadásával. A második kivonatot negatív kontrollként szolgált, mert a

DNP oldat helyett 1× kontrolloldatot tartalmazott. 5 µg derivatizált vagy kontrollfehérjét tartalmazó kivonatokat vittünk fel a géltre, és a gélelektroforézis és membrántranszfer az előzőeknek megfelelően zajlott. A membránokat 1 órán át blokkoló pufferben inkubáltuk (1× PBS pH 7,5 0,05% Tween 20 és 5% zsírszegény tej hozzáadásával). A membránokat 1× elsődleges anti-DNP antitesttel reagáltattuk (1:5000) 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten, majd háromszor mostuk 1× PBS pufferrel. A másodlagos antitestként 1× horseradish peroxidase (HRP)-kötött anti-nyúl ellenanyag szolgált (1:5000). Az előhíváshoz Immobilon Western Kemilumineszcens HRP szubsztrátot (Millipore Corporation, USA) használtunk a gyártó utasítása szerint. A membránokat egy géldokumentációs rendszerrel vizualizáltuk (Image System Felix 1000/2000, Biostep, Burkhardtsdorf, Németország).

A denaturáló és natív gélekben a fehérjék megfelelő futásának vizsgálatára ezüstoffestést alkalmaztunk Blum és mtsi. (1987) módszerét használva, kisebb módosításokkal. A gélek egy éjszakán át fixálóban (10 (w/v) % ecetsav, 50 (v/v) % metanol) voltak, majd három desztillált vizes mosás után szenzitizáló oldatba kerültek (0,00216 (w/v) % nátrium-tioszulfát desztillált vízben oldva). A következő lépés az ezüstoldat (0,2 (w/v) % ezüst-nitrát, 0,075 (v/v) % formaldehid), majd egy mosás után az előhívás (5 (w/v) % nátrium-karbonát, 0,05 (v/v) % formaldehid, 0,000048 (w/v) % nátrium-tioszulfát) következett.

GSNOR és az APX fehérjemennyiség kimutatása céljából a denaturált fehérjekivonatot SDS-PAGE elválasztásnak vetettük alá (12%). A nedves blottolást követően a membránokat különböző antitestekkel reagáltattuk (nyúlból származó anti-GSNOR [Agrisera katalógusszám: AS09 647] és anti-APX [Agrisera katalógusszám: AS08368] 1:2000 hígításban). Loading kontrollként anti-aktin antitestet (Agrisera, katalógusszám: AS132640) és fehérjestandardként aktint (borjúizomból, Sigma-Aldrich) használtunk. Másodlagos antitestként affinitástisztított, kecskéből származó anti-nyúl alkalikus foszfatázkapcsolt IgG-t (Sigma-Aldrich, katalógusszám A3687, 1:10000) használtunk.

4.12. STATISZTIKAI ANALÍZIS

A grafikonokon és a táblázatokban az átlageredményeket ábrázoltam a mintacsoportok standard hibájának feltüntetésével. Az eredmények statisztikai elemzése Microsoft Excel 2010 és SigmaPlot 12 programokkal történt. A szignifikancia megállapítására néhány esetben a Student-féle t-próbát alkalmaztunk, ahol a statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbiak szerint: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Más esetekben az adatokat egyutas varianciánálízisnek vetettük alá (one-way ANOVA), és a Duncan-teszttel

elemztük ($P \leq 0,05$). Az adatok homogenitásának vizsgálatára a Hartley's F_{\max} tesztet, a normalitás vizsgálatára pedig a Shapiro–Wilk-tesztet alkalmaztuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A SIMV MEGJELENÉSE KÜLÖNBÖZŐ KÍSÉRLETI RENDSZEREKBEN

A SIMV-gyökérfenotípus kialakulásáról akkor beszélhetünk, ha a FGY rövidülését az OGY-szám növekedése kíséri. Annak érdekében, hogy meghatározzuk e kevert növekedési válasz kialakulásának körülményeit, és általános következtetéseket vonhassunk le, többféle növénynevelési és -kezelési rendszert állítottunk be. A különböző kísérleti rendszereinkben tapasztalt gyökérmorfológiai válaszokat az 1. táblázatban foglaltam össze.

Az esszenciális mikroelem, a réz többlete tápoldatban és táptalajon nevelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* növények esetén is kialakította a sajátos gyökérfenotípust. Az alacsonyabb rézkoncentráció (2,5 μM) 28 nap alatt, a kétszeres dózisú rézterhelés 17 nap alatt okozta a FGY-gátló és OGY-indukáló választ. A metallofita *Brassica napus* és *Brassica juncea* esetén is hatásos volt a tápoldatban alkalmazott rézkezelés, itt a 10 μM réz-szulfát 7 nap alatt okozott SIMV-gyökérzetet.

A szintén esszenciális cink többlete a *B. juncea*-ban nem okozta a FGY rövidülését, bár az OGY-szám gyarapodott, így a klasszikus SIMV-tünetegyüttes nem jelent meg. Csak tápoldatos kezelés esetén a *B. napus*-ban okozta a cinkterhelés a FGY-rövidülés és az OGY-számgyarapodás együttes megjelenését. Talajban nevelve a *B. napus*-t 10 mg/kg cink jelenlétében mind a FGY-megnyúlás mind az OGY-képződés fokozódott, tehát itt nem a SIMV-re jellemző kevert növekedési válasz alakult ki, hanem a kezelés kedvező hatása érvényesült.

A nikkelt, mint esszenciális fém többlete az OGY-szám gyarapodását és FGY-rövidülést okozott 7 nap elteltével, vagyis a SIMV jelentkezett táptalajon kezelt vad típusú *A. thaliana*-ban. Érdekes módon az OGY-kezdemények (kisebb, mint VII. stádium) száma csökkent, a kifejlett OGY-k (nagyobb, mint VII. stádium) száma viszont nőtt, így összeségében a látható oldalgyökérszám gyarapodott.

Ehhez hasonlóan a nem esszenciális félfém, a szelén szelenit formában való alkalmazása során táptalajon nevelt *A. thaliana* esetén az OGY-kezdemények és a kifejlett OGY-k elkülönített vizsgálata azt mutatta, hogy kezelési koncentrációtól és időtartamtól függően nőtt vagy csökkent az OGY-kezdemények száma, míg a későbbi OGY-fejlődési szakaszt a szelenit pozitívan szabályozta. A szelenát esetében érdekes, hogy a szelenittel és a nikkelel szemben az OGY-primordiumok száma nőtt, a kifejlett OGY-eké viszont nem változott. A szelenát a FGY megnyúlására is pozitívan hatott, vagyis a klasszikus gyökér-SIMV nem alakult ki.

1. táblázat: Elemek többlete által okozott gyökérfejlődési válaszok a vizsgált növényfajokban, különböző nevelési-kezelési rendszerekben. Rövidítések: SIMV– stresszindukált morfogenikus válasz; OGY_{kezd} – oldalgöke-kezdemény; OGY_{kif} – kifejlett oldalgöke; FGY – főgyöke. Az oldalgökerek fejlettségi állapotát Malamy és Benfey (1997) alapján határoztuk meg.

| Elem | Növényfaj | Elem-felhalmozási képesség | Az elem koncentrációja, kémiai formája, a kezelés időtartama | Kezelési közeg | Gyökérrendszerre kifejtett hatás |
|-------------|--|----------------------------|--|------------------|---|
| Réz (Cu) | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 2,5 µM CuSO ₄ , 4 hét | tápoldat | SIMV |
| | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 5 µM CuSO ₄ , 17 nap | táptalaj | SIMV |
| | <i>Brassica juncea, Brassica napus</i> | akkumuláló | 10 µM CuSO ₄ , 7 nap | tápoldat | SIMV |
| Cink (Zn) | <i>Brassica napus</i> | akkumuláló | 50 µM ZnSO ₄ , 7 nap | tápoldat | SIMV |
| | <i>Brassica juncea</i> | akkumuláló | 50 µM ZnSO ₄ , 7 nap | tápoldat | OGY-szám nő, FGY-hossz nem változik |
| | <i>Brassica juncea</i> | akkumuláló | 50, 150, 300 µM ZnSO ₄ , 14 nap | tápoldat | OGY-szám nő, FGY-hossz nem változik |
| Szelén (Se) | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 10 µM Na ₂ SeO ₃ , 14 nap | táptalaj | SIMV (OGY _{kezd} - és OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken) |
| | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 15 µM Na ₂ SeO ₃ , 7 nap | táptalaj | SIMV (OGY _{kezd} -szám csökken, OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken) |
| | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 5 µM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap | táptalaj | OGY-szám nő (OGY _{kezd} -szám nő, OGY _{kif} -szám nem változik), FGY-hossz nem változik |
| | <i>Astragalus bisulcatus</i> | hiperakkumuláló | 100 µM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap | táptalaj | OGY-szám nő, FGY-hossz nő |
| Nikkel (Ni) | <i>Astragalus membranaceus</i> | nem akkumuláló | 100 µM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap | táptalaj | OGY-szám csökken, FGY-hossz csökken |
| | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 50 µM NiCl ₂ , 7 nap | táptalaj | SIMV (OGY _{kezd} -szám csökken, OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken) |
| | <i>Odontarrhena lesbiaca</i> | hiperakkumuláló | 3000 mg/kg NiCl ₂ , 14 nap | talajos rizotron | FGY-hossz csökken, OGY-szám nem változik vagy csökken |
| Ólom (Pb) | <i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i> | nem akkumuláló | 25 µM, PbNO ₃ , 14 nap | táptalaj | SIMV |

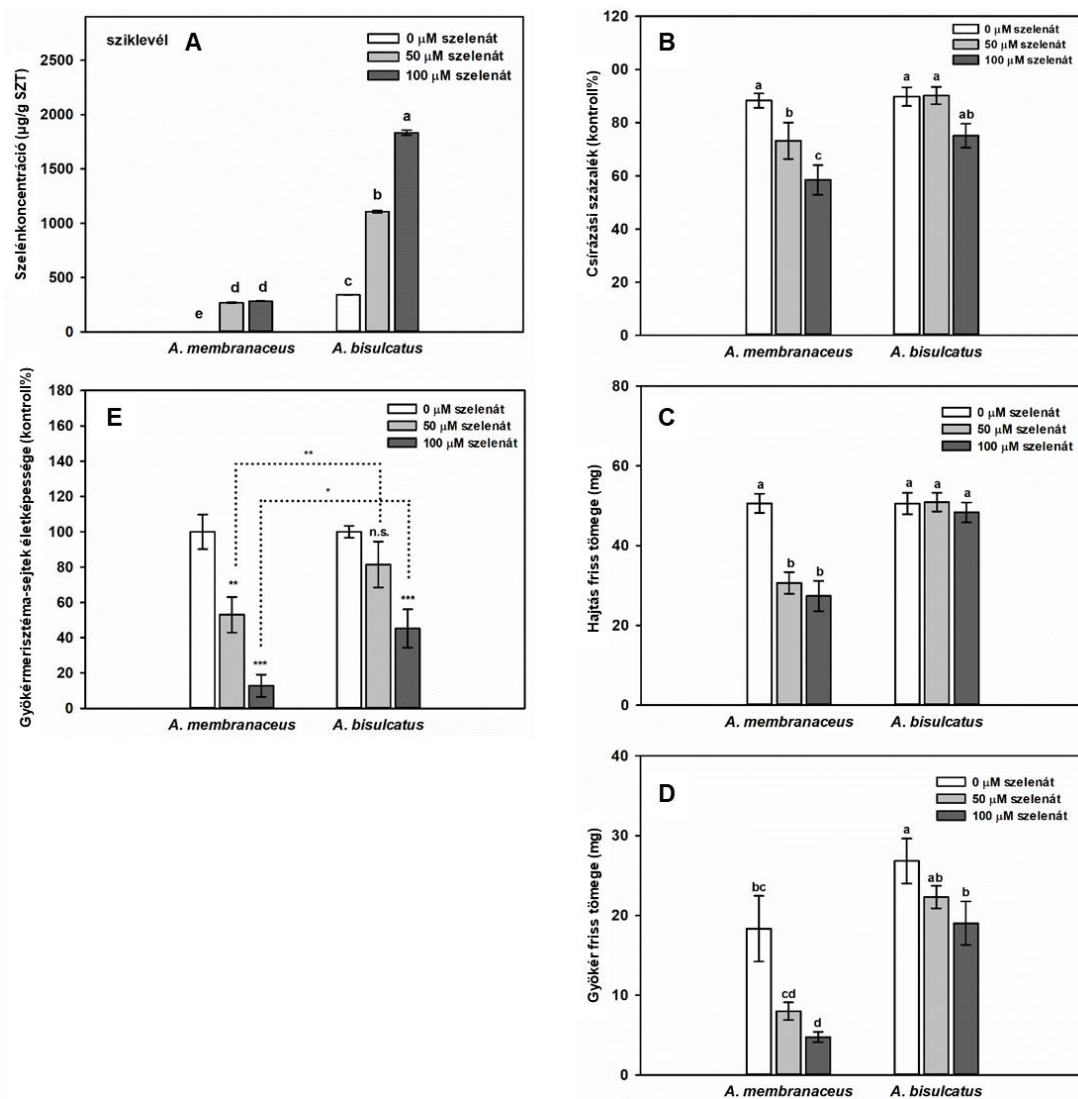
| | | | | |
|------------------------|------------|---|----------|------|
| <i>Brassica juncea</i> | akkumuláló | 25 μ M, PbNO ₃ , 7 nap | tápoldat | SIMV |
|------------------------|------------|---|----------|------|

5.2. A SIMV ÖSSZEFÜGGÉSE AZ ELEM-HIPERAKKUMULÁCIÓVAL ÉS -TŰRÉSSEL

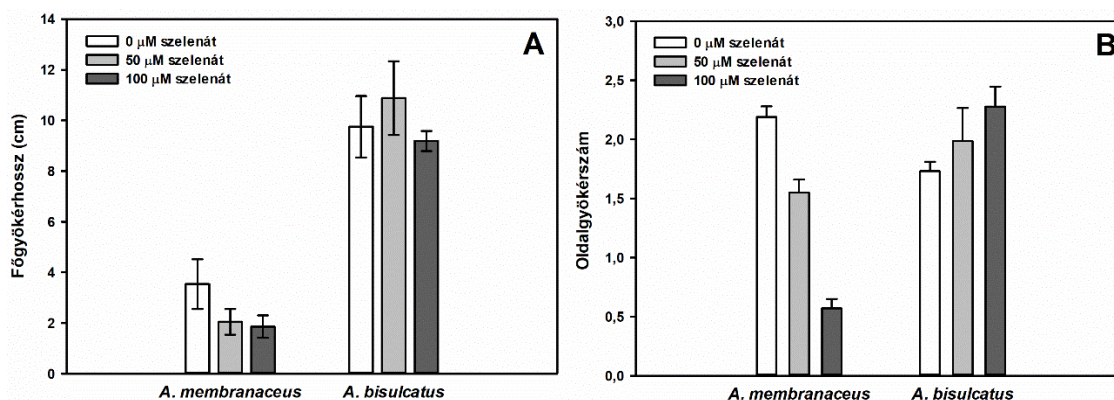
A SIMV széles körű megjelenése felvetette a kérdést, hogy az csupán a stressz elkerülhetetlen következménye, avagy célzott (védekezési) folyamatok összessége?

A növények elemfelhalmozó és -tűrő képessége, valamint a SIMV-gyökérfenotípus megjelenése közötti összefüggés feltárása volt a célunk annak a kérdésnek a megválaszolása érdekében, hogy a SIMV-gyökérzet hozzájárul-e az elemtöbbletek eltűrésének képességéhez? Elemtűrő és -hiperakkumuláló fajok kísérletekbe való bevonásával igyekeztük pontosabban megválaszolni a kérdést.

Az első kísérletsorban a szelén-hiperakkumuláló *Astragalus bisulcatus* csíranövények válaszait hasonlítottuk össze a szelént nem akkumuláló *Astragalus membranaceus*-ével. A várakozásoknak megfelelően az *A. bisulcatus* több szelént halmozott fel a föld feletti részébe (5. ábra A), jobban csírázott (5. ábra B), jobb hajtás- (5. ábra C) és gyökér- (5. ábra D) biomassza-produkciót, életképességet mutatott (5. ábra E) a szelenát (50, 100 μ M) jelenlétében, mint az *A. membranaceus*. Az *A. bisulcatus* OGY-száma szignifikáns módon nőtt 100 μ M szelenát jelenlétében (5. ábra B, 1. táblázat), és a FGY-hossz kontrollszinten maradt (6. ábra A, 1. táblázat), míg az érzékenyebb *A. membranaceus* faj esetén mindkét vizsgált gyökérnövekedési paraméter csökkent (6. ábra A és B, 1. táblázat).



5. ábra: Szelénkoncentráció (A), csírázási százalék (B), hajtás (C) és gyökér friss tömege (D), gyökérmérisztéma-sejt életképessége (E) 0, 50 vagy 100 µM szelenát mellett növesztett, 14 napos *Astragalus bisulcatus* és *Astragalus membranaceus* növények esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P < 0,05$, $n = 15$). Az E ábrarészben a statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, $n = 15$). „n.s.” = nem szignifikáns.

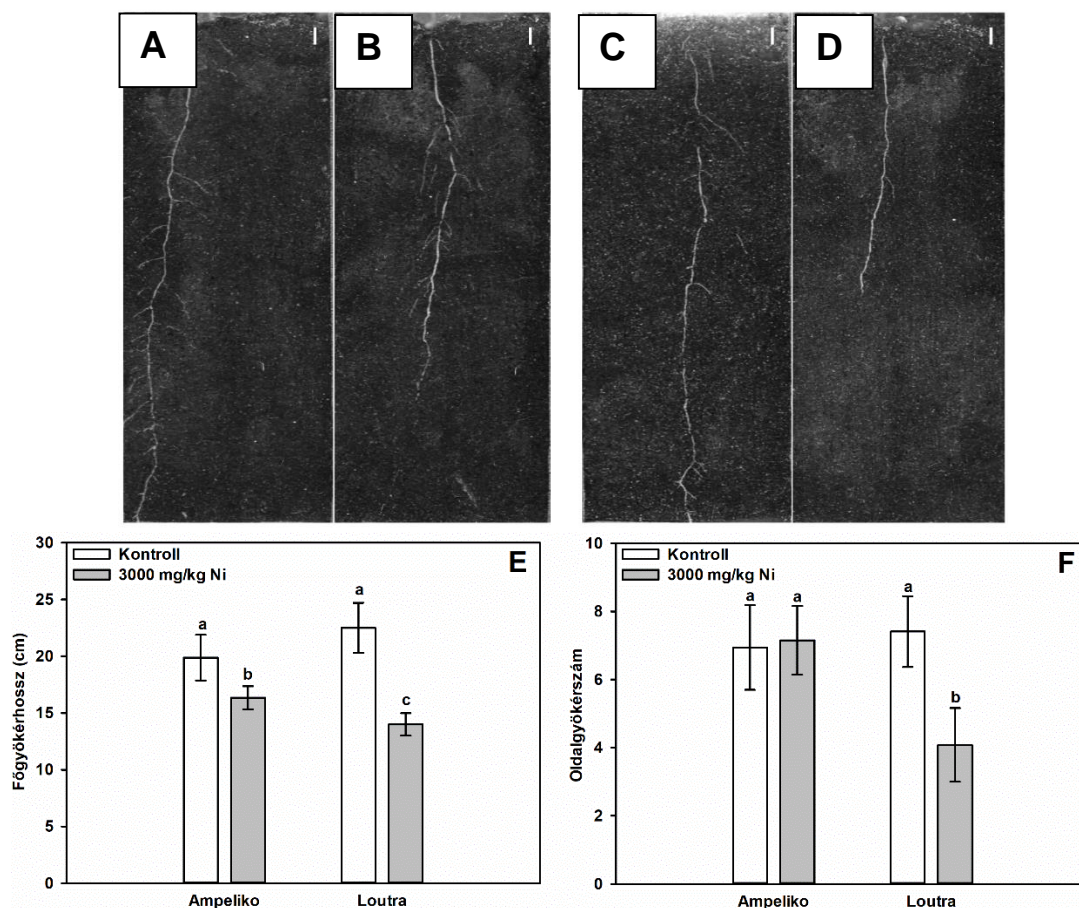


6. ábra: Főgyökérhossz (A) és oldalgökérszám (B) 0, 50 vagy 100 µM szelenáttal 14 napig kezelt *Astragalus bisulcatus* és *Astragalus membranaceus* növények esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=15$).

A második kísérleti rendszerben a nikkell-hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* faj különböző leszboszi élőhelyekről (Ampeliko, Loutra) származó ökotípusait talajos rizotronban neveltük. A faj képes volt növekedni rendkívül magas (3000 mg/kg) nikkellkoncentráció mellett is, bár a nagyfokú terhelés SIMV-et nem, hanem gyökérnövekedés-gátlást okozott. Ugyanakkor azt meg kell jegyezni, hogy a nagyobb fokú nikkellakkumulációt mutató Ampeliko ökotípus (2. táblázat) kisebb mértékű gyökérnövekedési változást mutatott a gyengébb felhalmozási képességű Loutra egyedekhez képest, melyek OGY-száma és FGY-hossza is jelentősen csökkent a nikkellgazdag talajban (7. ábra).

2. táblázat: Nikkelkoncentrációk (µg/g száraz tömeg) az *Odontarrhena lesbiaca* faj Ampeliko és Loutra területről származó, talajos rizotronban nevelt utódegyedeiben nikkellkezelés nélkül (kontroll) és 3000 mg/kg Ni jelenlétében. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$).

| | Kontroll | 3000 mg/kg Ni |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>O. lesbiaca</i> Ampeliko gyökér | 56,43 ± 15,76 ^h | 4186,49 ± 201,33 ^c |
| <i>O. lesbiaca</i> Loutra gyökér | 98,67 ± 20,66 ^g | 3874,67 ± 102,88 ^d |
| <i>O. lesbiaca</i> Ampeliko hajtás | 2204,77 ± 107,38 ^e | 11 985,55 ± 177,39 ^a |
| <i>O. lesbiaca</i> Loutra hajtás | 1679,82 ± 86,79 ^f | 9005,38 ± 203,88 ^b |



7. ábra: Az *Odontarrhena lesbiaca* két élőhelyről (Ampeliko A, B; Loutra C, D) származó ökotípusainak gyökérzetéről készült reprezentatív fotók. A növények 14 napig növekedtek talajos rizotronban nikkelkezelés nélkül (Ampeliko A, Loutra C), valamint 3000 mg/kg nikkel jelenlétében (Ampeliko B, Loutra D). Mércse=1 cm. Főgyökérhossz (E) és oldalgökérszám (F) az Ampeliko és a Loutra típusok esetén kontrollkörülmenyek között és nikkelterhelés esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$).

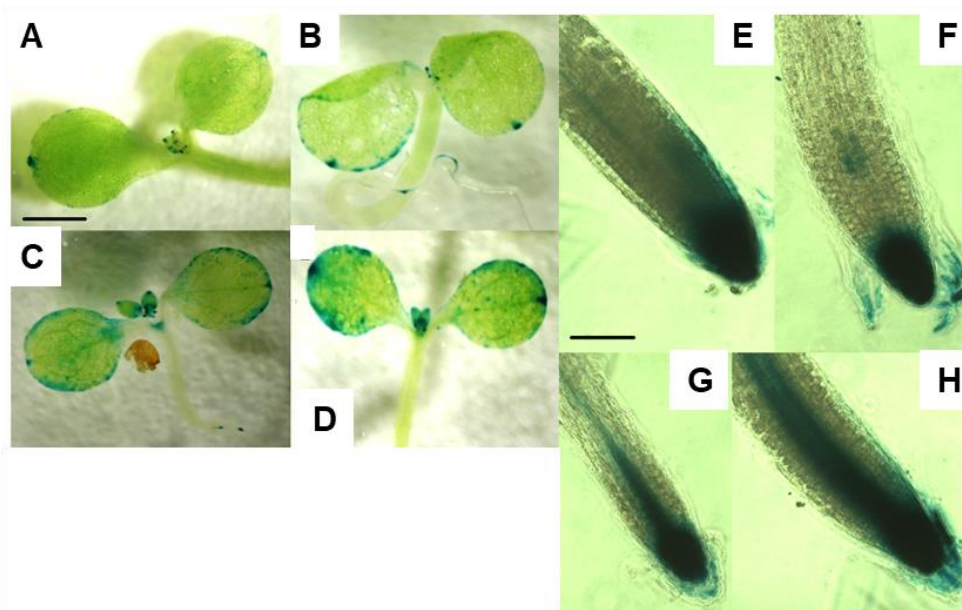
5.3. A NO ÉS A HORMONOK KAPCSOLATA AZ ARABIDOPSIS GYÖKÉRNÖVEKEDÉSI VÁLASZAI SORÁN

A növekedés elsődleges irányítói a fitohormonok, melyek transzportjában, jelátvitelében illetve fejlődési jelemolekulákkal (amilyen a NO is) való interakcióiban bekövetkező változások fejlődési átprogramozódást eredményezhetnek. A hormonok szintézisében, jelátvitelében bekövetkező változásokat Arabidopsis modellnövény különböző mutáns és transzgenikus vonalainak segítségével követtük nyomon.

5.3.1. Auxin-NO jelkapcsolat rézterhelt lúdfűben

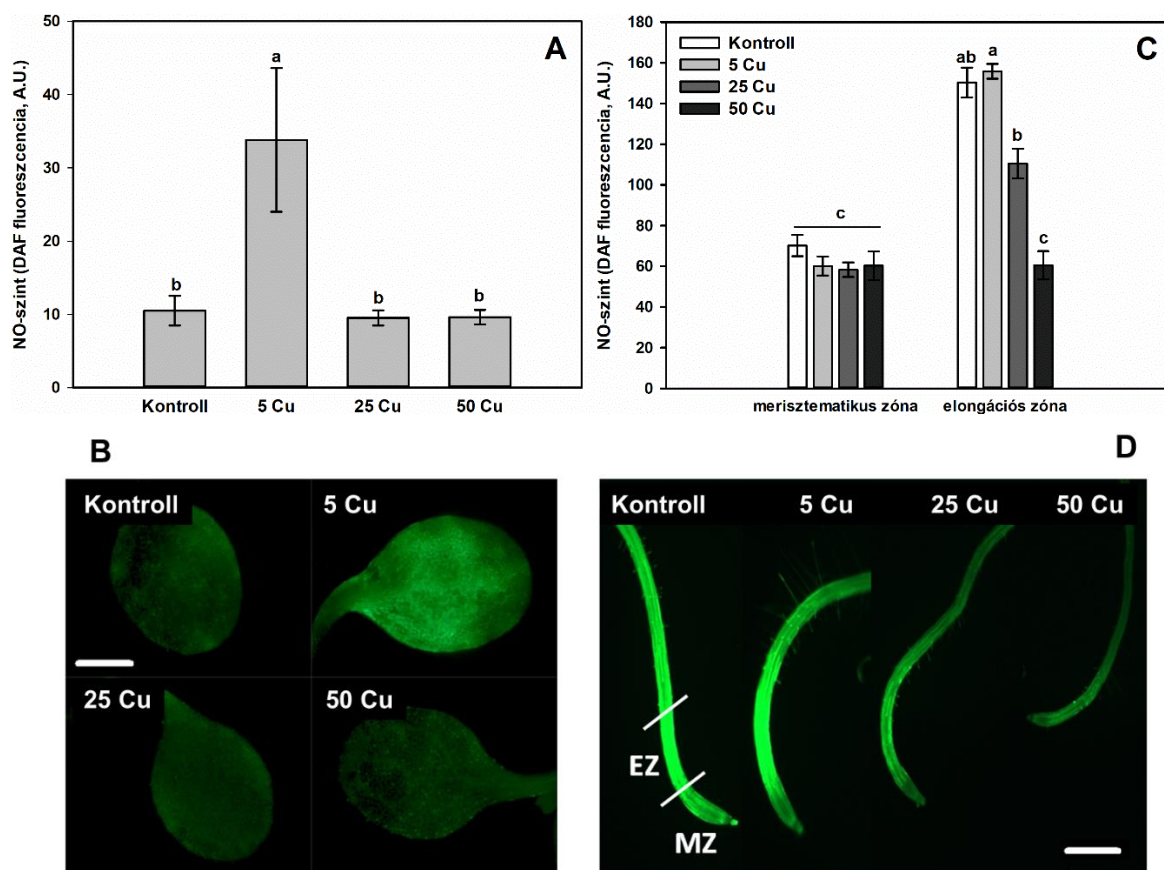
Legkorábbi vizsgálataink az auxin és a NO között fennálló, feltételezett kapcsolatra fókuszáltak. Kezelést nem kapott, 7 napos lúdfű csíranövényekben az auxinindukálható *DR5::GUS*-promóter aktivitása a sziklevel csúcsára korlátozódott (8. ábra A), míg növekvő

koncentrációjú rézkezelések mellett a teljes sziklevéllemezre kiterjedt (8. ábra B-D). A gyökércsúcsokban a rézterhelés fokozta a *DR5::GUS*-promóter aktivitását, és a sziklevélhez hasonlóan a válasz rézkoncentráció-függőnek mutatkozott (8. ábra E-H).



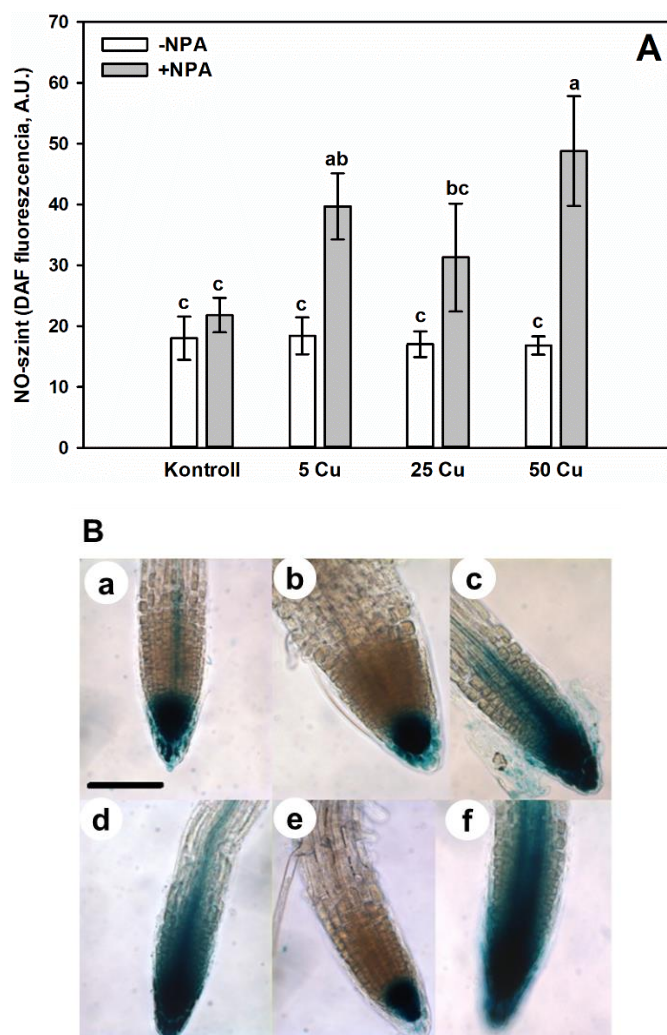
8. ábra: Kontroll- és rézkezelt *DR5::GUS Arabidopsis* csíranövények sziklevelei (A-D) és főgyökércsúcsai (E-H). A növények 0 (A, E), 5 (B, F), 25 (C, G) vagy 50 (D, H) μM réz-szulfát jelenlétében növekedtek 7 napig. Mércse=1 mm (A-D) és 0,5 mm (E-H).

A NO-jelmolekula szintje a sziklevélben csupán a legkisebb rézkoncentráció esetén növekedett meg (9. ábra A és B), a gyökérben (annak megnyúlási zónájában) azonban a 25 és az 50 μM rézkoncentráció is szignifikáns, koncentrációfüggő csökkenést okozott a NO-szintben (9. ábra C és D).



9. ábra: NO-szint a sziklelevélben (A) és a főgyökér két zónájában (C) kontroll- és 5, 25 vagy 50 μM rézkezelésnek kitétt, 7 napos vad típusú *Arabidopsis thaliana* esetében. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek DAF-FM DA próbával jelölt *A. thaliana* sziklevelekről (B) és főgyökerekről (D). MZ= merisztematikus zóna, EZ= elongációs zóna. Mércék= 1 mm.

Az auxin és a NO szintjeiben bekövetkező koncentrációfüggő, egymással ellentétes irányú rézindukált változások felvetették a lehetőségét a két jelmolekula kapcsolatának, amit farmakológiai módszerekkel tanulmányoztunk. A rézkezelés mellett alkalmazott auxintranszport-gátló NPA jelentősen megnövelte a gyökérmerisztéma NO-tartalmát (10. ábra A). Abban az esetben, ha a rézkezelés (50 μM) mellett NO-donor vegyületet (100 μM SNP) alkalmaztunk, a *DR5::GUS*-jel mértéke lecsökkent a csak rézterhelt növényekben detektálható képet (10. ábra B/e), míg a NO-gyökfogó cPTIO alkalmazása (100 μM) megnövelte a rézkezelt lúdfűgyökerek *DR5::GUS*-aktivitását (10. ábra B/f).

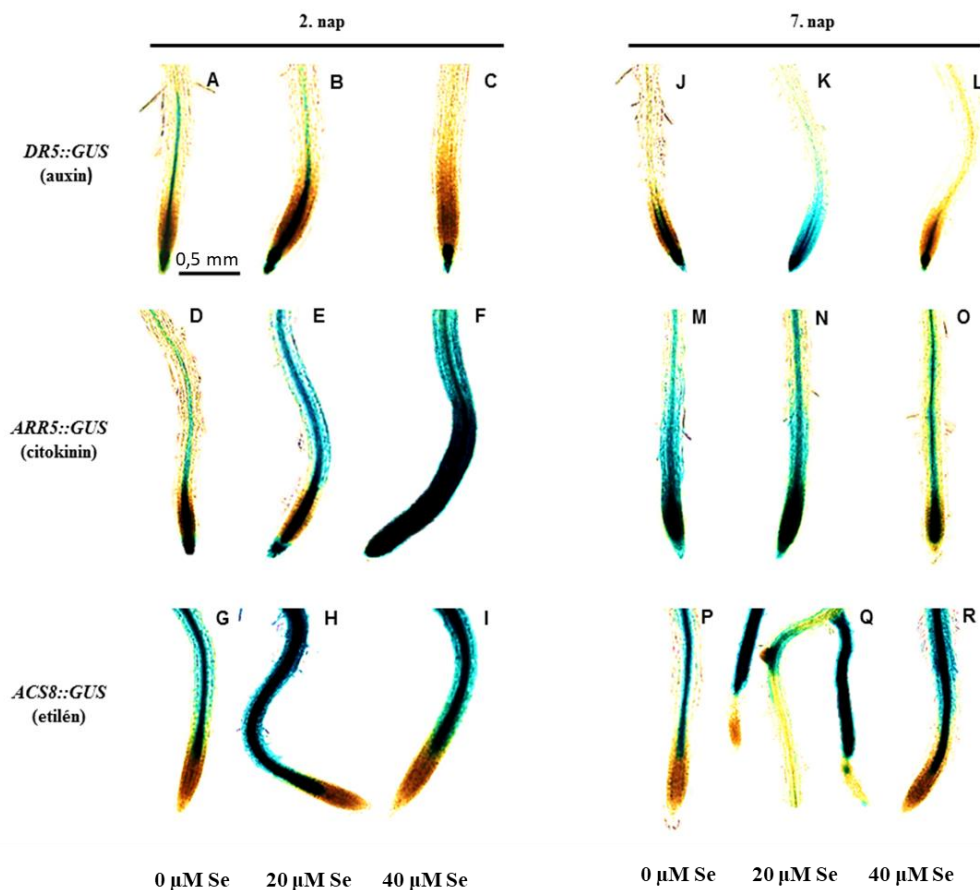


10. ábra: NO-szintek (A) 7 napos kontroll, 5, 25 vagy 50 μM rézkezelésnek kitett vad típusú *Arabidopsis thaliana* gyökerében. A növények 10 μM naftilftálsav (NPA) jelenlétében vagy anélkül növekedtek. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). (B) *DR5::GUS*-promóteraktivitás kontroll (a), 100 μM SNP-kezelt (b), 100 μM cPTIO-kezelt (c), 50 μM rézkezelte (d), 50 μM réz+100 μM SNP-kezelt (e) valamint 50 μM réz+100 μM cPTIO-kezelt *A. thaliana* csíranövények gyökércsúcsaiban. Mércse= 1 mm.

5.3.2. A NO kapcsolata az auxinnal, citokininnel és etilénnel szelénterhelt lúdfűben

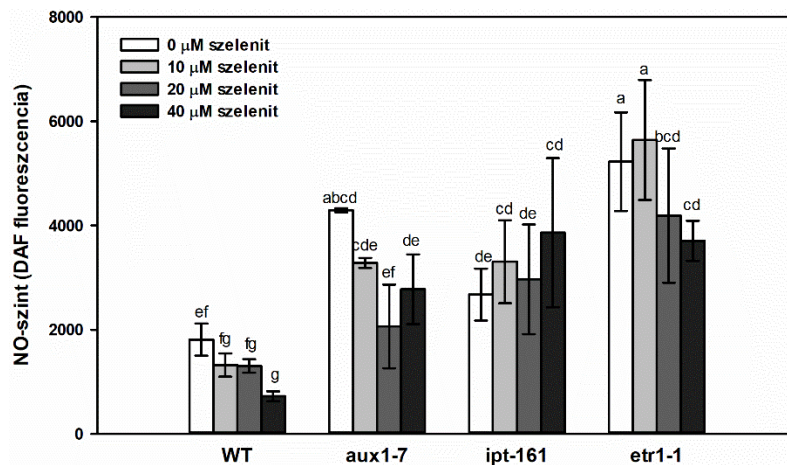
Mivel a szelénindukált gyökérnövekedési válaszok hormonális és jelátviteli folyamatai nagyrészt ismeretlenek voltak, figyelmünket e felé a magasabbrendű növényekben feltehetően nem esszenciális, mégis felhalmozódó, nemfémes elem felé fordítottuk. Szelenitet 10 μM koncentrációban alkalmazva az auxinindukálható *DR5::GUS*-promóteraktivitás enyhén növekedett a 2 napos és a 7 napos lúdfűgyökerekben is, míg a négyszeres koncentrációjú szelenit (40 μM) mindkét időpontban csökkenést eredményezett a gyökércsúcsi auxinszintben a kontrollhoz képest (11. ábra A-C, J-L). A citokininindukálható *ARR5::GUS*-aktivitás igen jelentős, koncentrációfüggő növekedést mutatott a lúdfűgyökércsúcsokban mind a 10 μM mind pedig a 40 μM szelenit jelenlétében rövid távon (2 nap), ugyanakkor a szelenit hatása gátlónak

mutatkozott 7 napos kezelés esetén (11. ábra D-F, M-O). Az etilénindukálható *ACS8::GUS/GFP* promóteraktivitás jelentősen megnövekedett a FGY-csúcsban mindkét szelenitdózis mellett mind rövidebb, mind pedig hosszabb távú kezelés esetén (11. ábra G-I, P-R).



11. ábra: Hormonszinteket jelző riporterkonstrukciók promóteraktivitása *Arabidopsis thaliana* gyökerében 2 (A-I) vagy 7 napig tartó (J-R), 0, 10 vagy 40 μM szelenitkezelés esetén. Az auxinszintet jelző *DR5::GUS*-aktivitás (A-C és J-L), a citokinin szintet jelző *ARR5::GUS*-aktivitás (D-F és M-O) és az etilénszintet jelző *ACS8::GUS*-aktivitás (G-I és P-R). Mércse= 0,5 mm.

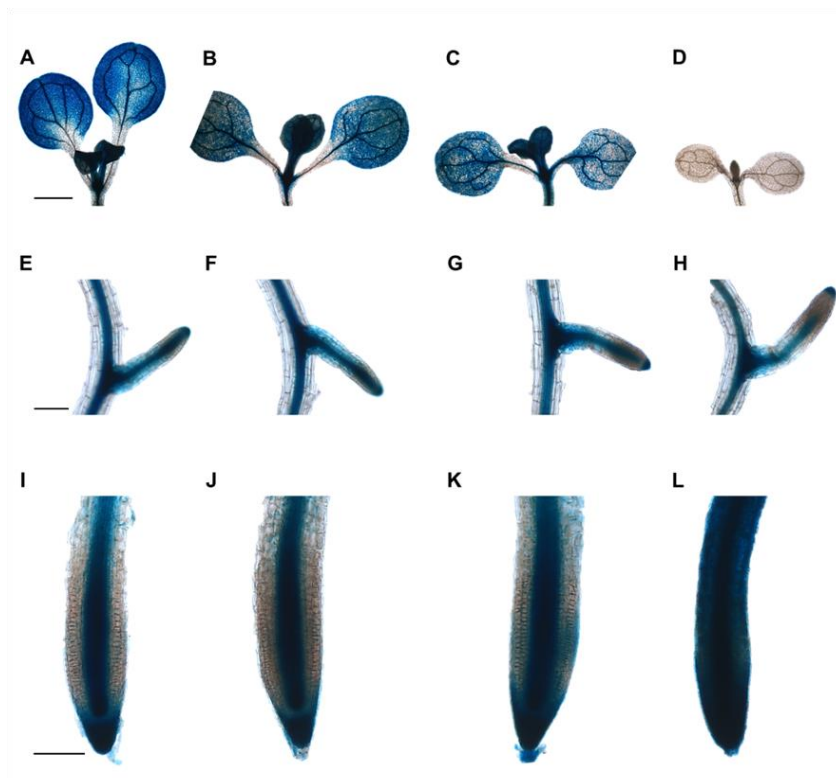
A vad típusú növények gyökerében a szelenit koncentrációfüggő módon csökkentette a NO-szintet (12. ábra). Az auxinérzéketlen és -hiányos *aux1-7* mutáns magas alap-NO-szintje szintén csökkent a szelenit hatására, bár ez csak a 20 μM -os kezelési koncentráció esetén volt szignifikáns. Az etilén-jelátvitelben hibás *etr1-1* esetén a nagyobb szelenitkoncentrációk csökkentették a NO-szintet, a vad típushoz hasonlóan. Az előzőektől eltérő módon, a citokinin túltermelő *ipt-161* lúdfű gyökércsúcsában a NO-szint emelkedett a szelenitkezelés hatására (12. ábra).



12. ábra: NO-szint vad típusú (WT) és hormonmutáns *A. thaliana* csíranövények gyökércsúcsában. A növények 0, 10, 20 vagy 40 μM szelenittartalmú táptalajon növekedtek 4 napig. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$).

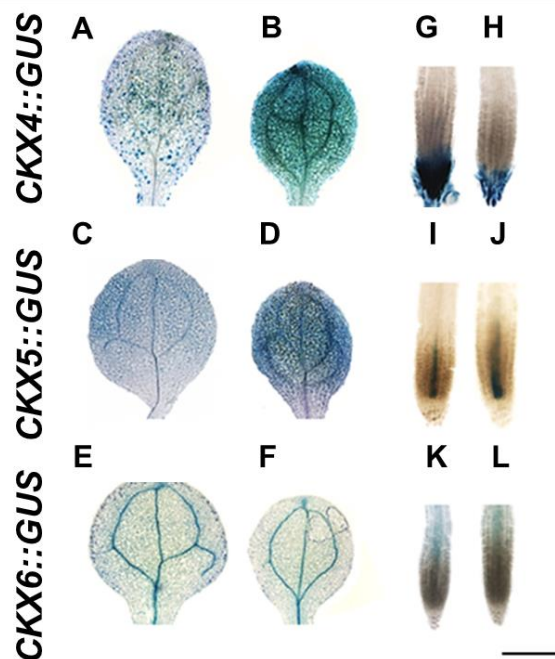
A szelenit által okozott jelentős citokininszint-növekedés és a citokinintúltermelő mutáns nem csökkenő NO-szintje miatt a citokinin-NO jelkapcsolatot részleteiben is megvizsgáltuk szelenitterhelt lúdfűben.

A citokininszintet jelző *ARR5::GUS*-riportervonal segítségével kimutattuk, hogy a szelenit koncentrációfüggő módon megnövelte a promóter aktivitását a gyökércsúcsi merisztémában (13. ábra I-L), a sziklevelekből azonban eltűnt a citokininszintet jelző kék színű GUS-jel a szelenitdózisok emelkedésével párhuzamosan (13. ábra A-D). A felsőbb gyökérszónában található nagyobb mint VII. stádiumú oldalgyökerekben a GUS-aktivitás enyhe csökkenést mutatott, ez azonban csak a 40 μM szelenitterhelés esetén volt vizualizálható (13. ábra E-H).



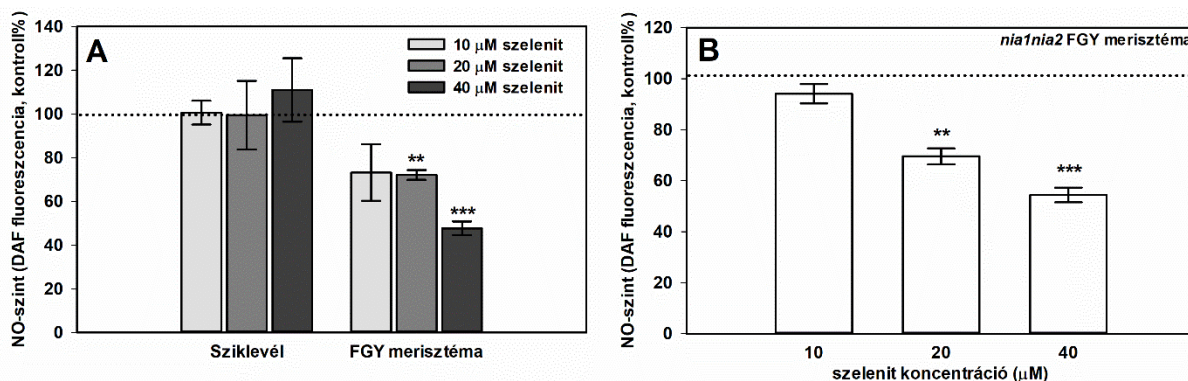
13. ábra: Négynapos kontroll- és szelenitkezelt (10, 20, 40 μM) X-Gluc-jelölt *ARR5::GUS* *A. thaliana* csíranövények hajtása (kontroll A, 10 μM szelenit B, 20 μM szelenit C, 40 μM szelenit D, mérce= 1mm), oldalgyökerei (nagyobb, mint VII. stádium Malamy és Benfey 1997 szerint, E-H, kontroll E, 10 μM szelenit F, 20 μM szelenit G, 40 μM szelenit H, mérce=100 μm) és főgyökércsúcsai (kontroll I, 10 μM szelenit J, 20 μM szelenit K, 40 μM szelenit L, mérce= 100 μm).

További GUS-riportervonalak segítségével megvizsgáltuk, hogy a szelenit enzimátikus lebontásában kulcsszerepet játszó citokinin-oxidázok felelősek lehetnek-e a szelenit által a citokinineloszlásban okozott változásokért. A 40 μM szelenittel kezelt *CKX4::GUS* és *CKX5::GUS* sziklevelekben a kontrollhoz képest fokozottabb promóteraktivitást detektáltunk, míg a gyökércsúcsban csupán az *CKX4::GUS*-vonal mutatott változást, nevezetesen a GUS-jel csökkenését. A *CKX5::GUS*-aktivitás a gyökérben nem csökkent szelenit hatására, a *CKX6::GUS*-promóteraktivitást pedig nem befolyásolta a szelenitkezelés egyik szervben sem (14. ábra).



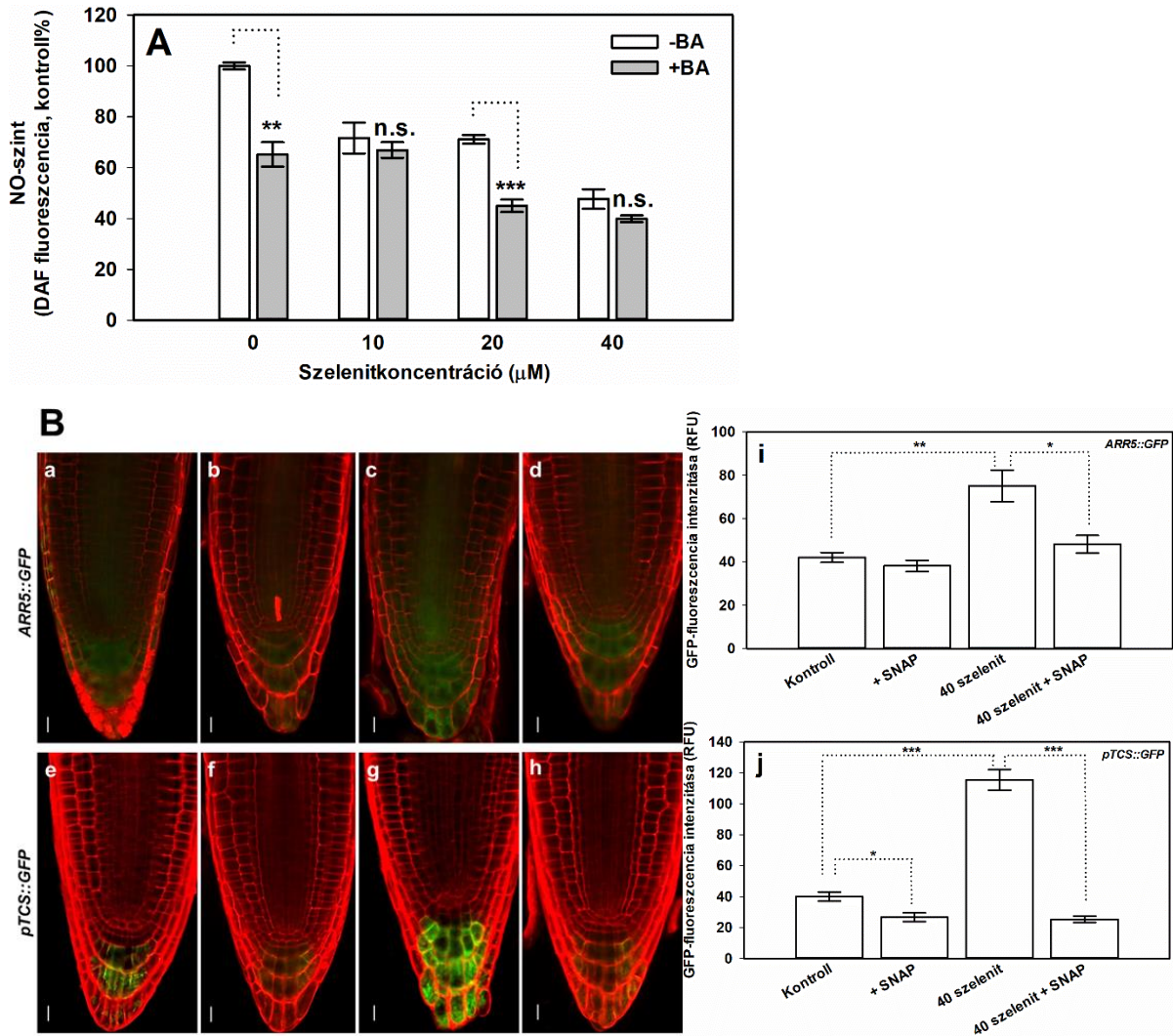
14. ábra: A citokinin-oxidáz aktivitását jelző *CKX::GUS* Arabidopsis-vonalak sziklevei (A-F) és főgyökércsúcsai (G-L). A növények kontroll- (A, C, E és G, I, K) vagy 40 μM szelenittel ellátott táptalajon (B, D, F és H, J, L) növekedtek 4 napig. Mércse= 1 mm.

Kimutattuk, hogy a vad típusú sziklevéiben a NO-szint nem változott szelenit jelenlétében (15. ábra A), a gyökércsúcsokban azonban a szelenit koncentrációfüggő módon csökkentette a NO-szintet (12. ábra és 15. ábra A). Továbbá a vad típushoz hasonló mértékű szelenitindukált NO-tartalomcsökkenés volt kimutatható a nitrát-reduktáz-deficiens *nia1nia2* lúdfű gyökerében is (15. ábra B).



15. ábra: (A) NO-szint 4 napos, 10, 20 vagy 40 μM szelenit jelenlétében nevelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* csíranövények szerveiben. (B) NO-szint 10, 20 vagy 40 μM szelenittel kezelt *nia1nia2* *A. thaliana* mutáns főgyökér merisztémájában. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=10$).

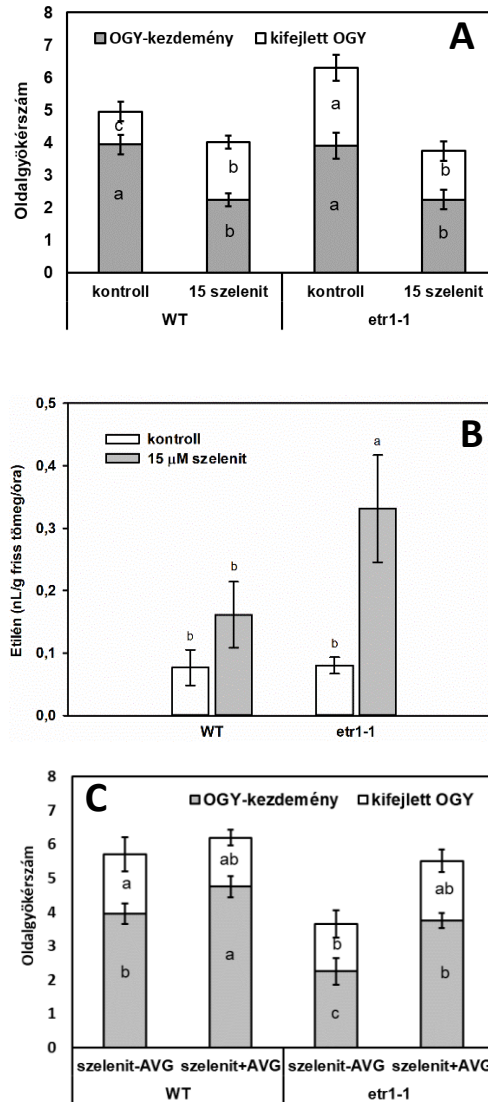
A citokininek és a NO egymásra gyakorolt hatását a szelenitkezelt lúdfű gyökerében külső kezelésekkel tanulmányoztuk. A BA adagolása nem változtatta meg a NO-szintet a 10 μM és a 40 μM szelenit esetén, de szignifikánsan csökkentette azt a 20 μM szelenitkezelt lúdfűben (16. ábra A). A SNAP NO-donorvegyület hatását a citokininszintre *ARR5::GFP* és *pTCS::GFP* növényvonalak gyökérmerisztémájában vizsgáltuk konfokális mikroszkópiával (16. ábra B). A SNAP kismértékben csökkentette a kontrollgyökérben a *pTCS::GFP* jelet (16. ábra B/f és j), és nem változtatta meg az *ARR5::GFP* fluoreszcenciát (16. ábra B/b és i). A 40 μM szelenit által megnövelt *ARR5::GFP* és *pTCS::GFP* kifejeződést azonban a NO-felszabadító vegyület jelentősen csökkentette a FGY-csúcsban (16. ábra B/d,h,i,j).



16. ábra: (A) NO-szintek vad típusú *Arabidopsis thaliana* csíranövények gyökércsúcsában, melyek 0, 10, 20 vagy 40 μM szelenitet vagy 0, 10, 20 vagy 40 μM szelenitet (-BA) és 0,1 μM benziladenint (+BA) tartalmazó táptalajon növekedtek 4 napig. (B) A NO-donor SNAP hatása a citokininszintet jelző *ARR5::GFP* és a *pTCS::GFP* expresszióra. Kontroll (a), 100 μM SNAP-kezelt (b), 40 μM szelenitkezelt (c) és 40 μM szelenit+100 μM SNAP-kezelt (d) *ARR5::GFP*-t kifejező *A. thaliana* gyökércsúcsokról készült konfokális mikroszkópos felvételek. Mércse= 10 μm. Kontroll (e), 100 μM SNAP-kezelt (f), 40 μM szelenitkezelt (g) és 40 μM szelenit+100 μM SNAP-kezelt (h) *pTCS::GFP*-t kifejező *A. thaliana* gyökércsúcsokról készült konfokális mikroszkópos felvételek. Mércse= 10 μm. A GFP fluoreszcenciaintenzitás mért értékei (RFU) az *ARR5::GFP* gyökércsúcsokban (i) és a *pTCS::GFP* gyökércsúcsokban (j). A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=15$). „n.s.”=nem szignifikáns.

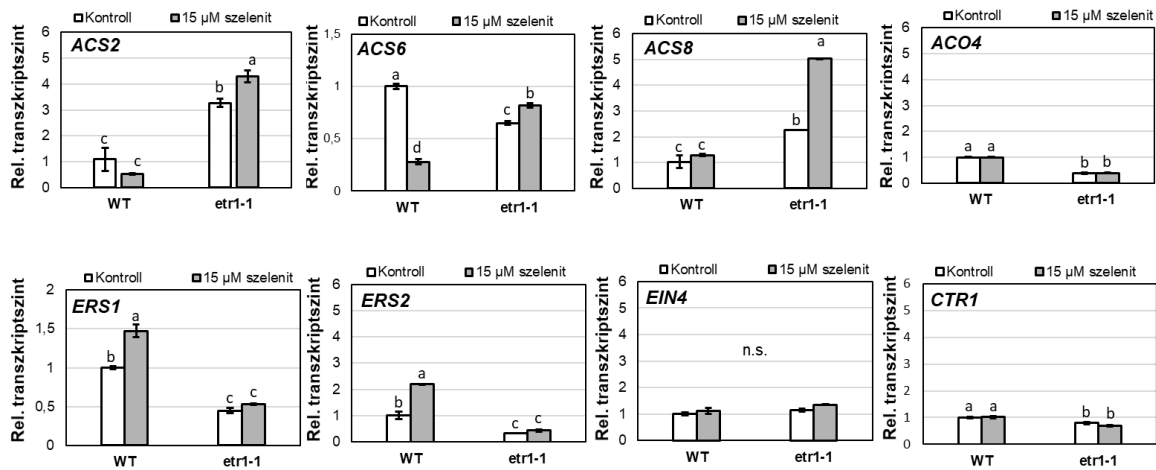
Alapozva a korábbi eredményeinkre, miszerint a szelenit ellentétesen befolyásolja a két gáz halmazállapotú jelátvivő, az etilén és a NO szintjeit a lúdfű gyökerében, molekuláris szinten tanulmányoztuk az etilén szerepét és az etilén és NO között fennálló feltételezett jelkapcsolatot. A vad típusban az alkalmazott 7 napos 15 μM szelenitkezelés SIMV-gyökérzetet alakított ki, mivel a FGY-megnyúlás gátlása (adatok nincsenek bemutatva) mellett fokozta a kifejlett OGY-ek számát (17. ábra A). Az etilén inszenzitív *etr1-1* mutánsban a szelenit gátolta az OGY-

növekedést, ami együtt járt egy nagymértékű (4-szeres) szelenitindukált etilénkoncentráció-emelkedéssel (17. ábra B). Feltételeztük, hogy a nagymértékű etilénprodukciónak az *etr1-1* lúdfűben hozzájárulhat az OGY-fejlődés gátlásához szelenitstressz során, ezért etilénszintézis-gátló AVG-t alkalmaztunk a szelenitkezelés mellett, ami visszafordította a szelenit OGY-számot csökkentő hatását, hiszen mind az OGY-kezdemények, mind pedig a kifejlett OGY-ek száma növekedett a szelenit+AVG-kezelt gyökerekben a csak szelenittel kezeltkéhez képest (17. ábra C).



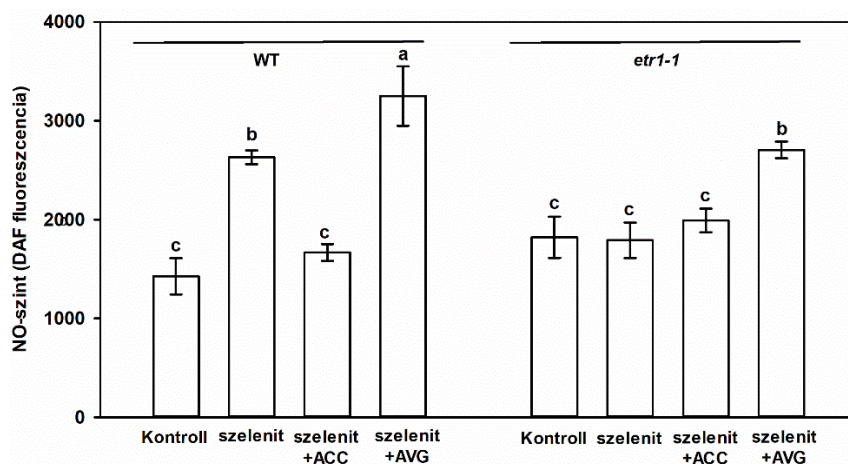
17. ábra: (A) Az oldalgyökér-kezdemények és a kifejlett oldalgyökök száma kontroll vagy 15 μ M szelenittel kezelt 7 napos, vad típusú és *etr1-1* mutáns *A. thaliana* esetén. (B) Etilénkoncentráció 7 napos kontroll és 15 μ M szelenittel kezelt vad típusú és *etr1-1* mutáns *A. thaliana* csíranövényekben. (C) 15 μ M szelenitet vagy 15 μ M szelenit+ 1,5 μ M AVG-t tartalmazó táptalajon növesztett vad típusú és *etr1-1* *A. thaliana* oldalgyökérszáma (OGY-kezdemény és kifejlett OGY). A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$).

Néhány etilénkapcsolt szintézisgén (*ACS2*, *ACS6*, *ACS8*, *ACO4*) és jelátviteli gén (*ERS1*, *ERS2*, *CTR1*) expressziós analízise felderítette, hogy a szelenitkezelés csökkentette az *ACS2* és *ACS6* gének expresszióját, és az *ERS2* kivételével nem befolyásolta az etilén-jelátviteli gének kifejeződését a vad típusban (18. ábra). Ezzel ellentétben az *etr1-1* vonalban a szelenit jelentős mértékben felülszabályozta az *ACS2* és az *ACS8* géneket, az *ERS1*, *ERS2*, *EIN4* és a *CTR1* jelátviteli gének kifejeződésében azonban nem okozott változást (18. ábra).



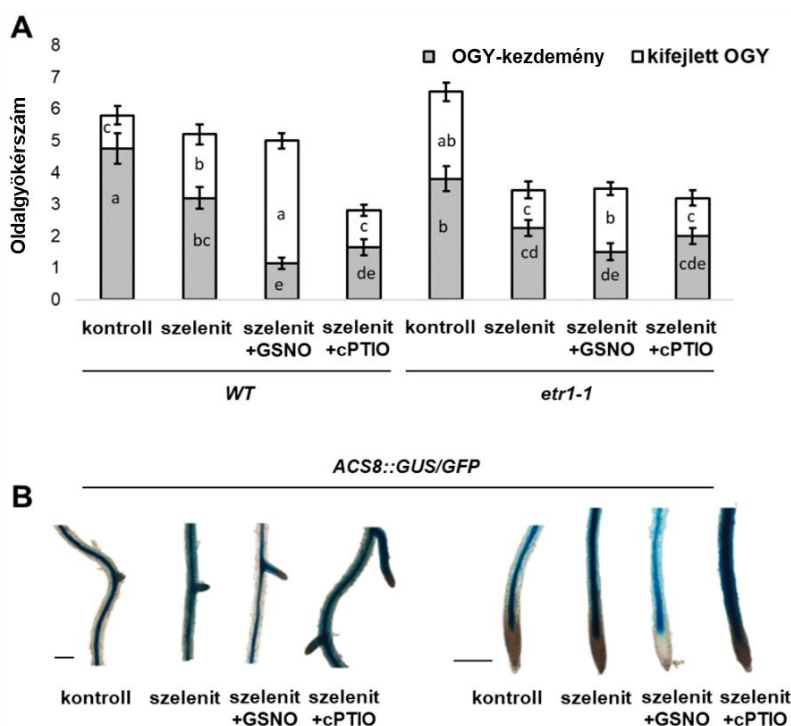
18. ábra: A kiválasztott etilénszintézis és jelátviteli gének relatív expressziója 7 napos vad típusú és *etr1-1* mutáns *A. thaliana* csíranövényekben, melyek 15 μM szelenit jelenlétében vagy anélkül (kontroll) fejlődtek. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=2$). Az adatokat az *A. thaliana* *ACTIN2* és *GAPDH2* gének, mint belső kontrollok felhasználásával normalizáltuk. A vad típusú kontrollmintákban mért relatív transzkriptszinteket önkényesen 1-nek tekintettük minden gén esetében.

A szöveti etilénszintek farmakológiai módosítása céljából ACC- és AVG-kezeléseket alkalmaztunk a kontroll- és a szelenitterhelt növényekben (19. ábra). A vad típusban a szelenit 1,8-szoros növekedést okozott a FGY NO-tartalmában, amit az ACC-kezelés kontrollszintre csökkentett, míg az AVG alkalmazása szignifikánsan megnövelte azt. Az *etr1-1* mutáns gyökerében a szelenit nem okozott NO-produkciót, az ACC pedig nem befolyásolta a NO-szintet, míg az AVG megnövelte azt (19. ábra).



19. ábra: NO-szintek 7 napos vad típusú és *etr1-1* *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcaiban. A növények a 15 μM szelenitkezelés mellett 5 nM ACC vagy 1,5 μM AVG-kezelést is kaptak. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$).

Annak érdekében, hogy tanulmányozni tudjuk a NO hatását az etilénszintre és az OGY-fejlődésre, a gyökerek NO-szintjét GSNO hozzáadásával megnöveltük, és cPTIO-gyökfogó alkalmazásával csökkentettük. A GSNO-kezelés a szelenit által megnövelt, kifejlett OGY-számot tovább növelte, az OGY-kezdemények számát pedig tovább csökkentette az összes OGY-szám módosítása nélkül (20. ábra A). A szelenitkezelés melletti cPTIO-adagolás a kifejlett OGY-szám csökkenéséhez vezetett, ami az összes OGY-szám csökkenését okozta (20. ábra A). A GSNO és a cPTIO az *etr1-1* mutánsban a vad típushoz hasonló OGY-fejlődési válaszokat okozott, vagyis a NO-szint növelése fokozta a kifejlett OGY-ek számát, a cPTIO pedig csökkentette azt a szelenit jelenlétében (20. ábra A). A GSNO-kezelés csökkentette az oldalgyökerekben és a főgyökércsúcsban a szelenitindukált *ACS8::GUS/GFP*-riporteraktivitást, a cPTIO pedig növelte azt a csak szelenittel kezelt növényekhez képest (20. ábra B).

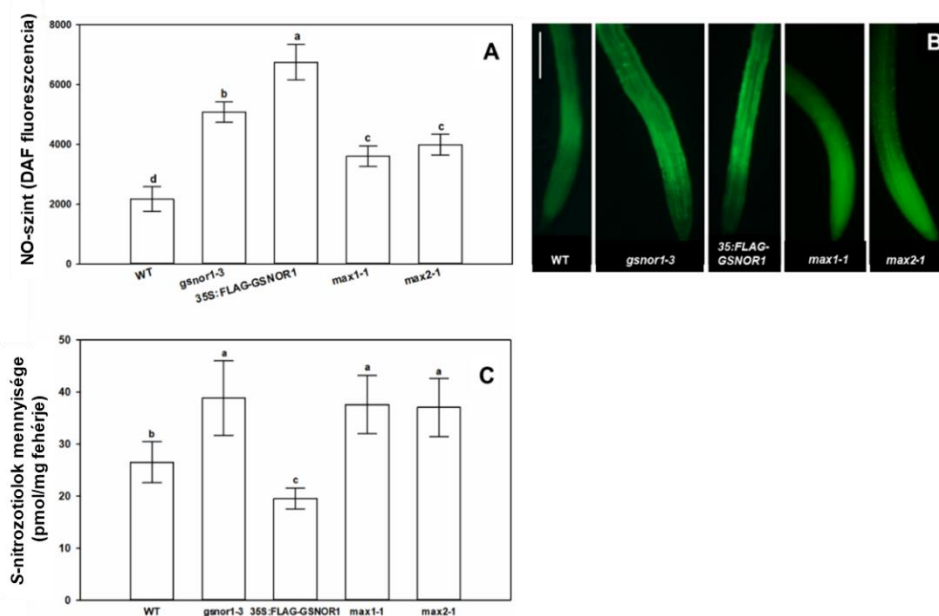


20. ábra: (A) Oldalgyökér-kezdemények és kifejlett oldalgyökerek száma 7 napos vad típusú és *etr1-1* mutáns *Arabidopsis thaliana*-ban. A növények 15 μM szelenitkezelést kaptak kiegészítve 250 μM GSNO- vagy 800 μM cPTIO-kezeléssel. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$). (B) X-Gluc jelölt *ACS8::GUS/GFP* *A. thaliana* oldal- és főgyökereiről készített mikroszkópos felvételek. A növények szelenitet vagy szelenitet és GSNO-t/cPTIO-t tartalmazó táptalajon nőttek. A kezelési koncentrációk az előzőeknek megfelelőek voltak. Mércék= 500 μm .

5.3.3. A NO kapcsolata a strigolaktonokkal és karrikinekkel a lúdfű gyökérnövekedése során stresszmentes körülmények között

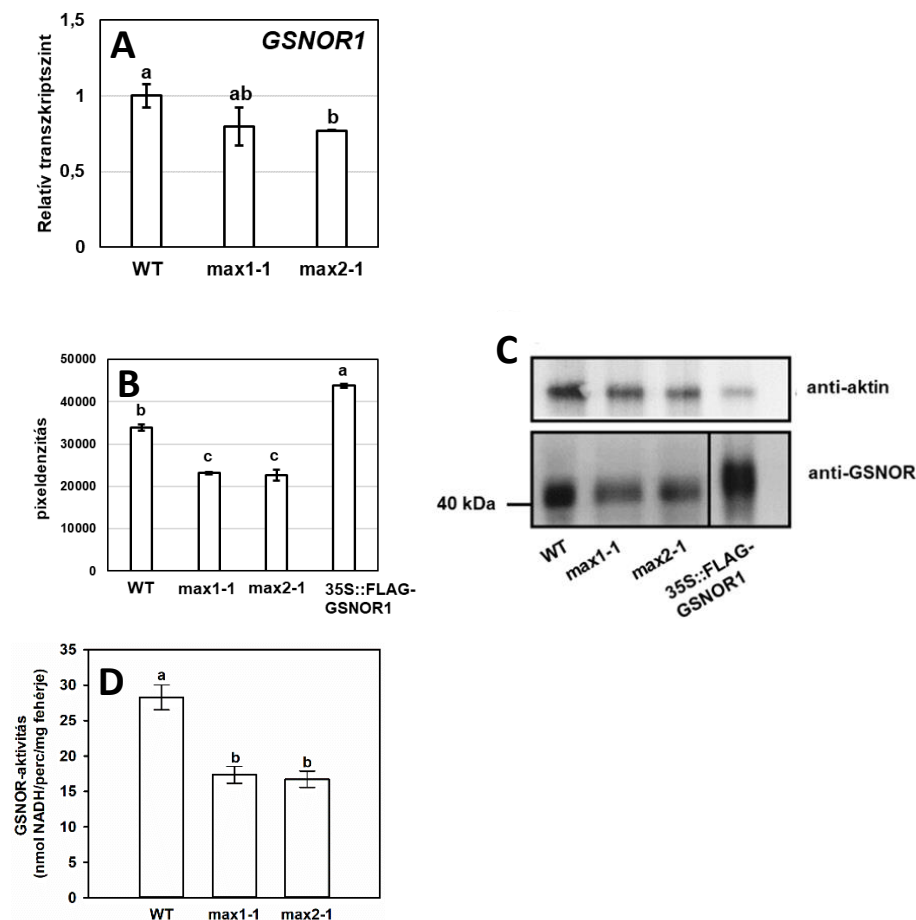
A strigolaktonok és a hozzájuk hasonló szerkezetű és jelátvitelű karrikinek széles körű hatást gyakorolnak a növényi szervek, így a gyökérzet szerkezetének kialakítására. Mivel a NO is szabályozza a gyökérnövekedést, felmerült a lehetősége annak, hogy a strigolaktonok és a karrikinek a NO-jelátvitellel kapcsolódva fejtik ki a növekedést reguláló hatásukat. Kísérleteinkbe strigolaktonszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*, *d14*), valamint karrikin-jelátvitelben (*hlt-3*) hibás *Arabidopsis thaliana* vonalakat vontunk be, emellett a GSNOR enzim génjében deficiens *gsnor1-3*, valamint az enzim génjét túlexpresszáló *35S::FLAG-GSNOR1* vonalat is felhasználtuk.

A *gsnor1-3* mutánsban és a *35S::FLAG-GSNOR1* vonalban is jelentősen megemelkedett NO-szintet detektáltunk a vad típushoz képest (21. ábra A és B). A *max1-1* és a *max2-1* vonalak hasonló mértékben megemelkedett NO-szintet mutattak a vad típushoz képest, ez a NO-akkumuláció azonban kisebb mértékű volt, mint a GSNOR-mutáns vonalak esetében (21. ábra A és B). Az SNO-szint – melyet a GSNOR közvetlenül szabályoz – az enzim hiánya esetén magasabb, a túltermelése esetén pedig alacsonyabb volt, mint a vad típusban (21. ábra C). Ennél érdekesebb azonban, hogy a strigolaktonmutánsokban hasonlóan a NO-szinthez, az SNO mennyisége is szignifikánsan magasabbnak adódott a vad típushoz képest (21. ábra C).



21. ábra: A NO-szint (A) és az S-nitrozotiolok mennyisége (C) 7 napos, kontrolltáptalajon nevelt vad típusú GSNOR- és strigolaktonmutáns *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$ NO esetén, $n=5$ nitrozotiolok esetén). (B) DAF FM DA-val jelölt *A. thaliana* gyökércsúcsokról készült reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse= 100 μm .

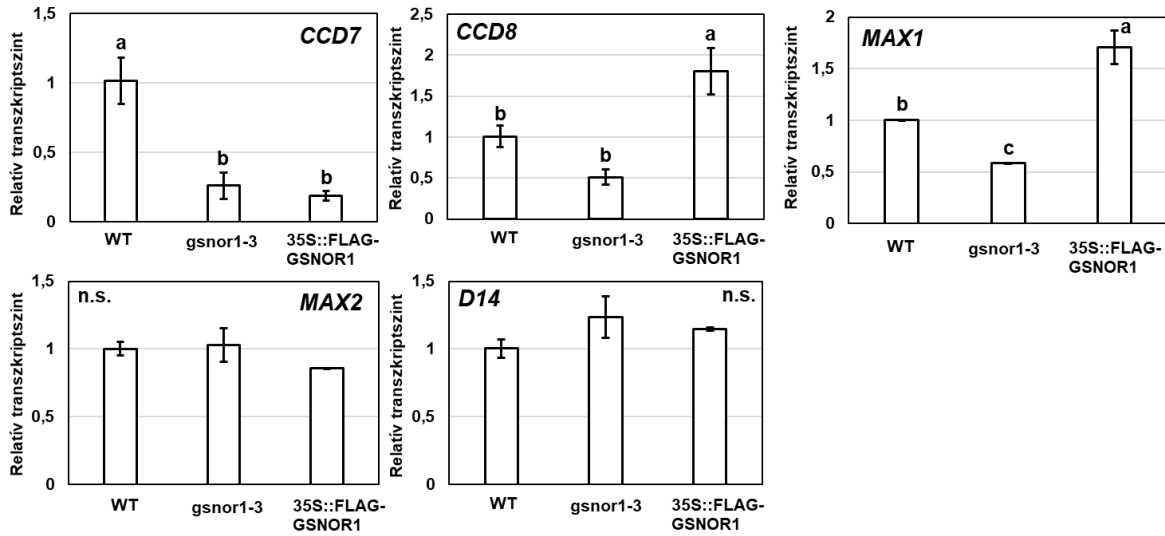
Annak kiderítése érdekében, hogy a GSNOR enzim szerepet játszik-e a strigolaktonhiba következtében megnövekedett NO-tartalom kialakításában, megvizsgáltuk az enzimet aktivitás-, fehérje- és génszinten. A *GSNOR1* gén kifejeződése nem mutatott változást a *max* mutánsokban a vad típushoz képest (22. ábra A), a fehérje mennyisége azonban jelentős mértékben alacsonyabbnak mutatkozott (22. ábra B és C). Pozitív kontrollként feltüntettem a *35S::FLAG-GSNOR1* vonal megemelkedett GSNOR-fehérjetartalmát (22. ábra B és C). A GSNOR aktivitása szintén szignifikánsan, csaknem 50%-kal alacsonyabb volt a *max1-1* és a *max2-1* vonalakban, mint a vad típusban (22. ábra D).



22. ábra: (A) A *GSNOR1* gén relatív transzkript szintje kontrolltáptalajon nőtt vad típusú, *max1-1* és *max2-1* Arabidopsis csíranövényekben. (B,C) A GSNOR-fehérje mennyisége vad típusú, strigolaktonmutáns és *35S::FLAG-GSNOR1* (mint pozitív kontroll) növényekben. (D) GSNOR-enzimaktivitás a vad típusú és a *max1-1* és *max2-1* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$ A, B, C ábrarészek esetén vagy $n=5$ a D ábrarész esetén).

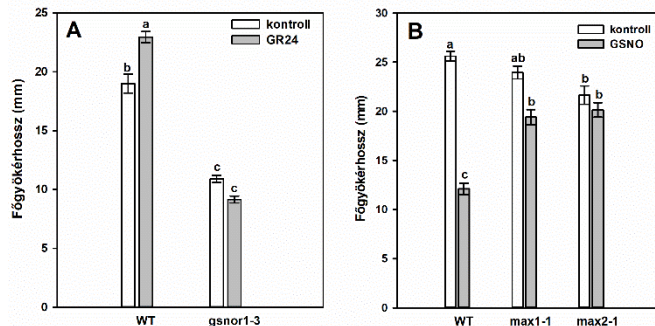
A fordított hatást is megvizsgáltuk, és azt az eredményt kaptuk, hogy a GSNOR elégtelen működése hat a strigolaktonokra, hiszen a *gsnor1-3* növényvonalban a strigolaktonszintézis-gének (*CCD7*, *CCD8*, *MAX1*) alulszabályozottak voltak a vad típusú növényekben detektált

génexpressziós szintekhez képest (23. ábra). A *MAX2* és *D14* jelátviteli gének kifejeződésében nem tapasztaltunk eltérést a vad típushoz képest (23. ábra).



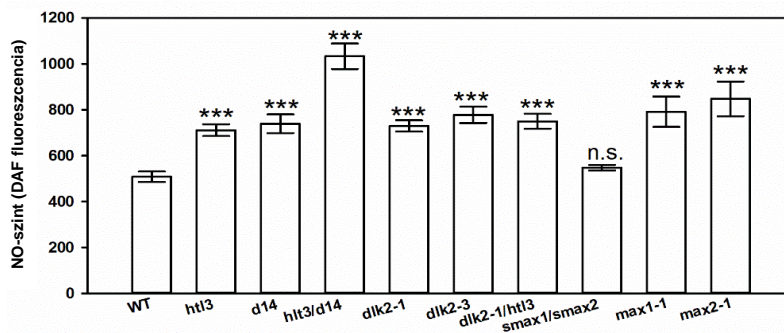
23. ábra: Strigolaktonasszociált gének relatív transzkript szintje vad típusú (WT), *gsnor1-3* és *35S::FLAG-GSNOR1* *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$). Az adatokat az *A. thaliana* *ACTIN2* és *GAPDH2* gének, mint belső kontrollok felhasználásával normalizáltuk. A vad típusú kontrollmintákban mért relatív transzkript szinteket önkényesen 1-nek tekintettük minden gén esetében.

A strigolakton és a GSNOR-szabályozott NO közötti jelkapcsolatra vonatkozó adatainkat szükségesnek láttuk megerősíteni, ezért összehasonlítottuk a mutáns vonalak exogén strigolakton és exogén NO-donor-kezelésekre adott gyökérnövekedési válaszait. A *rac*-GR24 strigolaktonanalóg fokozta a FGY megnyúlását a vad típusban, de ez a hatás nem jelent meg a *gsnor1-3* mutánsban (24. ábra A). A vad típusú lúdfű FGY-hossza a külsőleg alkalmazott NO donor (GSNO) hatására 50%-os rövidülést mutatott, a *max1-1* és a *max2-1* strigolakton-deficiens mutánsokban azonban ez a kezelés nem okozott szignifikáns FGY-megnyúlásgátlást (24. ábra B).



24. ábra: (A) Hétnapos vad típusú és *gsnor1-3* *Arabidopsis thaliana* főgyökérhossza 2 μ M GR24 jelenlétében vagy anélkül (kontroll). (B) Vad típusú, *max1-1* és *max2-1* *A. thaliana* főgyökérhossza 250 μ M GSNO jelenlétében vagy anélkül (kontroll). A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$).

Mivel a *rac*-GR24 és a *max2-1* mutáns érinti mind a strigolakton- mind pedig a karrikin-jelátvitelt, az eddig bemutatott adatok alapján nem zárható ki, hogy a karrikinnek részben felelősek a felfedezett hatásokért. Ezt erősítette meg a további eredményünk, miszerint a karrikin-jelátvitelre specifikus *htl-3* receptor mutáns gyökerében szignifikánsan magasabb NO-szintet detektáltunk a vad típushoz képest. A *dl4* strigolaktonreceptor mutáns szintén magasabb NO-szinttel bírt a vad típushoz képest, a kettős mutáns (*htl3/dl4*) NO-szintje pedig minden vonal közül a legmagasabb NO-szint értéket mutatta. A receptorcsalád harmadik tagja a DWARF14-LIKE2 (DLK2), ami nem szabályoz stigolakton-jelátvitelt. A NO-szint a DLK2 hibája esetén is (*dlk2-1*, *dlk2-3*, *dlk2-1/htl3*) emelkedett a vad típushoz képest. Nem volt különbség azonban a karrikin-jelátviteli represszor hibás *smax1/smax2* és a vad típus NO-szintje között, míg a stigolaktonszintézisben hibás *max1-1* és jelátvitelben hibás *max2-1* esetén a NO-szint magasabb volt, mint a vad típusban (25. ábra).



25. ábra: NO-szintek 7 napos, vad típusú (WT), *htl-3*, *d14*, *htl3/d14*, *dlk2-1*, *dlk2-3*, *smax1/smax2*, *max1-1* és *max2-1* mutáns *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcsában. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük a Student-féle t-próba alapján (*** $P \leq 0,001$, n.s.=nem szignifikáns, $n=10$).

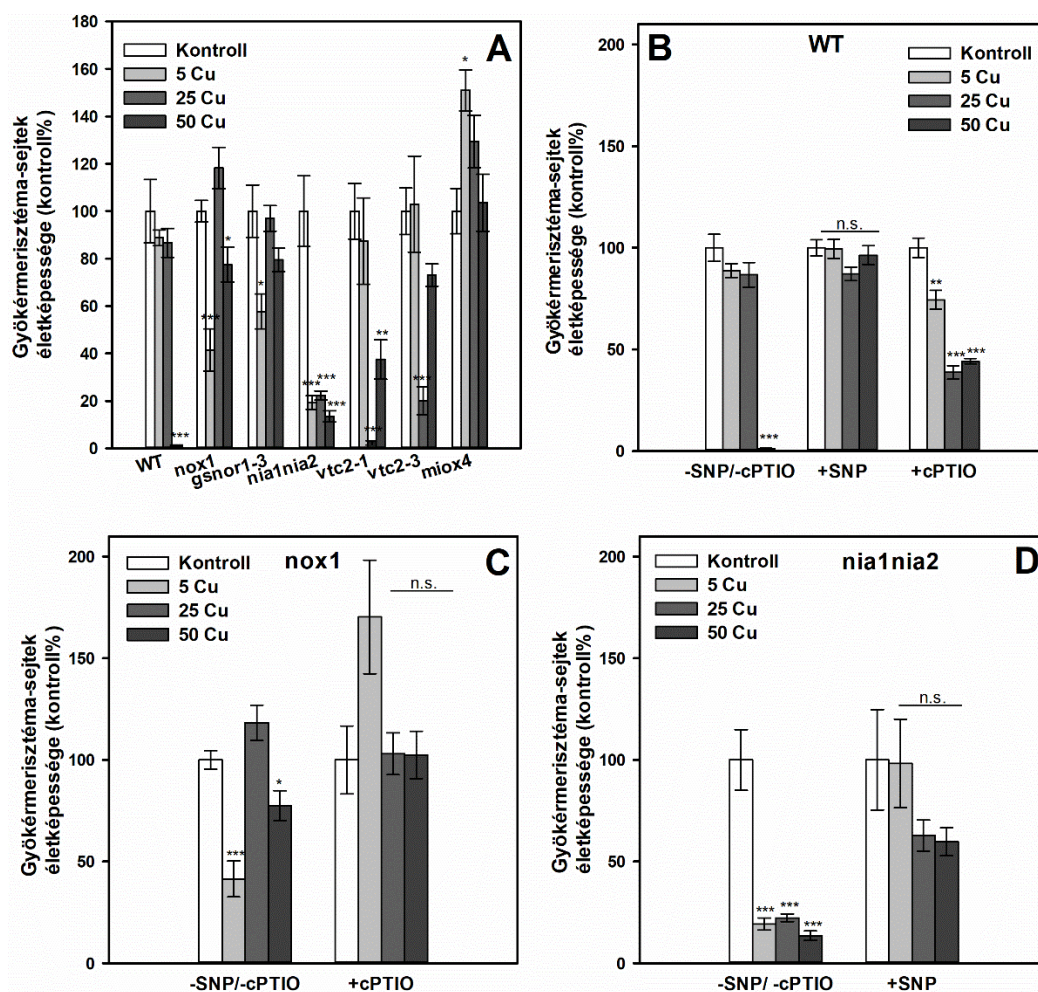
5.4. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEM-TÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKULÁSÁBAN

A következő, gyakorlati jelentőséggel is bíró kérdés az, hogy a növekedést szabályozó NO játszik-e valamiféle szerepet az elem-többletek által okozott stressz eltűrésében. Ha igen, akkor megvalósulhat-e a NO hatása a ROF szabályozásán keresztül? A kérdések megválaszolása céljából megváltozott NO-homeosztázisú *Arabidopsis thaliana* vonalakat vontunk be a kísérleteinkbe.

5.4.1. A NO részvétele az réztöbblettel szembeni toleranciában

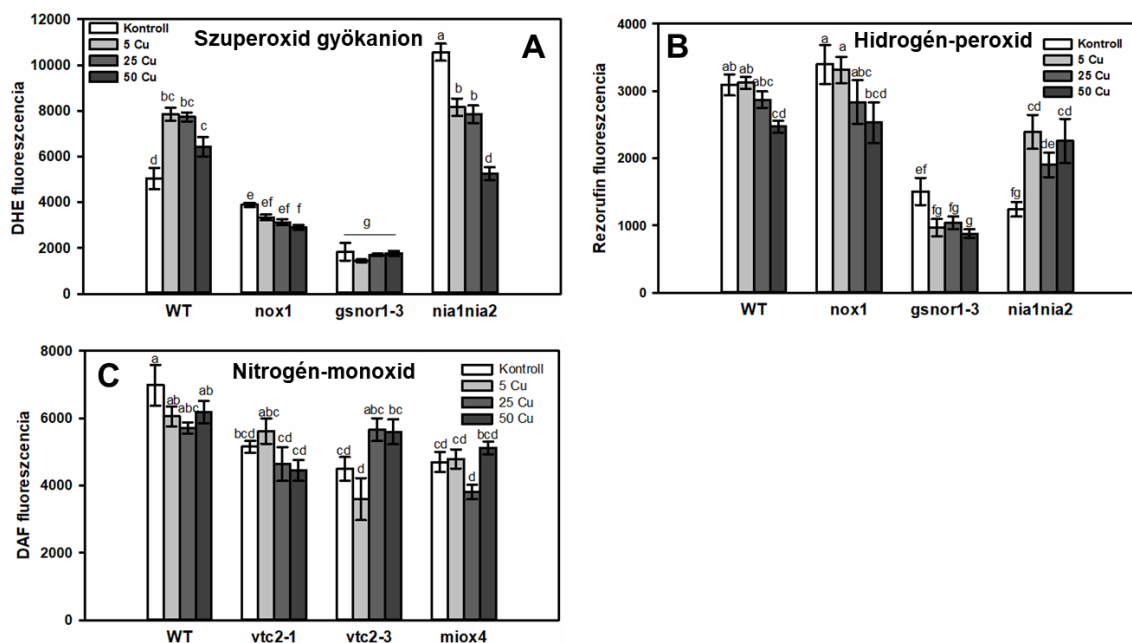
Elsőként rézterhelés mellett hasonlítottuk össze a NO-túltermelő és -alultermelő vonalaink életképességét. Érdekes módon a NO-túltermelő *nox1* és *gsnor1-3* vonalak

életképessége jelentős mértékű csökkenést szenvedett el alacsony rézkoncentráció esetén (5 μM Cu), de a vad típusnál jobb életképességgel rendelkeztek nagy rézkoncentrációk mellett (26. ábra A). Az alacsony NO-tartalommal bíró *nia1nia2* vonalban az 5 és a 25 μM réz a vad típusnál jelentősebb életképesség-vesztést okozott, bár a legnagyobb alkalmazott rézkoncentráció (50 μM) esetén jobb életképességet detektálunk a vad típushoz képest (26. ábra A). A külső NO adagolása (10 μM SNP) növelte a rézkezelt vad típusú (26. ábra B) és a *nia1nia2* (26. ábra C) növények életképességét mindhárom rézkoncentráció mellett, míg a NO eltávolítása súlyosbította az 5 és a 25 μM réz hatását a vad típusban (26. ábra B). A *nox1* mutánsban a magas endogén NO-szint eliminálása cPTIO-val megnövelte az 5 μM réz által redukált életképességet (26. ábra D).



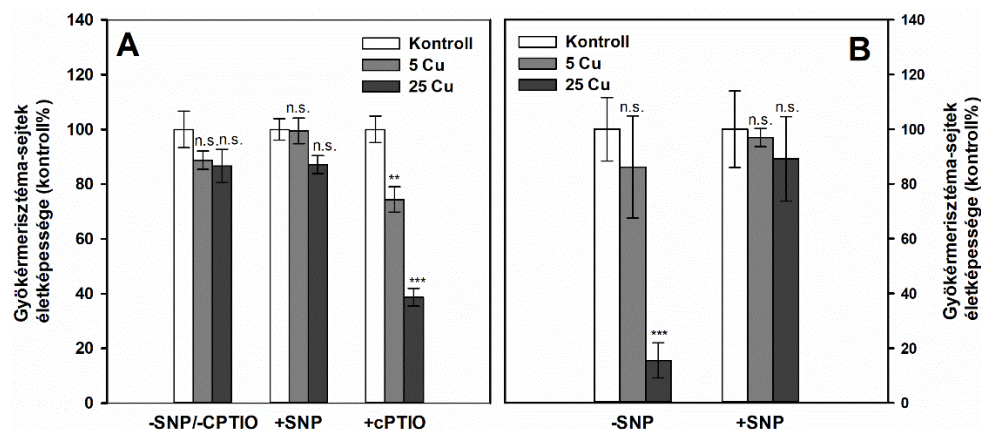
26. ábra: (A) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége kontroll és rézkezelt (5, 25 vagy 50 μM) vad típusú és mutáns *Arabidopsis thaliana* vonalak esetén. (B) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége vad típusú *A. thaliana* esetén. A növények 5, 25 vagy 50 μM rezet tartalmazó táptalajon növekedtek 10 μM SNP vagy 50 μM cPTIO jelenlétében, vagy azok nélkül. (C) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége rézkezelt *nox1* *A. thaliana* esetén 50 μM cPTIO hozzáadásával vagy anélkül. (D) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége rézkezelt *nia1nia2* *A. thaliana* esetén 10 μM SNP hozzáadásával vagy anélkül. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=10$). „n.s.”= nem szignifikáns.

A ROF kismértékű túltermelése az aszkorbinsav-hiányos *vtc2-1* és *vtc2-3* esetén azt eredményezte, hogy ezekben a növényekben az életképesség nagymértékben lecsökkent a 25 μM rézterhelés hatására (26. ábra A). Ezzel ellentétben a csökkent ROF-tartalom a *miox4* vonalban a vad típusnál jobb életképességet eredményezett minden rézkoncentráció esetén (26. ábra A). Mivel az adataink arra utaltak, hogy a NO hozzájárul a réztűréshez a ROF pedig érzékenységet fokoz, megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a NO a ROF-szintek csökkentése révén képes-e a réztolerancia fokozására. A vad típusú lúdfű gyökerében tapasztalt rézindukált $\text{O}_2^{\bullet-}$ -szintnövekedés a NO-túltermelő vonalakban nem következett be, azok eleve alacsony szintje kontrollközelben maradt a réz jelenlétében is (27. ábra A). Érdekes módon a *nialnia2* mutáns nagy $\text{O}_2^{\bullet-}$ -tartalma a réztöbblet hatására csökkenést mutatott (27. ábra A). Rézindukált H_2O_2 -felhalmozódás csupán a NO-hiányos *nialnia2* esetén történt, míg a NO-túltermelő vonalak gyökereiben a vad típushoz hasonlóan a H_2O_2 -szint réz által kiváltott csökkenését detektáltunk (27. ábra B). Felmerült az a kérdés is, hogy vajon az aszkorbinsav-mutációk befolyásolják-e a NO-szintet rézkezelés hiányában, illetve jelenlétében. Kontrolltáptalajon növesztve mindhárom mutáns (*vtc2-1*, *vtc2-3*, *miox4*) a vad típusnál alacsonyabb NO-szintet mutatott a gyökereiben, és a réz koncentrációi nem okoztak szignifikáns változást sem a vad típusú (WT), sem pedig a ROF-asszociált mutánsok NO-tartalmában (27. ábra C).



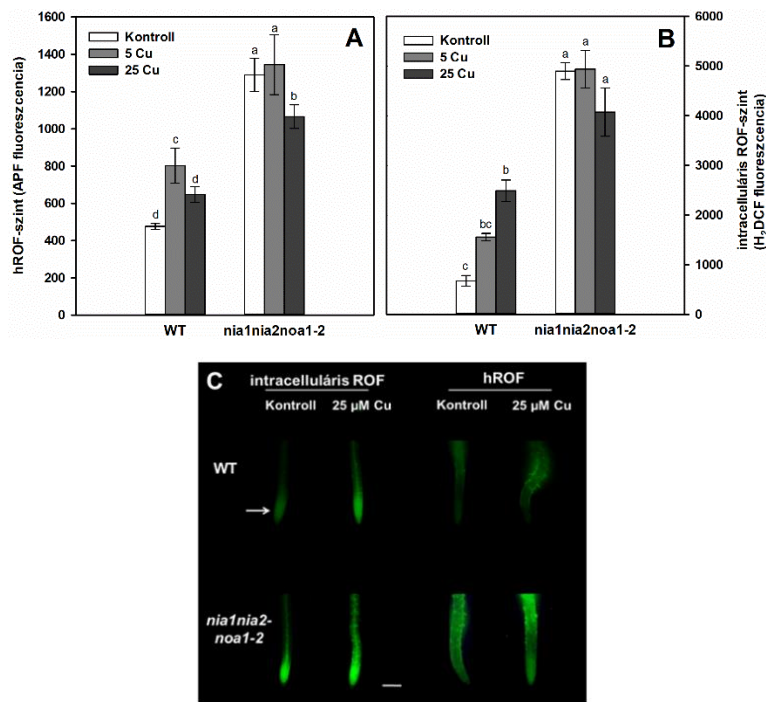
27. ábra: A szuperoxid gyökéanon (A) és hidrogén-peroxid (B) szintje kontroll és rézkezelte (5, 25 vagy 50 μM) vad típusú, *nox1*, *gsnor1-3* és *nialnia2* *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcsában. (C) Nitrogén-monoxid-szint kontroll és rézkezelte vad típusú, *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* *A. thaliana* gyökércsúcsában. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P < 0,05$, $n=10$).

További kísérleteinkben a NO-alultermelő *nialnia2noal-2* tripla mutáns növényvonal réztűrését és NO-szintjét vettük górcső alá. A hétnapos 5 μM és 25 μM koncentrációjú rézterhelés nem okozott életképesség-csökkenést a vad típusú gyökerek merisztémájában, de a 25 μM réz jelentős életképesség-vesztést eredményezett a tripla mutáns esetén (28. ábra A és B). A cPTIO alkalmazása rontotta a réz által csökkentett életképességet a vad típusú lúdfű esetén, az SNP NO-donor alkalmazása pedig nem befolyásolta azt (28. ábra A), de növekedést eredményezett a tripla mutáns gyökér-életképességében 25 μM rézterhelés mellett (24. ábra B).



28. ábra: (A) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége kontroll és rézkezelte *Arabidopsis thaliana* növényekben, melyek a réz mellett 10 μM SNP- vagy 50 μM cPTIO-kezelést is kaptak, vagy nem kaptak (-SNP/-cPTIO). (B) Kontroll és rézkezelte *nialnia2noal-2* növények gyökérsejtjeinek életképessége 10 μM SNP jelenlétében vagy hiányában. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=15$). „n.s.”= nem szignifikáns.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a *nialnia2noal-2* mutáns rézérzékenységéhez milyen ROF-szintek társulnak. Fluoreszcens próbákkal detektáltuk a nagy reaktivitású ROF (highly reactive ROF, hROF főként a ONOO^-) és az intracelluláris ROF (főként H_2O_2) tartalmakat; ezek szignifikánsan nagyobbak mutatkoztak a *nialnia2noal-2* mutánsban a vad típushoz képest stresszmentes körülmények között (29. ábra). A 25 μM rézterhelés szignifikáns csökkenést okozott a mutáns gyökerek hROF-szintjében, ám az még így is jóval magasabb maradt, mint a vad típusú növények hROF-szintje (29. ábra A és C). A mutáns intracelluláris ROF szintjében a rézkezelések nem okoztak szignifikáns változást, míg a vad típusban a réz növelte azt (29. ábra B és C).

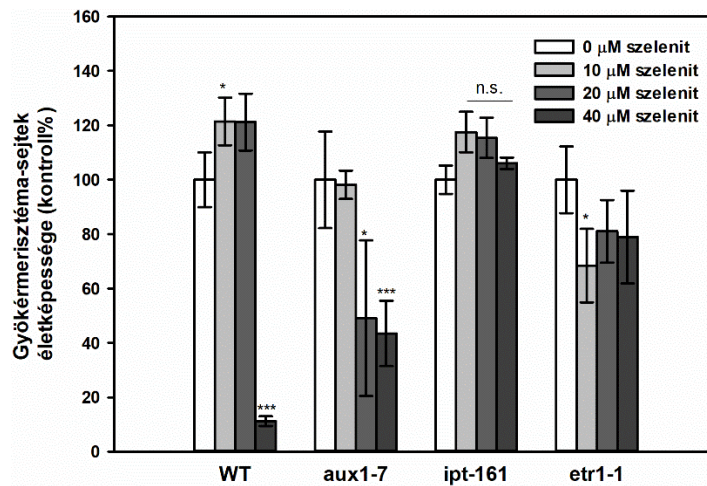


29. ábra: Nagy reakcióképességű reaktív oxigénformák (hROF, A) és intracelluláris reaktív oxigénformák (B) szintjei vad típusú és *nia1nia2noa1-2 Arabidopsis thaliana* gyökerében. A növények kontrollkörülmenyek között vagy 5 vagy 25 μM réz jelenlétében növekedtek 7 napig. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($p \leq 0,05$, $n=10$). (C) Fluoreszcens próbákkal (hROF esetén APF, intracelluláris ROF esetén $\text{H}_2\text{DCF-DA}$) jelölt kontroll és 25 μM rézkezelt *A. thaliana* gyökércsúcsokról készült reprezentatív mikroszkópos felvételek. A fehér nyíl a főgyökér-merisztémát jelöli, ahol a fluoreszcencia intenzitásának mérése történt. Mércse= 1mm.

5.4.2. A NO és a fitohormonok részvétele a szelenittel szembeni tolerancia kialakulásában

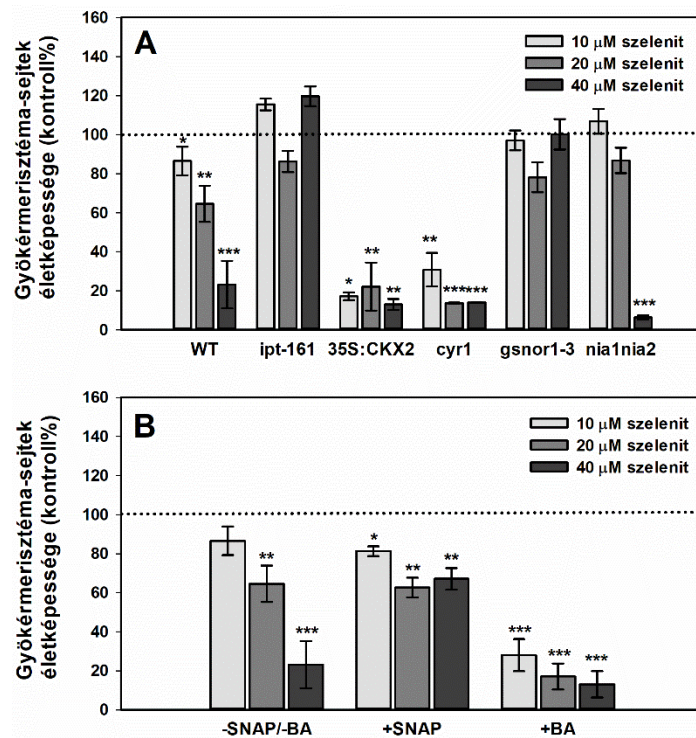
Farmakológiai és genetikai módszerekkel utánajártunk annak, hogy a NO, illetve az auxin, a citokininek és az etilén hogyan befolyásolják a szelenitoleranciát *Arabidopsis* modellben.

Az *aux1-7* mutánsok gyökér-életképessége a vad típushoz hasonló csökkenést szenvedett el a szelénkoncentrációk (10, 20, 40 μM szelenit) jelenlétében, míg a citokinintultermelő *ipt-161* és az etiléninszenzitív *etr1-1* vonalak életképessége egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben csökkent (30. ábra).



30. ábra: Négynapos vad típusú és hormonmutáns *Arabidopsis thaliana* vonalak gyökérmerisztémasejt-életképessége 0, 10, 20 vagy 40 μM szelenit jelenlétében. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$, $n=10$). „n.s.”= nem szignifikáns.

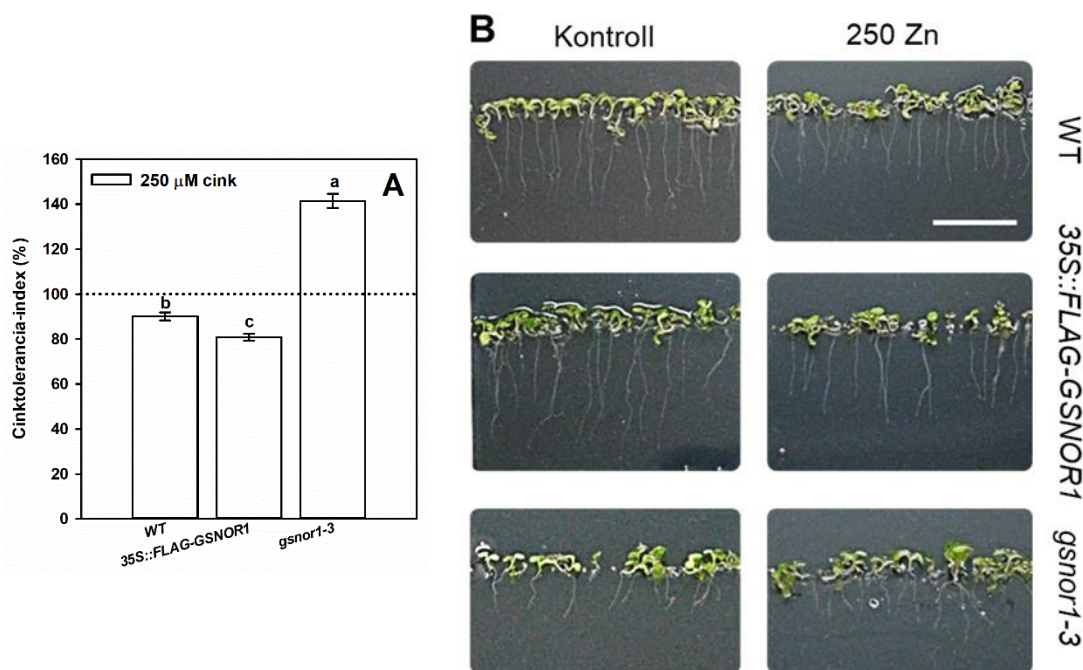
Az alacsony citokinintartalommal bíró *35S::CKX2* és a citokinininszenzitív *cyr1* mutánsok mindhárom szelenitdózis esetén a vad típusnál alacsonyabb életképességet mutattak (31. ábra A). Ennek látszólag ellentmond, hogy a BA alkalmazása a vad típusban életképességromlást okozott mindhárom szelenitkoncentráció mellett alkalmazva (31. ábra B). A NO-túltermelő *gsnor1-3* egyik szelénkoncentráció mellett sem mutatott életképesség-vesztést (31. ábra A). Ami a *nia1nia2* NO-alultermelő vonalat illeti, a szelenitre adott életképesség-beli válasza diverz volt, hiszen a 10 μM szelenit a vad típusnál kisebb mértékű életképesség-csökkenést okozott, míg a 40 μM szelenit esetén az életképessége csupán a kontrollénak a kb. 10% volt (31. ábra A). A NO szelenittűrésben való részvételét tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a vad típusú növények NO-szintjének SNAP alkalmazásával való megemlése a 40 μM szelenit jelenlétében javult életképességet eredményezett a csak szelenittel kezelt növényekhez képest (31. ábra B).



31. ábra: (A) Gyökérmerisztéma-sejtek életképessége 10, 20 vagy 40 μM szelenit jelenlétében növekedett vad típusú és mutáns *Arabidopsis thaliana* vonalak esetén. (B) Gyökérmerisztéma-sejtek életképessége vad típusú *A. thaliana* esetén. A növények 10, 20 vagy 40 μM szelenit jelenlétében növekedtek, és 100 μM SNAP vagy 0,1 μM BA kezelést kaptak, illetve anélkül nőttek (-SNAP/-BA). A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=10$).

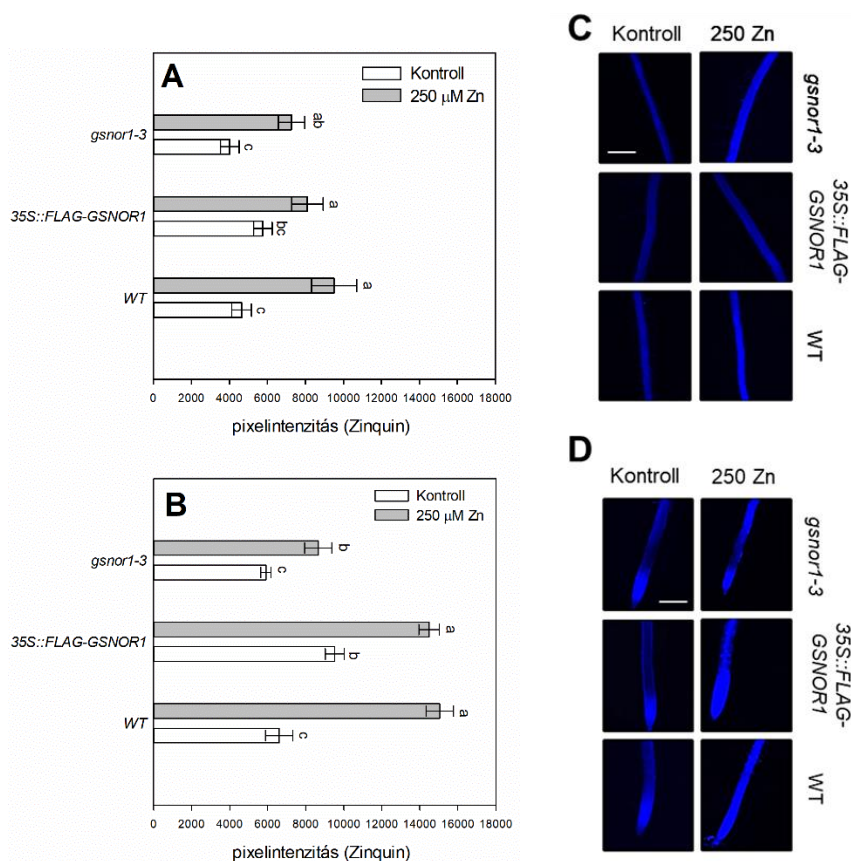
5.4.3. A NO-jelátvitel szerepe a cinktolerancia kialakításában lúdfűben

A *gsnor1-3* NO-túltermelő vonal előzőekben bemutatott figyelemre méltó réz- és szeléntűrése mellett tanulmányoztuk annak a lehetőségét is, hogy az a cinktöbblettel szemben is ellenállóbb a vad típushoz viszonyítva. A 7 napig tartó, 250 μM koncentrációjú cinkkezelés esetén a *gsnor1-3* gyökérmegnyúlási képességéből számított toleranciaindex jelentős mértékben meghaladta a vad típusét, míg a GSNOR-t túltermelő *35S::FLAG-GSNOR1* toleranciaindex alacsonyabbnak bizonyult (32. ábra A). A csíranövények növekedését kontrollesetben és cinktöbblet mellett a 32. ábra B része mutatja.



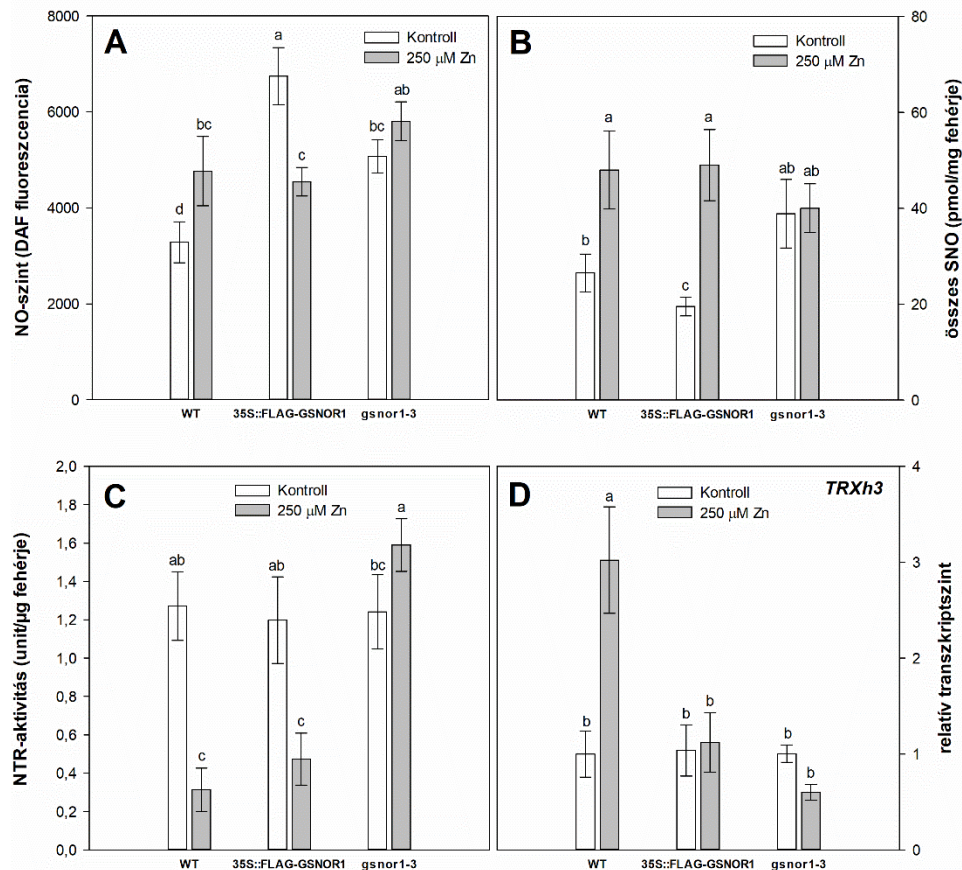
32. ábra: (A) Cinktolerancia-index (kontroll%) 7 napos vad típusú, 35S::FLAG-GSNOR1 és gsnor1-3 *Arabidopsis thaliana* esetén. A növények kontroll (15 μ M cink tartalmú) vagy 250 μ M cinket tartalmazó táptalajon növekedtek. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$). (B) Kontroll és 250 μ M cinkkel kezelt, 7 napos *A. thaliana* csíranövényekről készült reprezentatív felvételek. Mércse= 1 cm.

A felhalmozott cink mennyiségét fluoreszcens jelöléssel követve megállapítottuk, hogy az nem különbözött jelentős mértékben a növényvonalak gyökerének felszívási zónájában (33. ábra A és C). Meg kell említeni azonban, hogy a gsnor1-3 és a 35S::FLAG-GSNOR1 gyökérmerisztémájának cinkakkumulációs képessége kissé alacsonyabb volt a vad típushoz képest (33. ábra B és D).



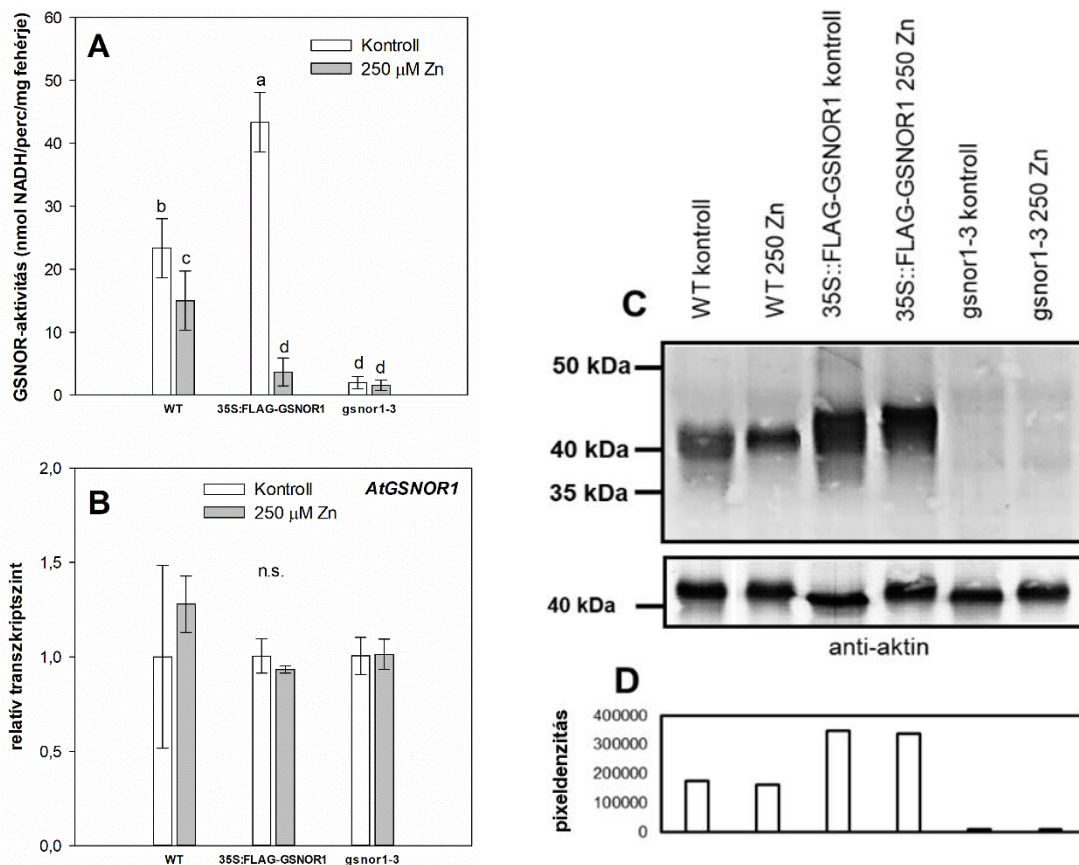
33. ábra: Cinkszintek (Zinquin-jelöléssel becstülve) kontroll és 250 μM cinkkel kezelt vad típusú, *35S::FLAG-GSNOR1* és *gsnor1-3* *Arabidopsis thaliana* növények gyökerének felszívási (A) és osztódási (B) zónájában. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). Reprezentatív mikroszkópos felvételek a vad típusú és mutáns *A. thaliana* főgyökerek felszívási zónájáról (C) és csúcsáról (D) kontroll és 250 μM cinkkezelés esetén. Mércék= 500 μm.

A cinktöbblet a NO- és az SNO-szinteket megnövelte a vad típusú lúdfű gyökerében, a *gsnor1-3* esetében azonban nem (34. ábra A és B). Mivel a GSNOR enzim hiányában megvalósult a NO- és az SNO-szintek kontrollálása, így ennek háttérében egy GSNOR-független szabályozási folyamatot sejtettünk. Ezért megvizsgáltuk a NADPH-függő tioredoxin-reduktáz aktivitást, ami cinkindukált növekedést mutatott a *gsnor1-3*-ban, ellentétben a vad típusban és a *35S::FLAG-GSNOR1*-ben tapasztalt aktivitásvesztéssel (34. ábra C). A *TRXh3* tioredoxin gén expressziós szintje a cink jelenlétében szignifikánsan megnőtt a vad típusban, viszont nem változott a kontrollhoz képest a *gsnor1-3*-ban (34. ábra D). A *TRXh5* gén esetében egyik vonalban sem történt expressziós változás cink hatására (adatok nincsenek bemutatva).



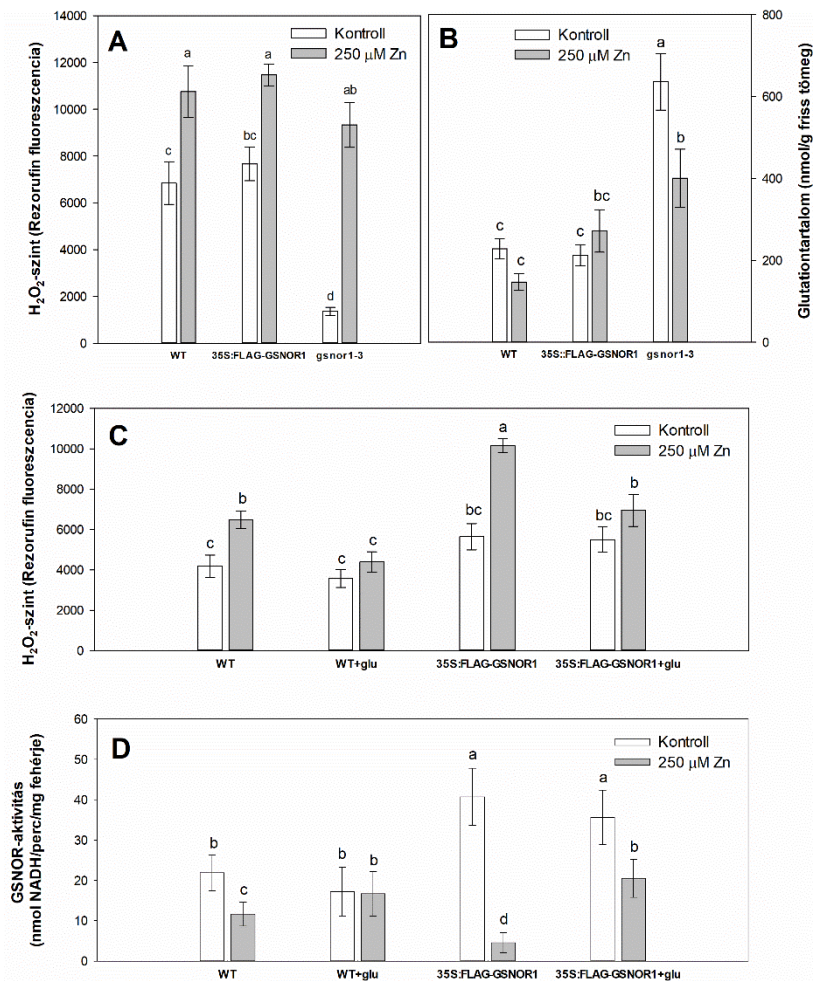
34. ábra: NO-szint a gyökércsúcsban (A) és az *S*-nitrozotiolok mennyisége teljes csíranövényekben (B) kontroll vagy 250 μ M cinkkezelt vad típusú, 35S::*FLAG-GSNOR1* és *gsnor1-3* *Arabidopsis thaliana* esetén. (C) NADPH-függő tioredoxin-reduktáz (NTR) aktivitás kontroll és cinkkezelt *A. thaliana* csíranövényekben. (D) A *TRXh3* gén relatív transzkript szintjei vad típusú és GSNOR-mutáns *A. thaliana* növényekben kontrollállapotban és 250 μ M cinkterhelés mellett. Az adatokat az *A. thaliana* *ACTIN2* és *GAPDH2* gének, mint belső kontrollok felhasználásával normalizáltuk. A vad típusú kontrollmintákban mért relatív transzkript szinteket önkényesen 1-nek tekintettük. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$ a NO-szint esetén, $n=5-7$ az SNO-tartalom és NTR-aktivitás esetén, $n=3$ a transzkript szint esetén).

A vad típusban és a 35S::*FLAG-GSNOR1* vonalban tapasztalt cinkindukált NO- és SNO-szintnövekedés háttérében tanulmányoztuk a GSNOR-aktivitás, fehérjemennyiség és génkifejeződés változásait. A cink többlete szignifikánsan csökkentette az enzim aktivitását (35. ábra A) a vad típusban és a 35S::*FLAG-GSNOR1* lúdfűben. Ez utóbbi vonalban az aktivitásvesztés mértéke összevethető volt a GSNOR-mutáció esetén tapasztalttal (35. ábra A). Az enzimfehérje mennyisége sem a vad típusban, sem pedig az enzimet túltermelő vonalban nem mutatott cinkindukált csökkenést (35. ábra C és D). A *GSNOR1* gén expressziójában a cink nem okozott változást egyik vonalban sem (35. ábra B).



35. ábra: A GSNOR enzim aktivitása (A) és a *GSNOR1* gén relatív transzkript szintje (B) kontroll és 250 μ M cink jelenlétében 7 napig nőtt vad típusú, *35S::FLAG-GSNOR1* és *gsnor1-3* *Arabidopsis thaliana* esetén. Az adatokat az *A. thaliana* *ACTIN2* és *GAPDH2* gének, mint belső kontrollok felhasználásával normalizáltuk. A vad típusú kontrollmintákban mért relatív transzkriptszinteket önkényesen 1-nek tekintettük. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=5$ az aktivitás esetén, $n=3$ a transzkriptszint esetén). „n.s.” nem szignifikáns. (C) GSNOR-fehérjemennyiség vad típusú és mutáns *A. thaliana* vonalakban 250 μ M cink jelenlétében vagy anélkül (kontroll). Az anti-aktinnal végzett western blot analízis „loading kontrollként” szolgált. (D) A fehérjesávok denzitását GelQuant szoftverrel kvantifikáltuk. A D ábrarész mintasorrendje megfelel a C ábrarészen feltüntetett sorrenddel.

Irodalmi adatok alapján feltételeztük a H_2O_2 szerepét a GSNOR enzim poszttranszkripcionális szintű inaktivációjában. A cink többlete H_2O_2 -akkumulációt okozott mindhárom növényvonal gyökerében (36. ábra A), ami a vad típus és a *gsnor1-3* esetén együtt járt a glutationtartalom csökkenésével (36. ábra B). A cinkindukált H_2O_2 -felhalmozást az exogén glutation alkalmazása mérsékelte mindkét vonal esetén (36. ábra C). Fontos eredményünk, hogy a glutation külső alkalmazása kontrollszintre állította vissza a 250 μ M cink jelenlétében lecsökkent GSNOR-aktivitást a vad típusban, valamint szignifikáns módon mérsékelte az aktivitáscsökkenést a *35S::FLAG-GSNOR1* vonalban (36. ábra D).



36. ábra: A hidrogén-peroxid szintje (A) és a glutaciontartalom (B) vad típusú és GSNOR-mutáns *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben 250 μM cink jelenlétében vagy hiányában (kontroll). Hidrogén-peroxid-szint (C) és GSNOR-aktivitás (D) kontroll vagy 250 μM cinkkel kezelt vad típusú és 35S::FLAG-GSNOR1 csíranövényekben 1 mM glutation hozzáadásával (+glu) vagy anélkül. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$ a H₂O₂-szintek esetén, $n=5$ a GSNOR-aktivitás esetén).

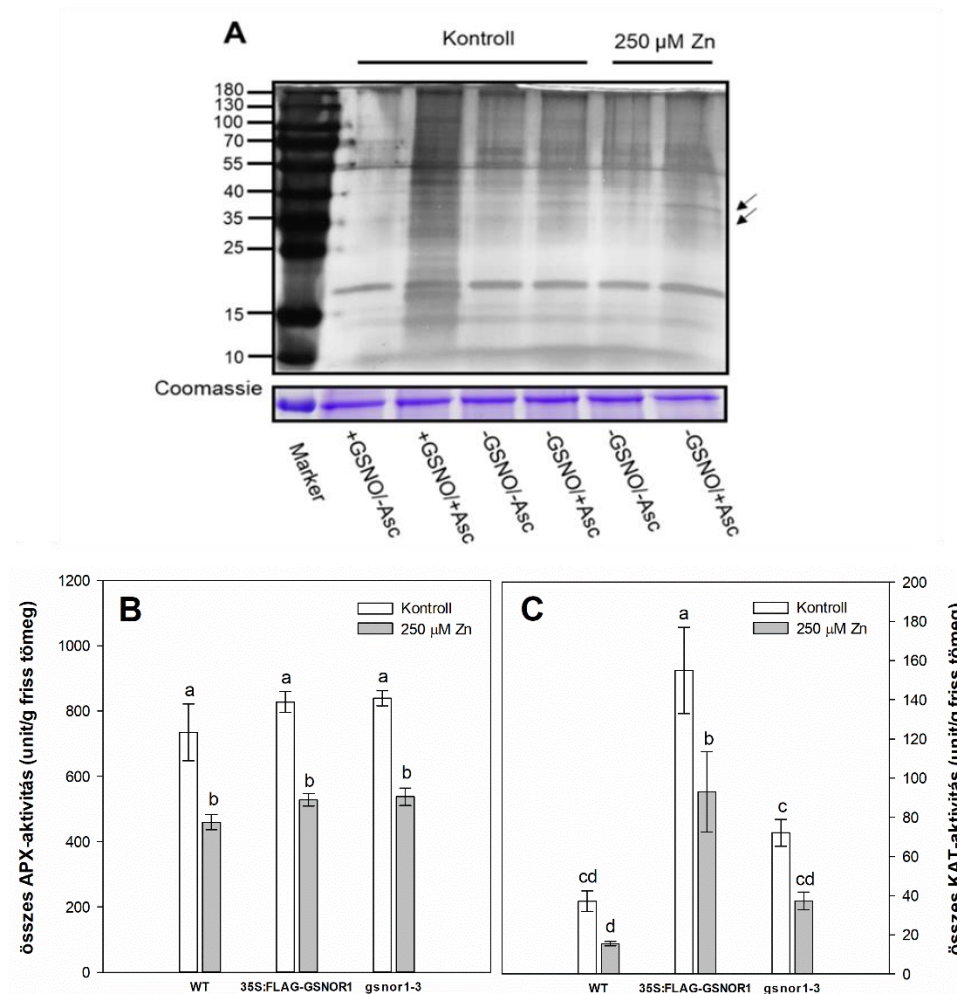
5.5. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV STRESSZ KIALAKÍTÁSÁBAN ELEMTÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN

Az előzőekben felvázolt, fémtűrést fokozó hatása mellett a NO és a belőle származó diverz molekulacsoport, a reaktív nitrogénformák bizonyos körülmények között hozzájárulhatnak a másodlagos nitrozatív stressz kialakulásához. Továbbá mivel a RNF és a ROF metabolizmusa szorosan összekapcsolódik, célszerű a nitrozatív és oxidatív (nitro-oxidatív) stresszfolyamatokat együttesen vizsgálni.

5.5.1. Cink- és cink-oxid nanorészecske-kezelések által okozott nitro-oxidatív stressz a Brassicaceae növénycsaládban

5.5.1.1. Cinkindukált NO-asszociált fehérjemódosulások *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben

Az előző fejezetben bemutatott, cink hatására a lúdfüben megnövekedett NO- és SNO-szintek (34. ábra A és B) fokozott fehérje S-nitrozilációt jósoltak, amit egy növénybiológiában újnak számító módszerrel, a RSNO-RAC technikával vizsgáltunk.



37. ábra: Fehérje S-nitrozilációt jelző ezüsttel festett SDS (12%) gél kontrollkörülmenyek között nőtt és 250 μM cinkkezelésnek kitett vad típusú *Arabidopsis thaliana* csíranövények esetén. Az 1 mM GSNO-val inkubált minták pozitív kontrollként szerepeltek (+GSNO), míg az aszkorbátot nem tartalmazó minták negatív kontrollként voltak (-Asc). „Loading kontrollként” Coomassie-festett gél szolgált. Összes aszkorbát peroxidáz (APX, B) és kataláz (KAT, C) aktivitása 250 μM cink hozzáadása nélkül (kontroll) és annak jelenlétében nőtt vad típusú, 35S::*FLAG-GSNOR1* és *gsnor1-3* *A. thaliana* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=5$).

A módszer validációja céljából a fehérjekivonatot 1 mM GSNO NO-donorral kezeltük aszkorbát jelenlétében (+GSNO/+Asc); ezek a minták pozitív kontrollként szolgáltak, és

nagymértékben megnövekedett *S*-nitrozilációs jelet mutattak (37. ábra A). A GSNO-kezelt mintákban aszkorbát hiányában az *S*-nitrozilált fehérjék feldúsulása kisebb mértékű volt. Enyhén fokozott *S*-nitroziláció volt kimutatható a 250 μ M cink jelenlétében, hét napig nevelt vad típusú lúdfű csíranövényekből származó fehérjekivonatban a kontrollhoz képest (nyilakkal jelölve a 37. ábra A részén).

3. táblázat: Cinkindukált *S*-nitrozilációt mutató fehérjék három, független kísérletben nevelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* növényekben (1., 2. és 3. ismétlés).

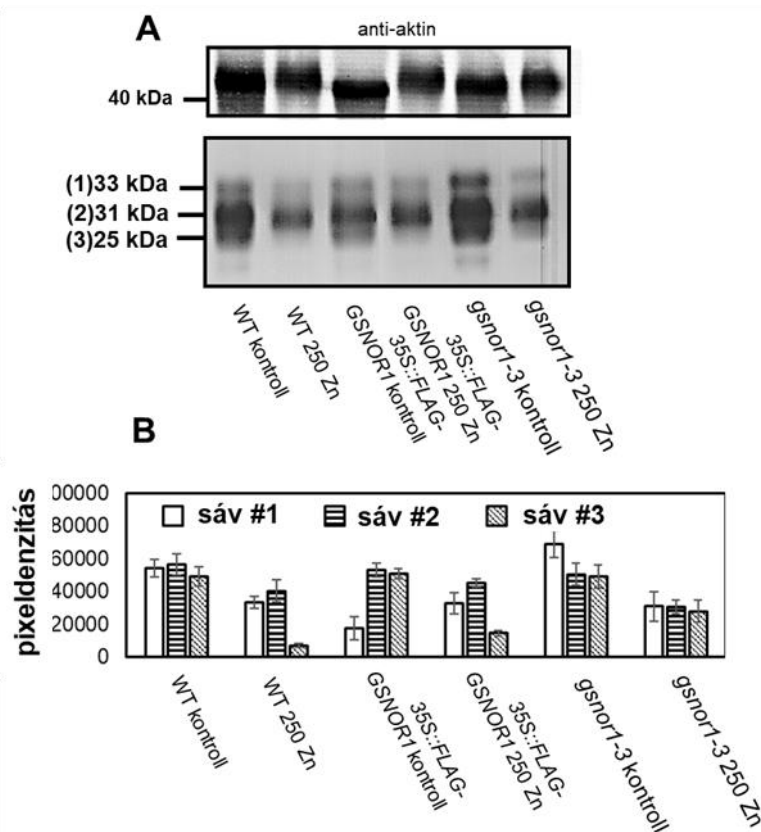
| Fehérje | kDa | Azonosító | peptidek száma | +Asc/ Asc arány 1. ism. | +Asc/ Asc arány 2. ism. | +Asc/ Asc arány 3. ism. |
|--|-----|-------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Laktát/malát-dehidrogenáz család fehérje | 35 | AT1G04410.1 | 2 | 10.12 | 66.35 | 5.71 |
| L-aszkorbát-peroxidáz 1, citoplazmikus | 27 | AT1G07890.1 | 3 | 76.55 | 67.63 | 2.66 |
| Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz GAPC2, citoplazmikus | 37 | AT1G13440.1 | 5 | 7.25 | 6.87 | 2.27 |
| Riboszómális fehérje S5/Elongációs faktor G/III/V család fehérje | 94 | AT1G56070.1 | 7 | 4.15 | 3.29 | 2.94 |
| Riboszómális fehérje L14p/L23e család fehérje | 15 | AT1G04480.1 | 2 | 7.96 | 4.33 | 1.80 |
| Riboszómális fehérje L19e család fehérje | 25 | AT1G02780.1 | 2 | 2.01 | 8.92 | 2.10 |
| fotoszintetikus elektrontranszfer B | 24 | ATCG00720.1 | 5 | 2.11 | 5.97 | 1.73 |
| Riboszómális fehérje L22p/L17e család fehérje | 20 | AT1G27400.1 | 3 | 5.20 | 8.03 | 1.52 |
| Metionin adenziltranszferáz 3 | 42 | AT2G36880.1 | 3 | 5.11 | 3.78 | 1.72 |
| ribulóz biszfoszfát karboxiláz kis alegység 1A | 20 | AT1G67090.1 | 4 | 6.60 | 2.73 | 1.94 |

Az *S*-nitrozilációs módosuláson keresztülmenő fehérjejelölteket LC-MS/MS technikával azonosítottuk. A GSNO-kezelt csíranövényekben 69 fehérjét azonosítottunk, melyek *in vitro* *S*-nitrozilációs célpontoknak tekinthetők (Függelék 6. táblázat). *In vivo* körülmények között (vagyis GSNO-kezelés nélkül) 26 fehérje bizonyult *S*-nitrozilációs célpontnak a cinkterhelést

nem kapott, kontrollnövényekben (Függelék 7. táblázat). Ami a cinkkezelt növényekből származó mintákat illeti, 10 protein felelt meg a követelményeknek, ennek alapján ígéretes S-nitrozilációs célfehérjékként tekinthetünk rájuk (3. táblázat). Ezek között alapvető metabolikus enzimfehérjéket találunk, mint például a laktát/malát-dehidrogenáz, glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz vagy a metionin-adenoziltranszferáz.

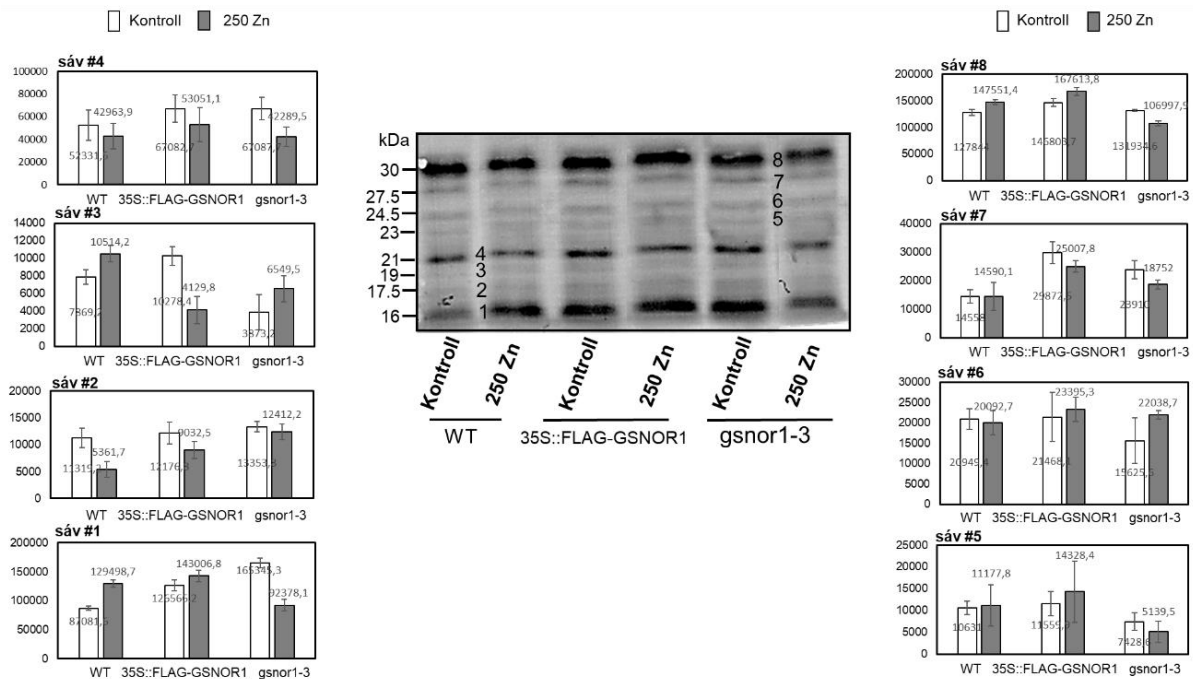
A szintén a listában szereplő APX1 csak és kizárólag cinkstressz jelenlétében mutatott S-nitrozilációs módosulást, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük az APX-aktivitás mérésére is. A cinkindukált APX-aktivitás csökkenését tapasztaltuk a vad típus mellett a két GSNOR-mutáns vonalban is (37. ábra B). Ezzel megegyező választ mutatott az APX mellett a H₂O₂-detoxifikációban közreműködő KAT enzim aktivitása is a cinkstresszre (37. ábra C).

Az APX-fehérje mennyiségét az aktivitáscsökkenéssel összefüggésben csökkentette a cinktöbblet a vad típusú és a *gsnor1-3* vonalakban, de a fehérjemennyiség kisebb mértékben változott a GSNOR-túltermelő vonalban (38. ábra A és B).



38. ábra: GSNOR-fehérje mennyiségét jelző western blot membrán vad típusú és mutáns *Arabidopsis thaliana* vonalakban 250 μM cink jelenlétében vagy anélkül (kontroll). Az anti-aktinnal végzett western blot analízis „loading kontrollként” szolgált. (B) A fehérjesávok (1,2,3) denzitását GelQuant szoftverrel kvantifikáltuk.

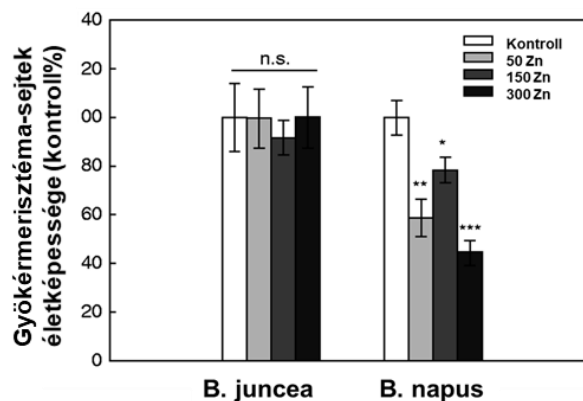
Az *S*-nitroziláció mellett görcső alá vettük a nitrozatív stressz markerének tekinthető fehérjetirozin-nitrációt a kezelést nem kapott, kontroll és a cinkterhelésnek kitett vad típusú és GSNOR-mutáns *A. thaliana* csíranövényekben. A 3-nitrotirozin elleni antitestre mutatott immunpozitivitást a kis molekulású-tartományban (16-30 kDa) detektáltuk (39. ábra). Nyolc fehérjesávot választottunk ki, melyek jelenlétét szoftveresen kvantifikáltuk. A legtöbb fehérjesáv nitrációs jele kismértékű cinkindukált intenzitásnövekedést mutatott a vad típusú és a *35S::FLAG-GSNOR1* vonalakban, míg a *gsnor1-3* növényekben a cinkterhelés csökkentette a legtöbb fehérjesáv nitrációját. Továbbá meg kell jegyezni, hogy a mutánsokban detektált fehérjenitrációs mintázat és intenzitás megegyezett a vad típusban kimutatottal, és a cink nem okozta új nitrált fehérjesávok megjelenését a membránon egyik növényvonal esetében sem (39. ábra).



39. ábra: 3-nitrotirozin elleni antitesttel reagáltatott, kontroll- és 250 μM cinkkezelt vad típusú és GSNOR-mutáns *Arabidopsis thaliana* csíranövényekből származó fehérjekivonat western blot membránja. A kvantifikált fehérjesávokat számokkal jelöltük a membránon. A grafikonok az egyes fehérjesávokban mért pixeldenzitásokat mutatják.

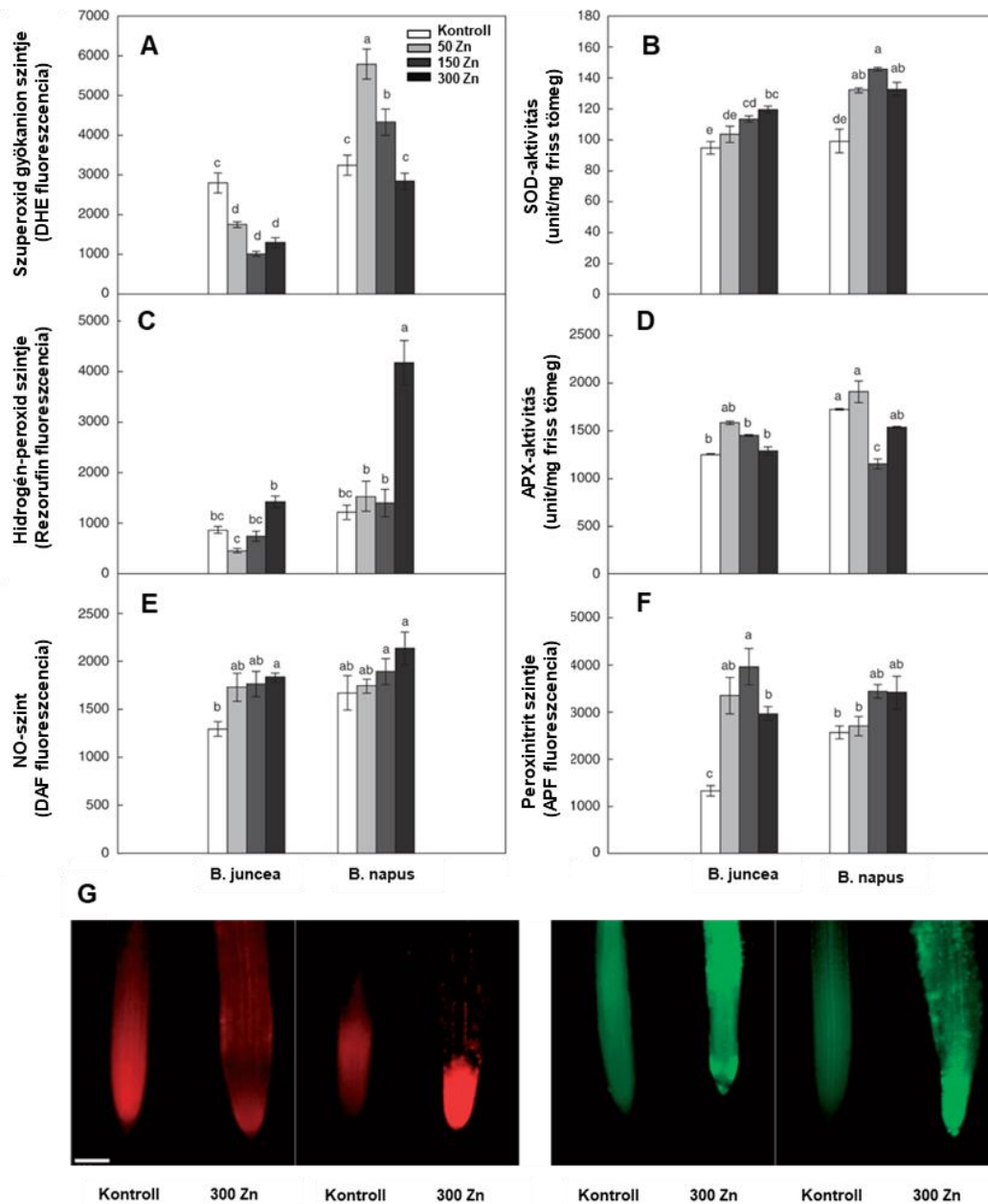
5.5.1.2. Cinkindukált nitro-oxidatív jelátvitel Brassica fajokban

A NO stresszt kialakító hatását a gazdasági jelentőségű *Brassica juncea* és *Brassica napus* fajok szerveiben is vizsgáltuk cinkterhelés (0, 50, 150, 300 μM cink-szulfát, 7 napig) hatására. A *B. juncea* jelentős cinktűrést mutatott a *B. napus*-szal szemben, amire az életképesség-vesztés (40. ábra) és a gyökérrövidülés hiánya (1. táblázat) mutatott rá.



40. ábra: Gyökérmerisztéma-sejtek életképessége kontroll, 50, 150 vagy 300 μM cinkkel, 7 napig kezelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* esetén. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, $n=10$). „n.s.”= nem szignifikáns.

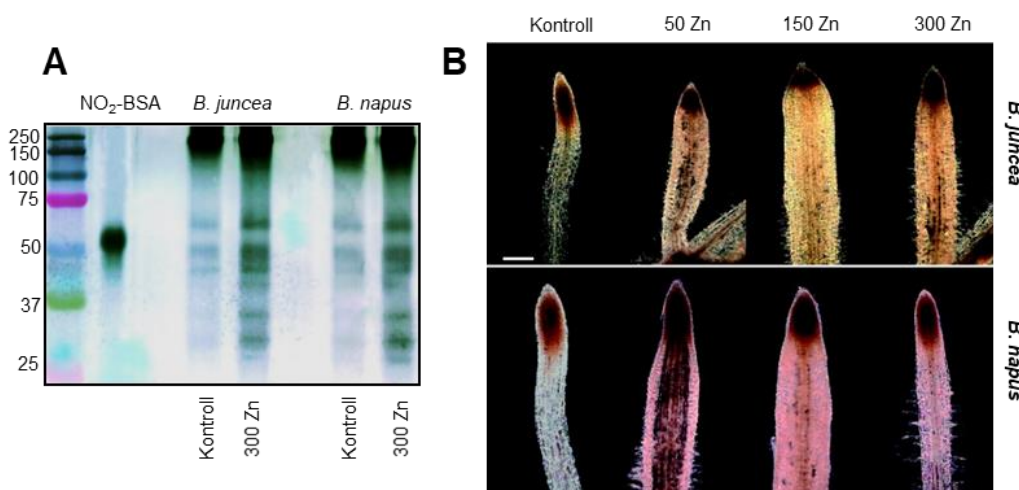
Az 50 és a 100 μM cinkkoncentrációk szignifikáns $\text{O}_2^{\bullet-}$ -produkciónak okoztak a *B. napus* gyökereiben, míg ezek a dózisok csökkentették a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -szintet a *B. juncea*-ban (41. ábra A). A $\text{O}_2^{\bullet-}$ eliminációját katalizáló SOD enzim aktivitása mindkét faj gyökerében nőtt a cinkdózisok hatására (41. ábra B). A cinkterhelés nem változtatta meg a H_2O_2 -szintet a *B. juncea* esetén, de a 300 μM cink szignifikánsan növelte azt a *B. napus* gyökerében (41. ábra C). A H_2O_2 -t detoxifikáló egyik antioxidáns enzim, az APX aktivitása nem változott a kontrollhoz képest a cinkkezelt *B. juncea* gyökereiben, de csökkent a *B. napus* esetén (a 150 μM cinkkezelés esetén, 41. ábra D). A NO-szint mindkét faj gyökerében nőtt a nagy cinkdózisok hatására (41. ábra E), a ONOO $^-$ -szintje azonban a *B. napus*-ban nem változott szignifikánsan, de a *B. juncea*-ban jelentősen megnőtt a cinkterhelés hatására (41. ábra F).



41. ábra: Szuperoxid gyökánon szintje (A), SOD-aktivitás (B), hidrogén-peroxid szintje (C), APX-aktivitás (D), NO-szint (E) és peroxinitrit szintje (F) 0 (kontroll), 50, 150 vagy 300 μM cinkkezelés mellett nevelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* növények gyökereiben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$ A, C, E, F esetében, $n=3$ B és D esetében). (G) Repräsentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek kontroll és 300 μM cinkkezelt *Brassica napus* gyökércsúcsairól (balról jobbra: szuperoxid gyökánon-specifikus DHE jelölés, hidrogén-peroxid-specifikus Ampliflu™ jelölés, NO-specifikus DAF-FM DA jelölés, ONOO-specifikus APF jelölés). Mércse= 200 μm.

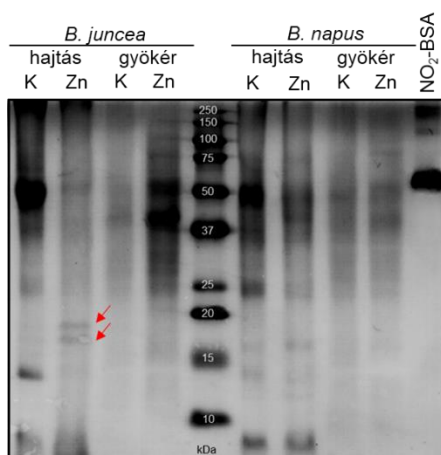
A két faj gyökérzetében tanulmányoztuk a fehérjetirozin-nitrációt, melynek során megállapítottuk, hogy a kezeltetlen növényekben hét fehérjesáv mutat nitrációs jelet (42. ábra A). A 300 μM cinkkezelésnek kitett növények gyökerében mind a hét fehérjesáv immunpozitív jele erősödött a kontrollhoz képest, és nem adódott jelentős különbség a fajok nitrációs válaszában (42. ábra A). Az oxidatív stressz markere, a lipidperoxidáció a *B. napus*

gyökércsúcsában detektálható volt *in vivo* festési eljárással, azonban a *B. juncea* gyökércsúcsai nem mutattak cinkindukált lipidperoxidációt (42. ábra B).



42. ábra: (A) Fehérjetirozin-nitráció kontroll és 300 μM cinkkezelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* gyökerében. Pozitív kontrollként nitrált marhaszérum-albumint (NO₂-BSA) használtunk. (B) Lipidperoxidációt jelző Schiff-reagenssel jelölt *Brassica*-gyökércsúcsokról készült fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse= 200 μm .

Hosszabb távú cinkterhelés (150 μM , 14 nap) esetén megfigyeltük, hogy a *Brassica* fajok szervei eltérő fehérjenitrációs választ mutattak. Mindkét faj egészséges egyedeinek hajtásában erősebb nitrációs jelet detektáltunk a gyökérhez viszonyítva (43. ábra). A cinkkezelés hatására a *B. juncea* hajtásában az 50, 37 és a kb. 12 kDa-os fehérjesávokban a nitráció csökkent, és két új immunpozitív sáv jelent meg 15 és 20 kDa közötti molekulásúly-tartományban (nyilakkal jelölve a 43. ábrán). A cinkkezelt *B. napus* hajtásában a nitrációs jelek csökkentek az 50, 37, 25 és kb. 12 kDa-os sávokban, míg másik két fehérjesáv esetén növekedést figyeltünk meg. Ezekkel szemben mindkét faj gyökérzetében cinkindukált nitrációfokozódást találtunk, bár ez a *B. juncea* fajban erőteljesebbnek bizonyult (43. ábra).

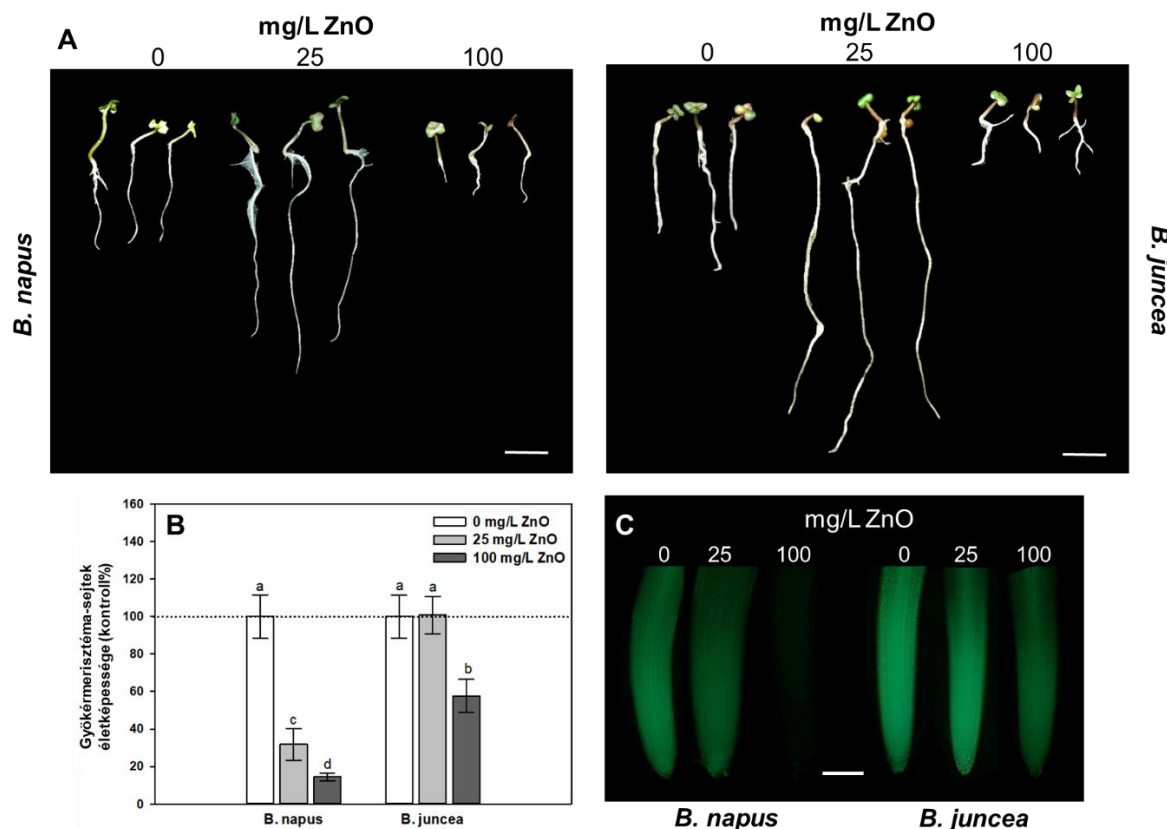


43. ábra: Fehérjetirozin-nitráció kontroll (K) és 150 μ M cinkkel 14 napig kezelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* gyökerében és hajtásában. Pozitív kontrollként nitrált marhaszérum-albumint (NO₂-BSA) használtunk. A piros nyilak a Zn hatására megjelenő immunpozitív fehérjesávokat jelzik.

5.5.1.3. Cink-oxid nanorészecskék által okozott nitro-oxidatív stresszjelátvitel *Brassica* fajokban

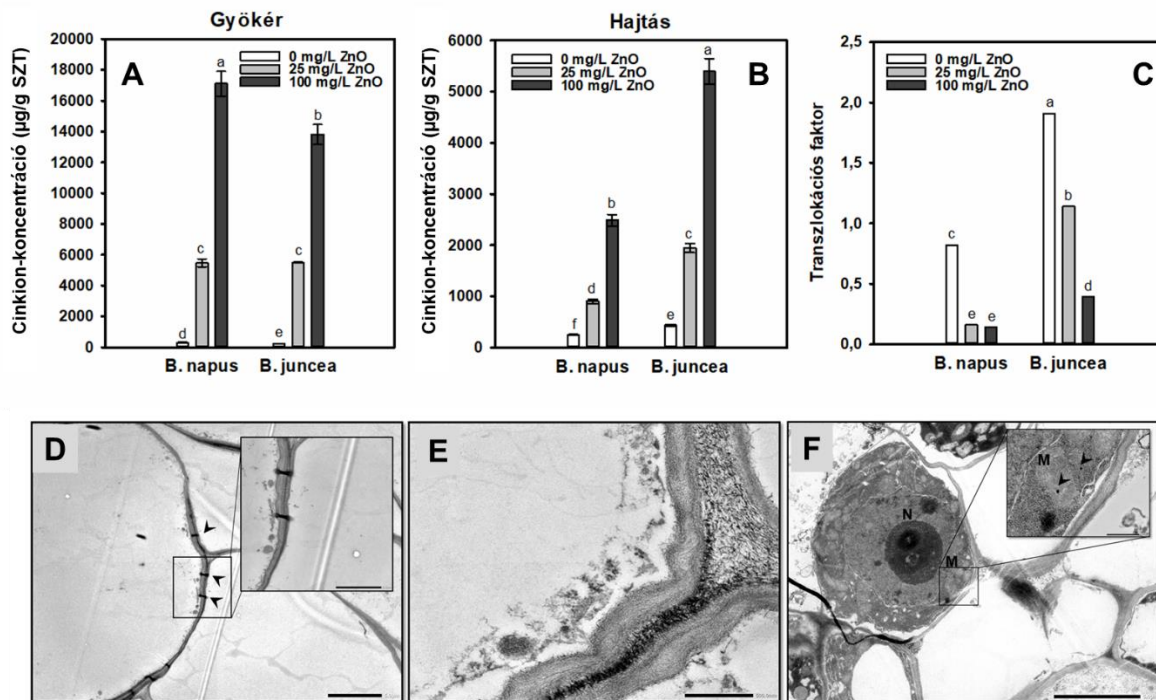
További kísérleteinkben a nano-cink nitro-oxidatív jelátvitelre gyakorolt hatását térképeztük fel, és a vizsgálati növényeink az előzőekhez hasonlóan a *Brassica napus* és a *Brassica juncea* voltak. A növényeket kb. 8 nm méretű cink-oxid NP-dózisok (0, 25 vagy 100 mg/L) jelenlétében csíráztattuk 5 napig.

A cink-oxid NP 25 mg/L koncentrációban mindkét faj növekedését előmozdította, a 100 mg/L-es dózis azonban jelentősen gátolta (44. ábra A). A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége a *B. napus*-ban koncentrációfüggő csökkenést mutatott, és a nagyobb NP-dózis esetén csaknem 80%-os életképesség-vesztés történt. A *B. juncea* gyökerek életképessége nem csökkent a kisebb NP-terhelés esetén a kontrollhoz képest, azonban a nagyobb dózis kb. 40%-os csökkenést eredményezett (44. ábra B és C).



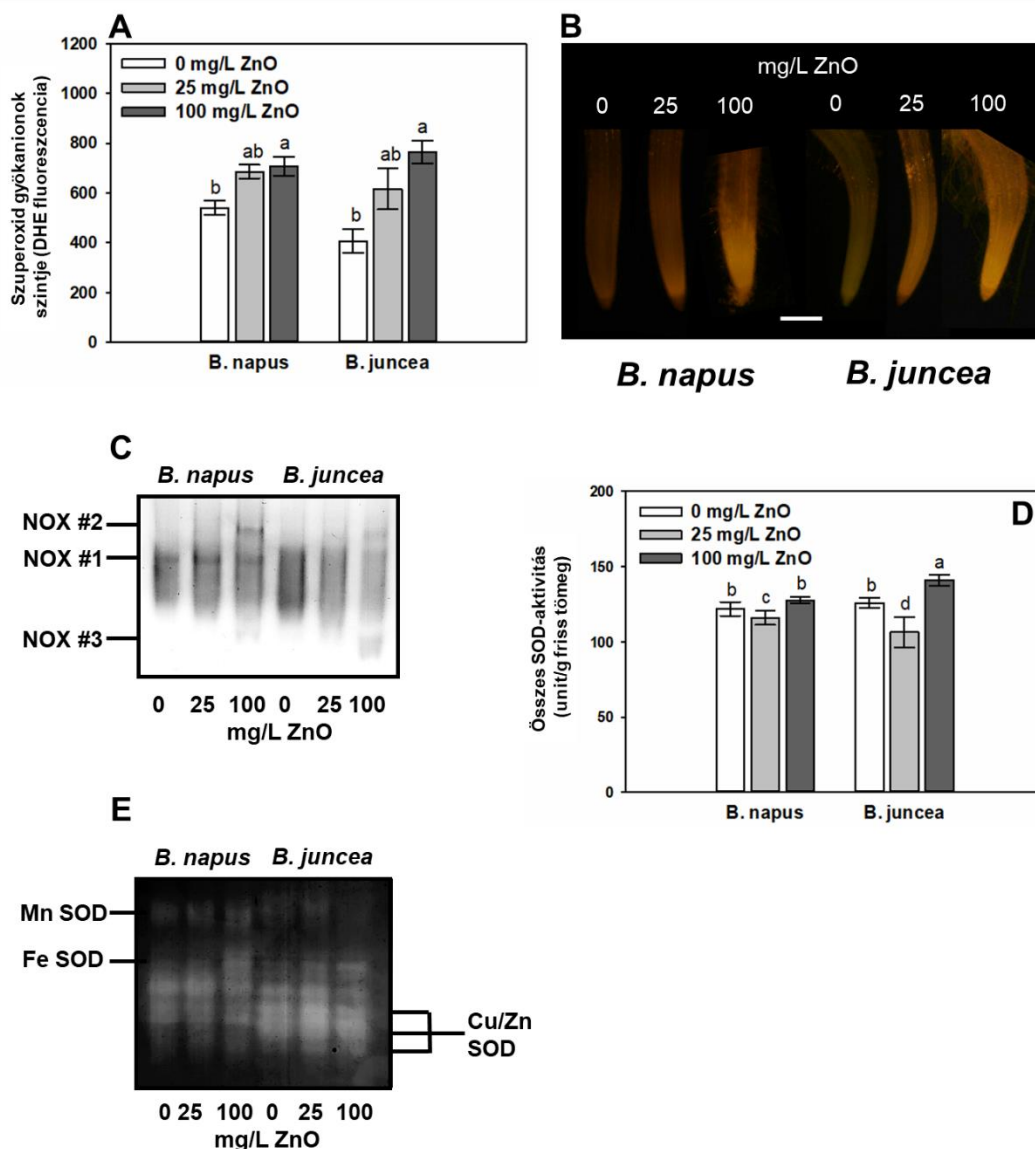
44. ábra: (A) Kontroll (0 mg/L) és cink-oxid (ZnO) nanopartikulummal (25 vagy 100 mg/L) 5 napig kezelt *Brassica napus* és *Brassica juncea* csíranövényekről készült reprezentatív felvételek. Kezelésenként három csíranövény látható. Mércék=1 cm. (B) A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége 0, 25 vagy 100 mg/L cink-oxid nanopartikulum jelenlétében nőtt *Brassica* csíranövények esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$). (C) FDA-próbával jelzett kontroll és cink-oxid nanopartikulummal kezelt *Brassica* csíranövények gyökércsúcsairól készített reprezentatív mikroszkópos felvételek. Mércse= 250 μ m.

A NP-kezelés koncentrációtól függően megnövelte a cinkkoncentrációt a *Brassica* növények gyökerében és hajtásában is (45. ábra A). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a gyökerekben tízszer annyi cink raktározódott, mint a hajtásban. A *B. juncea* gyökerében szignifikánsan alacsonyabb, hajtásában szignifikánsan magasabb cinkkoncentrációt alakított ki a 100 mg/L NP-dózis, mint a *B. napus* esetén, így a számított transzlokációs faktor értéke a *B. juncea* esetén közel háromszorosa volt a *B. napus*-énak. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek igazolták továbbá, hogy a 8 nm méretű NP-ok internalizálódtak a gyökérsejtekbe, és azok sejtfalainak középlemezében, plazmodezmákban és mitokondriumokban voltak kimutathatóak (45. ábra B).



45. ábra: Cinkion-koncentráció (A és B) és transzlokációs faktor 0, 25 vagy 100 mg/L cink-oxid (ZnO) nanopartikulum jelenlétében 5 napig nevelt *Brassica napus* és *Brassica juncea* csíranövények gyökerében (A) és hajtásában (B). A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$). (D-F) Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek, melyek a ZnO nanorészecskék jelenlétét mutatják az 5 napig 100 mg/L ZnO nanopartikulum jelenlétében nevelt *Brassica* csíranövények gyökérszéljében. ZnO nanopartikulumok a plazmodezmákban (D, fekete nyilakkal jelölve és nagyított képen), a sejtfal középlemezében (E) és a citoplazmában (F, fekete nyilakkal jelölve és nagyított képen, M=mitochondrium, N=nukleusz). Mércék= 5 µm (D és F), 2 µm (nagyított képek az D és az F ábrarészben), 500 nm (B).

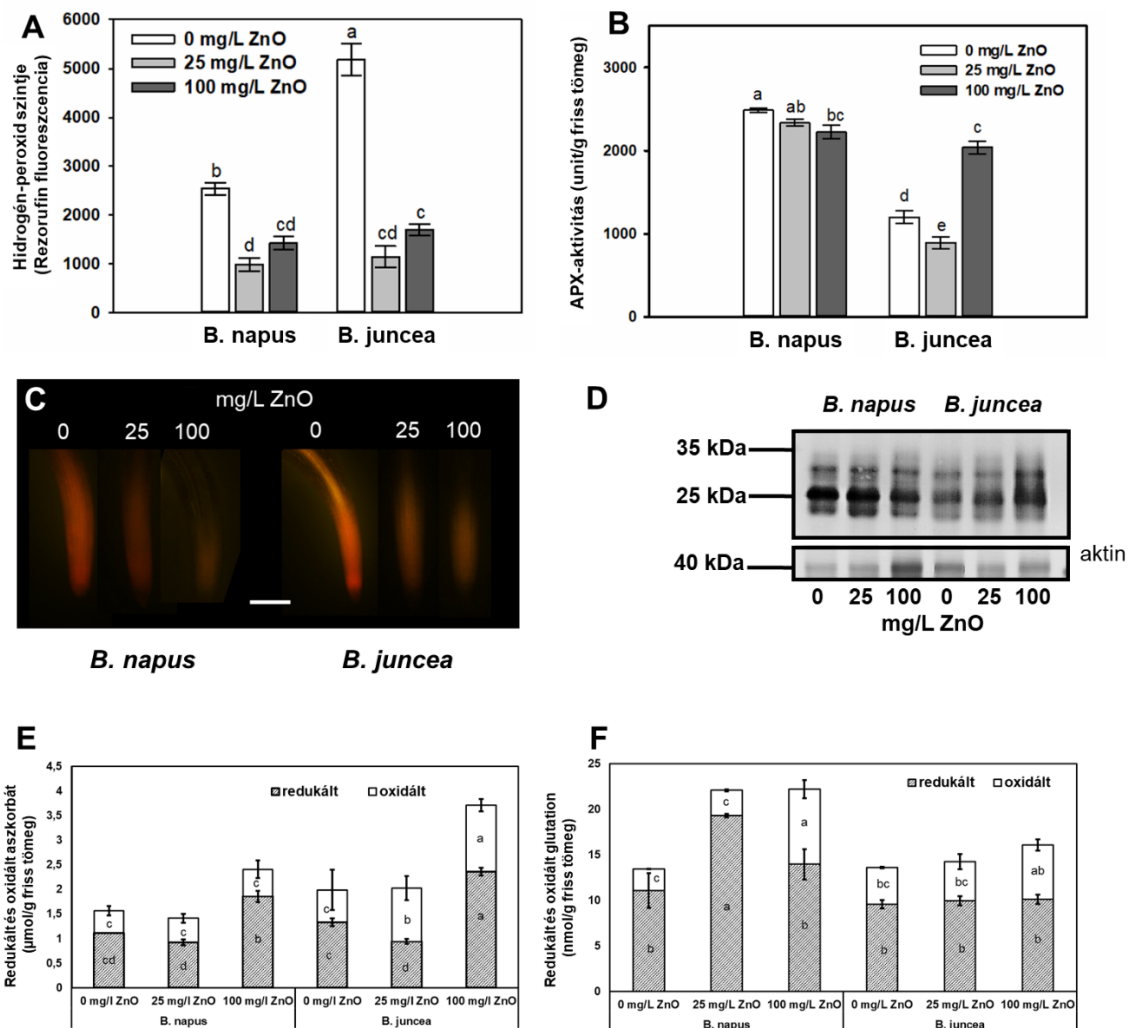
A stresszhatásokat követően az egyik elsőként keletkező ROF a $O_2^{\bullet-}$, melynek szintje dóziszfüggő emelkedést mutatott mindkét faj gyökerében (46. ábra A és B). A 100 mg/L cink-oxid NP-kezelés két új NOX izoenzim megjelenését eredményezte mindkét fajban (46. ábra C). Továbbá mindkét fajban csökkent a SOD enzimek aktivitása a 25 mg/L-es kezelés esetén, és az aktivitás szignifikáns növekedése csak a 100 mg/L-kezelt *B. juncea* gyökerekben volt kimutatható (46. ábra D). A SOD izoenzimek vizsgálata különbségeket tárt fel a fajok között, hiszen a *B. napus* esetén a cink-oxid NP jelenléte növelte a Fe SOD és a Mn SOD aktivitását, de csökkentette a három Cu/Zn SOD izoenzim aktivitását, míg a *B. juncea* esetén a Mn SOD aktivitása csökkent, a Fe SOD és a Cu/Zn SOD izoenzimek aktivitása pedig NP-indukált növekedést mutatott (46. ábra E).



46. ábra: (A) Szuperoxid gyökánionok szintje kontroll (0 mg/L) vagy cink-oxid (ZnO) nanopartikulummal (25 vagy 100 mg/L) kezelt 5 napos *Brassica juncea* és *Brassica napus* csíranövények gyökércsúcaiban. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). (B) DHE-próbával jelölt *Brassica*-gyökércsúcsokról készült fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércé= 250 μm . Kontroll (0 mg/L) és ZnO nanorészecske-kezelt *Brassica* csíranövényekben azonosított NADPH-oxidáz (NOX) izoenzimek (NOX #1, NOX#2, NOX #3) elválasztása natív gélben (C), és a SOD enzim aktivitása (D). A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($p \leq 0,05$, $n=3$). (E) SOD izoenzimek (Mn SOD, Fe SOD, Cu/Zn SOD) aktivitása natív gélben.

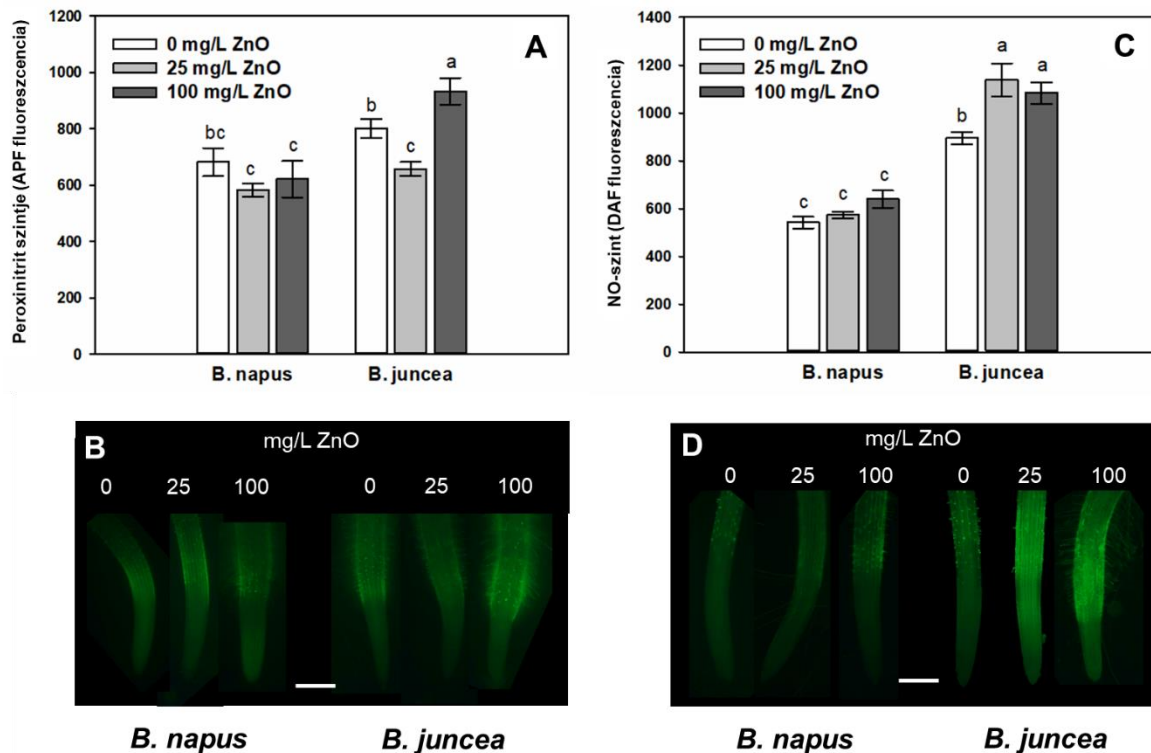
A H_2O_2 szintje a *B. juncea* kontrollegyedeinek gyökerében szignifikánsan magasabb volt a *B. napus*-hoz képest, bár a cink-oxid NP-ok jelenléte csökkenést okozott mindkét fajban (47. ábra A és C). Az APX aktivitása szignifikánsan csökkent a 100 mg/L NP-kezelt *B. napus* gyökerekben, míg ugyanez a dózis jelentősen megnövelte a *B. juncea*-gyökerek kontrollban tapasztalt alacsony APX-aktivitását. Ami a 25 mg/L-es cink-oxid NP-dózist illeti, az nem okozott változást a *B. napus* gyökereinek APX-aktivitásában, de csökkenést váltott ki a *B.*

juncea esetén (47. ábra B). Az aktivitással megegyező módon változott az APX-fehérje mennyisége, hiszen az eleve alacsony fehérjetartalmat mutató *B. juncea* esetén a 100 mg/L NP-dózis fokozta az enzim mennyiségét, míg a 100 mg/L NP-kezelt *B. napus* mintában enyhe csökkenés volt kimutatható (47. ábra D). A nemenzimatis antioxiidánsok közül az aszkorbát teljes mennyisége nőtt a 100 mg/L NP-kezelt *B. napus* esetén, amit a redukált aszkorbát mennyiségi növekedése okozott. A *B. juncea* esetén a 25 mg/L NP-dózis növelte a dehidro-aszkorbát mennyiségét, a 100 mg/L-es kezelés pedig mind a redukált, mind pedig az oxidált aszkorbát tartalmának növekedését okozta (47. ábra E). A redukált és az oxidált glutation mennyiségében nem okozott változást a cink-oxid NP-kezelés a *B. juncea* esetén, azonban a *B. napus*-ban az alacsonyabb nano-cink-oxid dózis megnövelte a redukált forma mennyiségét, míg a nagyobb dózis az oxidált glutation mennyiségi emelkedését eredményezte (47. ábra F).



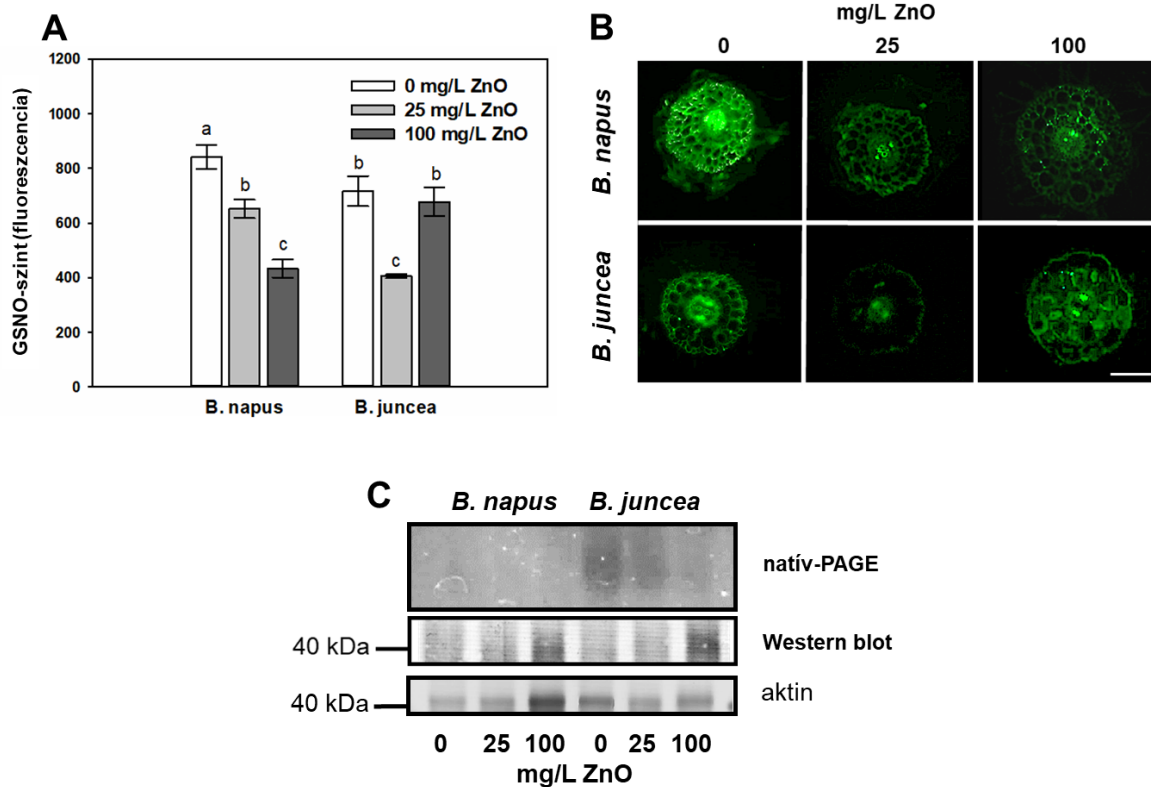
47. ábra: Hidrogén-peroxid szintje (A) és APX-aktivitás (B) kontroll (0 mg/L) és cink-oxid nanopartikulummal kezelt *Brassica juncea* és *Brassica napus* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($p \leq 0,05$, $n=10$ A esetén és $n=5$ B esetén). (C) A hidrogén-peroxid szintet jelző ADHP-próbával jelölt *Brassica* gyökércsúcsokról készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse= 250 μm. (D) APX-fehérjemennyiség kontroll és cink-oxid nanorészecskével kezelt *Brassica*-gyökerekben. Anti-aktin szolgált „loading kontrollként”. Redukált és oxidált aszkorbát- (E) és glutation- (F) koncentrációk a kontroll és kezelt *Brassica* csíranövényekben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$).

A ROF-kal ellentétben a RNF esetén a nano-cink-oxid által kiváltott fajspecifikus válaszokat tapasztaltunk. A ONOO⁻ szintje a NP-kezelt *B. napus* gyökerekben nem változott szignifikánsan a kezelést nem kapott növényekhez képest, viszont a *B. juncea*-ban a 25 mg/L NP-csökkenést, a 100 mg/L NP pedig növekedést eredményezett a kontrollhoz viszonyítva (48. ábra A és B). A NO gyökérbéli szintje nem változott a *B. napus* esetén, de szignifikánsan nőtt cink-oxid NP jelenlétében a *B. juncea* gyökerekben (48. ábra C és D).



48. ábra: Peroxinitrit szintje (A) és NO-szint (B) 0, 25 vagy 100 mg/L cink-oxid (ZnO) nanopartikulum jelenlétében nevelt 5 napos *Brassica juncea* és *Brassica napus* gyökércsúcsaiban. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). APF próbával jelölt (B) és DAF-FM DA próbával jelölt (D) *Brassica*-gyökércsúcsokról készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék= 250 μ m.

A GSNO-szinteket gyökérkeresztmetszetekben vizsgálva megállapítottuk, hogy az koncentrációfüggő csökkenést mutatott a NP jelenlétében nevelt *B. napus* gyökereiben. A *B. juncea* esetén 25 mg/L NP-indukált csökkenést detektáltunk a GSNO-szintben, ugyanakkor a 100 mg/L-es dózis kontrollközeli GSNO-szintet alakított ki a gyökerekben (49. ábra A és B). A GSNO-szintek változásainak háttérében tanulmányoztuk a GSNOR enzim aktivitását, azonban ez natív gélben csak a *B. juncea* esetén volt kimutatható (49. ábra C). Az eredmény azt mutatja, hogy a cink-oxid NP koncentrációfüggő módon csökkenést idézett elő a GSNOR aktivitásában. A fehérje mennyiségét vizsgálva megállapítást nyert, hogy a kezeltlen növények gyökérzetében alacsony volt az enzimfehérje mennyisége, ez azonban jelentős mértékben növekedett a 100 mg/L NP-koncentráció hatására mindkét fajban (49. ábra C).



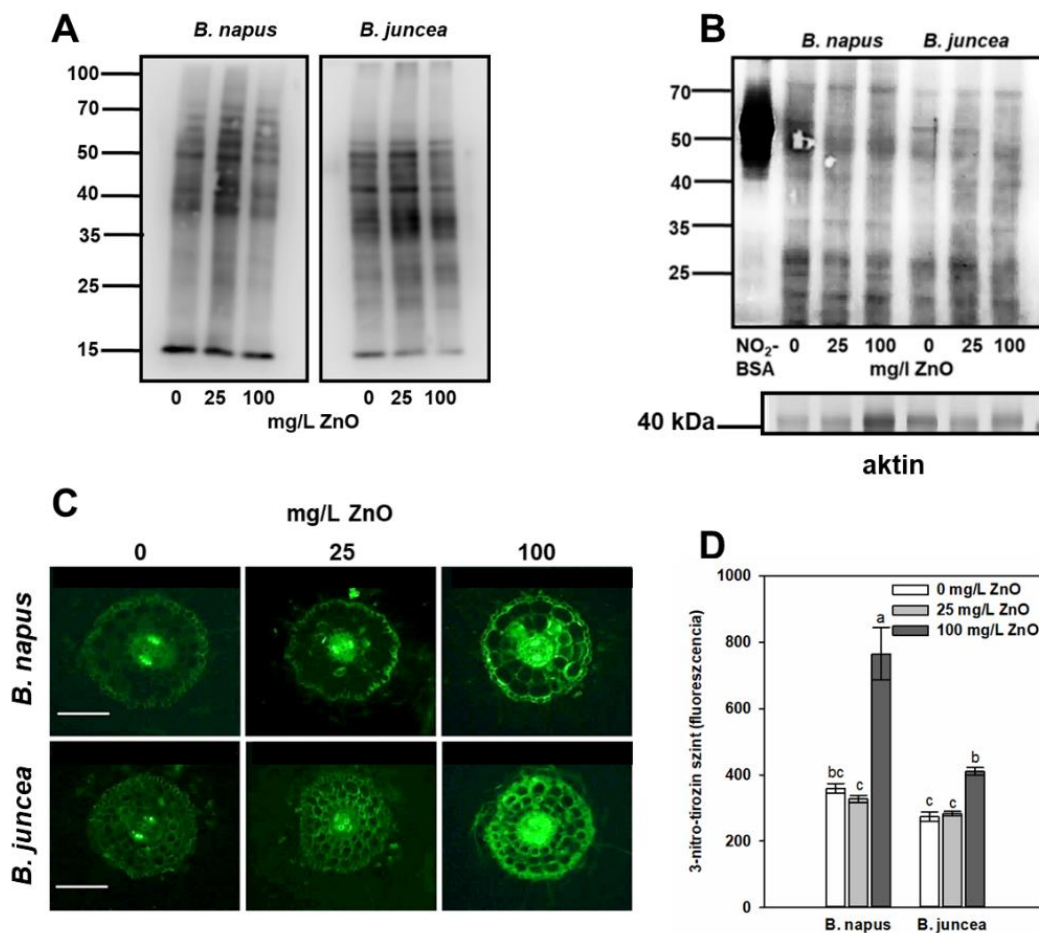
49. ábra: (A) GSNO-szint 5 napos 0, 25 vagy 100 mg/L cink-oxid (ZnO) nanopartikulum jelenlétében nevelt *Brassica napus* és *Brassica juncea* csíranövények gyökerében. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=6$). (B) GSNO elleni antitesttel jelölt, *Brassica* főgyökeréből készített keresztmetszeteket ábrázoló fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse= 200 μm . (C) GSNOR-aktivitás natív gélben (natív-PAGE) és a GSNOR-fehérje mennyisége (Western blot) kontroll és kezelt *Brassica*-gyökerekben. Anti-aktin szolgált „loading kontrollként”.

A ROF- és RNF-jelátvitel fehérjeszintű következményei a karboniláció és a tirozinnitráció, ezért a fent részletezett ROF- és RNF-metabolizmusban bekövetkező változások okán ezeket a poszttranszlációs módosításokat is tanulmányoztuk (50. ábra).

A kezeletlen növények gyökerében hasonló mértékű fehérjekarbonilációt mutattunk ki a 15 és 70 kDa közötti molekulásúly-tartományban (50. ábra A). A 25 mg/L NP-dózis hatására legalább 10 fehérjesávban fokozódott a karboniláció mindkét vizsgált faj esetén. Ezzel ellentétben a 100 mg/L cink-oxid NP-kezelés csökkentette a karbonilációt a legtöbb fehérjesáv esetén a *Brassica* fajokban. Enyhe fajok közötti különbségként adódott, hogy a *B. juncea* esetén a karbonilációs jel csökkenése kisebb mértékű volt, mint a *B. napus*-ban.

Ami a fehérjenitrációt illeti, az a karbonilációhoz hasonlóan detektálható volt a kezelést nem kapott, egészséges növények gyökerében is a 15–70 kDa molekulásúly-tartományban (50. ábra B). A nano-cink-oxid jelenlétében nevelt *B. napus* növényekben néhány fehérjesáv nitrációs jele csökkent, más sávoké pedig növekedett, és a nitrációs mintázat mindkét NP-dózis

esetén azonos volt. A *B. juncea* gyökereiben a 25 mg/L NP-koncentráció fokozta, a 100 mg/L NP-koncentráció nem módosította a fehérjék nitrációját az alacsony molekulású régiókban. A *B. juncea* esetén a cink-oxid NP hatására újonnan nitrálódott fehérjesávokat is kimutattunk. A fehérjenitrációt gyökérkeresztmetszetekben immunfluoreszcens módszerrel vizsgálva azt kaptuk, hogy az alacsonyabb NP-dózis nem okozott változást a nitrációban, a 100 mg/L-es kezelés azonban jelentősen megnövelte a fehérjenitrációval összefüggő fluoreszcenciát, és a növekedés a *B. napus* gyökereiben nagyobb mértékűnek bizonyult a *B. juncea*-hoz képest (50. ábra C és D).

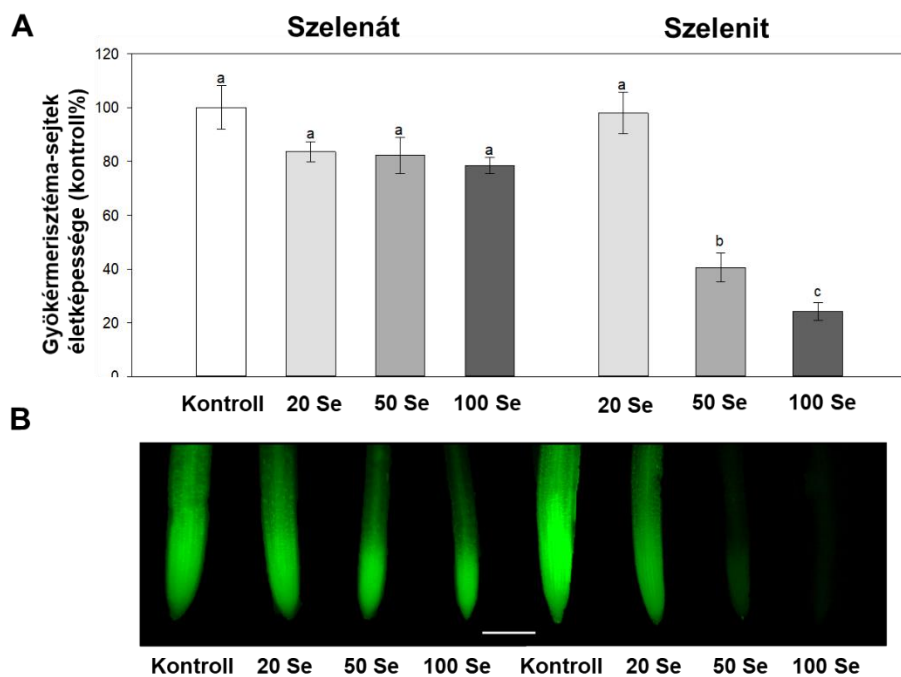


50. ábra: Karbonilált fehérjéket bemutató anti-DNP antitesttel jelölt immunblot (A) és 3-nitrotirozín elleni antitesttel jelölt, tirozinnitrált fehérjéket bemutató immunblot (B) kontroll és cink-oxid (ZnO) nanorészecske-kezelésnek kitett 5 napos *Brassica napus* és *Brassica juncea* gyökereiből származó mintákban. Nitrált marhaszérum-albumint (NO₂-BSA) használtunk pozitív kontrollként, anti-aktint pedig „loading kontrollként”. (C) 3-nitrotirozín elleni antitesttel jelölt gyökérkeresztmetszetelekről készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék=200 μm. (D) A 3-nitrotirozín-asszociált fluoreszcens jel intenzitása a Brassica gyökérkeresztmetszeteiben. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=6$).

5.5.1.4. A szelén által okozott nitro-oxidatív jelátvitel, és ennek összefüggése a toleranciával

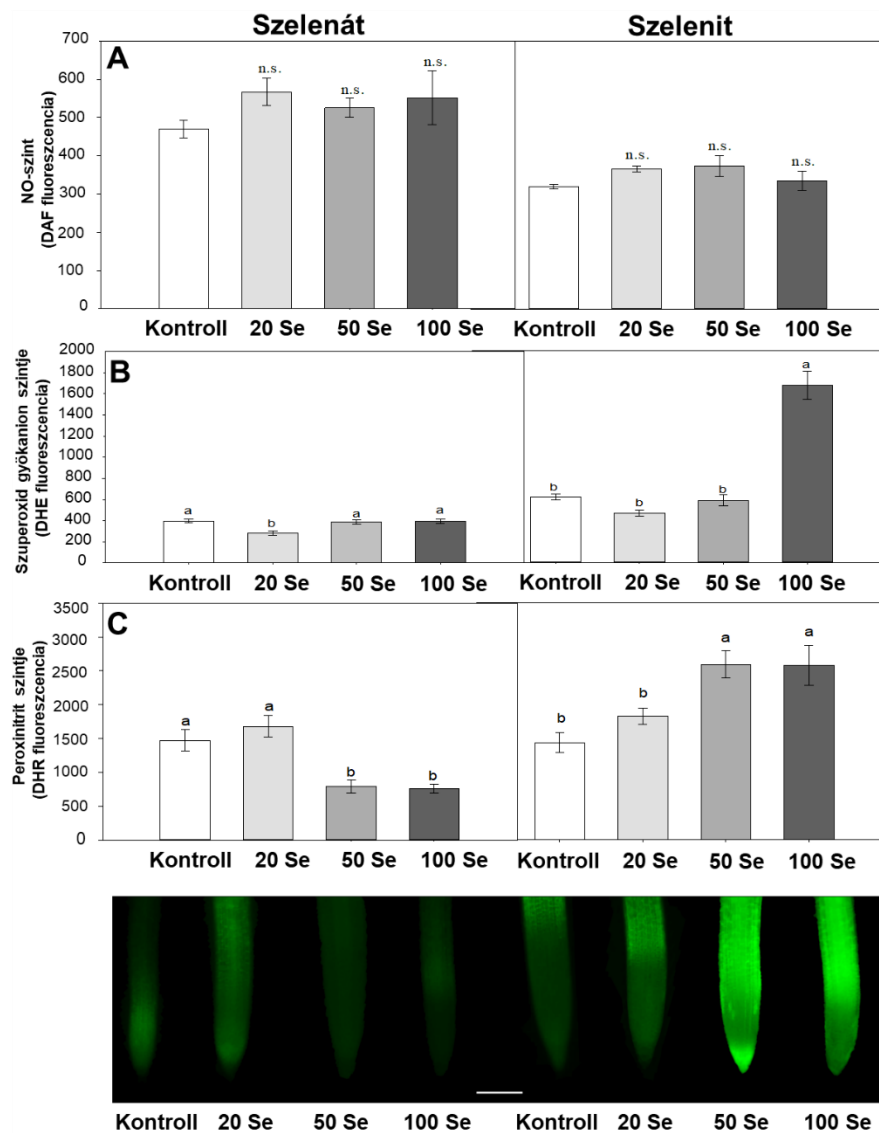
A szelén fitotoxicitásért felelős hatásai között számontartjuk a fehérjék szintézisének és működésének megzavarását, valamint a másodlagos oxidatív stresszt. Kíváncsiak voltunk azonban, hogy az oxidatív stressz mellett másodlagos stresszként nitrozatív folyamatok is lejátszódnak-e, és ha igen, akkor van-e összefüggés a nitro-oxidatív stressz és a szelén tűrés/érzékenység között.

Az első ezzel kapcsolatos kísérleti rendszerünkben *Brassica juncea* növényeket tettünk ki 0, 20, 50 vagy 100 μM szelenit- vagy szelenátkezelésnek 14 napig. A növények gyökérmerisztémájának életképességét a szelenátkoncentrációk nem csökkentették le a kontrollhoz képest, az 50 és a 100 μM szelenit azonban koncentrációfüggő módon redukálta azt, kb. 40 és 25%-os életképességeket kialakítva a gyökércsúcsokban (51. ábra).



51. ábra: A gyökérmerisztéma-sejtek életképessége (A) 14 napig 0 (kontroll), 20, 50 vagy 100 μM szelenát- vagy szelenitkezelésnek kitett *Brassica juncea* esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($p \leq 0,05$, $n=15$). (B) FDA-próbával jelölt *Brassica*-gyökércsúcsokról készült fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse= 200 μm .

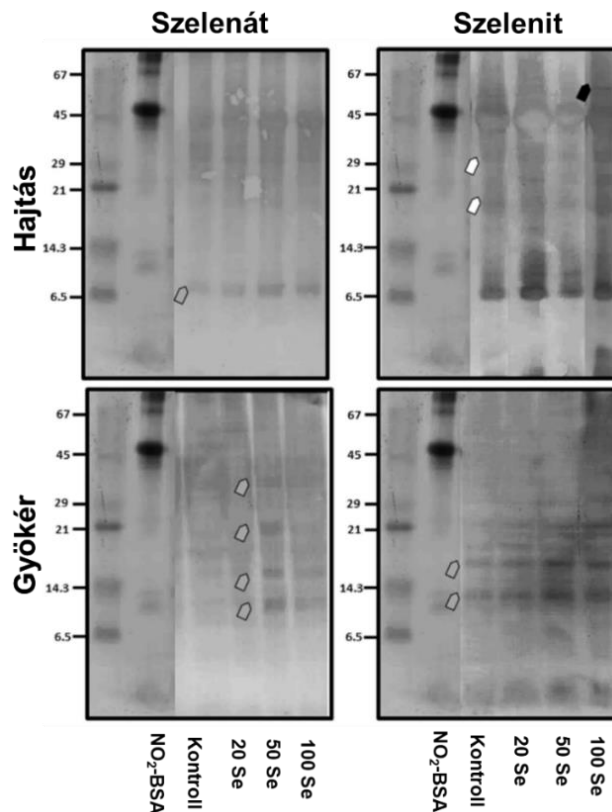
Érdekes módon a NO-szinteket nem módosította egyik szelénforma sem (52. ábra A), a $\text{O}_2^{\bullet-}$ szintjében azonban a 20 μM szelenátcsökkenést, a 100 μM szelenit pedig jelentős növekedést eredményezett (52. ábra B). A ONOO⁻ szintjét a két szelénforma ellenkező irányban befolyásolta a *B. juncea* gyökereiben, mivel az 50 és a 100 μM szelenát csökkentette, ugyanezen koncentrációjú szelenit azonban szignifikánsan megemelte azt (52. ábra C).



52. ábra: NO-szint (A), a szuperoxid gyökkanion szintje (B) és a peroxinitrit szintje (C) kontroll (0), 20, 50 vagy 100 μM szelenáttal vagy szelenittel 14 napig kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsaiban. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). „n.s. nem szignifikáns.

A fehérjenitrációt a *Brassica juncea* hajtásában és gyökerében is detektáltuk (53. ábra), aminek eredményeképpen azt kaptuk, hogy a hajtásban a szelenát kismértékű fokozódást idézett elő a fehérjenitrációban a kontrollban észlelt képest, új nitrált fehérjesávok megjelenése nélkül. A szelenit azonban a szelenáthoz képest nagyobb mértékű fokozódást okozott a proteintirozinnitrációban, valamint két sávban csökkent az immunpozitív jel (fehér nyilak), és egy új, nitrált sáv is megjelent a membránon kb. 60 kDa molekulásúlynál (fekete nyíl). A gyökérben a szelenát nagyobb mértékű hatást gyakorolt a proteom nitrációjára, mint a hajtásban. Az 50 μM szelenát négy fehérjesávban is fokozta a nitrációt (szürke nyilak), azonban a 100 μM -os kezelés csak enyhe változást okozott, és a 20 μM szelenát nem volt hatással a gyökér nitroproteomjára.

A másik alkalmazott szelénforma, a szelenit 20 és 50 μM koncentrációban is fokozta a fehérjék nitráltságát a *B. juncea* gyökérzetében (szürke nyilak, 53. ábra).

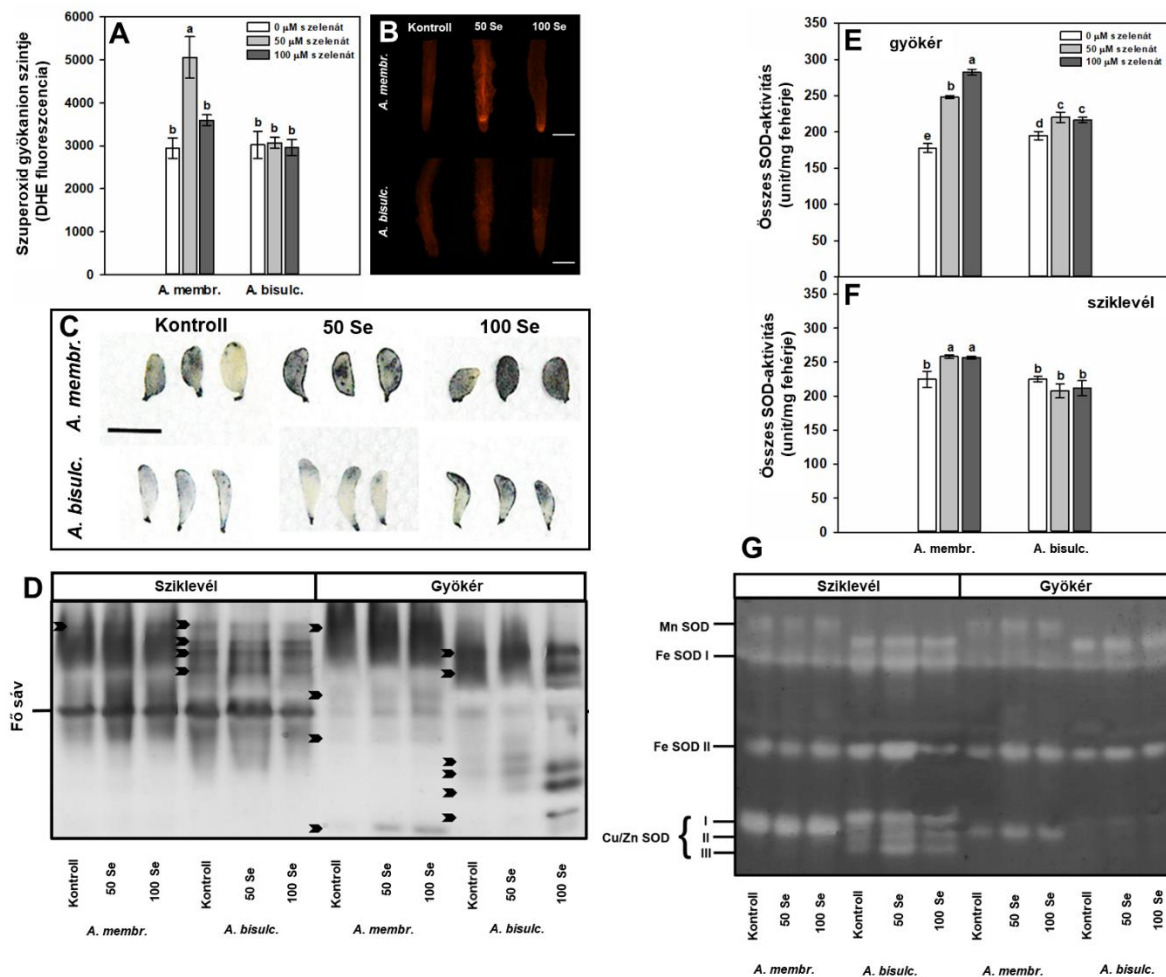


53. ábra: Fehérjetirozin-nitráció szelenáttal vagy szelenittel (20, 50 vagy 100 μM) kezelt *Brassica juncea* csíranövények gyökerében és hajtásában. Pozitív kontrollként nitrált marhaszérum-albumint ($\text{NO}_2\text{-BSA}$) használtunk. A fehér nyilak csökkenő nitrációjú fehérjesávokat, a szürke nyilak pedig erősödő nitrációjú fehérjesávokat jelölnek. A fekete nyíl új, nitrált sávot jelez.

Az egyik korábban bemutatott – a szelén-hiperakkumuláló és -tűrő *Astragalus bisulcatus*-t és a nem akkumuláló, szelénérzékeny *Astragalus membranaceus*-t tanulmányozó – kísérleti rendszerünkben (1. ábra) részletesen vizsgáltuk a szelenátindukált nitro-oxidatív stressz molekuláris folyamatait.

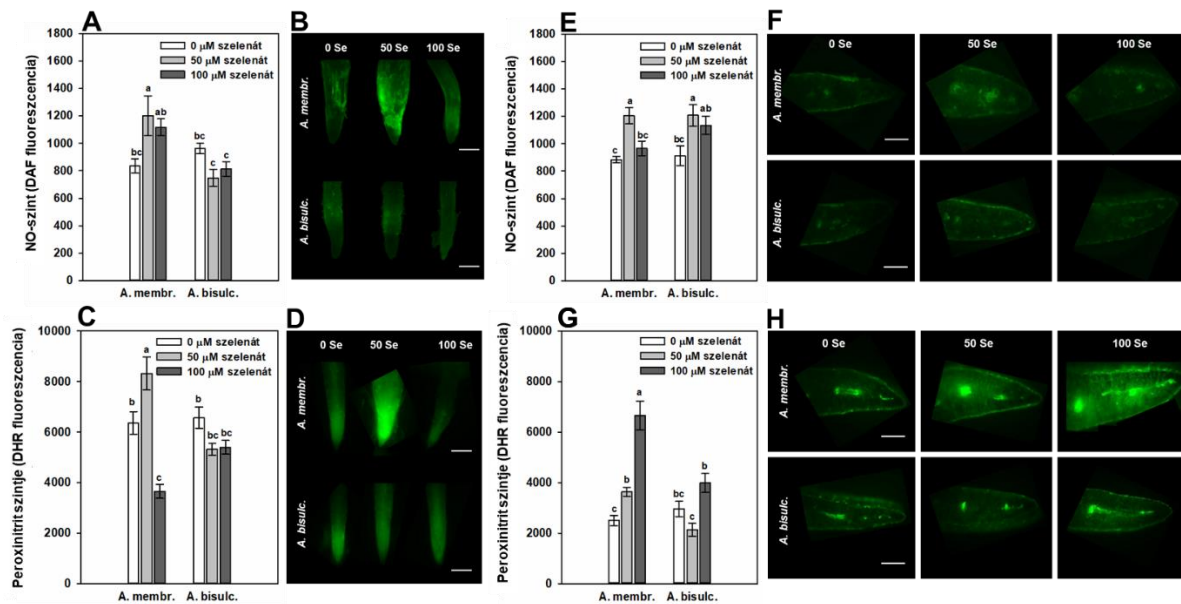
A $\text{O}_2^{\bullet-}$ szintje az *A. bisulcatus* gyökerében nem mutatott változást szelenát hatására (54. ábra A,B), és a sziklevélben csupán a 100 μM -os kezelés okozott kismértékű $\text{O}_2^{\bullet-}$ -szintnövekedést (54. ábra C). Az *A. membranaceus* esetén a gyökérben és a sziklevélben is szelenát által okozott jelentős mértékű $\text{O}_2^{\bullet-}$ -akkumuláció volt kimutatható (54. ábra A,B,C). A $\text{O}_2^{\bullet-}$ -szintéziséért felelő NOX enzim egy izoformáját azonosítottuk az *A. bisulcatus* sziklevelében, négy izoenzimet pedig az *A. membranaceus* sziklevelében, melyek esetében a szelenátterhelés jelentősebb aktivitásfokozódást okozott az *A. bisulcatus*-hoz képest. Mindkét faj gyökerében a fő NOX-fehérjesáv aktivitása kismértékű volt, de azt a szelenát fokozta az *A. bisulcatus*-ban. Ezenkívül négy további fehérjesáv mutatott NOX-aktivitást a hiperakkumuláló

faj gyökerében, melyek közül háromnak az aktivitását fokozta a szelenátkezelés. Az *A. membranaceus* gyökerében a fő NOX-fehérjesáv aktivitását a szelén csökkentette, viszont új, NOX-aktivitást mutató fehérjesávok jelentek meg, és aktiválódtak a szelenáttal kezelt mintában (54. ábra D). Ami a $O_2^{\bullet-}$ -t elimináló SOD enzim aktivitását illeti, az *A. membranaceus* szerveiben a szelenátkezelések növekedést okoztak, az *A. bisulcatus* esetében azonban a SOD-aktivitás szelenát általi növelése csak a gyökérzetben volt szignifikáns (54. ábra E és F). A SOD-izoformákat natív gélben tanulmányozva különbséget fedeztünk fel mind a fajok, mind pedig azok szervei között (54. ábra G). Az *A. bisulcatus* mindkét szervében négy SOD izoenzimet (Mn SOD 1, Fe SOD 1, Fe SOD 2, Cu/Zn SOD 1), míg az *A. membranaceus* sziklelevelében hatot mutattunk ki (Mn SOD 2, Fe SOD 1, Fe SOD 2, Cu/Zn SOD 1, 2, 3). Továbbá az *A. membranaceus* gyökerében csupán három aktivitássáv volt kimutatható (Mn SOD 2, Fe SOD 1, Fe SOD 2). A szelenát a legnagyobb alkalmazott koncentrációban enyhe hatást gyakorolt az *A. bisulcatus* sziklelevelében detektált SOD izoenzimekre, ugyanakkor az 50 μ M szelenát a hatból öt izoenzimet aktivált az érzékeny faj sziklelevelében. A gyökérben mindkét szelenátdózis fokozta a Mn SOD, Fe SOD és a Cu/Zn SOD izoenzimek aktivitását az *A. bisulcatus* esetén, de ez az indukció nagyobb mértékű volt az *A. membranaceus*-ban (54. ábra G).



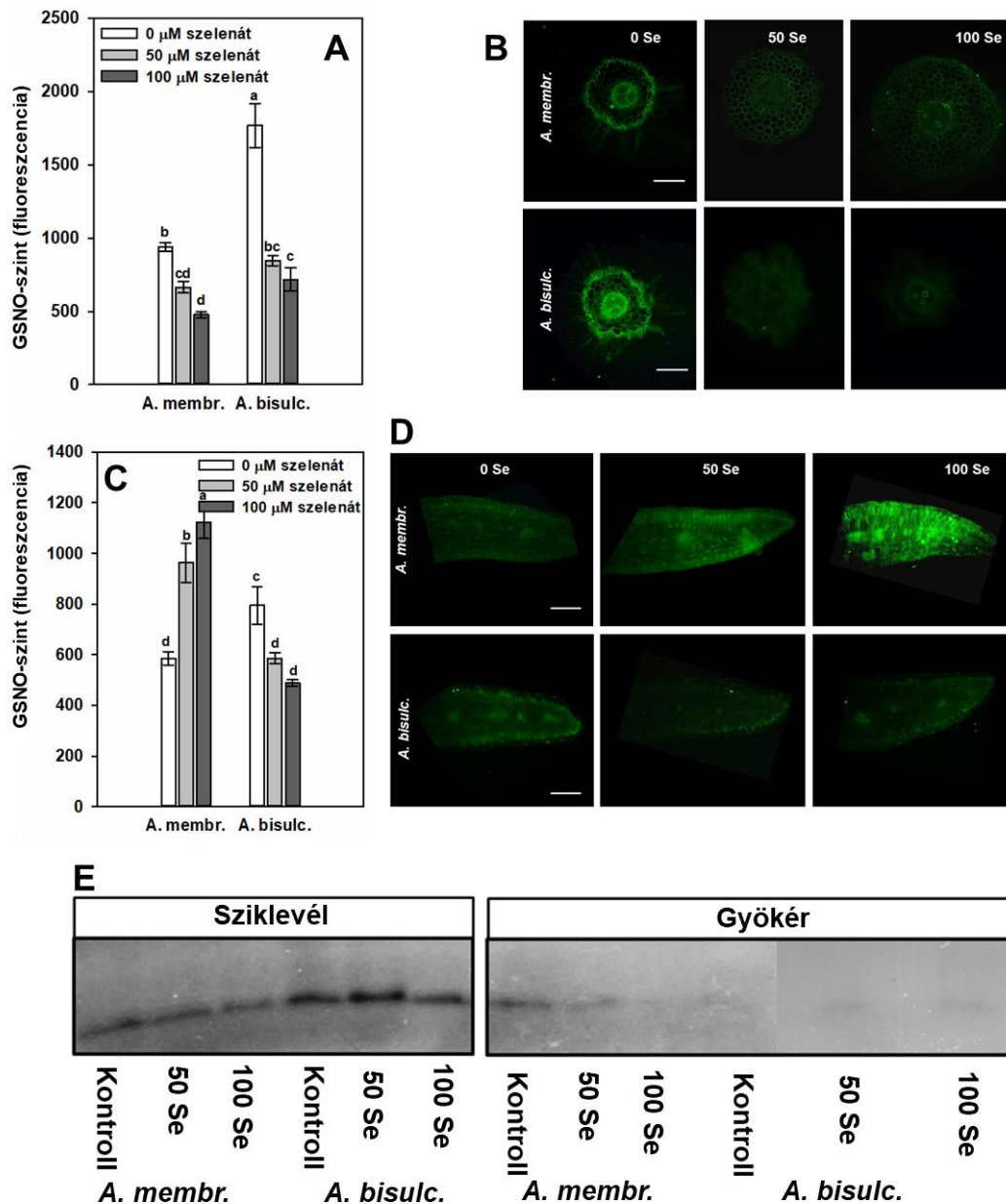
54. ábra: (A) A szuperoxid gyökanyon szintje kontroll (0 μM selenát), 50 vagy 100 μM selenáttal 14 napig kezelt *Astragalus membranaceus* és *Astragalus bisulcatus* gyökerében. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). (B) DHE próbával jelölt gyökércsúcsokról készült reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék= 500 μm . (C) NBT-jelölt kontroll és selenátkezelt sziklevelekről készített felvételek. A kék elszíneződés a szuperoxid gyökanyon szintjének szövetbeli növekedését jelzi. Mércse= 1 cm. (D) NADPH-oxidáz (NOX) izoenzimek aktivitása natív gélben. A leginkább reprezentatív fehérjesávot „fő sávként” jelöltem az ábrán. A fekete nyilak a további NOX izoenzimeket jelölik, a csillagok pedig a selenát hatására megjelenő izoenzimeket mutatják. Összes SOD-aktivitás az *Astragalus* fajok gyökerében (E) és sziklevelében (F) selenátkezelés hatására vagy anélkül. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=3$). (G) SOD izoenzimek aktivitása natív gélben kontroll és selenátkezelt *Astragalus* fajok gyökerében és sziklevelében.

A RNF közé tartozó NO és ONOO⁻ szintje az *A. bisulcatus* gyökereiben nem módosult, viszont az *A. membranaceus* gyökerében szignifikánsan nőtt selenát jelenlétében (55. ábra A-D). Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a 100 μM selenátkezelt *A. membranaceus*-gyökérben a ONOO⁻ szintje csökkent a kontrollhoz képest. A sziklevélben a NO-szintje nőtt az 50 μM selenátkezelés hatására mindkét fajban, míg a nagyobb selenátdózis kontrollszintű NO-szinteket eredményezett (55. ábra E és F). A ONOO⁻ szintje koncentrációfüggő emelkedést mutatott a selenátkezelések hatására az *A. membranaceus* sziklevelében, és változatlan maradt az *A. bisulcatus* esetén (55. ábra G és H).



55. ábra: NO-szint (gyökér A, sziklevél E), a peroxinitrit szintje (gyökér C, sziklevél G) kontroll (0 μM szelenát) és 50 vagy 100 μM szelenáttal kezelt *Astragalus membranaceus* és *Astragalus bisulcatus* esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). Reprézntatív mikroszkópos felvételek DAF-FM DA próbával jelölt gyökércsúcsokról (B) és sziklevél keresztmetszetekről (F), valamint DHR-próbával jelölt gyökércsúcsokról (D) és sziklevél-kétszmetzetekről (H). Mércék= 500 μm .

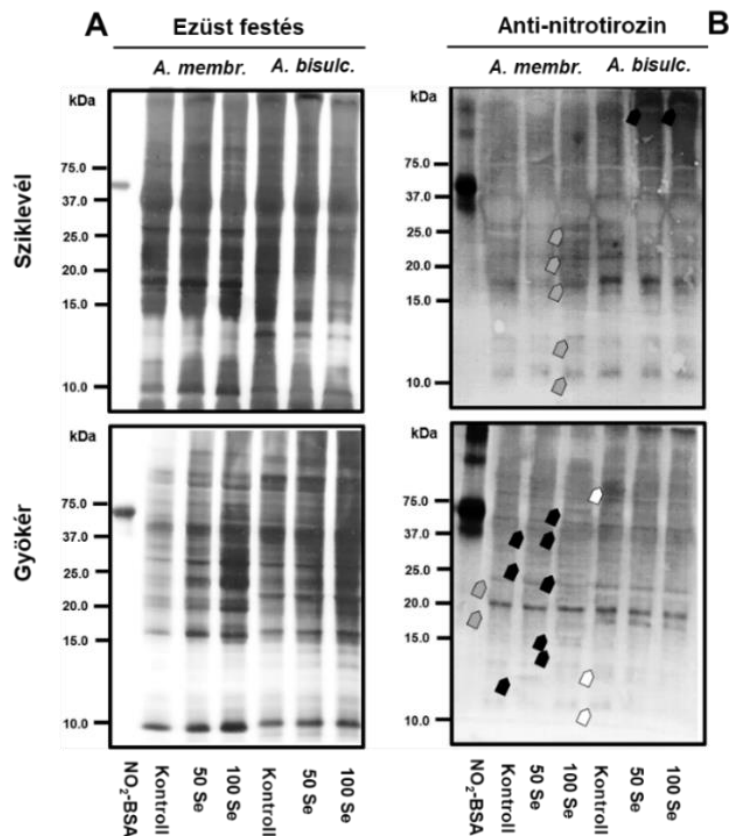
A GSNO-szintje az egészséges (kontroll) *A. bisulcatus* növény gyökerében magasabbnak bizonyult, mint az *A. membranaceus*-ban detektált, de mindkét fajban kimutatható volt a szelenátindukált GSNO-szint csökkenése (56. ábra A és B). Érdekes módon a sziklevélben az *A. bisulcatus* GSNO-szintje csökkent a szelenát hatására, az *A. membranaceus*-ban azonban a szelenát növelte a GSNO-szinteket (56. ábra C és D). A GSNOR-aktivitás mindkét faj esetén a sziklevélben volt nagyobb mértékű a gyökérhez képest kontrollkörülmenyek között (56. ábra E). A szelenát jelentős mértékben csökkentette az *A. bisulcatus* sziklevelének GSNOR-aktivitását, azonban az *A. membranaceus* sziklevelében az enzim aktivitása fokozódott az 50 μM szelenát hatására. A kontrollnövények gyökérrendszerét tekintve elmondható, hogy az *A. bisulcatus* nagyobb GSNOR-aktivitást mutatott, mint az *A. membranaceus*, ahol az aktivitás alig volt kimutatható. A szelenát koncentrációfüggő módon csökkentette a GSNOR-aktivitást az *A. bisulcatus* esetén, és nem befolyásolta azt az *A. membranaceus*-ban (56. ábra E).



56. ábra: GSNO-szint kontroll (0 μM szelenát) és 50 vagy 100 μM szelenáttal kezelt *Astragalus membranaceus* és *Astragalus bisulcatus* gyökerében (A) és sziklevelében (C). A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=5-6$). GSNO-immunjelölt gyökérkeresztmetszetekről (B) és sziklevél-keresztmetszetekről (D) készült fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék= 200 μm . (E) A GSNOR enzim aktivitása natív gélben az *Astragalus* fajok sziklevelében és gyökerében.

A fehérjetitozin-nitrációs analízis az előzőekhez hasonlóan azt mutatta, hogy a kezelést nem kapott, egészséges *Astragalus* csiranövények gyökerében és sziklevelében is felismerhetők voltak nitrált fehérjesávok (57. ábra). Az *A. membranaceus* sziklevelében a szelenátkezelések öt esetén mutatták az immunpozitív jel fokozódását (~27, 22, 17, 12, 10 kDa, szürke nyilakkal jelölve az 57. ábra B részén), bár új nitrátsáv nem jelent meg. Az *A. bisulcatus* sziklevelében mindkét szelenátdózis egy nagy molekulatömegű nitrált sáv megjelenését eredményezte (fekete

nyilak jelölik az 57. ábra B részén), ezenkívül azonban más nitrációs változást nem okozott a szelenáttelhelés a proteomban. A gyökérzetben az *A. bisulcatus* esetén nem detektálunk nitrációs jelfokozódást a szelénkezelések hatására, sőt három sáv esetén csökkent jelet tapasztaltunk (~75, 12, 10 kDa). Ezzel ellentétben az *A. membranaceus* gyökerében számos fehérjesáv mutatott szelenátindukált tirozinnitrációt (fekete nyilakkal jelölve az 57. ábra B részén).

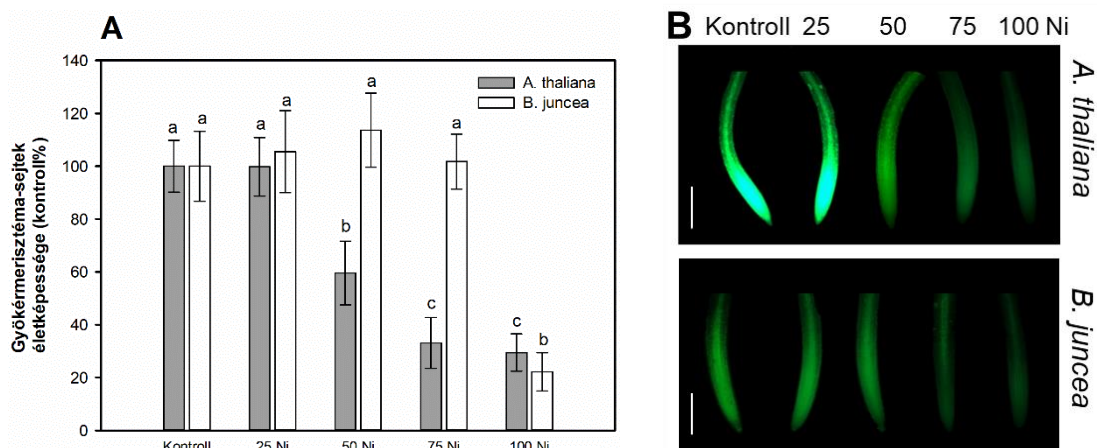


57. ábra: Fehérjetirozin-nitráció kontroll és szelenáttal (50 vagy 100 μM) kezelt *Astragalus membranaceus* és *Astragalus bisulcatus* sziklevelében és gyökerében. Ezüsttel festett SDS-gélek (A) és a fehérjenitrációt jelző anti-nitrotirozinnal jelölt western blot membránok (B). Nitrált marhaszérum-albumint ($\text{NO}_2\text{-BSA}$) használtunk pozitív kontrollként. A szürke nyilak olyan fehérjesávokat mutatnak, melyek nitrációs jele fokozódott, a fehér nyilak pedig csökkent nitrációjú fehérjesávokat jelölnek. A fekete nyilak a szelenátkezelés hatására újonnan nitrálódó fehérjesávokat jelölik.

5.5.1.5. A nikkeltől okozott nitro-oxidatív stressz és ennek összefüggése a toleranciával

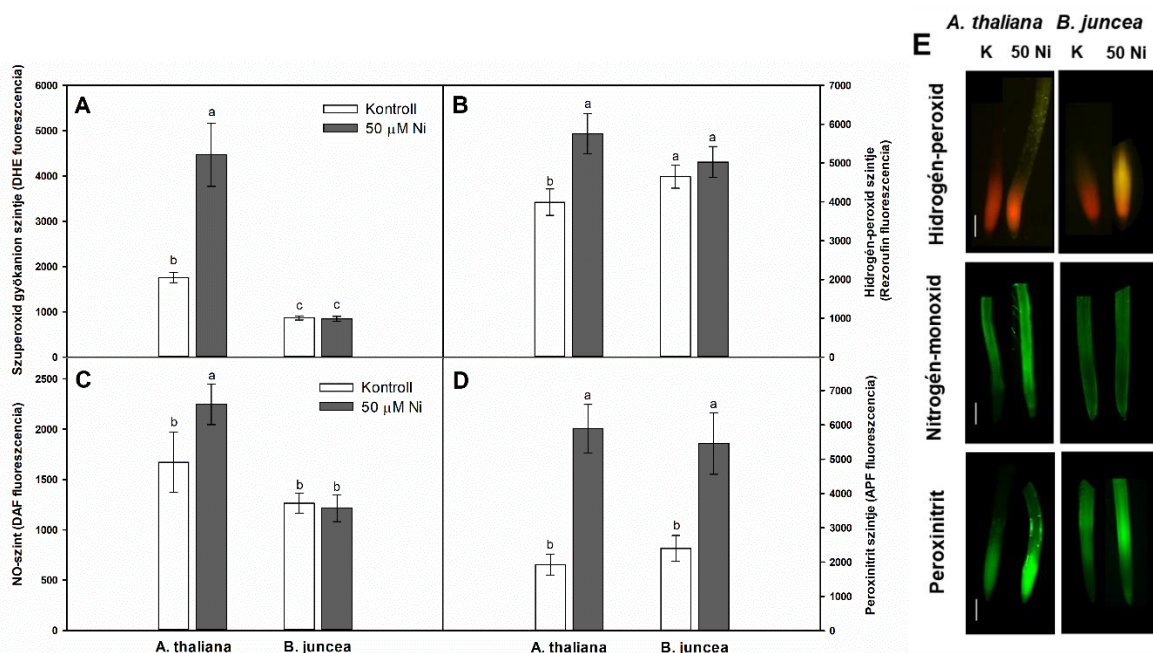
A nikkeltől stressz esetén is vizsgáltuk a nitro-oxidatív jelátvitel kialakulását a tűréssel összefüggésben egy, a metallofita *Brassica juncea*-t és a vad típusú *Arabidopsis thaliana*-t összehasonlító kísérleti rendszerben. A tolerancia mutatójaként meghatározott gyökérmerisztémasejt-életképesség az 50, 75 és a 100 μM nikkeltől-klorid-kezelések hatására

szignifikánsan csökkent az *A. thaliana* esetén, míg a *B. juncea*-ban csupán a 100 μM -os koncentráció okozott szignifikáns életképesség-vesztést (58. ábra).



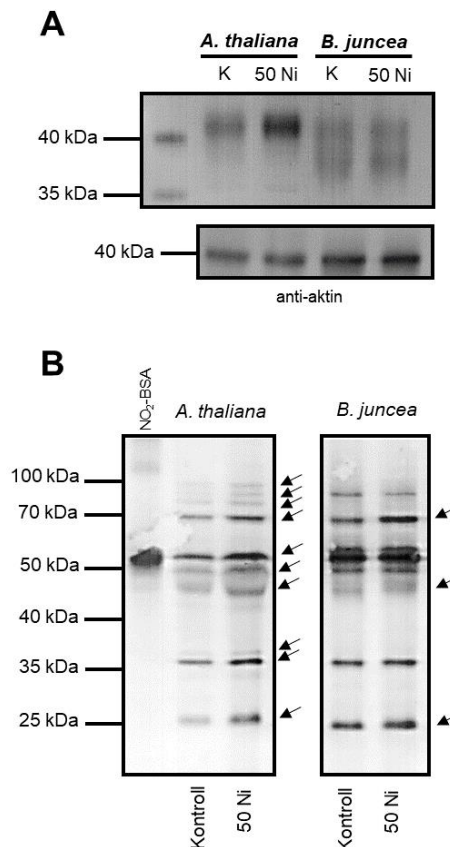
58. ábra: Gyökérmerisztéma-sejtek életképessége (A) kontroll, 25, 50, 75 vagy 100 μM nikkellel kezelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* és *Brassica juncea* esetén. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$). (B) FDA próbával jelölt gyökércsúcsokról készült reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék= 2 cm.

A $\text{O}_2^{\bullet-}$ szintje a kezeletlen *A. thaliana* gyökerében magasabb volt, mint a *B. juncea* esetén, és ez tovább nőtt 50 μM nikkellel jelenlétében, míg a kontroll *B. juncea* relatíve alacsony $\text{O}_2^{\bullet-}$ szintjét a nikkellel nem módosította (59. ábra A). A H_2O_2 szintje a kontroll *B. juncea* gyökereiben volt magasabb, de a nikkellel nem változtatta meg azt, míg az *A. thaliana*-ban növekedést okozott (59. ábra B és E). A nikkellel az előzőekhez hasonló módon hatott a fajok NO-szintjére, mivel növelte azt az *A. thaliana* esetén, és nem befolyásolta a *B. juncea* gyökereiben (59. ábra C és E). Érdekes módon a ONOO⁻ szintje hasonló mértékű nikkellel indukált növekedést mutatott mindkét fajban (59. ábra D és E).



59. ábra: A szuperoxid gyökánon szintje (A), a hidrogén-peroxid szintje (B), NO-szint (C) és a peroxinitrit szintje (D) kontroll és 50 μM nikkelkezelt vad típusú *Arabidopsis thaliana* és *Brassica juncea* gyökércsúcsaiban. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). (E) Különböző fluoreszcens próbákkal jelölt gyökércsúcsokról készített reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércék= 200 μm.

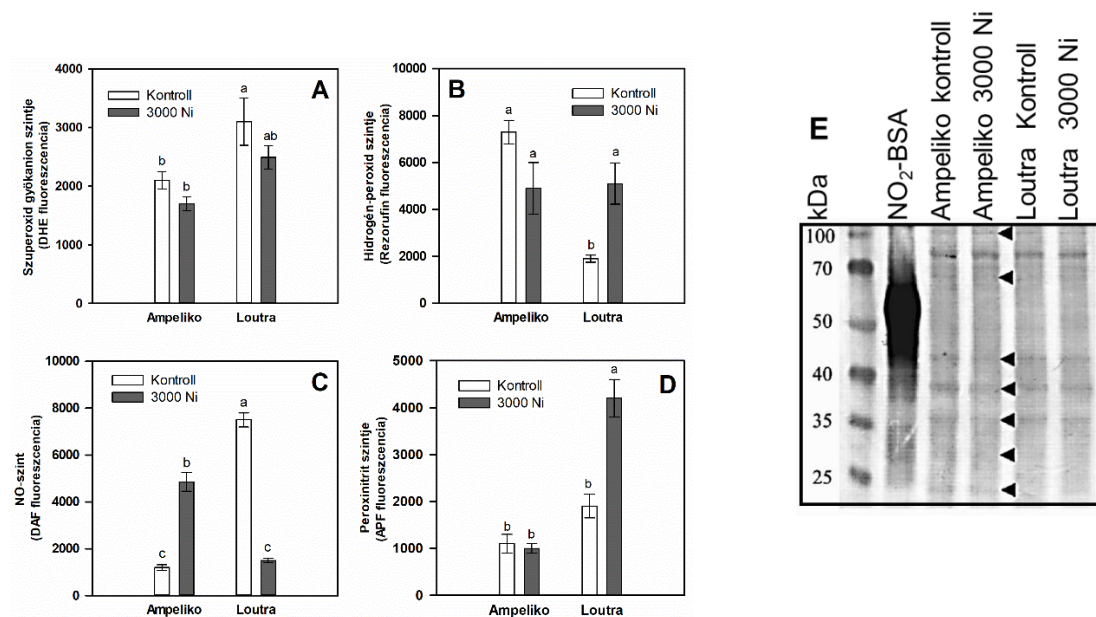
Az *A. thaliana*-ban az 50 μM-os nikkelkezelés megnövelte a GSNOR enzim mennyiségét, a *B. juncea*-ban azonban nem befolyásolta (60. ábra A). A kezelést nem kapott *A. thaliana* csíranövényekben tíz nitrációs jelet mutató fehérjesávot mutattunk ki, míg *B. juncea* esetén ezek száma nyolc volt (60. ábra B). A két fajnak a nikkelre adott nitrációs válasza igen különböző volt. Az *A. thaliana* esetén mind a tíz, kontrollban jelen lévő nitrált fehérjesáv 3-nitrotirozin elleni immunpozitív jele erősödött a nikkelkezelés hatására (nyilakkal jelölve az 60. ábra B részén). A *B. juncea* esetén három fehérjesáv mutatott jelerősödést a nikkelkezelt növényekből származó mintában. Egyik faj esetén sem tapasztaltunk a nikkel hatására újonnan megjelenő nitrált sávokat (60. ábra B).



60. ábra: (A) A GSNOR-fehérje mennyisége kontroll és 50 μ M nikkellekezelésnek kitétt vad típusú *Arabidopsis thaliana* és *Brassica juncea* növényekben. Anti-aktint használtunk „loading kontrollként”. (B) A nikkellel kiváltott fehérjetirozin-nitrációt jelző anti-3-nitrotirozinnal jelölt reprezentatív western blot membrán. Nitrált marhaszérum-albumint (NO_2 -BSA) használtunk pozitív kontrollként. A nyilak a kezelés hatására fokozódó immunpozitivitást mutató fehérjesávokat jelölik.

A nitro-oxidatív jelátvitelt tanulmányoztuk a nikkellel-hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* növényfaj két leszboszi területről származó egyedei esetén is (3. ábra). A relatív nikkeltűrési kontroll Ampeliko ökotípus gyökerében a O_2^{\bullet} szintje alacsonyabb volt, mint a Loutra gyökérben, és a magas nikkellekoncentráció (3000 mg/kg) nem okozott szignifikáns változást egyik fajban sem (61. ábra A). A H_2O_2 szintje a kezelt Loutra-gyökerekben volt alacsonyabb, és a nikkellel hatására nőtt, míg az Ampeliko relatív magas „nyugalmi” H_2O_2 -szintje nem változott a 3000 mg/kg nikkellel jelenlétében (61. ábra B). A gyökércsúcsok NO-szintje érdekes, ellentétes irányú változást mutatott a faj két különböző területről származó utódaiban. A kontrollkörülmények között nőtt Ampeliko-ban a NO-szint szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Loutra-ban, és a nikkellel az előbbi típusban növelte, az utóbbiban pedig csökkentette a NO-szintet (61. ábra C). A ONOO^- -szint az Ampeliko-ban nem változott nikkellel hatására, de a Loutra típusban szignifikánsan megemelkedett (61. ábra D), ami nem járt együtt a fehérjenitráció fokozódásával (61. ábra E). Az Ampeliko növényekben a nikkellel többlete a

kontrollban detektált nitrált fehérjesávok immunpozitivitásának csökkenését eredményezte (nyilakkal jelölve a 61. ábra E részén).



61. ábra: A szuperoxid gyökéanion szintje (A), a hidrogén-peroxid szintje (B), NO-szint (C) és a peroxinitrit szintje (D) kontrolltalajban és 3000 mg/kg nikkellátott talajban nőtt *Odontarrhena lesbiaca* két különböző élőhelyről (Ampeliko, Loutra) származó egyedeinek gyökerében. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=10$). (E) Fehérjetirozin-nitráció kontroll és nikkellátott *O. lesbiaca* két különböző élőhelyről származó egyedeinek gyökerében. Pozitív kontrollként nitrált marhaszérum-albumint (NO₂-BSA) használtunk. A nyilak a nikkellátásra lecsökkent immunpozitivitást mutató fehérjesávokat jelzik.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A SIMV MEGJELENÉSE KÜLÖNBÖZŐ KÍSÉRLETI RENDSZEREKBE

A fémes és nemfémes elemek talajbéli feldúsulása kihívást jelent az olyan rögzült életmódú organizmusok, mint a növények számára, melyek nagyrészt a növekedésük átprogramozása (pl. stresszindukált morfogénikus válasz, SIMV, Potters és mtsi. 2007) révén képesek alkalmazkodni az őket körülvevő stresszhatásokhoz. Az elemtöbbletek esetén a gyökér kitüntetett szerepe az alkalmazkodási folyamatban, hiszen közvetlen kapcsolatban van a talajban lévő kémiai elemekkel.

A többféle kísérleti rendszer vizsgálatából világosan látszik, hogy mind az esszenciális redoxaktív (réz) és nem redoxaktív (cink, nikkel), mind pedig a nem esszenciális (ólom) fémek és nemfémes (szelén) elemek többlete képes kiváltani a SIMV-gyökérfenotípus megjelenését, vagyis a növekedési válasz az elem típusától (esszencialitás, redox-aktivitás, fémes-nemfémes jelleg) független (1. táblázat). A gyökérszerkezetbeli változás megjelenik tápoldatban és táptalajon való nevelés esetén is, de a talajjal töltött rizotronrendszerben kísérleteink nem tudtak SIMV-gyökérszerkezetet kimutatni. Ezzel ellentétben talajjal töltött rizoboxban nevelt *Stanleya pinnata* esetén a szelenit és *Thlaspi caerulescens* esetén a cink-oxid SIMV-gyökérszerkezetet okozott (Goodson és mtsi. 2003, Whiting és mtsi. 2000). Az általunk tervezett rizotronok csupán a gyökérrendszer kétdimenziós növekedését tették lehetővé, ami hozzájárulhatott a SIMV-módosulás elmaradásához. Az eredményeinkhez hasonlóan a réz többlete SIMV-fenotípusú gyökérnövekedési választ okozott búzában (*Triticum aestivum* L.), lúdfüben és oreganóban (*Origanum vulgare* L.), a cinktöbblet pedig számos egy- és kétszikű fajban különböző nevelési közegek esetén (összefoglalva Kolbert 2016 által). A nem esszenciális elemek közül az ólom, a kadmium és az arzén is SIMV-gyökérfenotípust okozott *A. thaliana*-ban saját eredményeinkkel egybehangzóan (összefoglalva Kolbert 2016). A SIMV megjelenése a sokféle növényfajban felveti a lehetőségét annak, hogy egy fajfüggetlen, általános stresszvásarról van szó. Ugyanakkor a SIMV megjelenését a kezelési koncentráció és az időtartam befolyásolja, hiszen csupán alacsony dózisú elemtöbbletek esetén és relatíve hosszú idő alatt jelenik meg a növekedési válasz (1. táblázat).

Potters és munkatársai (2007) az elemtöbbletek nyomán kialakuló elágazó gyökérszerkezet szerepét feltételezték a fémszennyezett talajrészecskék elkerülési folyamatában, ugyanakkor a több oldalgyökér jobb rögzítést tehet lehetővé, és javíthatja a víz- és tápanyagfelvételt, ezáltal optimalizálhatja a növény fitneszét. Ez esetben a SIMV nem csupán

az elemtöbbletek révén jelentkező stressz elkerülhetetlen következménye, hanem az aktív akklimatizáció része. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a SIMV-gyökérzet az elemek alacsony dózisának jelenlétében figyelhető meg, magas koncentrációk esetén a gyökérnövekedés gátolva van. Feltehetőleg a szubletális stressz okozta SIMV eredményeként a legoptimálisabb testalak, méret, szerkezet alakul ki, nagymértékű stressz során azonban nincs lehetőség optimalizációra, és az egyed károsodik.

6.2. A SIMV ÖSSZEFÜGGÉSE AZ ELEM-HIPERAKKUMULÁCIÓVAL ÉS -TŰRÉSSEL

A SIMV elemtöbbletek hatására történő megjelenésének vizsgálata hiperakkumuláló és -tűrő növényfajokban választ adhat a SIMV stressztűrésben játszott szerepére vonatkozó kérdésre. A szelenittartalmú táptalajon nőtt *Astragalus bisulcatus* a hajtásában közel 2000 mg/kg szelént halmozott fel, ami bizonyítja a faj hiperakkumuláló képességét az *Astragalus membranaceus*-szal szemben, ami csupán negyedannyi szelén felhalmozására volt képes. Az *A. bisulcatus* hiperakkumuláló jellegére utal az is, hogy kontrollkörülmények között jelentős szeléntartalommal bír (Mehdawi és Pilon-Smits 2012). Az *A. bisulcatus* csírázása szelén-inszenzitívnek bizonyult, és a hajtás- és gyökérnövekedését fenn tudta tartani a szeléndózisok jelenlétében, ami arra utal, hogy a szelén-hiperakkumuláció hipertűréssel párosul (Mehdawi és Pilon-Smits 2012), és ebben a fajban nem a szelén kizárása, hanem annak detoxifikációja vezet a tűréshez. Az *A. bisulcatus*-ban a hipertűréshez a szelenát gyökérzetre gyakorolt pozitív hatása társult, az *A. membranaceus* pedig súlyos gyökérnövekedés-gátlást szenvedett el. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a FGY megnyúlása összefüggésben van a szeléntoleranciával, vagyis a FGY megnyúlási képességet tekinthetjük a szeléntűrés indikátorának (Tamaoki és mtsi. 2008). Az OGY-szám növekedése szintén mutat összefüggést a szeléntűréssel, hiszen csak a hiperakkumuláló faj tudta megnövelni OGY-számát a szelenát jelenlétében, az érzékeny faj nem. Hasonló eredményt mutatott a cink-hiperakkumuláló és -toleráns *Thlaspi caerulescens* és nem akkumuláló *Thlaspi arvense* összehasonlítása, hiszen a lokalizált cinkellátásra adott válaszként a *T. caerulescens* fokozta az OGY fejlődését, míg a *T. arvense* gyökérnövekedése gátolt volt (Whiting és mtsi. 2000). Továbbá a lokalizált szelénkezelés nem okozott SIMV-gyökérzetet a *Brassica juncea* esetén, de a hiperakkumuláló *Stanleya pinnata* képes volt átprogramozni a gyökérfejlődését (Goodson és mtsi. 2003). A Se-hiperakkumuláló *Neptunia amplexicaulis* rizotrófnban, Se jelenlétében nevelve nagyobb gyökérzetdenzitást mutatott, mint a Se-érzékeny *N. gracilis* (Pinto Irish és mtsi. 2021).

Az *Odontarrhena lesbiaca* faj mindkét lesboszi élőhelyről származó egyedei magas nikkellkoncentrációt mutattak kontrollkörülmenyek között, valamint 3000 mg/kg nikkeltartalmú talajban növekedve ~10 000 mg/kg nikkelt halmoztak fel a hajtásukban (2. táblázat). Ezek alátámasztják, hogy nikkell-hiperakkumuláló fajról van szó, ami a hajtás epidermiszsejtjeinek vakuólumaiban és a levélfelszín csillagszöreibben raktározza a nikkelfelesleget (Küpper és mtsi. 2001). Az Ampeliko területen a nikkellkoncentráció meghaladja a Loutra terület nikkeltartalmát (Kazakou és mtsi. 2010), és az Ampeliko területről származó utódegyedek több nikkelt halmoztak fel, mint a Loutra-utódegyedek, és gyökernövekedésüket is jobban fenn tudták tartani a nikkellgazdag rizotronban. Ez felveti a lehetőségét annak, hogy a növényfajok környezetük által befolyásolt nikkellérzékenysége genetikailag öröklődik. Habár – feltehetően az alkalmazott nagy nikkeldózis miatt – SIMV egyik növénytípusban sem jelent meg, az eredmények azt erősítik meg, hogy a FGY-megnyúlási képesség és az OGY-fejlődési képesség fenntartása összefüggésben van az elemtűrészi képességgel. Ezt támasztja alá Rosatto és mtsi. (2021) összehasonlító vizsgálatának eredménye, miszerint a Ni-hiperakkumuláló *Alyssoides utriculata* és *Noccaea caeruleascens* nem mutatott gyökernövekedés-gátlást Ni jelenlétében, míg a nem akkumuláló *Alyssum montanum* és *Thlaspi arvense* gyökérzetének kiterjedése, biomasszája Ni-indukált csökkenést szenvedett el.

A két kísérleti rendszerben kapott eredmények azt mutatják, hogy – bár klasszikus kevert növekedési válasz nem volt kimutatható – az elemtöbblet hatására a hiperakkumuláló/tűró növényfajban a gyökernövekedés átprogramozódik (Astragalus-kísérlet) vagy fennmarad (Odontarrhena-kísérlet), míg az érzékenyebb fajban/típusban a növekedési folyamatok súlyosan károsodnak. Ez a gyökernövekedési plaszticitás és az elemtűrészi képesség között fennálló kapcsolatra enged következtetni.

6.3. A NO ÉS A HORMONOK KAPCSOLATA AZ *ARABIDOPSIS THALIANA* GYÖKÉRNÖVEKEDÉSI VÁLASZAI SORÁN

A növényi szervnövekedés egyik legfőbb irányítójaként számontartott auxin metabolizmusának és transzportjának megváltozása számos nehézfém jelenlétében bizonyítást nyert (Pandey V és mtsi. 2019). A mi kísérleteinkben a réz koncentrációfüggő módon megnövelte a sziklevek és a gyökerek auxinszintjét (*DR5::GUS*-promóteraktivitásból következtetve), és Lequeux és munkatársai (2010) eredményeihez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a *DR5::GUS*-kifejeződés a merisztéma feletti gyökérrégiókban fokozódik, ugyanakkor a merisztémában is kifejezetté válik. A réz által szabályozott gének transzkriptomanalízise

feltárta, hogy az auxin bioszintézisében szereplő gének (pl. IES-amid-szintáz, triptofán-szintáz) kifejeződését a réz többlete felülszabályozza (Zhao C-R és mtsi. 2009), s ez a folyamat lehet felelős az auxinszint növekedéséért az *A. thaliana* szerveiben. A szikleveleiben tapasztalt alacsony rézkoncentráció által kiváltott jelentős NO-felszabadulás feltételezi, hogy a NO jelátvivő molekulaként szerepel a réztöbbletre adott növényi válaszban. A gyökér NO-tartalma ezzel szemben rézkoncentráció-függő csökkenést mutatott, ami rávilágít a NO-kapcsolt jelátvitel szervfüggésére rézterhelés során. Nehézfémek hatására bekövetkező NO-tartalombéli csökkenést tapasztaltak *Pisum sativum* gyökerében (Terrón-Camero és mtsi. 2020), ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a nehézfémeknek a NO-szintre gyakorolt hatása több tényező mellett függ a kezelés koncentrációjától és időtartamától is (Xiong és mtsi. 2010). Az auxin és a NO szintje az *A. thaliana* gyökerében ellentétes irányú, rézkoncentráció-függő változást mutatott, ami feltételezi a hormon és a növekedési regulátor kapcsolatát. Ezt alátámasztotta a farmakológiai kísérletünk, amely igazolta, hogy az auxintranszport gátlása a NO felhalmozódásának kedvez a rézterhelt gyökérben, és fordítva. Vagyis az auxin negatívan szabályozza a NO-ot a gyökércsúcsban. Korábbi publikációkban a NO-ot az auxin-jelátvitel pozitív regulátoraként tüntették fel az oldal- vagy járulékosgyökér-fejlődés során (Correa-Aragunde és mtsi. 2004, 2006, Pagnussat és mtsi. 2002), a főgyökér-merisztémában azonban a NO negatívan szabályozza az auxin szintjét és transzportját (Fernández-Marcos és mtsi. 2011). A rézstressznek kitett gyökérben az auxinszintek növekedése negatívan szabályozza a NO-ot, és a NO visszahat az auxinra, vagyis a réz által felborított auxin- és NO-metabolizmus és jelátvitel kölcsönösen negatívan befolyásolja egymást.

Egy másik elem, a szelenit *DR5::GUS*-aktivitásra gyakorolt hatása nem bizonyult sem koncentráció- sem időfüggőnek, hiszen az alacsony dózisú szelenitterhelés növelte, a magasabb szelenitkoncentráció pedig csökkentette azt a kontrollhoz képest a gyökércsúcsban rövidebb és hosszabb kezelési periódus esetén is. Van Hoewyk és munkatársai (2008) eredményei szerint a szelén befolyásolja az auxintranszportot és -konjugációt azáltal, hogy az auxin efflux carrier PIN géneket alulszabályozza, az inaktív auxinkonjugátumok képzéséért felelős indol-3-acetát β -glükoziltranszferáz enzim génjének kifejeződését viszont fokozza. Továbbá a szelénkezelt *A. thaliana*-ban számos auxinszignalizációban érintett génkomponens kifejeződése volt redukált (Van Hoewyk és mtsi. 2008). Újabb eredmények szerint a szelén alulszabályozza a *YUCCA1* és *YUCCA3* auxin bioszintézis géneket rizs csíranövényekben (Malheiros és mtsi. 2019). Hosszabb távon (7 nap) az *ARR5::GUS*-aktivitás csökkent, az *A. thaliana* korai fejlődése során azonban a szelenit nagymértékben fokozta a citokininszintet a főgyökércsúcsban, ami hozzájárulhat a gyökérmegnyúlás gátlásához (adatok nincsenek bemutatva), hiszen a citokinin

a gyökérnövekedés negatív regulátora (Stenlid 1982). A Van Hoewyk és munkatársai (2008) által végzett transzkriptomanalízis rávilágított, hogy a szelén erősen alulszabályozza a citokinin-oxidáz gént (*AtCKX6*), ami a citokinin tartalom növekedését vonhatja maga után. A szelén koncentrációtól és időtartamtól függetlenül növeli az etilénszintet a gyökerekben, aminek háttérfolyamata lehet az, hogy a szelénit és a szelenát indukálja számos etilénbioszintézis és -jelátviteli gén kifejeződését (Tamaoki és mtsi. 2008, Van Hoewyk és mtsi. 2008). A réztöbblet esetén tapasztaltakhoz hasonlóan a vad típusú lúdfű gyökerében a szelénit koncentrációfüggő módon csökkentette a NO-szintet a korai csíranövény-fejlődési szakaszban, aminek háttérben olyan nem enzimátikus NO-eltávolítási folyamatokat sejtethünk, mint az oxigénnel, glutationnal vagy a fitoglobinnal való reakció (Cochrane és mtsi. 2017, Sanz-Luque és mtsi. 2015). Az *aux1-7* növényekben az auxin efflux fehérje mutációja hibás hajtás-gyökér auxintranszportot, csökkent auxinkoncentrációt és kisebb auxinérzékenységet okoz a vad típushoz képest (Pickett és mtsi. 1990). A kezeletlen *aux1-7* növények gyökerében tapasztalt magas NO-szint az auxin és NO közötti negatív szabályozó kapcsolatot feltételez, amit Fernández-Marcos és munkatársai (2011) azon eredménye is megerősít, hogy a nagy NO-koncentráció csökkenti a *DR5::GUS*-expressziót és a PIN-mediált auxintranszportot az *A. thaliana* gyökércsúcsában. A szelénit a vad típushoz hasonlóan csökkentette a NO-szintet az *aux1-7* és az *etr1-1* etilén inszenzitív vonalban, ami arra utal, hogy a szelénitkezelt főgyökérben az auxin és a NO, valamint az etilén és a NO között nincs jelentős szignálkapcsolat. Ezekkel ellentétben a citokinin és NO közötti interakciót joggal feltételezhetjük, hiszen a citokinin túlermelése megakadályozta a szelénit által a vad típusban okozott NO-szintcsökkenést.

A citokinin-NO kapcsolatot részleteiben is vizsgáltuk. A szelénitindukált koncentrációfüggő citokininszint-növekedés a gyökérben és -csökkenés a hajtásban rámutatott arra, hogy a gyökércsúcsban termelődő citokinin (Torrey 1976) hajtásba történő szállítása gátlódik, és ezzel a növényi testben való citokinin eloszlás nagyban módosul. Ismert az, hogy a citokinin xilémbe történő transzlokációja környezeti jeleket közvetít a gyökér és a hajtás között (Kudo és mtsi. 2010, Li és mtsi. 2021). Amellett, hogy a transzlokáció gátlódik, a hajtásban a szelénit citokininszintet csökkentő hatásához hozzájárulhat a citokinin-oxidáz gének (*CKX4* és *CKX5*) felül szabályozódása, a gyökérben pedig a növekvő citokininszintet részben kialakíthatja a *CKX4* expresszió csökkenése. Tamaoki és munkatársai (2008) eredményeivel szemben a kísérleteinkben a *CKX6* nem bizonyult szelén-reszponzívnak. A vad típusú növényben tapasztalt szelénitindukált NO-szintcsökkenés a NR enzim deficiens *nia1nia2* gyökérében is megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy a szelénitnek a NO-tartalomra gyakorolt hatása nem az enzim aktivitásának megváltozásán keresztül valósul meg. A NO képes

egy nitrációs reakcióban a citokinin adenincsoportjával reagálni, ezáltal a saját endogén szintjét csökkenteni (Liu és mtsi. 2013), ami egy lehetséges magyarázat a szelenit NO-szintet csökkentő hatására. Annál is inkább, mert további kísérleteink kölcsönösen negatív szabályozó kapcsolatot fedtek fel a citokininnek és a NO-szignál között a szelenitstressz növény gyökerében. Az exogén citokinin NO-szintet csökkentő hatása a kontrollban igazolja a citokinin negatív hatását egészséges lúdfűben. Bár a mutánsal végzett kísérlet ezt nem támasztotta alá, hisz a nagy citokinintartalommal bíró *ipt-161* lúdfű gyökerében a NO-szint hasonló volt a vad típuséhoz. A különbséget a citokininformákban rejlő különbség okozhatja, hiszen a mutánsban az endogén zeatintartalom megemelkedett, a farmakológiai kezelés pedig BA formájában történt. Ez felhívja a figyelmet a citokinin kémiai formától függő, NO-szintet módosító hatására. A BA az egyik szelenitkoncentráció jelenlétében csökkentette a NO-szintet, a NO-donor adagolása pedig lecsökkentette a szelenitindukált citokininszintet (*ARR5::GFP* és *TCS::GFP* jel alapján becsülve) a gyökércsúcsban. Ez utóbbi arra utal, hogy a NO-szint csökkenése szükséges a szelenitindukált citokininjel akkumulációjához, vagyis megerősíti a negatív citokinin-NO jelkapcsolat működését a szelenitstressznek kitett *A. thaliana* gyökerében. A citokininnek NO általi nitrációjának feltételezett szerepe szelenitstressz alatt megerősítést nyert azáltal is, hogy a sziklevelekben a teljesen eltűnő citokininjel változatlan NO-szinttel párosul, míg a gyökérben a citokininszint növekedése lehetővé teszi a NO-szint csökkenését.

A továbbiakban az etilén és a NO kapcsolatát vizsgáltuk a szelenitindukált oldalgökér-növekedés során, hiszen mind az etilén (Negi és mtsi. 2008, Ivanchenko és mtsi. 2008), mind pedig a NO (Correa-Aragunde és mtsi. 2004, 2006) szabályozza a folyamatot. Az alkalmazott szelenitkoncentráció SIMV-gyökérzetet alakított ki a vad típusban azáltal, hogy fokozta a látható, másnéven kifejelett oldalgökerek (nagyobb, mint VII. stádium, Malamy és Benfey 1997 szerint) számát. A szelenit hatása ezzel ellentétesnek bizonyult az etilénreceptor-mutáns *etr1-1*-ben, ahol az eredetileg nagy oldalgökérszám (mindkét stádiumú) csökkent, rámutatva arra, hogy az *etr1-1* OGY-fejlődési folyamatai érzékenyebbek a szelenitre, mint a vad típusé. Továbbá a szelenit OGY-számot fokozó hatása nem érvényesül az ETR-függő etilén-jelátvitel hibája esetén, ami a jelátvitel érintettségére utal a folyamatban. A különböző gyökérszerkezetük ellenére a vad típus és az *etr1-1* mutáns endogén etiléntartalma hasonló volt, a szelenit azonban jelentősebb etilénakkumulációt okozott az *etr1-1* jelátviteli mutánsban, mint a vad típusban. Az etilénszintek változásainak magyarázata céljából etilénszintézis és -jelátviteli gének kifejeződését tanulmányoztuk a vad típusban és az *etr1-1* mutáns csíranövényekben. Az összes, vizsgált ACS gén a gyökérben fejeződik ki (Dugardeyn és mtsi. 2008). A szelenitkezelés nem

befolyásolta az etilén-jelátviteli gének kifejeződését, de felülszabályozta az ACS2 és ACS8 géneket az *etr1-1* vonalban, ami összefüggésben lehet a nagyfokú szelenitindukált etilén felszabadulással. Hasonló módon a kadmium fokozza az ACS2 gén kifejeződését, ami bizonyítja, hogy az ACS2 kulcsszerepet játszik az etilénszintézisben környezeti stressznek kitett növényben (Schellingén és mtsi. 2014). A kezeletlen *etr1-1* vonalban az ACS2 és az ACS8 magasan expresszált, hasonlóan Peng és munkatársainak (2005) eredményeihez, ugyanakkor az etilénszint a mutánsban a vad típushoz hasonló, ami arra utal, hogy egyéb, a bioszintetikus gének kifejeződésén kívüli folyamatok (pl. az ACS-enzimaktivitások poszttranszlációs szabályozása, Wang és mtsi. 2002) szabályozzák a csíranövények egyensúlyi etilénszintjét. Feltételeztük, hogy az *etr1-1* vonalban az oldalgyökérszám-gyarapodás elmaradása összefüggésben lehet a jelentős szelenitindukált etilénfelszabadulással, amit alátámasztott az, hogy az etilénszintézis gátlása a szelenit OGY-számot csökkentő negatív hatását enyhítette. Az etilén hatásmechanizmusát illetően elmondható, hogy az auxinnal fennálló szabályozó kölcsönhatás vezethet az OGY-növekedés gátlásához. Ugyanis a szelenit által megnövelt etilénmennyiség hatására az auxintranszport fokozódhat a gyökér teljes hosszában, ami az OGY-fejlődést lehetővé tévő lokális auxinmaximumok kialakulásának gátat szabhat (Negi és mtsi. 2008). További kérdésünk volt, hogy az etilén befolyásolja-e a NO-ot a szelenit által kiváltott OGY-fejlődés során. Felismertük, hogy a vad típusban okozott NO-szintnövekedéssel ellentétben az *etr1-1* vonalban nem történik szignifikáns változás, ami egyrészt arra utal, hogy funkcionális ETR-függő etilén-jelátvitelre van szükség a szelenit NO-szintet növelő hatásához, másrészt az etilén NO-szintet reguláló szerepére is felhívja a figyelmet. Ezt a feltételezést megerősítette az, hogy a szelenit által megnövelt NO-szintet az etilén bioszintézisének gátlása tovább emeli, az etilén ACC formájában való hozzáadása pedig csökkenti. Az etiléngátlás NO-felszabadulást okozó hatása azt feltételezi, hogy a szelenitkezelt *etr1-1* mutánsban jelen lévő nagy etilénmennyiség megakadályozza a NO-szint növekedését, bár az etilén NO-képződést érintő negatív hatásának részletei nem tisztázottak ebben a rendszerben. Ismert azonban az, hogy az etilén indukálja a *PHYTOGLOBIN1* gént, ami a NO-szint csökkentését okozza, bár ezt a szabályozó kapcsolatot árasztásos hipoxia során tárták fel (Hartman és mtsi. 2019). A növények NO-tartalmának megnövelése GSNO-adagolással felerősítette a szelenit OGY-növekedést indukáló hatását mind a vad típusban, mind pedig az ETR-mutánsban, ami a NO OGY-számot fokozó hatását az etilén-jelátviteltől függetlenné teszi. A NO eltávolítása a szelenit mellett gátolta az OGY-kifejlődést a vad típusban. Az eredmények arra utalnak, hogy a NO pozitívan szabályozza a szelenitindukált OGY-kifejlődést. Amellett, hogy a NO eltávolítása csökkenti az OGY-számot, növeli az etilénszintet (*ACS8::GUS/GFP* aktivitás

alján becsülve) az OGY-ben és a FGY-csúcsokban is, a GSNO pedig csökkenti azt, ami magyarázza, hogy a NO az etilénszint csökkentésén keresztül tudja indukálni az OGY-kifejlődést a szelenitterhelt *A. thaliana*-ban. A NO etilénszintre gyakorolt negatív hatását más kísérleti rendszerekben is leírták (összefoglalva Kolbert és mtsi. 2019c által). Összességében levonható az a következtetés, hogy a szelenitterhelt gyökérrendszerben a megnövekedett etiléntartalom gátolja a NO képződését, és a NO negatívan befolyásolja az etilénszintet, vagyis a két gáz halmazállapotú jelátvivő kölcsönösen negatív jelkapcsolata hozzájárul a szelenit által kiváltott OGY-indukcióhoz, ami a SIMV egyik fő jellemzője.

Az újabb növényi hormonsalád, a strigolaktonok NO-jelátvitellel való kapcsolatának vizsgálatát arra alapoztuk, hogy mindkét molekula ismert szabályozó funkciókkal bír olyan gyökérfejlődési folyamatok során, mint a FGY-megnyúlás, járulékosgyökér-fejlődés, oldalgöyökér-fejlődés és gyökérszőrfejlődés (Kapulnik és mtsi. 2011, Rasmussen és mtsi. 2012, Villaécija-Aguilar és mtsi. 2019, Sanz és mtsi. 2015). A GSNOR enzim közvetlenül szabályozza a GSNO és az SNO mennyiségét, így a fehérje S-nitroziláción keresztül a NO-jelátvitelt, és közvetett módon regulálja a NO-szinteket. Ez magyarázza a *GSNORI* génben hibás vonalban (*gsnor1-3*) detektált, vad típusnál magasabb NO- és SNO-szinteket. A *35S::FLAG-GSNORI* vonalban az enzim túltermelése csökkent SNO-szintet eredményez, a nagy NO-tartalma azonban a magas nitritkoncentrációból és NR-aktivitásból eredhet (Frunghillo és mtsi. 2014). Ezek alapján a *35S::FLAG-GSNORI* vonal vizsgálata a nitrátból származó NO-val kapcsolatos következtetések levonását teszi lehetővé, míg a *gsnor1-3* vonal vizsgálatával a GSNOR általi NO-eltávolítás szerepéről kaphatunk információt. Az első, a strigolaktonok és a NO-jel között fennálló szabályozó kapcsolat meglétére utaló jel az volt, hogy a NO-szint és a SNO-tartalom magasabb volt a *max1-1* és *max2-1* strigolaktonszintézisben és -jeltávitelben hibás növényekben, mint a vad típusban. A *max* mutánsok magas NO-tartalma összefüggésben lehet a GSNO-szintjükkel, amit a GSNOR enzim szabályoz. A *GSNORI* gén kifejeződésében nem volt jelentős különbség a növényvonalak között, az enzimfehérje mennyisége és aktivitása azonban alacsonyabb volt a vad típushoz képest. Ez egyrészt magyarázhatja a mutánsok megnövekedett NO- és SNO-szintjeit, másrészt felveti a lehetőségét annak, hogy a strigolaktonhiány poszttranszkripcionálisan regulálja a GSNOR enzimet, így befolyásolva a SNO/NO-szinteket. A magas NO/SNO-szintet mutató *gsnor1-3* lúdfűben a strigolaktonbioszintézis gének (*CCD7*, *CCD8*, *MAX1*) alulszabályozottak voltak, ami a fordított irányú hatásra, vagyis a NO/SNO-szintek strigolaktonszintézist gátló hatására enged következtetni. Az adatok további megerősítése céljából vizsgáltuk a *gsnor1-3* mutáns strigolaktonanalógra (*rac-GR24*) adott válaszát. A vad típusban a GR24 a korábban publikáltaknak megfelelően (pl.

Ruyter-Spira és mtsi. 2011, Marzec 2016) FGY-megnyúlást okozott, azonban a *gsnor1-3* kezelésre mutatott érzéketlensége arra utal, hogy funkcionális GSNOR enzim szükséges a strigolakton gyökérmegnyúlást fokozó hatásának érvényesüléséhez. A fordított irányú jelkapcsolat is igazolást nyert a gyökérmegnyúlás kísérletekben, hiszen a *max* mutánsok érzéketlensége az exogén GSNO gyökérrövidülést kiváltó hatásával szemben azt sugallja, hogy megfelelően működő strigolakton-jelátvitel szükséges a NO gyökérhosszra kifejtett hatásához. Mivel a NO gyökérfajlódást befolyásoló hatása tehát részben a strigolakton-jelátvitelen keresztül valósul meg, a strigolaktonok hatása a GSNOR-szabályozott NO-szintekre egy kompenzációs visszacsatolási mechanizmusként valósulhat meg. Ezek – és további itt be nem mutatott – eredmények egyértelművé teszik, hogy a GSNOR által szabályozott NO és SNO és a strigolaktonok között kölcsönösen negatív regulációs kölcsönhatás működik, ami a lúdfű gyökérszerkezetének kialakításában kulcsfontosságú. A *max2-1* mutáció és a *rac-GR24* strigolakton jelátvitelre nem specifikus jellege miatt, az előzőekben bemutatott eredmények esetén, nem lehet egyértelműen kizárni a karrikin hatását. A karrikin és a strigolakton jelátviteli útjainak különválasztása céljából felhasznált receptormutánsok (*htl3=kai2* karrikin receptor-mutáns, *d14* strigolaktonreceptor-mutáns) gyökerében detektált magas NO-szintek arra utalnak, hogy a NO-jelátvitel kölcsönhat mind a karrikin-, mind pedig a strigolakton-szignáltranszdukció kezdeti lépéseivel. Ezt támasztja alá a *htl3/d14* dupla mutáns előző vonalaknál magasabb NO-szintje. Érdekes módon a karrikin- és strigolaktonreceptorok családjába tartozó harmadik tag, a DLK2 (Végh és mtsi. 2017) receptormutációja szintén emelkedett NO-szintet okoz, ami arra utal, hogy a hatása nem specifikusan a karrikin- vagy a strigolaktonpercepcióra irányul, hanem a receptorcsaládot általánosan érinti. A karrikin jelátvitelének azonban feltehetően nincs kapcsolata a NO-dal, amire a *smax1/smax2* jelátviteli mutánsok vad típus-szerű NO-szintje utal.

Az eredményeinkből levonható általános következtetésünk az, hogy az elemtöbblet mellett növekedő növények gyökércsúcsában a fitohormonok (auxin, citokinin, etilén) és a NO metabolizmusa ellentétesen szabályozódik, ami általában a hormonszint és jelátvitel fokozódásában és ezzel párhuzamosan a NO-szint csökkenésében nyilvánul meg. Az auxin és a NO, a citokinin és a NO, valamint az etilén és a NO között kölcsönösen negatív regulációs kapcsolat áll fenn, aminek hozzájárulását a gyökérmegnyúlás válaszkhoz több rendszerben bizonyítottuk. A stresszmentes körülmények között fejlődő növény gyökerében a strigolaktonok GSNOR-függő módon szabályozzák a NO/SNO-szinteket, a NO pedig génexpressziós szinten visszahat a strigolaktonszintekre és -jelátvitelre. A két molekula gyökérmegnyúlásra gyakorolt hatása ellentétes, és egymás részvételével valósul meg. Legújabb

eredményeink arra utalnak, hogy a NO növekedésszabályozó szerepe kapcsolódik a karrikin-jelátvitellel is, sőt feltehetőleg a D14, KAI2 és DLK receptorokat magába foglaló teljes receptorcsaládra kiterjed.

6.4. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEMTÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKULÁSÁBAN

A rézterhelt, NO-túltermelő és -alultermelő *A. thaliana* vonalak életképességének összevetése azt az eredményt hozta, hogy enyhe stressz során a magas endogén NO-szint fokozza a rézérzékenységet, súlyosabb rézterhelés mellett azonban a réztűréshez járul hozzá. Ez azt jelenti, hogy a NO-jelátvitel hatása a stressz erősségétől függ. A kis rézkoncentráció életképességre gyakorolt negatív hatása visszafordítható volt a *nox1* vonal magas NO-tartalmának csökkentésével. A NO réztűrést fokozó hatására utal továbbá az is, hogy a vad típus NO-szintjének emelése külső NO-adagolással jelentős réztűrést okozott, míg a NO eltávolítása fokozta az érzékenységet az alacsonyabb rézdózisok mellett is. A *nia1nia2* mutáns NO-szintjének NO-donorral való megemelése minden rézkoncentráció mellett növelte a tűrőképességet. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NO-jelátvitel hozzájárul a növények réztűréséhez. A NO abiotikus és biotikus stresszrezisztenciában betöltött szerepe számos kísérleti rendszerben igazolást nyert. Például a NO-túltermelő paradicsommutáns (*shr*) nagyfokú betegség-ellenállóságot mutat (Negi és mtsi. 2010). Továbbá a *nia1nia2* mutáns vízstresszel szemben érzékenynek mutatkozott (Lozano-Juste és León 2010). A ROF-túltermelő *vtc2-1* és *vtc2-3* vonalak gyenge réztűrése és a rézterhelt *miox4* jobb életképessége arra enged következtetni, hogy a fokozódó ROF-jelátvitel a rézindukált károsodáshoz járul hozzá, míg az aszkorbinsav túltermelése következtében lecsökkent endogén ROF-tartalom a réztűrésnek kedvez. Eredményeinkhez hasonlóan a *vtc2* mutánsok más stresszfaktorokkal szemben (pl. fotooxidatív stressz, hő- és ózonstressz) is érzékenynek bizonyultak (Smirnoff 2000, Müller-Moulé és mtsi. 2004, Larkindale és mtsi. 2005, Bellini és de Tullio 2019), ami alátámasztja azt, hogy a ROF-jelátvitel a másodlagos oxidatív stressz kiváltásán keresztül fokozza a stresszérzékenységet. A NO túltermelése esetén a növények $O_2^{\bullet-}$ -tartalma alacsony volt, a NO alacsony szintje pedig nagy endogén $O_2^{\bullet-}$ -tartalmat alakított ki, ami arra utal, hogy stresszmentes körülmények között a NO szabályozza a $O_2^{\bullet-}$ -szintet, aminek mechanizmusa lehet a NO és a $O_2^{\bullet-}$ között lejátszódó, ONOO⁻-képződéshez vezető kémiai reakció (Koppenol és mtsi. 1992), vagy a NO antioxidáns enzimek aktivitását szabályozó képessége (Wani és mtsi. 2021). A $O_2^{\bullet-}$ képzéséért a NOX enzim a felelős a rézterhelt *A. thaliana* gyökerében (Opdenakker és mtsi. 2012). A NO túltermelése esetén (*nox1*, *gsnor1-3*) a rézindukált NO-

akkumuláció elmaradását okozhatta az, hogy a NO *S*-nitroziláció révén inaktiválja a NOX enzimet (Yun és mtsi. 2011). A réz hatására a H₂O₂-szintek csökkentek abban az esetben, ha a NO nagy koncentrációban volt jelen a növényekben. Ennek magyarázata az lehet, hogy a NO indukálja az antioxidáns enzimek génjeinek kifejeződését (Grün és mtsi. 2006), és poszttranszlációsán is aktiválhatja azokat *S*-nitrozilációs reakción keresztül (Begara-Morales és mtsi. 2016). Továbbá a NO alacsony endogén szintje esetén a rézterhelés O₂^{•-}-szint-csökkenést és H₂O₂-szint-növekedést okozott, ami a SOD általi detoxifikációs mechanizmus aktiválódását feltételezi, ugyanis a NO mellett az antioxidánsok aktivitását számos más faktor is szabályozza. A megváltozott aszkorbátmetabolizmusú és ROF-szintű mutánsok alacsony endogén NO-szintje arra utal, hogy a NO-metabolizmust szigorúan szabályozott ROF-szint regulálja. A NO-szintek, rézindukált nem szignifikáns változásai alapján feltételezhetjük, hogy rézstressz során a ROF nem gyakorol jelentős hatást a NO-metabolizmusra. Az alacsony NO-szinttel rendelkező *nia1nia2noal-2* tripla mutáns *A. thaliana* rézérzékenységének tanulmányozása megerősítette a korábbi eredményeinket, miszerint a csökkent NO-szint rézzel szembeni szenzitivitást okoz, és az életképesség-vesztés enyhíthető a NO kívülről való adagolásával. A NO-kezelés rézstresszt enyhítő hatását kimutatták többek között búzában, paradicsomban, rozsbán (*Secale cereale* L.) és dohányban (*Nicotiana tabacum* L.), ahol a NO hatása főként az antioxidáns-rendszer felülszabályozása révén valósult meg (összefoglalva Rather és mtsi. 2020 által). A mutáns rézérzékenységéhez az alacsony NO-tartalmán túl feltehetően a magas ROF-tartalma (intracelluláris és nagy reakcióképességű ROF) is hozzájárul, ami bár nem fokozódik a rézterhelés hatására, de sokkal magasabb, mint a vad típusban. Ez az eredmény alátámasztja a korábbi megállapításunkat, miszerint a NO- és a ROF-szintek antagonistá módon változnak a kezelést nem kapott és a rézkezelt növényekben egyaránt. Ennek az antagonizmusnak a hátterében a már korábban leírt mechanizmusok, vagyis a NO ROF-metabolizmust szabályozó hatásai állhatnak, amik elsősorban az antioxidánsok és szintézisenzimek génexpressziós (Grün és mtsi. 2006) vagy poszttranszlációs (Begara-Morales és mtsi. 2016) szintű regulációja révén valósulnak meg.

A szelenit jelenlétében az *etr1-1* *A. thaliana* vonal – melyben az etiléntartalom a vad típuséhoz hasonló – kismértékű életképesség-vesztése arra utal, hogy az etilén-jelátvitel hibája szelenittűrést alakít ki, vagyis a normál etilénérzékelés és -jelátvitel fokozza a szelenérzékenységet. Továbbá ez az eredmény azt is sugallja, hogy a szelenitérzékelés összefügg az etilén hormon érzékelésével a lúdfű gyökerében. Ami az endogén etiléntartalmat illeti, Tamaoki és munkatársai (2008) szelenit jelenlétében jelentősen megnövekedett etilénszintet mutattak ki, ami szükségesnek bizonyult a kénasszimilációban szereplő gének

indukciójához. Korábbi eredményünk igazolta, hogy az *etr1-1* vonalban az endogén etilénszint jelentősebben megnő szelenitkezelés hatására, mint a vad típusban, ami a kénasszimiláció javításán keresztül hozzájárulhat a nagyobb mértékű szelenittűréshez. Az *etr1-1* mellett a citokinintúltermelő *ipt-161* vonal is szelenittűrőbbnek bizonyult, ami feltételezi a citokinineknek a széles körű szelenittoleranciában játszott szerepét. A nagy citokininszint a szelénmetabolizmusban érintett *ADENOZIN-FOSZFOSZULFÁT-REDUKTÁZI (APR1)* gén kifejeződését indukálja (Ohkama és mtsi. 2002), hozzájárulva ezzel a tűréshez. Megemlítendő, hogy a NR egy citokinin által indukálható enzim (Samuelson és mtsi. 1992), tehát a nagy citokinintartalom által fokozott aktivitású enzim hatékony nitrogénmetabolizmushoz járulhat hozzá, így növelheti a szelenittel terhelt növény életképességét. Az *ipt-161* vonal szelenittűrése megerősítést nyert egy további kísérletsorozatban is, azonban a vad típusú növények exogén citokininnel (BA) való kezelése jelentősen rontotta az életképességet szelenit jelenlétében és hiányában is. Az ellentmondó eredmények magyarázata az lehet, hogy a BA nagy koncentrációban sejthalált indukál (Carimi és mtsi. 2005), ami fennállhat az általunk alkalmazott rendszerben. Ugyanakkor az *ipt-161* mutáns a zeatint tartalmazza nagy koncentrációban, a külső kezelés azonban egy másik citokininformával, a BA-nel történt, ami felveti a lehetőségét annak, hogy a citokininek szelenittűrésre (csakúgy, mint a NO-tartalomra) gyakorolt hatása függ a citokinin típusától. A nagy endogén citokininszint szelenittűrést fokozó hatását megerősíti az, hogy az alacsony endogén citokinintartalommal bíró *35S::CKX2* szelenitérzénynek bizonyult. Továbbá a hibás citokinin-jelátvitelű *cyr A. thaliana* vonal szelenitérzékenysége arra utal, hogy a citokininérzékelés és -jelátvitel normál működése szükséges a szelenittolerancia mechanizmusainak aktiválódásához. A NO túltermelése teljes mértékben megakadályozta a szelenitindukált életképesség-vesztést, az alacsony NO-tartalmú *nia1nia2* mutáns pedig szelenitérzékenységet mutatott, ami arra utal, hogy a nagy NO-szint rontja a szelenitérzékelést, az alacsony NO-tartalom pedig kedvez annak. Ezek az eredmények együttesen a NO-jelátvitelnek a szelenitérzékelésben és -stresszválaszban játszott szerepére utalnak. Ezt támasztja alá az, hogy a NO exogén adagolása a szelenit mellett jelentős mértékben fokozta a vad típusú növények tűrését. A NO stresszt enyhítő hatását felismerték más kedvezőtlen környezeti hatások esetén is, mint pl. a szárazság, a só- vagy nehézfémterhelés (összefoglalva Nabi és mtsi. 2019 által). A szelenitstressz egyik következménye a növényi sejtekben az oxidatív stressz (Kolbert és mtsi. 2019a), ami a NO antioxidatív hatásának célpontja lehet.

A NO-jelátvitel cinktoleranciában játszott szerepének vizsgálatához a korábban is alkalmazott, NO-túltermelő *gsnor1-3* mutáns mellett alkalmaztuk a *35S::FLAG-GSNORI*

vonalat is, melyben a GSNOR enzim túl van termeltetve. A *gsnor1-3* vonal általunk tapasztalt nagyfokú cinktűrése egybecseng a réz- és szelenittűrésével, azonban ellentmond a korlátozott betegség-ellenállósági képességével és mérsékelt hőtűrésével (Feechan és mtsi. 2005, Lee és mtsi. 2008), ami arra utal, hogy a SNO-jelátvitel pozitív és negatív irányban is képes szabályozni a stresszválaszokat a stressz természetétől függően. A *gsnor1-3* cinktoleranciájának hátterében nem mutattunk ki a vad típustól eltérő mértékű cinkfelhalmozást a gyökér felszívási zónájában, vagyis a mutáns cinktoleranciája nem csökkent mértékű felvétel következménye. A vad típusban tapasztalt cinkindukált NO-produkció háttérmechanizmusaként feltételezhetjük a kialakuló vashiányt, ahogy azt fekete csucor (*Solanum nigrum* L.) gyökércsúcsában valószínűsítették (Xu és mtsi. 2010), illetve a fémindukált GSNO-lebomlás is vezethet NO-képződéshez a kísérleti rendszerünkben. Érdekes módon a *gsnor1-3* mutánsban a cinkterhelés nem vezetett a NO- és az SNO-szint növekedéséhez, ami a GSNOR-aktivitás hiányában egy GSNOR-független SNO/NO-szint-szabályozást feltételez. A NADPH-függő tioredoxin-reduktáz rendszer közvetlen és szelektív denitrozilációs aktivitást mutató enzimerendszernek tekinthető, amely időben és térben regulálja az SNO-jelátvitelt (Umbreen és mtsi. 2018). Az NTR enzim aktivitását megnövelte a cink a *gsnor1-3*-ban, ami feltételezi, hogy az NTR részt vesz a NO/SNO-szintek szabályozásában a GSNOR enzim hiányában, cinkterhelés esetén. A *THIOREDOXIN (TRX)* gén kifejeződését a cink nem befolyásolta a *gsnor1-3* vonalban, bár nem zárható ki, hogy a cink jelenlétében a TRX-aktivitás poszttranszkripcionálisan szabályozódik. Összefoglalva, az eredmények azt sugallják, hogy a vad típusú és a GSNOR-túltermelő vonalban a cink fokozza az SNO-jelátvitelt, míg a GSNOR-enzim-hiányos vonalban az NTR-aktivitás cink általi fokozódása részt vesz az SNO-jelátvitel korlátozásában. A GSNOR-enzimaktivitás csökkenése a vad típusban és az enzimet túltermelő vonalban nem járt együtt a fehérjemennyiség csökkenésével, ami arra utal, hogy a cinkkezelt növényben jelen lévő GSNOR enzimállomány nagy része inaktív lehet. A *GSNORI* gén kifejeződését a cinkterhelés nem befolyásolta egyik növényvonalon sem, ami feltételezi, hogy a GSNOR-aktivitásban bekövetkező cinkindukált változások poszttranszkripcionális szinten történnek. A GSNOR enzim cink indukálta inaktíválódásának egyik mechanizmusa az lehet, hogy a képződő H_2O_2 a GSNOR katalitikus helyén lévő ciszteineket oxidatív módon módosítja, így cinkion-felszabadulást okoz, ezáltal inaktíválva az enzimet (Kovács és mtsi. 2016). Amikor glutation külső adagolásával csökkentettük a cinkindukált H_2O_2 -felhalmozódást a vad típusban és a GSNOR-enzimtúltermelő vonalban, akkor a GSNOR aktivitásvesztése megszűnt, vagy mértéke csökkent, ami bizonyítja a H_2O_2 közvetlen szerepét a GSNOR cinktöbblet általi

inaktiválódásában. A H_2O_2 által indukált, feltételezett cinkion-felszabadulás következtében fellépő fehérjeszerkezeti változásra utal az is, hogy a GSNOR-fehérje gélben való futási tulajdonsága kissé megváltozik. A cinktöbblet hatására bekövetkező ROF-képződés főleg az apoplastban (Morina és mtsi. 2010) és a citoplazmában történik más esszenciális fémek homeosztázisának felborulása következtében (pl. vas, Schützendübel és Polle 2002), és a citoplazmában a GSNOR célpontja lehet a ROF – köztük a H_2O_2 – módosító hatásának.

Minden általunk vizsgált rendszerben mutáns lúdfüvonalak és farmakológiai módszerek felhasználásával igazoltuk, hogy a NO-, illetve az SNO-kapcsolt jelátvitel fokozza a réz-, a cink- és a szelénterheléssel szembeni toleranciát. Mindhárom elem többlete ROF-túlprodukciónak okoz, aminek mértéke összefüggést mutat az elemérzékenységgel. Eredményeink feltételezik, hogy a NO mérsékeli az elem-többletek által okozott ROF-produkciót, ami irodalmi adatok alapján az antioxidáns-rendszer szabályozása révén valósulhat meg.

6.5. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV JELÁTVITEL KIALAKÍTÁSÁBAN ELEMTÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN

A cinkterhelt *A. thaliana*-ban a NO- és SNO-szint növekedése maga után vonta a fehérje S-nitroziláció kismértékű fokozódását, amit RSNO-RAC módszerrel mutattunk ki. A proteomra gyakorolt kismértékű hatás annak a következménye lehet, hogy az általunk alkalmazott cinkkoncentráció csupán enyhe stressznek felelt meg. A fehérjetargetek azonosítása során a biológiai ismétlésekből származó adatok meglehetősen nagy szórását tapasztaltuk (3. táblázat), ami a RSNO-RAC eljárás nagyfokú komplexitásával magyarázható, és azzal, hogy a növényeket három független kísérletben neveltük. Tíz fehérje mutatott olyan mértékű dúsulást (+Asc/-Asc arány nagyobb, mint 1,5) mindhárom biológiai ismétlésben, ami ígéretes S-nitrozilációs célponttá teszi azokat (3. táblázat). Ezek között az aszkorbát peroxidáz 1 csak és kizárólag a cinkterhelt mintában mutatott S-nitrozilációt. Irodalmi adatok szerint az APX1 fehérje 32. ciszteinjén történik az S-nitrozilációs reakció, ami az enzim aktiválásához vezet (Begara-Morales és mtsi. 2014, Yang és mtsi. 2015). Ezzel ellentétben az APX-aktivitás és a fehérjemennyiség cink hatására csökkent mindhárom *A. thaliana* vonalban, bár a 35S::FLAG-GSNOR1 vonalban a cink által okozott fehérjemennyiség-csökkenés kisebb mértékű volt. Ez arra utal, hogy míg a vad típusú és GSNOR-hiányos lúdfüben a cink a fehérjemennyiség redukálása révén csökkenti az APX-aktivitást, addig a GSNOR túltermelése enyhíti a fehérjemennyiség csökkenését, így a fehérjeabundancia jelentős csökkentése nélkül okozza az APX inaktivációját. A kataláz (KAT3) S-nitrozilációs célpontnak bizonyult *in vitro*, és az összes KAT-aktivitás cinkindukált csökkenést mutatott, aminek oka lehet többek között

fehérjenitráció, hiszen mindkét enzimről igazolást nyert korábban, hogy átesnek tirozinnitrációs módosuláson (Begara-Morales és mtsi. 2014, Chaki és mtsi. 2015). A nitrozatív stressz markerének tekinthető proteintirozin-nitráció az alacsony molekulatömegű fehérjesávokban (16-30 kDa) volt kimutatható az optimális cinkellátottságú és a cinktöbblet mellett nőtt vonalakban is. Ez a fiziológiásnak tekinthető nitroproteom mindhárom növényvonalban hasonló méretű volt, megegyező nitrációs mintázat mellett. Az, hogy az optimális feltételek között növekedő, egészséges növényekben a fehérjeállomány egy része nitrált, arra utal, hogy a proteintirozin-nitráció lehet egy alapvető fehérjeaktivitás-szabályozási mód. Hasonlóan eredményeinkhez, a fehérjék bazális nitrációs állapotát mutatták ki fiziológiás folyamatokban (összefoglalva Corpas és mtsi. 2021). A fehérjesávok nagy része esetén tapasztalt nitrációs erősödés a vad típusban és a GSNOR-túltermelő vonalban arra utal, hogy a cinkterhelés kismértékben fokozza a proteom nitrációját, de újonnan nitrált fehérjesávok megjelenését nem eredményezi. A *gsnor1-3* vonalban tapasztalt enyhe cinkindukált nitrációsökkenés feltételezett, bár növényekben még nem ismert denitrációs mechanizmusok aktiválódásának vagy a fokozódó fehérjebontásnak (Kolbert és mtsi. 2017) tudható be.

A NO/SNO-jelátvitel és a cinkstressz összefüggéseit vizsgáló kísérleteink fő következtetése az, hogy a cink indukálta H_2O_2 közvetlenül részt vesz a GSNOR inaktivációjában, így pozitívan szabályozza a NO- és SNO-szinteket, amik többek között az APX1 enzim *S*-nitrozilációjához vezetnek. Az APX és a KAT aktivitásában bekövetkező változások befolyásolhatják a H_2O_2 -szinteket a cinkterhelt növényekben. Ez az jelenti, hogy a H_2O_2 egy SNO-jelátvitelt involváló önszabályozó folyamatban befolyásolja a saját szintjét. Ezek az eredmények a ROF- (H_2O_2) és NO/SNO-jelátvitel között működő szabályozó kölcsönhatásra hívják fel a figyelmet a cinkstressznek kitett növényben.

A Brassica fajok cinktüresét összehasonlító kísérletünk eredménye az lett, hogy az emelkedő cinkkoncentrációk mellett a *Brassica juncea* fenn tudta tartani a gyökérmerisztémájának életképességét, ezzel nagyfokú cinktürest mutatva a *Brassica napus*-szal szemben, ami a csökkenő életképessége okán relatíve cinkérzékenynek bizonyult. A két Brassica faj eltérő toleranciája felveti a lehetőségét a cinkérzékenység fajspecifitásának. A *B. napus* cinkérzékenységéhez a kisebb cinkkoncentrációk hatására $O_2^{\bullet-}$ -produkciónak és minden cinkdózis esetén jelentkező SOD-enzimaktivációnak társult, ami arra utal, hogy a SOD aktiválódása nem tudta kompenzálni a $O_2^{\bullet-}$ képződését enyhébb cinkterhelés esetén, de csökkentette azt fokozott cinkstressz mellett. A cinktürebb *B. juncea* gyökerében feltehetőleg az indukálódó SOD-aktivitás összefüggésben lehet a csökkenő $O_2^{\bullet-}$ -szinttel, míg az alacsonyan maradó H_2O_2 -szinteket nem magyarázzák az APX-aktivitás változásai, tehát a H_2O_2 -szintek

kontrollálásában egyéb, APX-független mechanizmusok (pl. kataláz, glutationrendszer) vehetnek részt. Ehhez hasonlóan a *B. napus*-ban jelentkező jelentős cinkindukált H_2O_2 -képződés sincs összefüggésben az APX enzim aktivitásával. Eredményeinkhez hasonlóan, cinkindukált ROF-képződést és bizonyos antioxidáns enzimek aktivitásában beálló változásokat tapasztaltak többek között cukorrépában (*Beta vulgaris* L. subsp. vulgaris), paprikában (*Capsicum annuum* L.), kávéban (*Coffea arabica* L.) (Jain és mtsi. 2010, Kaya és mtsi. 2018, dos Santos és mtsi. 2019).

A *B. juncea* gyökércsúcsában a cinkstressz által indukált NO-képződést tapasztaltunk, aminek háttérében feltételezhető vashiányt (Xu és mtsi. 2010) nem mutattunk ki a Brassica fajokban (adatok nincsenek bemutatva). Lehetséges továbbá az elsősorban a gyökérben a NO-szintézishez hozzájáruló NR enzim aktiválódása. További lehetőség a cinkindukált NO-képződésre (a korábban leírtak szerint) a GSNO, mint mobilis NO-raktár fémkatalizált bomlása (Smith és Dasgupta 2000). A szignifikáns, cinkindukált ONOO⁻-tartalom növekedése magyarázhatja a kismértékű NO-akkumulációt, mivel a képződő NO egy része feltehetőleg ONOO⁻-té alakul. Ezt a feltételezést alátámasztja a *B. juncea*-ban csökkenő $O_2^{\bullet-}$ -szint, míg a *B. napus* esetén a $O_2^{\bullet-}$ -szintek magasak maradnak, és feltehetőleg kevesebb ONOO⁻ képződik ezen az útvonalon. A cink hatására kisebb-nagyobb mértékben megnövekedő ONOO⁻-szint következményeként mindkét fajban a fehérjetirozin-nitráció fokozódását tapasztaltuk, vagyis igazoltuk a cinkterhelés fehérjenitrációt fokozó hatását Brassica fajokban is. Az optimális cinkellátás mellett nőtt Brassica fajokban hét nitrotirozin-immunpozitív fehérjesáv volt detektálható, ami alátámasztja a fiziológiás nitroproteom meglétét. Mivel a kontrollban is jelen lévő nitrált fehérjesávok nitrációja fokozódott újabb nitrált fehérjesávok megjelenése nélkül, ezért elmondható, hogy a cinkterhelés nem változtatja meg a nitrációs mintázatot. Továbbá mivel mindkét fajban hasonló mértékű nitrációfokozódás mutatkozott a cinkterhelés hatására, tehát kijelenthető, hogy a Brassica fajok proteomja hasonló mértékben érzékeny a nitrációs módosulásra. Stresszindukált fehérjenitráció-fokozódást mutattak ki többek között vízhiányos szarvaskerepben (*Lotus japonicus* L.) (Signorelli és mtsi. 2013), alacsony hőmérsékleten nevelt lúdfűben (Begara-Morales és mtsi. 2019) és indiummal kezelt búzában (Zhao és mtsi. 2022). A ONOO⁻ peroxinitrites sav (ONOOH) képződésén keresztül lipidperoxidációhoz is vezethet, ami a *B. napus* gyökércsúcsában kimutatható volt, a *B. juncea* esetében azonban nem. Ez arra utal, hogy a cinktűrő *B. juncea* nem szenved el oxidatív károsodást. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy e cinktűrő faj enyhe ROF-produkcióval és az antioxidáns enzimek aktiválódásával válaszolt a cink-többletre, vagyis jelentős cinkindukált oxidatív stresszt nem mutatott. Bár a NO és a ONOO⁻ nagyfokú képződése és a fehérjenitráció fokozódása cinkindukált nitrozatív

stresszre utal a *B. juncea*-ban. A nitrozatív stresszjelátvitel az érzékeny *B. napus*-ban is fokozódott, de ebben a fajban ezt cinkindukált oxidatív stressz is kísérte, vagyis nitro-oxidatív stresszről beszélhetünk. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a cinkkel szembeni érzékenységet az oxidatív stresszfolyamatok inkább meghatározzák, mint a nitrozatív stressz, hiszen annak megjelenése a cinktűréstől függetlennek bizonyult.

A hosszabb távú cinkterhelés fehérjenitrációra gyakorolt hatásának vizsgálata során kiderült, hogy az egészséges Brassica fajok hajtásának fehérjeállománya nagyobb mértékben nitrált, mint a gyökér fehérjéi, ami a fehérjetirozin-nitráció szervspecifitására utal. A cinkterhelés különbözőképpen módosítja a nitrációs mintázatot a fajok hajtásproteomjában, míg a gyökérben általános, cinkindukált nitrációs erősödés (új, nitrált fehérjesávok megjelenése nélkül) tapasztalható, és ez a *B. juncea* esetén jelentősebbnek bizonyult a *B. napus*-hoz képest.

A Brassica fajokat cink-oxid NP jelenlétében csíráztatva igazoltuk, hogy az alacsonyabb NP-koncentráció pozitívan hat mindkét faj gyökérnövekedésére, a nagyobb dózis pedig káros hatású. A Brassica fajoknak a gyökérmerisztéma-sejtek életképességéből következően érzékenysége azonban különböző, hiszen a *B. napus* jelentős életképesség-vesztésével szemben a *B. juncea* csak kisebb mértékű érzékenységet jelzett. Az adatok azt is mutatják, hogy nincs egyértelmű összefüggés a merisztémasejt-életképesség és a gyökérhossz között, amit az magyarázhat, hogy a merisztémasejtek aktivitása/osztódása mellett a gyökérhossz sejtmelegnyúlási folyamatok is szabályozzák, melyeket többek között sejtformálódások és fitohormonok jelátvitel is nagyban befolyásol. Khan és munkatársai (2019) kimutatták, hogy az etilénszintézisben és -jelátvitelben érintett gének kifejeződését és az etilénszintet jelző *EBS::GUS* aktivitását a cink-oxid nanorészecskék fokozták *A. thaliana*-ban. A cink-oxid NP-kezelés koncentrációjával arányos szöveti cinkion-felhalmozódás mindkét faj mindkét szervében azt sugallja, hogy a NP-ok jelentős mennyiségű cinkiont szabadítanak fel feltehetőleg a gyökér felszínén bekövetkező biotranszformációs folyamatban (López-Moreno és mtsi. 2010). A NP-ok jelenlétében fejlődő gyökérzetben a tízszeres cinkkoncentráció a hajtáshoz képest pedig arra utal, hogy a felvett cink nagy része a gyökérben raktározódik, feltehetőleg a vakuólumokban. Ugyanakkor gyökér-hajtás irányú cinktranszlokáció is történik, ami a xilémekben maláttal, citráttal vagy hisztidinnel alkotott cinkkomplexek formájában valósulhat meg (da Cruz és mtsi. 2017). Babnövényben (*Phaseolus vulgaris* L.) a cink-oxid NP (~40 nm) kezelés a xilémbe irányuló cinkiontranszportban szereplő gének (*HMA2*) és a vakuólumba irányuló cinkion-kompartmentalizációban szereplő gének (*NRAMP3,-4* és *-8*) kifejeződését indukálja (da Cruz és mtsi. 2019), ami alátámasztja a nano-cink-oxid cinkioneloszlást tanszkripcionális szinten befolyásoló szerepét. A Brassica fajok cinktranszlokációs

kapacitásában különbség adódott, hiszen a cink-oxid NP-kezelt *B. juncea* a gyökeréből a hajtásába több cinket transzlokált, így megvalósulhatott a cinktöbblet optimális elosztása a szervek között, ami hozzájárulhatott a faj nagyobb fokú cink-oxid NP-tűréséhez. Azon túl, hogy a cink-oxid NP-ok jelenlétében fokozódik a növényi szövetek cinkiontartalma, az általunk alkalmazott kisméretű (~8 nm) nanorészecskék bejutottak a gyökérsejtekbe a plazmodezmákon keresztül, amelyek 5 és 30 nm közötti átmérőjüknel fogva a kisebb nanorészecskék vagy aggregátumok átjutását támogatják, és lehetővé teszik, hogy azok elérjék a plazmamembránt (López-Moreno és mtsi. 2010). A további, plazmamembránon keresztüli internalizáció lehetséges endocitózissal, szállítófehérjék aktivitása révén vagy ioncsatornákon keresztül megy végbe (Kurczyńska és mtsi. 2021). A gyökérsejtek falának középlemezében és a gyökérsejtek mitokondriumaiban is kimutathatók voltak a cink-oxid nanorészecskék, és a fajok között nem volt különbség az internalizációban. Hasonlóképp Lin és Xing (2008) kimutatták a nanorészecskék (~8 nm) jelenlétét az árpagyökér vaszkuláris és endodermális sejteinek citoplazmájában. Egy másik tanulmányban a cink-oxid NP-ok internalizációját kimutatták az epidermiszben, a kéregsejtekben és a gyökércsúcsban, de a nanorészecskék hajtásba való transzlokációja nem volt detektálható (Lv és mtsi. 2015). A mi kísérleteink sem igazoltak NP-jelenlétet a hipokotilsejtekben (adatok nincsenek bemutatva), ami alátámasztja azt, hogy a cink-oxid NP-ok nem transzlokálódnak a hajtásba. A növényi sejtekbe bejutott nanorészecskék, illetve a biotranszformáció révén felhalmozódott cinkion az oxidatív jelátvitel fokozódását okozhatja. A relatíve toleráns *B. juncea* gyökerében a NP nagyobb mértékben fokozza SOD (izoenzimek) aktivitását, mint az érzékenyebb *B. napus*-ban. Ugyanakkor a cink-oxid NP NOX aktivitásra és a $O_2^{\bullet-}$ -szintekre gyakorolt hatását illetően nem volt kimutatható fajfüggő különbség. A H_2O_2 -szintek cink-oxid NP-indukált csökkenése csak a 100 mg/L cink-oxid NP-kezelt *B. juncea* esetén volt magyarázható az APX-aktivitás növekedésével. A nem enzimatisz antioxidánsok mennyiségi vizsgálata rávilágított, hogy az aszkorbát-kapcsolt redox jelátvitel a toleráns *B. juncea*-ban megemelkedik az alacsonyabb NP-dózis esetén, míg a szenzitív *B. napus*-ban az kevésbé kifejezett, és csak a 100 mg/L NP-koncentrációban történik meg. A glutationkapcsolt antioxidáns folyamatok a cink-oxid NP-kezelt *B. napus*-ban indukálódnak, vagyis az aszkorbát- és a glutationrendszereknek a cink-oxid nanorészecskék jelenlétére utaló indukálhatósága fajfüggő jelleget mutat. Meg kell jegyezni továbbá azt, hogy a vizsgált antioxidáns enzimek aktivitásában és a nem enzimatisz antioxidánsok mennyiségében bekövetkező NP-indukált fajfüggő változások ellenére a ROF-szintek hasonló változásokat mutattak a fajokban. Ez arra utal, hogy további, általunk nem tanulmányozott metabolikus folyamatok játszhatnak szerepet a ROF-szintek kontrollálásában a cink-oxid NP-mal terhelt

növényekben. A cink-oxid nanorészecskék ROF (főként $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2) generáló és/vagy antioxidáns (főként APX, KAT, aszkorbát és glutation) moduláló hatását jellemezték többek között békalencsében (*Lemna minor* L.) (Hu és mtsi. 2013), búzában (Tripathi és mtsi. 2017), és Arabidopsis-ban (Kahn és mtsi. 2019). Például Tripathi és munkatársai (2017) eredményei szerint a cink-oxid NP-kezelés annak következtében növelte meg a H_2O_2 szintjét, és fokozta a lipidperoxidációt, hogy súlyosan gátolta az aszkorbát-glutacion ciklus enzimeinek aktivitását, és csökkentette magának az aszkorbátnak és a glutationnak a mennyiségét. A NO és a ONOO⁻ szintje a ROF-kal ellentétben fajfüggő módon változott a cink-oxid NP jelenlétében, hiszen csak a *B. juncea*-ban mutattunk ki növekedést. Mivel – ahogyan azt korábban említettem – a GSNO fémkatalizált bomlása vezethet NO-képződéshez, megvizsgáltuk a GSNO-szintek összefüggését a NO-szintek változásaival, de nem mutattunk ki egyértelmű kapcsolatot a GSNO és a NO szintjeinek cinkindukált módosulásai között. Ez azt sugallja, hogy elsősorban nem a GSNO lebomlása felelős a cink-oxid NP által indukált NO-produkcióért. Mivel mind a GSNO, mind pedig a NO felszabadulás nélküli lebontásáért felelős GSNOR-aktivitás csökkent a cink-oxid NP hatására, az enzim aktivitását nem lehetett összefüggésbe hozni a GSNO-szintekkel. A GSNOR aktivitáscsökkenését a fehérjemennyiség növekedése kísérte a nagy cink-oxid NP-dózis esetén, ami arra utal, hogy a regulációs hatás nem a transzláció szintjén valósul meg, hanem a cink-oxid NP a meglévő GSNOR enzimeket inaktíválja. Ennek egy – előzőekben bemutatott – lehetséges mechanizmusa a cink-oxid NP által kiváltott ROF/ H_2O_2 -felhalmozódás következtében történő GSNOR-inaktiváció (Kovács és mtsi. 2016). A nitro-oxidatív stressznek a fehérjék szintjén megvalósuló következménye a fehérjenitráció mellett a karboniláció. A két Brassica faj gyökerében hasonló mértékű, fiziológias fehérjekarbonilációt mutattunk ki. Az oxidatív károsodást indukáló hatásán túl a fehérjekarboniláció a ROF-jelátvitelt is szabályozza a fehérjék funkciójának és sorsának befolyásolása révén (Matamoros és mtsi. 2018). Ez magyarázza a pozitív hatású, kis dózisos NP-kezelés karbonilációt fokozó hatását mindkét fajban. Az emelt NP-dózis esetén azonban a proteom karbonilációjának csökkenése arra utal, hogy az ily módon módosult fehérjék proteaszómális lebontási folyamatai aktiválódhatnak (Jain és mtsi. 2008). Mivel a karboniláció cink-oxid NP által indukált csökkenése kisebb mértékű volt a *B. juncea*-ban, elképzelhető, hogy ez a faj kevésbé hatékonyan tudja szabályozni az oxidatív fehérjemódosulás mértékét. Az előzőekhez hasonlóan az egészséges növényekben fiziológias nitroproteomot detektáltunk. A *B. napus*-ban a cink-oxid NP-dózisok nem okozták új, nitrált sávok megjelenését a membránon, míg a *B. juncea* gyökereiben néhány új sáv mutatott nitrációt, ami a nitrációs mintázat megváltozását jelenti. A karbonilált fehérjékhez hasonlóan a nitrált fehérjék lebontása is lehetséges a proteaszómákban

a károsodás mérséklése érdekében (Tanou és mtsi. 2012, Castillo és mtsi. 2015), és ez állhat a csökkent nitráció hátterében a nagy cink-oxid NP-koncentrációval kezelt Brassica fajokban. A nitrált fehérjéket a gyökérben *in situ* vizsgálva kiderült, hogy azok a rizodermiszben, az endodermiszben és a központi hengerben, főként a xilém- és a floémsejtek falában lokalizálódnak a kontrollnövényekben, és ez a mintázat nem változik meg jelentősen a NP-stressznek kitett növényekben sem. A nitrotirozinasszociált fluoreszcencia intenzitásának meghatározása kimutatta, hogy a *B. napus*-ban a nagy NP-dózis jelentősebb nitrációt okoz a gyökérben, mint a *B. juncea* esetén. Ami a nitro-oxidatív stressz fehérjeszintű következményeit illeti, a cink-oxid NP által okozott fehérjekarbonilációs válasz a két Brassica fajban hasonló mértékű volt, de a proteinnitrációban a NP-indukált módosulások fajfüggő jelleget mutattak. Összességében elmondható, hogy a *B. juncea* toleránsabbnak bizonyult a cink-oxid NP-kezelésre, mint a *B. napus*. A cink-oxid NP-kezelés cinkion-felszabadulást okozott a Brassica fajok szerveiben, ugyanakkor a kisméretű nanorészecskéket a gyökérsejtek internalizálták, a hajtásba azonban azok nem transzlokálódtak. A cink-oxid NP-kezelés megzavarja a $O_2^{\bullet-}$ és a H_2O_2 homeosztázisát, továbbá módosítja a ROF-metabolikus enzimeket (NOX, SOD, APX) és a nem enzimikus antioxidánsokat (aszorbát és glutation), hasonló mértékű oxidatív jelátvitelt váltva ki mindkét Brassica fajban. A RNF- (NO, ONOO⁻, GSNO) szinteket szintén módosítja a cink-oxid NP jelenléte, de az okozott metabolikus változások különbözőek a fajokban. Továbbá a cink-oxid nanorészecskék változásokat indukálnak a Brassica fajok fehérjekarbonilációjában és -nitrációjában. A fentiek arra utalnak, hogy a cink-oxid nanorészecskék nitro-oxidatív jelátvitelt indukálnak a növényekben, ami hozzájárulhat a toxicitásukhoz.

A *Brassica juncea* gyökérmerisztémájának életképessége – hasonlóan az irodalmi adatokhoz (Smith és Watkinson 1984) – jelentősebben csökkent a szelenit hatására, mint a szelenátkezeléssel, bizonyítva a szelenitnek a szelenátnál toxikusabb viselkedését. A toxicitásbeli igen jelentős különbségek hátterében részben az áll, hogy a szelenit sokkal gyorsabban lép reakcióba aminosavakkal, és épül be a fehérjékbe, mint a szelenát (Lyons és mtsi. 2005). A *B. juncea*-ban egyik kezelés sem befolyásolta a NO-szintet, ami ellentmond a Chen és mtsi. (2014) által mezei mustárban (*Brassica rapa* L.) vagy a kutatócsoportunk által borsóban (Lehotai és mtsi. 2016) kimutatott szelénindukált NO-produkcióval, ami a NO-metabolizmus fajsztintű különbségeire utal a szelénstressz esetén. Az irodalmi adatok szerint a szelén megemeli a szövetek $O_2^{\bullet-}$ -tartalmát (Tamaoki és mtsi. 2008, Freeman és mtsi. 2010), ezt azonban saját kísérletünk csupán a legnagyobb dózisu szelenitkezelés esetén igazolta, míg érdekes módon a szelenátterhelés nem okozta ennek a ROF-nak az akkumulációját. A szelén

antioxidáns-kapacitást növelő jellegével hozható összefüggésbe a 20 μM -os szelenitkoncentráció $\text{O}_2^{\bullet-}$ -szintet csillapító hatása, melyet az irodalom is széleskörűen dokumentált (Djanaguiraman és mtsi. 2010, Ekanayake és mtsi. 2015, Borbély és mtsi. 2021). A ONOO⁻ igen erős makromolekula-módosító hatással bír (Arasimowicz-Jelonek és Floryszak-Wieczorek 2011), így mennyisége utal a nitro-oxidatív stressz erősségére. A szelenátkezelés hatására csökkent mennyiségének a háttérében aktiválódó lebontófolyamatok állhatnak. Az, hogy a szelenit fokozza az erősen prooxidáns és pronitráns ONOO⁻ produkcióját, alátámasztja, hogy a szelenit ugyanazon koncentrációja toxikusabb a szelenáthoz képest. A proteintirozinnitráció fiziológias körülmények között, azaz stresszmentes közegben nevelkedett növényekben való kimutathatóságát ebben a kísérleti rendszerünkben is igazoltuk, és megerősítettük korábbi megállapításunkat, miszerint a *Brassica juncea* esetében a hajtásproteom nitráltsága nagyobb fokú a gyökéréhez képest. A szelenátkezelés enyhe nitrációs mintázat-erősödést okozott mindkét szervben, s bár ez hatással lehetett az aktív proteinállományra, a növények számára kevésbé volt hátrányos. A szelenitkezelés ezzel ellentétben a hajtásban megváltoztatta a növények nitrációs mintázatát (új nitrált fehérjesávok jelentek meg), ami hozzájárulhat a szelénforma jelentősebb toxicitásához. A gyökérben, bár a nitrációs mintázat nem változott, a nitráció mértéke jelentősen emelkedett. A növényi proteinek inaktivációja nitráción keresztül egy igen érzékeny folyamat, így ennek jelentős változásai, akár a szelenit esetében, erős toxicitásra engednek következtetni. Mind a szelenit mind pedig a szelenát pronitráns hatású volt a *B. juncea* növényben, de a nitráció intenzitása és a mintázata függ a szelén kémiai formájától. Továbbá a szelénindukált fehérjenitráció mértéke és mintázata szervfüggést mutat.

A nitro-oxidatív jelátvitel és a szeléntűrés összefüggésének vizsgálatát a korábban bemutatott, *Astragalus* fajokat összehasonlító rendszerben tanulmányoztuk. A szelén toxikus hatásáért részben a ROF-felhalmozódás és ennek következtében fokozódó oxidatív stressz a felelős (Van Hoewyk 2013). A gyorsan képződő káros gyök, a $\text{O}_2^{\bullet-}$ felhalmozódása és a SOD aktiválódása az *A. membranaceus* szerveiben szelénindukált oxidatív stressz bekövetkezésére utal, míg a hiperakkumuláló *A. bisulcatus*-ban jelentős oxidatív károsodás nem volt kimutatható. A $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t előállító NOX izoenzimek tekintetében fajfüggést tapasztaltunk, és az *A. membranaceus* esetében a szelenát új izoenzimek megjelenését eredményezte. Az *A. membranaceus* sziklelevelében több Cu/Zn SOD izoenzim található, mint az *A. bisulcatus*-ban, és a szelenát jelentős mértékben aktiválja a legtöbb izoenzimet. Szelénindukált $\text{O}_2^{\bullet-}$ -felhalmozódást mutattak ki a nem akkumuláló *Stanleya albescens* és az *A. thaliana* fajokban, továbbá a másodlagos akkumuláló mezei mustárban (Tamaoki és mtsi. 2008, Freeman és mtsi.

2010, Chen és mtsi. 2014, Dimkovikj és Van Hoewyk 2014). A hiperakkumuláló *Stanleya pinnata* esetén a ROF-at elimináló aszskorbát és glutation mennyisége emelkedett, és ezek részt vesznek a szelén által indukált oxidatív stressz kivédésében (Freeman és mtsi. 2010). A mi rendszerünkben az *A. bisulcatus* kissé nagyobb SOD-aktivitást (különösen Cu/Zn SOD) mutatott a gyökérben, mint az *A. membranaceus*, ami hozzájárulhat a szelénindukált oxidatívstressz-tűrési képességéhez. Ugyanakkor a szelén-hiperakkumuláló növényfajok szerves szelénformákat (főként metil-szeleno-ciszteint) halmoznak fel az oxidatív stresszt okozó szerves szelénformák helyett, amely mechanizmus védelmet jelenthet számukra az oxidatív stresszel szemben (Schiavon és Pilon-Smits 2017). A szelénát alacsonyabb dózisa NO-képződést váltott ki a főként a nem akkumuláló fajban, s ez az eredmény egybecseng a szelénkezelt borsóban (Lehotai és mtsi. 2016) és szelénátkezelést kapott mezei mustárban (Chen és mtsi. 2014) leírtakkal. Rios és mtsi. (2010) eredményei alapján feltételezhető, hogy a szelénát indukálja a NR enzimet, ami a NO fő enzimikus forrása a gyökérben, és hozzájárul az endogén NO-szintézishez a föld feletti növényi részekben (Zhao M-G és mtsi. 2009). A szelén hatása a NR enzimre lehet közvetett vagy közvetlen, mivel a szelénkezelés által okozott kénhiány növelheti a szövetek molibdéntartalmát, ezáltal növelheti a NR enzim aktivitását (Shinmachi és mtsi. 2010). A mi kísérletünkben szignifikánsan magasabb molibdéntartalmat mértünk a szelénkezelt *A. membranaceus* mindkét szervében (adatok nincsenek bemutatva), ami kapcsolatban lehet a megnövekedett NO-tartalommal. A ONOO⁻-szint növekedéséből arra következtetünk, hogy az *A. membranaceus* súlyosabb nitro-oxidatív stresszt szenved el, mint az *A. bisulcatus*. Bár a nagyobb szelénátkoncentráció mellett a ONOO⁻ szintje lecsökkent az *A. membranaceus* faj gyökerében, ami kioltó mechanizmusok aktiválódását feltételezi. A GSNO a növényi sejtek mobilis NO-raktára, és spontán bomlása NO felszabadulásához vezet, míg enzimikus bontását a GSNOR enzim végzi NO felszabadulása nélkül, továbbá fehérjetiolokkal transznitrozilációs reakcióba lépve önmaga lebomlik (Lindermayr 2018). Mindkét faj a gyökérük endogén GSNO-raktárának csökkentésével válaszolt a szelénátkezelésre, de ez csak az *A. membranaceus* esetén vezethetett NO-képződéshez. Feltehetőleg az *A. bisulcatus*-ban az eredetileg magas GSNO-tartalom transznitrozilációs reakciókban vesz részt SNO képződése mellett, és a GSNOR-katalizált lebomlás nem vesz részt a GSNO-szint szabályozásában szelénstressz alatt. Az *A. bisulcatus* sziklevelében a GSNO-szint kimutatott csökkenésének okozója valószínűleg a lebomlás NO képződése mellett, de nem GSNOR-aktivitás által. A *B. juncea* és *B. napus*, valamint az *A. thaliana* fajokhoz hasonlóan mindkét *Astragalus* faj jellemezhető fiziológiás nitroproteommal, ami feltehetőleg az optimális körülmények között nőtt növény proteomjának nitráció általi szabályozását (főként

inaktivációját) jelenti. A szelenátkezelt *A. membranaceus* szerveiből származó fehérjekivonatokban megjelenő vagy erősödő jelet mutató számos nitrált fehérjesáv azt jelzi, hogy az érzékeny faj nagyobb mértékű fehérjenitrációt mutat a hiperakkumuláló fajhoz képest. Továbbá az eredmények azt mutatják, hogy az extrém szelénfelhalmozó *A. bisulcatus* nagyobb fiziológiás nitroproteommal és NO-raktárral bír, ami képes pufferelni a NO-tartalmát. A GSNO és a 3-nitrotirozin lebomlása NO felszabadulása nélkül hozzájárulhat a faj nitro-oxidatív stresszel szembeni toleranciájához. A 3-nitrotirozin mennyiségének szelén általi csökkenése proteaszómális degradáció révén valósulhat meg (Castillo és mtsi. 2015).

Az érzékenynek bizonyult *A. membranaceus*-ban a szelénterhelés a NOX és a SOD enzimek befolyásolása révén felborítja a $O_2^{\bullet-}$ metabolizmusát, és a RNF-metabolizmus megzavarása révén a proteom jelentős tirozinnitrációt szenved el. A hiperakkumuláló és -tűrő *A. membranaceus*-ban a nagy endogén GSNO-szint és a nitroproteom méretének csökkentése NO felszabadulása nélkül a tirozinnitráció elmaradásához vezet. Mindez arra utal, hogy a tűrő *Astragalus* faj képes kivédeni a szelénindukált nitro-oxidatív stresszt. Mivel más kémiai elemek többlete (pl. arzén, nikkell, réz, cink) is kiváltja a fehérjenitráció fokozódását, és hasonló zavarokat okoz a növények ROF- és RNF-metabolizmusában (Letierrier és mtsi. 2012, Georgiadou és mtsi. 2018), a szelénindukált nitro-oxidatív stressz általánosnak tekinthető, és nem tekinthető szelénre specifikus jelenségnek.

Összehasonlító kísérleti rendszerünkben igazoltuk, hogy a *Brassica juncea* toleránsabb a nikkelterhelésre, mint az *A. thaliana*. A *B. juncea* fajt nehézfém-toleráns, ún. metallofitá növénynek tekintjük, amely gyors növekedése és nagy biomassza-produkciója révén fitoremediációs potenciállal bír (Mourato és mtsi. 2015). Eredményeinkkel összhangban a *B. juncea* nikkeltűrő tulajdonságát bizonyították más tanulmányokban is (pl. Amari és mtsi. 2014). A főbb ROF- és RNF-szintjeinek vizsgálatából az a következtetés vonható le, hogy az *A. thaliana* gyökérzetében a nikkell indukálja a nitro-oxidatív jelátvitelt, míg a *B. juncea* esetén csak a ONOO⁻-kapcsolt jelátvitel aktiválódik. Eredményeinkkel ellentétben Georgiadou és mtsi. (2018) kontrollszintű NO-szinteket mutattak ki a (100, 250, 500 ppm) nikkellkezelésnek kitett bazsalikom (*Ocimum basilicum* L.) leveleiben. A nikkellnek a NO-szintre gyakorolt eltérő hatása azzal magyarázható, hogy különböző növényfajok különböző szerveit vizsgálták. Egy érdekes kapcsolat a ROF és a NO között, hogy külső NO-donorral való kezelés több növényfajban csökkentette a nikkeltotoxicitást, részben a ROF-szintek és -jelátvitel mérséklésén keresztül (Mihailovic és Drazic 2011, Kotapati és mtsi. 2017, Rizwan és mtsi. 2018). Az RNF-jelátvitel nikkellindukált fokozódását alátámasztja a GSNOR-fehérje mennyiségének megnövekedése a lúdfűben. Ezzel ellentétben a *B. juncea* GSNOR-mennyisége nem válaszolt

a nikkellezésre. A megzavart RNF-homeosztázis proteomot érintő következménye a fehérjetirozin-nitráció, aminek elemtöbbletek hatására való fokozódását számos kísérlet kimutatta. Az egészséges növényekben detektált fehérjenitráció ebben a rendszerben is alátámasztja a fiziológias nitroproteom meglétét a két fajban. A *B. juncea*-ban annak ellenére enyhe proteinnitráció-erősödés történik, hogy a ONOO⁻-akkumuláció nagymértékű, ami azt sugallja, hogy a faj proteomja kevésbé érzékeny a nitrációs módosulásra. A nagyobb mértékű nikkelindukált nitrációfokozódás a ROF- és RNF-metabolizmus zavarával együtt az *A. thaliana*-ban, míg ezek enyhébb nikkelindukált változása a *B. juncea*-ban arra utal, hogy összefüggés van a nikkellezés és a nitro-oxidatív stresszjelátvitel mértéke között.

A nikkelle-hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* faj Ampeliko és Loutra élőhelyekről származó egyedek utódait összehasonlító kísérletünkben felismertük, hogy a nagyobb nikkelfelhalmozású Ampeliko (2. táblázat) esetén a nikkelleterhelés a NO-tartalmat növeli, a O₂^{•-}, H₂O₂- és a ONOO⁻-szinteket azonban nem módosítja, vagyis a nitro-oxidatív jelátvitelt kevésbé befolyásolta a nikkelle jelenléte ebben az ökotípusban a Loutra-hoz képest. Ehhez a nikkelle által csökkentett fehérjetirozin-nitráció társult az Ampeliko ökotípusban, aminek háttérben a nitrált fehérjéket hatékonyan elimináló proteaszómális lebontás aktiválódását feltételezzük (Castillo és mtsi. 2015), ami hozzájárulhat az ökotípus nikkelle-tűréséhez. A NO-szint jelentős nikkelindukált növekedése az Ampeliko-ban arra utal, hogy az a toleranciát fokozó jelmolekulaként hathat. A ONOO⁻-felhalmozódás ellenére a nikkellekezelés nem okozott nitrációfokozódást a Loutra gyökerében, ami arra utal, hogy az ökotípus proteomja nem érzékeny a nitrációs módosulásra. Megjegyzendő továbbá, hogy a kontrollnövények gyökérzetében is kimutathatók nitrált fehérjesávok, és kismértékű eltérés detektálható az ökotípusok nitrációs mintázatában fiziológias körülmények között.

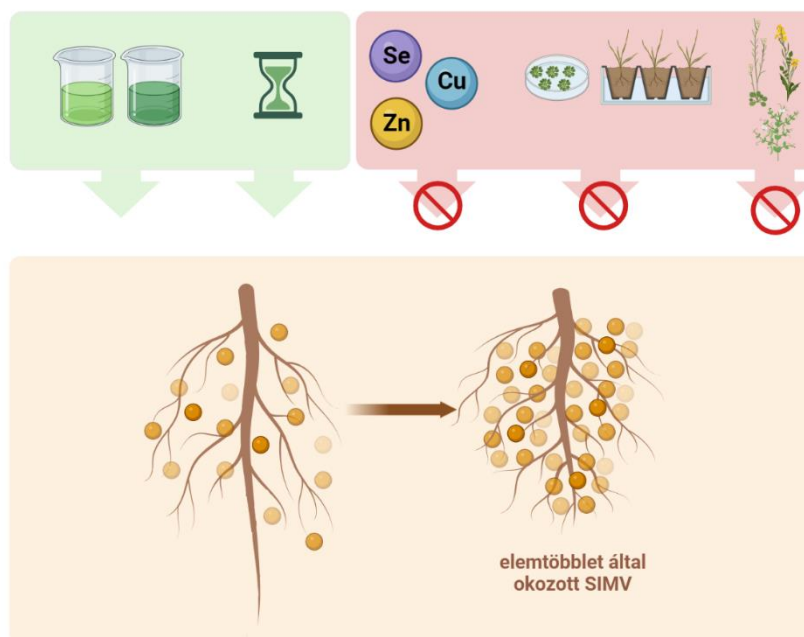
Az általunk vizsgált növényfajok (*A. thaliana*, *B. napus*, *B. juncea*, *A. membranaceus*, *A. bisulcatus*, *O. lesbiaca*) mindegyikében kimutatható volt a fiziológias nitroproteom megléte, aminek mintázata, így feltételezett összetétele különbségeket mutatott a fajok között, szervek között és ökotípusok között. A legtöbb esetben az elemek többlete a ROF és RNF metabolizmusát megzavarva a fehérjenitráció fokozódását okozta, ezek az általános, másodlagos nitro-oxidatív stressz folyamatainak tekinthetők. A hiperakkumuláló fajokban az elem-tűrés összefüggésben lehet a nitrált fehérjék lebontási képességével. A cink- és a cink-oxid NP-stressz esetén a nitro-oxidatív jelátvitel nem mutat összefüggést a toleranciával, míg a szelénterhelés és a nikkeltöbblet esetén világos összefüggés van az érzékenység/tűrés és nitro-oxidatív stressz mértéke között.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A növények bámulatos képessége a környezeti körülmények változásaihoz (pl. elemtöbbletek a talajban) való dinamikus alkalmazkodás, ami nagyrészt a szervnövekedésük módosításán keresztül valósul meg. Ilyen, stresszhatásra bekövetkező növekedésátprogramozódás a stresszindukált morfogénikus válasz (röviden SIMV), ami a gyökérzetben növekedésgátlási (főgyökér-rövidülés) és -indukciós (fokozott oldalgöyökképzés) hatások összessége. Ezeknek a folyamatoknak a megértése feltáró kutatások révén meg kell, hogy előzze a stressztűrést fokozó gyakorlati eljárások (pl. nemesítés vagy kezelések) kidolgozását, ami szükségessé teszi a növekedési válaszok molekuláris szinten való megismerését. Ez új szabályozókomponensek azonosítását, szerepük és interakcióik feltárását is jelenti a szervfejlődést irányító komplex jelátviteli hálózatokban.

7.1. A NO FITOHORMONOKKAL ÉS NEM FITORHORMON JELLEGŰ NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓKKAL VALÓ KAPCSOLATA ELEM-TÖBBLETTNEK KITETT GYÖKÉRZETBEN

Első vizsgálatainkban a SIMV-gyökérfenotípus megjelenését mutattuk ki esszenciális redox-aktív és nem redox-aktív, valamint nem esszenciális fémek és nemfémes elemek többletének jelenlétében többféle növényfaj és nevelési-kezelési metódus esetén. Ezen összehasonlító vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy *a SIMV megjelenése független az elem típusától, a növény nevelési-kezelési körülményeitől és a növényfajtól is, vagyis egy általános növekedési stresszválasznak tekinthető*. Ugyanakkor a SIMV megjelenése csak relatíve hosszú időtartamú és enyhe elemkitettség esetén figyelhető meg (62. ábra), ami arra utal, hogy *az a növény akklimatizációs programjának a része*. További eredményeink alátámasztották, hogy a főgyökérmegnyúlás és az oldalgöyökképzés képessége (vagyis a *gyökérnövekedési plaszticitás*) összefügg a szelén- és a nikkkel-hipertoleranciával, hiszen a szelén- és a nikkkel-hipertoleráns növények nagy dózisos jelenlétében is fenn tudják tartani gyökérnövekedésüket, míg az érzékeny növények gyökérnövekedése gátolt.



62. ábra: Tényezők, melyektől függ (zöld) illetve nem függ (rózsaszín) az elemtöbblet által okozott stresszindukált morfogénikus válasz (SIMV) megjelenése a gyökérrendszerben. Részletek a szövegben.

A továbbiakban a NO-auxin, NO-citokinin és NO-etilén kapcsolatot tanulmányoztuk a gyökérzetben elemtöbbletek esetén, valamint górcső alá vettük a NO-strigolakton és a NO-karrikin interakciót is stresszmentes körülmények között nőtt növényekben. Általános következtetésként megfogalmazhatjuk, hogy az *elemkitettséggel* mellett nőtt növények gyökerében a *fitohormonok és a NO szintjei és jelátvittele ellentétesen szabályozódnak, és a fennálló regulációs kapcsolat a NO és az egyes hormonok között kölcsönösen antagonisztikus*. Környezeti stressz nélkül a *strigolaktonok GSNOR-függő módon szabályozzák a gyökér NO/SNO-szintjét, a NO pedig visszahat a strigolaktonszintekre és -jelátvitelre*. Továbbá eredményeink a *karrikinek és a NO jelátvittele között is jelkapcsolatot feltételeznek*.

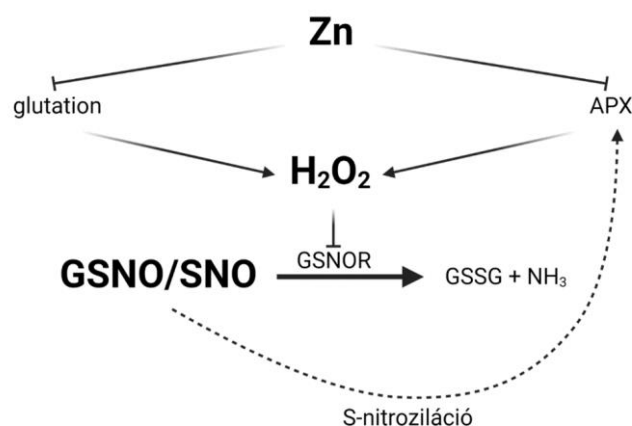
7.2. A NO RÉSZVÉTELE A NÖVÉNYEK ELEMTÖBBLETTEL SZEMBENI TOLERANCIÁJÁNAK KIALAKÍTÁSÁBAN

A NO gyökérnövekedést szabályozó szerepének megértésén túl arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a NO hozzájárul-e – és ha igen, hogyan – a stressztűréshez elemtöbbletek esetén. Rézterhelt lúdfű vad típusa és mutáns vonalai esetén kimutattuk, hogy *a csökkent endogén NO-szint rézérzékenységet okoz, valamint hogy a NO-ot külsőleg alkalmazva a tolerancia fokozható*. A rézérzékenységhez magas ROF-szint társul, ami jelzi a *NO- és a ROF-szintek ellentétes irányú, rézindukált változását*. Szelenitkoncentrációk jelenlétében az

etilénérzékelésben és -jelátvitelben hibás (*etr1-1*), valamint a citokinintúltermelő (*ipt-161*) mutáns törőnek bizonyult, míg az alacsony citokinintartalmú *35S::CKX2* szelenitérzékenységet mutatott, ami az *etilén és a citokinineknek a szeléntűrésben játszott széles körű szerepét jelzi*. Mindemellett a *magas endogén NO-szint, illetve NO adagolása fokozza a szelenittűrést*. A cinkterhelésnek kitett *gsnor1-3* növények esetén a NO/SNO-jelátvitelt feltehetőleg a NTR enzimrendszer korlátozza GSNOR hiányában. A vad típusban a *NO/SNO-jelátvitel fokozódásának hátterében a GSNOR cinktöbblet általi poszttranszlációs szintű down-regulációját valószínűsítjük, aminek a mechanizmusaként a H₂O₂-akkumuláció enzimet módosító hatását azonosítottuk*.

7.3. A NO RÉSZVÉTELE A NITRO-OXIDATÍV JELÁTVITEL KIALAKÍTÁSÁBAN ELEM-TÖBBLETEK HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ NÖVÉNYFAJOKBAN

Az előző kísérleti rendszerben tapasztalt *cinkindukált NO/SNO-növekedés* következtében enyhén fokozódik az *S-nitroziláció, és ezen PTM célpontjai között megtalálható az APX és a KAT enzim, melyek összes aktivitása csökkenést mutat*. Vagyis az előzőekben bemutatott eredményekkel együtt levonható az a következtetés, hogy *a cink többlete esetén akkumulálódó H₂O₂ a GSNOR gátlásának következtében fokozza a fehérje S-nitrozilációt, ami alulszabályozza az APX és a KAT antioxidáns enzimeket, így ez az autoregulációs folyamat a H₂O₂-szint növekedését eredményezheti* (63. ábra). Ebben a kísérleti rendszerben a vad típusú és a GSNOR-túltermelő vonalak a cinkindukált tirozinnitráció fokozódását mutatják, míg a GSNOR-hiányos növényben a fehérjenitráció cink hatására csökken, feltehetőleg fokozott fehérjedegradációs mechanizmusoknak köszönhetően.



63. ábra: A hidrogén-peroxid (H₂O₂) cinkindukált autoregulációs folyamatának sematikus ábrája. Részletek a szövegben. Rövidítések: Zn= cink, APX= aszkorbát-peroxidáz, GSNO/SNO= S-nitrozoglutation/S-nitrozotiol, GSNOR= S-nitrozoglutation-reduktáz, GSSG= oxidált glutation, NH₃= ammónia.

További kísérleti rendszerünkben a *Brassica juncea* cinktűrőnek, míg a *Brassica napus* cinkérzékenynek bizonyult. A cinkterhelés fokozza a NO és ONOO- képződését, aminek következtében a tirozinnitráció mértéke megnő mindkét Brassica fajban, de a *Brassica napus*-ban ezt oxidatív stressz is kíséri, ami arra utal, hogy a *nitrozatív stressz önmagában nem elegendő, hanem a nitro-oxidatív stressz kialakulása szükséges a cink általi károsodások megjelenéséhez*. Hosszabb távú cinkterhelés esetén a fehérjenitráció szervspecifikus módon fokozódik.

A cink-oxid nanorészecskék (~8 nm) a gyökér felszínén cinkionokat szabadítanak fel, melyek a növényi szövetekben felvéve/transzlokálódva koncentrációfüggő módon növekedést indukálnak avagy gátolnak. Továbbá az alkalmazott nanorészecskék a növényi szöveten belül kimutathatók. A koncentrációfüggő hatáson túl a ZnO NP-hatás fajfüggő is, hiszen a *Brassica juncea* jobb tűrőképességet mutat, mint a *Brassica napus*. A ROF-szintek a cinkérzékenységtől függetlenül változnak a ZnO NP-kitettség hatására, míg a vizsgált antioxidánsok aktivitásában és mennyiségében adódnak különbségek a fajok között. A NO és a ONOO- szintjei csak a *Brassica juncea*-ban növekednek, míg a GSNO szintje és a GSNOR aktivitása csökken mindkét fajban. A GSNOR ZnO NP által indukált inaktiválódásának hátterében feltételezzük a H₂O₂-produkciónak fokozódását. A fehérjekarboniláció mértéke dózisfüggést mutat, és a nagyobb ZnO NP-koncentráció esetén tapasztalt csökkenés – melynek mértéke nagyobb a *B. napus*-ban – a fokozott proteaszómális degradáció következménye lehet. Ami a tirozinnitrációt illeti, a *B. napus*-ban a mintázat nem változik, míg a *B. juncea*-ban újonnan nitrált fehérjesávok is megjelennek a ZnO NP-terhelés esetén. Összességében elmondható, hogy a *ZnO NP-k nitro-oxidatív stresszt alakítottak ki a Brassica fajokban, ami hozzájárulhat a toxicitásukhoz*.

A továbbiakban két szelénforma nitro-oxidatív stresszt előidéző hatását vizsgáltuk a toxikusabb szelenit és a kevésbé toxikus szelenát hatásának összehasonlításával *Brassica juncea* fajban. Arra az eredményre jutottunk, hogy a O₂⁻ és a ONOO⁻-produkciónak csupán a szelenitkezelés fokozza, a szelenát nem. A szelenitterhelés fehérjenitrációra gyakorolt hatásának mértéke mind a hajtásban, mind pedig a gyökérben felülmúlja a szelenát hatását, vagyis *a szelén kémiai formája, illetve annak toxicitása összefügg a fehérjenitráció mértékével*. Szelén-hiperakkumuláló és nem -akkumuláló *Astragalus* fajok esetén a nem akkumuláló és érzékenységet mutató faj jelentős oxidatív stresszt szenvedett el. Továbbá a NO és a ONOO- szintjei is növekedést mutatnak a szelénkezelt, nem akkumuláló *Astragalus* fajban, míg a hipertűrő fajban ez nem következik be, és a tirozinnitráció fokozódását sem tapasztalunk, ami arra utal, hogy *a hiperakkumuláló/toleráns Astragalus faj képes kivédeni a nitro-oxidatív stresszt*.

A nikkelterhelésre a *Brassica juncea* nagyobb fokú toleranciát mutatott, mint az *Arabidopsis thaliana*, és ezzel összefüggésben jelentősebb nikkelindukált ROF- és RNF-produkciót detektáltunk a lúdfűben. A nikkelterhelés nitrációs fehérjemódosító hatása az érzékeny lúdfű esetén egyértelműen nagyobb mértékben jelentkezik, mint a *Brassica juncea*-ban. A nikkel-hiperakkumuláló *Odontarrhena leasbiaca* két ökotípusával végzett kísérleteink rámutattak, hogy a nagyobb mértékű felhalmozást mutató Ampeliko esetén a nikkelkezelés a nitro-oxidatív jelátvitel kismértékű módosulását, a következményként jelentkező fehérjenitrációban pedig csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest. A Loutra ökotípus gyökérzetében a vizsgált jelmolekulák szintje jelentősebb nikkelindukált változásokat mutat, ennek ellenére azonban ebben a hiperakkumuláló ökotípusban sem fokozódik a nitrált fehérjék mennyisége, ami *hatékony fehérjebontás általi detoxifikációra utal*.

Az itt bemutatott eredményeink beleilleszkednek a nemzetközi kutatási trendekbe, és azokat kiegészítve új lehetőségeket tárnak fel, új irányt mutatnak a növényi stresszválaszok megértésében. Az eredményeink gyakorlati hasznosíthatósága lehetséges, hiszen a feltárt összefüggések alapján alapot szolgáltathatnak jobb ellenállóságú haszonnövények előállításához, valamint a toleranciafokozó mezőgazdasági kezelések és a károsodás mértékét detektáló biomarker-alapú eljárások kidolgozásához.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Kimutattuk, hogy a SIMV-gyökérfenotípus megjelenése független az elem típusától (esszencialitás, redoxaktivitás, fémes és nemfémes jelleg), a növénynevelési-kezelési rendszertől és a növényfajtól, de függ az elem koncentrációjától és a terhelés időtartamától is.
- Megállapítottuk, hogy klasszikus SIMV-gyökérfenotípus nem jelenik meg hiperakkumuláló/tűrő fajokban, de a gyökérnövekedés átprogramozódik vagy fennmarad, amiből a gyökérnövekedési plaszticitás és az elemtűrési képesség közötti kapcsolatra következtetünk.
- Igazoltuk, hogy az elemtöbblet mellett növekedő növények gyökérzetében a fitohormonok (auxin, cikokinin, etilén) és a NO között antagonistá szabályozó kapcsolat áll fenn, ami hozzájárul a gyökérnövekedési válaszokhoz. Elsőként határoztuk meg, hogy a strigolaktonok és a NO egymás szintjét és jelátvitelét kölcsönösen szabályozva hatnak a gyökérmeggyúlásra egészséges növényben. A NO növekedésszabályozó szerepe kapcsolódik a karrikin-jelátvitellel is, sőt feltehetőleg a D14, KAI2 és DLK receptorokat magába foglaló teljes receptorcsaládra kiterjed.
- Mutáns lúdfűvonalak és farmakológiai módszerek segítségével igazoltunk, hogy a NO fokozza az elemtöbbletekkel szembeni toleranciát. A cinkterhelés esetén elsőként mutattuk ki a H₂O₂-szinteknek a GSNOR-szabályozott SNO-jelátvitel részvételével megvalósuló autoregulációs folyamatát.
- Elsőként mutattuk ki a tirozinnitrációt mint a toxicitáshoz hozzájáruló fehérjemódosítást cink-, cink-oxid nanorészecske-, szelén- és nikkelstressznek kitett különböző növényfajokban. Összefüggéseket tártuk fel a RNF metabolizmusában, jelátvitelében és a fehérjenitrációban (összefoglalva nitro-oxidatív stresszben) beálló változások és az elemek kémiai típusa, a növényfajok tűrőképessége, a kezelési koncentrációk és időtartamok tekintetében. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a tirozinnitráció az elemtöbbletnek kitett növények általános, proteomot érintő válasza, vagyis megbízható biomarkernek tekinthető a károsodások detektálásában.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Abeles F, Morgan P, Saltveit MJ (1992)** Ethylene in Plant Biology. Academic Press USA, San Diego, CA
- Adrees M, Ali S, Rizwan M és mtsi. (2015)** The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:8148-8162
- Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ (2011)** Detection and quantification of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant Cell Physiol* 52:2006-2015
- Al Mahmud J, Bhuyan MHMB, Anee TI, Nahar K, Fujita M, Hasanuzzaman M (2019)** Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. In: *Plant Abiotic Stress Tolerance*. Springer Denmark, Cham pp 221-257
- Amari T, Ghnaya T, Debez A és mtsi. (2014)** Comparative Ni tolerance and accumulation potentials between *Mesembryanthemum crystallinum* (halophyte) and *Brassica juncea*: metal accumulation, nutrient status and photosynthetic activity. *J Plant Physiol* 171:1634-1644
- Amjad M, Raza H, Murtaza B és mtsi. (2020)** Nickel toxicity induced changes in nutrient dynamics and antioxidant profiling in two maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Plants* 9:5
- Andreini C, Bertini I, Rosato A (2009)** Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* 42:1471-1479
- Andryka-Dudek P, Ciacka K, Wiśniewska A, Bogatek R, Gniazdowska A (2019)** Nitric oxide-induced dormancy removal of apple embryos is linked to alterations in expression of genes encoding ABA and JA biosynthetic or transduction pathways and RNA nitration. *Int J Mol Sci* 20:1007
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubiś J (2009)** Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Sci* 177:682-690
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2011)** Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – from physiology to pathophysiology. *Phytochem* 72:681-688
- Archer MC, Tannenbaum SR, Fan TY, Weisman M (1975)** Reaction of nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation. *J Natl Cancer Inst* 54:1203-1205
- Arnér ESJ, Zhong L, Holmgren A (1999)** Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 300:226-239
- Barillas JRV, Quinn CF, Freeman JL és mtsi. (2012)** Selenium distribution and speciation in the hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus* and associated ecological partners. *Plant Physiol* 159:1834-1844
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A és mtsi. (2006)** Localization of *S*-nitrosoglutathione and expression of *S*-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* 57:1785-1793
- Bartlett D, Church DF, Bounds PL, Koppenol WH (1995)** The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Rad Biol Med* 18:85-92
- Beauchamp C, Fridovich I (1971)** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M és mtsi. (2014)** Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and *S*-nitrosylation. *J Exp Bot* 65:527-538
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M és mtsi. (2016)** Antioxidant systems are regulated by nitric oxide-mediated post-translational modifications (NO-PTMs). *Front Plant Sci* 7:152
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Gómez-Rodríguez MV és mtsi. (2019)** Short-term low temperature induces nitro-oxidative stress that deregulates the NADPH-malic enzyme function by tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Antiox* 8:448
- Begara-Morales JC, Mata-Perez C, Padilla MN, Chaki M, Valderrama R, Aranda-Cano L, Barroso JB (2021)** Role of electrophilic nitrated fatty acids during the response to abiotic stress processes in plants. *J Exp Bot* 72:917-927
- Bellini E, De Tullio MC (2019)** Ascorbic acid and ozone: novel perspectives to explain an elusive relationship. *Plants* 8:122
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004)** Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16:332-341
- Bharti N, Bhatla SC (2015)** Nitric oxide mediates strigolactone signaling in auxin and ethylene-sensitive lateral root formation in sunflower seedlings. *Plant Signal Behav* 10:8
- Binder BM (2020)** Ethylene signaling in plants. *J Biol Chem* 295:7710-7725
- Blakeslee JJ, Rossi TS, Kriechbaumer V (2019)** Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *J Exp Bot* 70:5041-5049
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
- Borbély P, Molnár Á, Valyon E és mtsi. (2021)** The effect of foliar selenium (Se) treatment on growth, photosynthesis, and oxidative-nitrosative signalling of *Stevia rebaudiana* leaves. *Antiox* 10:72
- Bouwmeester HJ, Fonne-Pfister R, Screpanti C, De Mesmaeke A (2019)** Strigolactones: plant hormones with promising features. *Ang Chem* 58:12778-12786
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A (2007)** Zinc in plants. *New Phytol* 173:677-702
- Bruand C, Meilhoc E (2019)** Nitric oxide in plants: pro- or anti-senescence. *J Exp Bot* 70:4419-4427
- Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009)** Copper homeostasis. *New Phytol* 182:799-816
- Carimi F, Zottini M, Costa A és mtsi. (2005)** NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell Environ* 28:1171-1178

- Castillo M, Lozano-Juste J, González-Guzmán M, Rodríguez L, Rodríguez PL, León J (2015)** Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Sci Signal* 8:ra89
- Cavallari N, Artner C, Benkova E (2022)** Auxin-regulated lateral root organogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 13:a039941
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM és mtsi. (2009)** Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *J Exp Bot* 60:4221–4234
- Chaki M, Álvarez de Morales P, Ruiz C és mtsi. (2015)** Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Ann Bot* 116:637–647
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á és mtsi. (2016)** A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ* 39:2097–2107
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993)** Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Sci* 262:539–544
- Chen JJ, Boylan LM, Wu CK, Spallholz JE (2007)** Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors* 31:55–66
- Chen Y, Mo H-Z, Zheng M-Y és mtsi. (2014)** Selenium inhibits root elongation by repressing the generation of endogenous hydrogen sulfide in *Brassica rapa*. *PLoS One* 9:e110904
- Chevalier F, Nieminen K, Sánchez-Ferrero JC és mtsi. (2014)** Strigolactone promotes degradation of DWARF14, an α/β hydrolase essential for strigolactone signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:1134–1150
- Cochrane DW, Shah JK, Hebelstrup KH, Igamberdiev AU (2017)** Expression of phytohemoglobin affects nitric oxide metabolism and energy state of barley plants exposed to anoxia. *Plant Sci* 265:124–130
- Cohu CM, Pilon M (2010)** Cell biology of copper. In: *Cell biology of metals and nutrients*. Plant Cell Monographs Springer Germany, Berlin pp 55–74
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000)** Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genet* 154:847–856
- Conklin PL (2001)** Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ* 24:383–394
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966)** Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour): isolation and properties of a potent stimulant. *Sci* 154:1189–1190
- Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA (1994)** Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect* 102:460–462
- Corpas FJ, del Río LA, Barroso JB (2007)** Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends Plant Sci* 12:436–438
- Corpas FJ, Carreras A, Esteban FJ, Chaki M, Valderrama R, del Río LA, Barroso JB (2008)** Localization of *S*-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and *S*-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods Enzymol* 437:561–574
- Corpas FJ, Barroso JB (2013)** Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytol* 199:633–635
- Corpas FJ, Barroso JB (2017)** Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide* 68:5–6
- Corpas FJ, González-Gordo S, Palma JM (2020)** Nitric oxide: A radical molecule with potential biotechnological applications in fruit ripening. *J Biotech* 324:211–219
- Corpas FJ, González-Gordo S, Palma JM (2021)** Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress* 2:100026
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004)** Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218:900–905
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L (2006)** Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot* 57:581–588
- Correa-Aragunde N, Foresi N, Del Castello F, Lamattina L (2018)** A singular nitric oxide synthase with a globin domain found in *Synechococcus* PCC 7335 mobilizes N from arginine to nitrate. *Sci Rep* 8:12505
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D (2008)** Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca^{2+} and protein kinases. *J Exp Bot* 59:155–163
- D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000)** Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124:1706–1717
- da Cruz TNM, Savassa SM, Gomes MHF és mtsi. (2017)** Shedding light on the mechanisms of absorption and transport of ZnO nanoparticles by plants *via in vivo* X-ray spectroscopy. *Environ Sci Nano* 4:2367
- da Cruz TNM, Savassa SM, Montanha GS és mtsi. (2019)** A new glance on root-to-shoot *in vivo* zinc transport and time-dependent physiological effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles on plants. *Sci Rep* 9:10416
- Dalton DA (2019)** Essentiality of nickel for plants. In: *Nickel in Soils and Plants*. CRC Press USA, Boca Raton, FL pp 1–20
- De Cuyper C, Struk S, Braem L, Gevaert K, De Jaeger G, Goormachtig S (2017)** Strigolactones, karrikins and beyond. *Plant Cell Environ* 40:1691–1703
- De Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T (2006)** Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol* 60:871–887
- Deikman J, Ulrich M (1995)** A novel cytokinin-resistant mutant of *Arabidopsis* with abbreviated shoot development. *Planta* 195:440–449
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981)** Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 32:93–101
- Dimkovikj A, Van Hoewyk D (2014)** Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biol* 14:259

- Djanaguiraman M, Prasad PV, Seppanen M (2010)** Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol Biochem* 48:999-1007
- dos Santos JO, Andrade CA, Dázio de Souza KR és mtsi. (2019)** Impact of zinc stress on biochemical and biophysical parameters in *Coffea arabica* seedlings. *J Crop Sci Biotechnol* 22:253-264
- Dugardeyn J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D (2008)** To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *J Exp Bot* 59:1-16
- Ekanayake LJ, Vial E, Schatz B, McGee R, Thavarajah P (2015)** Selenium fertilization on lentil (*Lens culinaris* Medikus) grain yield, seed selenium concentration, and antioxidant activity. *Field Crops Res* 177:9-14
- European Environment Agency** <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/copper-concentration-in-european-union-soils>
- Fabiano CC, Tezotto T, Favarin JL, Polacco JC, Mazzafera P (2015)** Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Front Plant Sci* 6:754
- Fares A, Rossignol M, Peltier J-B (2011)** Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* 416:331-336
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005)** A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:8054-8059
- Feng J, Wang C, Chen Q és mtsi. (2013)** S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat* 4:1529-1529
- Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011)** Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18506-18511
- Fisher B, Yarmolinsky D, Abdel-Gany S, Pilon M, Pilon-Smits EA, Sagi M, Van Hoewyk D (2016)** Superoxide generated from the glutathione-mediated reduction of selenite damages the iron-sulphur cluster of chloroplastic ferredoxin. *Plant Physiol Biochem* 106:228-235
- Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Trengove RD (2004)** A compound from smoke that promotes seed germination. *Sci* 305:977
- Foo E, Turnbull CGN, Beveridge CA (2001)** Long-distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol* 125:1-7
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L (2010)** Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: no generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 22:3816-3830
- Freeman JL, Tamaoki M, Stushnoff C és mtsi. (2010)** Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol* 153:1630-1652
- Freschi L (2013)** Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front Plant Sci* 4:398
- Frungillo L, Skelly MJ, Loake GJ, Spoel SH, Salgado I (2014)** S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat Commun* 5:5401
- Gallé Á, Csizsár J, Secenji M és mtsi. (2009)** Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. *J Plant Physiol* 166:1878-1891
- Gallei M, Luschnig C, Friml J (2020)** Auxin signalling in growth: Schrödinger's cat out of the bag. *Curr Opin Plant Biol* 53:43-49
- Geisler M, Murphy AS (2006)** The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* 580:1094-1102
- Georgiadou EC, Kowalska E, Patla K, Kulbat K, Smolińska B, Leszczyńska J, Fotopoulos V (2018)** Influence of heavy metals (Ni, Cu, and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Front Plant Sci* 9:862
- Gietler M, Nykiel M, Orzechowski S, Fettke J, Zagdańska B (2016)** Proteomic analysis of S-nitrosylated and S-glutathionylated proteins in wheat seedlings with different dehydration tolerances. *Plant Physiol Biochem* 108:507-518
- Gili B-N, Sharon M (2014)** Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomol* 4:862-884
- Goodson CC, Parker DR, Amrhein C, Zhang Y (2003)** Soil selenium uptake and root system development in plant taxa differing in Se-accumulating capability. *New Phytol* 159:391-401
- Goretski J, Hollocher TC (1988)** Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* 263:2316-2323
- van der Graaff EE, Hooykaas PJJ, Auer CA (2001)** Altered development of *Arabidopsis thaliana* carrying the Agrobacterium tumefaciens ipt gene is partially due to ethylene effects. *Plant Growth Regul* 34:305-315
- Grant K, Carey NM, Mendoza M, Schulze J, Pilon M, Pilon-Smits EA, van Hoewyk D (2011)** Adenosine 5-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in Arabidopsis implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem J* 438:325-335
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AF, Hogeweg P, Scheres B (2007)** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449:1008-1013
- Griffith OW (1980)** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-211
- Groß F, Rudolf EE, Thiele B, Durner J, Astier J (2017)** Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 68:2149-2162
- Groves JT, Wang CCY (2000)** Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:687-695
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006)** Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* 57:507-516
- Guerra D, Ballard K, Truebridge I, Vierling E (2016)** S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). *Biochem* 55:2452-2464

- Guo Y, Zheng Z, La Clair JJ, Chory J, Noel JP (2013)** Smoke-derived karrikin perception by the α/β -hydrolase KAI2 from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:8284–8289
- Guzmán P, Ecker JR (1990)** Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513–523
- Habib S, Ali A (2011)** Biochemistry of nitric oxide. *Ind J Clin Biochem* 26:3–17
- Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A (1997)** Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236:591–593
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984)** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1–14
- Hancock JT, Neill SJ (2019)** Nitric Oxide: Its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* 8:41
- Harrison R (2002)** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Rad Biol Med* 33:774–797
- Hartman S, Liu Z, van Veen H és mtsi. (2019)** Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nat Commun* 10:4020
- Hassan MU, Chattha MU, Khan I és mtsi. (2019)** Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environ Sci Pollut Res* 26:12673–12688
- Hayashi K, Arai K, Aoi Y és mtsi. (2021)** The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nat Commun* 12:6752
- He Y, He Y, Tang R és mtsi. (2004)** Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Sci* 305:1968–1971
- Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS (2001)** *S*-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol* 3:E46–E48
- Hu C, Liu Y, Li X, Li M (2013)** Biochemical responses of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to zinc oxide nanoparticles. *Arch Environ Contam Toxicol* 64:643–651
- Hu J, Huang X, Chen L és mtsi. (2015)** Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously *S*-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 167:1731–1746
- Huang S, Yamaji N, Ma JF (2022)** Zinc transport in rice: dilemma between optimal plant requirement and human nutrition. *J Exp Bot* <https://doi.org/10.1093/jxb/erab478>
- Ioio RD, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S (2007)** Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* 17:678–682
- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008)** Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55:335–347
- Izbiańska K, Floryszak-Wieczorek J, Gajewska J, Meller B, Kuźnicki D, Arasimowicz-Jelonek M (2018)** RNA and mRNA nitration as a novel metabolic link in potato immune response to *Phytophthora infestans*. *Front Plant Sci* 9:672
- Jahnová J, Luhová L, Petřivalský M (2019)** *S*-nitrosoglutathione reductase—the master regulator of protein *S*-nitrosation in plant NO signaling. *Plants* 8:48
- Jain V, Kaiser W, Huber SC (2008)** Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* 49:843–852
- Jain R, Srivastava S, Solomon S, Shrivastava AK, Chandra A (2010)** Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiol Plant* 32:979–986
- Jeandroz S, Lamotte O, Astier J és mtsi (2013)** There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. *Plant Physiol* 163:459–470
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ és mtsi. (2016)** Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal* 9:re2
- Kádár I (1998)** A szennyezett talajok vizsgálatáról. In: Kármentesítési kézikönyv 2. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest.
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N és mtsi. (2011)** Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233:209–216
- Kato M, Shimizu S (1987)** Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can J Bot* 65:729–735
- Kaur H, Garg N (2021)** Zinc toxicity in plants: a review. *Planta* 253:129
- Kaya C, Ashraf M, Akram NA (2018)** Hydrogen sulfide regulates the levels of key metabolites and antioxidant defense system to counteract oxidative stress in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exposed to high zinc regime. *Environ Sci Pollut Res* 25:12612–12618
- Kazakou E, Adamidis GC, Baker AJM, Reeves RD, Godino M, Dimitrakopoulos PG (2010)** Species adaptation in serpentine soils in Lesbos Island (Greece): Metal hyperaccumulation and tolerance. *Plant Soil* 332:369–385
- Keszler A, Zhang Y, Hogg N (2009)** The reaction between nitric oxide, glutathione and oxygen in the presence and absence of protein: How are *S*-nitrosothiols formed? *Free Rad Biol Med* 48:55–64
- Khan RA, Wakeel A, Muhammad N és mtsi. (2019)** Involvement of ethylene signaling in zinc oxide nanoparticle-mediated biochemical changes in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Environ Sci Nano* 6:341–355
- Kochian LV (2016)** Root architecture. *J Integr Plant Biol* 58:190–192
- Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L (2008a)** Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* 165:967–975
- Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L (2008b)** Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol Plant* 133:406–416
- Kolbert Zs (2016)** Implication of nitric oxide (NO) in excess element-induced morphogenic responses of the root system. *Plant Physiol Biochem* 101:149–161
- Kolbert Zs, Lehotai N, Molnár Á, Feigl G (2016)** "The roots" of Se toxicity: a new concept. *Plant Signal Behav* 11:e1241935

- Kolbert Zs, Feigl G, Bordé Á, Molnár Á, Erdei L (2017)** Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiol Biochem* 113:56-63
- Kolbert Zs (2019)** Strigolactone-nitric oxide interplay in plants: The story has just begun. *Physiol Plant* 165:487-497
- Kolbert Zs, Molnár Á, Feigl G, van Hoewyk D (2019a)** Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs. *J Plant Physiol* 232:291-300
- Kolbert Zs, Molnár Á, Oláh D és mtsi. (2019b)** S-Nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 60:2449–2463
- Kolbert Zs, Feigl G, Freschi L, Poór P (2019c)** Gasotransmitters in action: nitric oxide-ethylene crosstalk during plant growth and abiotic stress responses. *Antiox* 8:167
- Kolbert Zs, Szöllösi R, Rónavári A, Molnár Á (2022)** Nanoforms of essential metals: from hormetic phytoeffects to agricultural potential. *J Exp Bot* <https://doi.org/10.1093/jxb/erab547>
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1992)** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842
- Kotapati KV, Palaka BK, Ampasala DR (2017)** Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *Crop J* 5:240-250
- Kovács I, Holzmeister C, Wirtz M és mtsi. (2016)** ROS-mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. *Front Plant Sci* 7:1669
- Kozłow MV (2005)** Pollution resistance of mountain birch, *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, near the copper-nickel smelter: natural selection or phenotypic acclimation. *Chemosphere* 59:189–197
- Kruse CPS, Wyatt SE (2022)** Nitric oxide, gravity response, and an unified schematic of plant signaling. *Plant Sci* 314:111105
- Kuderová A, Urbánková I, Válková M, Malbeck J, Brzobohatý B, Némethová D, Hejátko J (2008)** Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol* 49:570–582
- Kudo T, Kiba T, Sakakibara H (2010)** Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J Integr Plant Biol* 52:53-60
- Kumar H, Sharma D, Kumar V (2012)** Nickel-induced oxidative stress and role of antioxidant defence in barley roots and leaves. *Inter J Environ Biol* 2:121-128
- Kumar V, Pandita S, Sidhu GPS és mtsi. (2021)** Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere* 262:127810
- Kurczyńska E, Godel-Jędrzychowska K, Sala K, Milewska-Hendel A (2021)** Nanoparticles-plant interaction: what we know, where we are? *Appl Sci* 11:5473
- Küpper H, Lombi E, Zhao F-J, Wieshammer G, McGrath SP (2001)** Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J Exp Bot* 52:2291–2300
- Lange B, van der Ent A, Baker AJM, Echevarria G, Mahy G, Malaisse F, Faucon MP (2017)** Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytol* 213:537-551
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005)** Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138:882–897
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983)** Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem J* 210:899–903
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E (2008)** Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20:786-802
- Lehotai N, Lyubenova L, Schröder P és mtsi. (2016)** Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil* 400:107-122
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010)** Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol Biochem* 48:673-682
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV (1998)** Evidence for the function of the free radical gas -nitric oxide (NO)- as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 36:825-833
- Lešková A, Zvarik M, Araya T, Giehl RFH (2020)** Nickel toxicity targets cell wall-related processes and PIN2-mediated auxin transport to inhibit root elongation and gravitropic responses in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 61:519–535
- Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ (2011)** Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal Behav* 6:789-793
- Leterrier M, Airaki M, Palma JM, Chaki M, Barroso JB, Corpas FJ (2012)** Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in Arabidopsis. *Environ Pollut* 166:136-43
- Li H-F, McGrath SP, Zhao F-J (2008)** Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178:92-102
- Li S, Chen L, Li Y és mtsi. (2016)** Effect of GR24 stereoisomers on plant development in Arabidopsis. *Mol Plant* 9:1432–1435
- Li SM, Zheng HX, Zhang XS és mtsi. (2021)** Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Rep* 40:271–282
- Lin D, Xing B (2008)** Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol* 42:5580–5585
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005)** Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 137:921–930
- Lindermayr C (2018)** Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: Key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Rad Biol Med* 122:110-115
- Liu H, Li C, Yan M és mtsi. (2022)** Strigolactone is involved in nitric oxide-enhanced the salt resistance in tomato seedlings. *J Plant Res* 135:337-350
- Liu W-Z, Kong D-D, Gu X-X és mtsi. (2013)** Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:1548–1553

- Lombardo MC, Lamattina L (2018)** Abscisic acid and nitric oxide modulate cytoskeleton organization, root hair growth and ectopic hair formation in Arabidopsis. *Nitric Oxide* 80:89-97
- López MÁ, Magnitski S (2011)** Nickel: The last of the essential micronutrients. *Agro Colomb* 29:49-56
- López-Huertas E, Corpas JF, Sandalio ML, del Río LA (1999)** Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* 337:531–536
- López-Moreno ML, de la Rosa G, Hernández-Viezas JA, Castillo-Michel H, Botez CE, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2010)** Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ Sci Technol* 44:7315-7320
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P és mtsi. (2004)** Myoinositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* 134:1200–1205
- Lozano-Juste J, León J (2010)** Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noal-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152:891–903
- Lv J, Zhang S, Luo L, Zhang J, Yang K, Christie P (2015)** Accumulation, speciation and uptake pathway of ZnO nanoparticles in maize. *Environ Sci Nano* 2:68-77
- Lynch JP (2022)** Harnessing root architecture to address global challenges. *Plant J* 109:415-431
- Lyons GH, Stangoulis JCR, Graham RD (2005)** Tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to high soil and solution selenium levels. *Plant Soil* 270:179-188
- Ma M, Wendehenne D, Philippot L, Hänsch R, Flemetakis E, Hu B, Rennenberg H (2020)** Physiological significance of pedospheric nitric oxide for root growth, development and organismic interactions. *Plant Cell Environ* 43:2336-2354
- Maher EP, Martindale SJB (1980)** Mutants of Arabidopsis with altered responses to auxins and gravity. *Biochem Genet* 18:1041-1053
- Maheshwari R, Dubey, RS (2009)** Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regul* 59:37-49
- Malamy JE, Benfey PN (1997)** Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci* 2:390-396
- Malheiros RSP, Costa Lucas C, Ávila Rodrigo T és mtsi. (2019)** Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. *Planta* 250:333–345
- Manoli A, Trevisan S, Voigt B, Yokawa K, Baluška F, Quaggiotti S (2016)** Nitric oxide-mediated maize root apex responses to nitrate are regulated by auxin and strigolactones. *Front Plant Sci* 6:1269
- Marschner H (1995)** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press UK, London
- Marzec M (2016)** Perception and signaling of strigolactones. *Front Plant Sci* 7:1260
- Marzec M, Melzer M (2018)** Regulation of root development and architecture by strigolactones under optimal and nutrient deficiency conditions. *Int J Mol Sci* 19:1887
- Matamoros MA, Kim A, Peñuelas M és mtsi. (2018)** Protein carbonylation and glycation in legume nodules. *Plant Physiol* 177:1510-1528
- Mehdawi AFE, Pilon-Smits EAH (2012)** Ecological aspects of plant selenium hyperaccumulation. *Plant Biol (Stuttg)* 14:1-10
- Mihailovic N, Drazic G (2011)** Incomplete alleviation of nickel toxicity in bean by nitric oxide supplementation. *Plant Soil Environ* 57:396-401
- Mikkelsen RL, Haghnia GH, Page AL (1989)** Factors affecting selenium accumulation by crop plants. In: *Selenium in Agricultural and the Environment*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America pp 65–93
- Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV (2013)** Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *J Exp Bot* 64:369–381
- Mishina TE, Lamb C, Zeier J (2007)** Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 30:39–52
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004)** Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37:128-138
- Mok DW, Mok MC (2001)** Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Biol* 52:89–118
- Mori N, Sado A, Xie X és mtsi. (2020)** Chemical identification of 18-hydroxycarboxylactonic acid as an LjMAX1 product and in planta conversion of its methyl ester to canonical and non-canonical strigolactones in *Lotus japonicus*. *Phytochem* 174:112349
- Morina F, Jovanovic L, Mojovic M, Vidovic M, Pankovic D, Veljovic Jovanovic S (2010)** Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiol Plant* 140:209-224
- Mourato MP, Moreira IN, Leitão I, Pinto FR, Sales JR, Martins LL (2015)** Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *Int J Mol Sci* 16:17975-17998
- Müller-Moulé P, Golan T, Niyogi KK (2004)** Ascorbate-deficient mutants of Arabidopsis grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiol* 134:1163–1172
- Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, Yun B-W (2019)** Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environ Exp Bot* 161:120-133
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010)** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review *Environ Chem Lett* 8:199-216
- Nakano Y, Asada K (1981)** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
- Naramoto S (2017)** Polar transport in plants mediated by membrane transporters: focus on mechanisms of polar auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* 40:8-14
- Nedvěd D, Hošek P, Klíma P, Hoyerová K (2021)** Differential subcellular distribution of cytokinins: How does membrane transport fit into the big picture? *Int J Mol Sci* 22:3428

- Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK (2008)** Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55:175-187
- Negi S, Santisree P, Kharshiing EV, Sharma R (2010)** Inhibition of the ubiquitin–proteasome pathway alters cellular levels of nitric oxide in tomato seedlings. *Mol Plant* 3:854–869
- Nieboer E, Richardson DHS (1980)** The replacement of the nondescript term ‘heavy metal’ by a biologically significant and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut B* 1:3–26
- Noulas C, Tziouvalekas M, Karyotis T (2018)** Zinc in soils, water and food crops. *J Trace Elem Med Biol* 49:252–260
- Nyström T (2005)** Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24:1311-1317
- Ohkama N, Takei K, Sakakibara H, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T (2002)** Regulation of sulphur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43:1493-1501
- Oladele EO, Odeigah PGC, Taiwo IA (2013)** The genotoxic effect of lead and zinc on bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *Afr J Environ Sci Technol* 7:9–13
- Opdenakker K, Remans T, Keunen E, Vangronsveld J, Cuypers A (2012)** Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environ Exp Bot* 83:53–61
- Yun B-W, Feechan A, Yin M és mtsi. (2011)** S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478:264–268
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007)** Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol* 58:93–113
- Ötvös E, Pázmándi T, Tuba Z (2003)** First national survey of atmospheric heavy metal deposition in Hungary by the analysis of mosses. *Sci Total Environ* 309:151-160
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P és mtsi. (2005)** Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* 43:849-60
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002)** Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129:954–956
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003)** Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132:1241–1248
- Palma JM, Freschi L, Rodríguez-Ruiz M, González-Gordo S, Corpas FJ (2019)** Nitric oxide in the physiology and quality of fleshy fruits. *J Exp Bot* 70:4405–4417
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987)** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nat* 327:524-526
- Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Kraemer U, Borg S, Schjorring JK, Sanders D (2008)** Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci* 13:464–473
- Pan C, Li X, Yao S és mtsi. (2021)** S-nitrosated proteomic analysis reveals the regulatory roles of protein S-nitrosation and S-nitrosogluthione reductase during Al-induced PCD in peanut root tips. *Plant Sci* 308:110931
- Pandey S, Kumari A, Shree M és mtsi. (2019)** Nitric oxide accelerates germination via the regulation of respiration in chickpea. *J Exp Bot* 70:4539–4555
- Pandey V, Dutt I, Shyamal B, Nandi K (2019)** Role and regulation of auxin signaling in abiotic stress tolerance. In: *Plant Signaling Molecules, Role and Regulation Under Stressful Environments*. Woodhead Publishing UK, Sawston pp 319-331
- Papdi Cs, Ábrahám E, Joseph MP, Popescu C, Koncz Cs, Szabados L (2008)** Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* 147:528–542
- Park J, Lee Y, Martinoia E, Geisler M (2017)** Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biol* 15:93
- Pasternak TP, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK (2005)** Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *J Exp Bot* 56:1991-2001
- Pattyn J, Vaughan-Hirsch J, Van de Poel B (2021)** The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytol* 229:770-782
- Peng H-P, Lin T-Y, Wang N-N, Shih M-C (2005)** Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. *Plant Mol Biol* 58:15–25
- Petřivalský M, Luhová L (2020)** Nitrated nucleotides: new players in signaling pathways of reactive nitrogen and oxygen species in plants. *Front Plant Sci* 11:598
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012)** Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanoparticle Res* 14:1109
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990)** The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol* 94:1462-1466
- Pinto Irish K, Harvey M-A, Erskine PD, van der Ent A (2021)** Root foraging and selenium uptake in the Australian hyperaccumulator *Neptunia amplexicaulis* and non-accumulator *Neptunia gracilis*. *Plant Soil* 462:219-233.
- Pokorná E, Hluska T, Galuszka P és mtsi. (2021)** Cytokinin N-glucosides: occurrence, metabolism and biological activities in plants. *Biomol* 11:24
- Polacco JC (1977)** Nitrogen metabolism in soybean tissue culture: II. urea utilization and urease synthesis require Ni. *Plant Physiol* 59:827–830
- Polverari A, Molesini B, Pezzotti M, Buonauro R, Marte M, Delledonne M (2003)** Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1094–1105
- Poór P, Kovács J, Borbély P, Takács Z, Szepesi Á, Tari I (2015)** Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant Never ripe and wild type tomato roots. *Plant Physiol Biochem* 97:313-22

- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007)** Stress-induced morphogenetic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12:98-105
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK (2009)** Different stresses, similar morphogenetic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ* 38:158-169
- Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K (2016)** Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Front Plant Sci* 7:601
- Qiu C-W, Zhang C, Wang N-H, Mao W, Wu F (2021)** Strigolactone GR24 improves cadmium tolerance by regulating cadmium uptake, nitric oxide signaling and antioxidant metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ Pollut* 273:116486
- Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C és mtsi. (2012)** Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiol* 158:1976–1987
- Rather BA, Masood A, Sehar Z, Majid A, Anjum NA, Khan NA (2020)** Mechanisms and role of nitric oxide in phytotoxicity-mitigation of copper. *Front Plant Sci* 11:675
- Reeves RD, Baker AJM, Jaffre T, Erskine PD, Echevarria G, van der Ent A (2018)** A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytol* 218:407-411
- Reeves RD, van der Ent A, Echevarria G, Isnard S, Baker AJM (2021)** Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. In: *Agromining: Farming for Metals, Mineral Resource Reviews*. Springer Denmark, Cham, pp 133–154
- Reichman SM (2002)** The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. *Australian Minerals & Energy Environment Foundation* pp 22
- Reimann C, Birke M, Demetriades A, Filzmoser P, O'Connor P (Editors) (2014)** Chemistry of Europe's agricultural soils – Part B: General background information and further analysis of the GEMAS data set. *Geologisches Jahrbuch (Reihe B 103)*, Schweizerbarth, Hannover, Germany, pp 352
- Rios JJ, Blasco B, Rosales MA és mtsi. (2010)** Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. *J Sci Food Agric* 90:1914–1919
- Rizwan M, Mostofa MG, Ahmad MZ és mtsi. (2018)** Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. *Chemosphere* 191:23-35
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002)** Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *53:103–110*
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, Del Río LA, Sandalio LM (2009)** Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol* 150:229-243
- Romanov GA, Lomin SN, Rakova NY, Heyl A, Schmülling T (2008)** Does NO play a role in cytokinin signal transduction? *FEBS Lett* 582:874–880
- Rosatto S, Mariotti M, Romeo S, Roccotiello E (2021)** Root and shoot response to nickel in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator species. *Plants* 10:508
- Roychoudhry S, Kepinski S (2022)** Auxin in root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* a039933
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T és mtsi. (2011)** Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* 155:721–734
- Rümer S, Gupta KJ, Kaiser WM (2009)** Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *J Exp Bot* 60:2065–2072
- Ryan BM, Kirby JK, Degryse F, Harris H, McLaughlin MJ, Scheiderichh K (2013)** Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytol* 199:367-378
- Sabbagh M, Van Hoewyk D (2012)** Malformed selenoproteins are removed by the ubiquitin-proteasome pathway in *Stanleya pinnata*. *Plant Cell Physiol* 53:555–564
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002)** Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* 515:20–24
- Samuelson ME, Eliasson L, Larsson CM (1992)** Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiol* 98:309–315
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O (2015)** Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *J Exp Bot* 66:2857–2868
- Sanz-Luque E, Ocaña-Calaborro F, Llamas Á, Galvan A, Fernandez E (2013)** Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* 64:3373–3383
- Sanz-Luque E, Ocaña-Calaborro F, de Montaigu A, Chamizo-Ampudia A, Llamas Á, Galván A, Fernández E (2015)** THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J* 81:467-479
- Sarkar TS, Biswas P, Ghosh SK, Ghosh S (2014)** Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions. *PLoS One* 9:e107348
- Sarret G, Harada E, Choi Y-E és mtsi. (2006)** Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* 141:1021–1034
- Scaffidi A, Waters MT, Sun YK és mtsi. (2014)** Strigolactone hormones and their stereoisomers signal through two related receptor proteins to induce different physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 165:1221–1232
- Schellingen K, Van Der Straten D, Vandenbussche F, Prinsen E, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2014)** Cadmium-induced ethylene production and responses in Arabidopsis thaliana rely on ACS2 and ACS6 gene expression. *BMC Plant Biol* 14:214
- Scherer GFE, Holk A (2000)** NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regul* 32:345–350
- Schiavon M, Pilon-Smits EAH (2017)** The fascinating facets of plant selenium accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytol* 213:1582-1596

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E és mtsi. (2012)** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
- Schützendübel A, Polle A (2002)** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365
- Seymour JL, Lazarus RA (1989)** Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal Biochem* 178:243–247
- Shah T, Noor MA, Hasanuzzaman M (2019)** Role of nitric oxide in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. In: *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*. John Wiley & Sons Ltd USA, New Jersey pp 591–608
- Shahzad B, Tanveer M, Rehman A, Cheema SA, Fahad S, Rehman S, Sharma A (2018)** Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. *Plant Physiol Biochem* 132:641–651
- Shao H-B, Chu L-Y, Ni F-T, Guo D-G, Li HL, Li W-X (2010)** Perspective on phytoremediation for improving heavy metal-contaminated soils. In: *Plant Adaptation and Phytoremediation* Springer Netherlands, Dordrecht pp 227–244
- Shen Q, Wang Y-T, Tian H, Guo F-Q (2012)** Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 6:1214–1225
- Shinmachi F, Buchner P, Stroud JL, Parmar S, Zhao F-J, McGrath SP, Hawkesford MJ (2010)** Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiol* 153:327–336
- Sidhu GPS (2016)** Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. *J Global Biosci* 5:4603–4633
- Signorelli S, Corpas FJ, Borsani O, Barroso JB, Monza J (2013)** Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Sci* 201–202:137–146
- Smirnoff N (2000)** Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:1455–1464
- Smith GS, Watkinson JH (1984)** Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover. *New Phytol* 97:557–564
- Smith JM, Dasgupta TP (2000)** Kinetics and mechanism of the decomposition of *S*-nitrosoglutathione by ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 4:57–66
- Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008)** Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker? *Free Rad Biol Med* 45:357–366
- Stenlid G (1982)** Cytokinins as inhibitors of root growth. *56:500–506*
- Stirnberg P, Van De Sande K, Leyser HMO (2002)** MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Develop* 129:1131–1141
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001)** A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835–841
- Stöhr C, Ullrich WR (2002)** Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* 53:2293–2303
- Sun H, Bi Y, Tao J és mtsi. (2016)** Strigolactones are required for nitric oxide to induce root elongation in response to nitrogen and phosphate deficiencies in rice. *Plant Cell Environ* 39:1473–1484
- Swarbreck SM, Mohammad-Sidik A, Davies JM (2020)** Common components of the strigolactone and karrikin signaling pathways suppress root branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 184:18–22
- Takatsuka H, Umeda M (2014)** Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot* 64:2633–2643
- Takei K, Ueda N, Aoki K és mtsi. (2004a)** AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45:1053–1062
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004b)** *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J Biol Chem* 279:41866–41872
- Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH (2008)** Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:1219–1230
- Tanou G, Filippou P, Belghazi B, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012)** Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant J* 72:585–599
- Terrile MC, Paris R, Calderon-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalongue CA (2012)** Nitric oxide influences auxin signaling through *S*-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *Plant J* 70:492–500
- Terrón-Camero LC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM, Romero-Puertas MC (2020)** Nitric oxide is essential for cadmium-induced peroxule formation and peroxisome proliferation. *Plant Cell Environ* 43:2492–2507
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000)** Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401–432
- Thompson JW, Forrester MT, Moseley MA, Foster MW (2013)** Solid-phase capture for the detection and relative quantification of *S*-nitrosoproteins by mass spectrometry. *Methods* 62:130–137
- Tola AJ, Jaballi A, Missihoun TD (2021)** Protein carbonylation: emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10:1451
- Torrey JG (1976)** Root hormones and plant growth. *Annu Rev Plant Physiol* 27:435–459
- Tóth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L (2016)** Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ Inter* 88:299–309
- Tripathi DK, Mishra RK, Singh S és mtsi. (2017)** Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles phytotoxicity in wheat seedlings: implication of the ascorbate–glutathione cycle. *Front Plant Sci* 8:1

- Trippe RC, Pilon-Smits EAH (2021)** Selenium transport and metabolism in plants: Phytoremediation and biofortification implications. *J Haz Mat* 404B:124178
- Tsuchisaka A, Theologis A (2004)** Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* 136:2982–3000
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997)** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963–1971
- Umbreen A, Lubega J, Cui B, Pan Q, Jiang J, Loake GJ (2018)** Specificity of nitric oxide signalling. *J Exp Bot* 19:3439–3448
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A és mtsi. (2007)** Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 581:453–461
- Vallentine P, Hung C-Y, Xie J, Van Hoewyk D (2014)** The ubiquitin-proteasome pathway protects *Chlamydomonas reinhardtii* against selenite toxicity, but is impaired as reactive oxygen species accumulate. *AoB Plants* 6:plu062
- Van der Pas L, Ingle RA (2019)** Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants* 8:11
- Van Hoewyk D (2013)** A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Ann Bot* 112:965–972
- Van Meeteren U, Kaiser E, Malcolm Matamoros P, Verdonk JC, Aliniaefard S (2020)** Is nitric oxide a critical key factor in ABA-induced stomatal closure? *J Exp Bot* 71:399–410
- Végh A, Incze N, Fábrián A, Huo H, Bradford KJ, Balázs E and Soós V (2017)** Comprehensive analysis of DWARF14-LIKE2 (DLK2) reveals its functional divergence from strigolactone-related paralogs. *Front Plant Sci* 8:1641
- Villaécija-Aguilar JA, Hamon-Josse M, Carbonnel S és mtsi. (2019)** SMAX1/SMXL2 regulate root and root hair development downstream of KAI2-mediated signalling in Arabidopsis. *PLoS Genet* 15:e1008327
- Villaécija-Aguilar JA, Körösy C, Maisch L és mtsi. (2022)** KAI2 promotes Arabidopsis root hair elongation at low external phosphate by controlling local accumulation of AUX1 and PIN2. *Curr Biol* 32:228–236
- Vollár M, Feigl G, Oláh D és mtsi. (2020)** Nitro-oleic acid in seeds and differently developed seedlings of *Brassica napus* L. *Plants* 9:406
- Wakabayashi T, Hamana M, Moriryota A és mtsi. (2019)** Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Sci Adv* 5:eaax9067
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002)** Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14:S131–S151
- Wang Q, Smith SM, Huang J (2022)** Origins of strigolactone and karrikin signaling in plants. *Trends Plant Sci* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.009>
- Wani KI, Naeem M, Castrovverde CDM, Kalaji HM, Albaqami M, Aftab T (2021)** Molecular mechanisms of nitric oxide (NO) signaling and reactive oxygen species (ROS) homeostasis during abiotic stresses in plants. *Int J Mol Sci* 22:9656
- Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC (2017)** Strigolactone signaling and evolution. *Annu Rev Plant Biol* 68:291–322
- Welch RM (1981)** The biological significance of nickel. *J Plant Nutr* 3:345–356
- Welch RM, Norvell AW, Schaefer SC, Shaff JE, Kochian LV (1993)** Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190:555–561
- Welinder C, Ekblad L (2011)** Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10:1416–1419
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003)** Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15:2532–2550
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T (2006)** New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol* 8:371–381
- Werner T, Schmülling T (2009)** Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12:527–538
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I és mtsi. (2010)** Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* 22:3905–3920
- White PJ, Whiting SN, Baker AJM, Broadley MR (2002)** Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol* 153:201–207
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P és mtsi. (2004)** Interactions between selenium and sulphur nutrition in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 55:1927–37
- Whiting SN, Leake JR, McGrath SP, Baker AJM (2000)** Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 145:199–210
- Wilhelmová N, Fuksova H, Srbova M és mtsi. (2006)** The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *Biofactors* 27:203–211
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993)** Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol Gen Genet* 239:289–297
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GFE (2011)** Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181:593–603
- Xiao-Ping S, Xi-Gui S (2006)** Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiol Plant* 128:569–579
- Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C (2010)** Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch Biochem Biophys* 497:13–20
- Xu J, Yin H, Li Y, Liu X (2010)** Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiol* 154:1319–1334
- Xu S, Guerra D, Lee U, Vierling E (2013)** S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 4:430

- Yang H, Mu J, Chen L és mtsi. (2015)** S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiol* 167:1604–1615
- Yang H, Yang X, Ning Z és mtsi. (2022)** The beneficial and hazardous effects of selenium on the health of the soil-plant-human system: An overview. *J Haz Mat* 422:126876
- Yao J, Waters MT (2020)** Perception of karrikins by plants: a continuing enigma. *J Exp Bot* 71:1774–1781
- Yoneyama K, Akiyama K, Brewer PB és mtsi. (2020)** Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in *Arabidopsis*. *Plant Direct* 4:e00219
- Yoneyama K, Brewer PB (2021)** Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development? *Curr Opin Plant Biol* 63:102072
- Yruela I (2005)** Copper in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:145-156
- Yu M, Lamattina L, Spoel SH, Loake GJ (2014)** Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *202:1142-1156*
- Zelko I, Lux A, Sterckeman T, Martinka M, Kollárová K, Lišková D (2012)** An easy method for cutting and fluorescent staining of thin roots. *Ann Bot* 110:475–478
- Zeng H, Wu H, Yan F, Yi K, Zhu Y (2021)** Molecular regulation of zinc deficiency responses in plants. *J Plant Physiol* 261:153419
- Zhang L, Hu B, Li W és mtsi. (2014)** OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice. *New Phytol* 201:1183-1191
- Zhang M, Dong J-F, Jin H-H, Sun L-N, Xu M-J (2011)** Ultraviolet-B-induced flavonoid accumulation in *Betula pendula* leaves is dependent upon nitrate reductase-mediated nitric oxide signaling. *Tree Physiol* 31:798–807
- Zhang Z-W, Fu Y-F, Zhou Y-H és mtsi. (2019)** Nitrogen and nitric oxide regulate *Arabidopsis* flowering differently. *Plant Sci* 284:177-184
- Zhao C-R, Ikka T, Sawaki Y és mtsi. (2009)** Comparative transcriptomic characterization of aluminium, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 9:32
- Zhao H, Qian R, Liang X, Ou Y, Sun C, Lin X (2022)** Indium induces nitro-oxidative stress in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *J Haz Mat* 428:128260
- Zhao M-G, Chen L, Zhang L-L, Zhang W-H (2009)** Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151:755–767
- Zhao XQ, Mitani N, Yamaji N, Shen RF, Ma JF (2010)** Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol* 153:1871-1877
- Zhong S, Shi H, Xue C, Wei N, Guo H, Deng XW (2014)** Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 111:11
- Zürcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkerli K, Tarr PT Müller B (2013)** A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network *in planta*. *Plant Physiol* 161:1066–1075

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti a Szegedi Tudományegyetem vezetőségét, hogy lehetővé tették a munka elvégzését.

Szűkebb környezetemben szeretném megköszönni prof. dr. Fehér Attila jelenlegi és dr. Tari Irma korábbi tanszékvezetők támogatását.

Hálásan köszönöm prof. Erdei Lászlónak, aki 1995 és 2010 között vezette a tanszékét, hogy szakdolgozóként a csoportjába fogadott, lehetőséget biztosított a kutatómunka folytatására doktori, majd posztdoktori szinten, és az elmúlt 18 évben szüntelenül támogatott mind emberileg, mind pedig szakmailag.

Köszönöm az egykori közvetlen kollégáimnak és doktorandusz társaimnak (dr. Bartha Bernadettnek, dr. Guóth Adriennek, dr. Gémes Katalinnak, dr. Szepesi Ágnesnek, dr. Gallé Ágnesnek, Vidács Líviának, Kecskeméti Anitának), hogy a kezdeti években segítettek, támogattak és felejtethetlenné tették ezt az időszakot.

Hálásan köszönöm egykori és jelenlegi doktorandusz, posztdoktor hallgatóimnak (dr. Pető Andreának, dr. Lehotai Nórának, dr. Feigl Gábornak, dr. Molnár Árpádnak, Oláh Dórának, Selahattin Kondaknak) az áldozatos munkájukat, ami nélkül a bemutatott eredmények nagy része nem születhetett volna meg.

Köszönet illeti a szak- és diplomadolgozó hallgatóimat is, akik szintén hozzájárultak a bemutatott eredményekhez.

Köszönöm dr. Szöllősi Réka és Kapásné Török Éva segítségét egy-egy részfeladat végrehajtásában vagy a kísérletek elő- és utómunkálatai során.

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak a munkatársaknak, külföldi és hazai együttműködő partereknek, akiket bár név szerint nem említek, bármilyen formában segítettek a munkámat.

Köszönöm szüleimnek és nagymamámnak, hogy lehetővé tették számomra a tanulást, és folyamatosan ösztönöznek, motiválnak céljaim elérésében.

Köszönöm férjem, dr. Ördög Attila szüntelen, odaadó támogatását.

Ajánlom Bencének és Marcinak.

FÜGGELÉK

1. táblázat: A kutatások során felhasznált hormonmutáns és transzgenikus *Arabidopsis thaliana* vonalak.

| Mutáns elnevezése | NASC azonosító (ha van) | Lókusz | Vad típusú háttér | Leírás | Referencia |
|---|-------------------------|-------------|-------------------|--|-------------------------------|
| <i>aux1-7</i> (AUXIN RESISTANT 1) | N16704 | AT2G38120 | Col-0 | Auxinrezisztens és -deficiens vonal | Maher és Martindale (1980) |
| <i>ipt-161</i> (ISOPENTHENYL TRANSFERASE-161) | N117 | AT1G25410.1 | C24 | Az izopentenil-transzferáz gén terméke a citokinin-bioszintézisben játszik szerepet, a mutáns ezt túlexpresszálja, így 10-szeres zeatintartalommal bír a vad típushoz képest | van der Graaf és mtsi. (2001) |
| <i>hls1-1</i> (HOOKLESS 1) | N3037 | AT4G37580 | Col-0 | Csökkent etilénszintézist mutató vonal | Guzmán és Ecker (1990) |
| <i>etr1-1</i> (ETHYLENE RESPONSE 1) | N237 | AT1G66340 | Col-0 | Az ETR etilénreceptor mutációja miatt az etilénfüggő jelátvitel nem működik a vonalban, etiléninszenzitív | Chang és mtsi. (1993) |
| <i>max1-1</i> (MORE AXILLARY BRANCHES 1) | N9564 | AT2G26170.1 | Col-0 | A MAX1 gén terméke részt vesz a strigolaktonok szintézisében, ezért a mutáns strigolakton tartalma alacsonyabb a vad típushoz képest. | Stirnberg és mtsi. (2002) |
| <i>max2-1</i> (MORE AXILLARY BRANCHES 2) | N9565 | AT2G42620.1 | Col-0 | A MAX2 gén terméke közvetíti a strigolakton- és a karrikin-jelátvitelt is, így a mutáns ezekre érzéketlen. | Stirnberg és mtsi. (2002) |
| <i>htl3</i> (=kai2, KARRIKIN INSENSITIVE 2) | | AT4G37470.1 | Col-0 | A gén terméke a karrikin receptora, így a mutáns karrikin érzéketlen. | Guo és mtsi. (2013) |
| <i>d14</i> (DWARF 14) | | AT3G03990.1 | Col-0 | A gén terméke (alfa/béta hidroláz) a strigolakton-jelátvitelhez nélkülözhetetlen. A mutáns strigolakton érzéketlen. | Chevalier és mtsi. (2014) |
| <i>htl3/d14</i> | | | Col-0 | A dupla mutáns érzéketlen strigolaktonra és karrikinre. | Végh és mtsi. (2017) |
| <i>dlk2-1</i> és <i>dlk2-3</i> | | AT3G24420.1 | Col-0 | A vonal hibás a DWARF14-LIKE2 (DLK2) fehérjében, ami a karrikin- és strigolaktonreceptorokat is magába foglaló receptorcsalád harmadik tagja. | Végh és mtsi. (2017) |
| <i>dlk2-1/htl3</i> | | | Col-0 | A dupla mutáns hibás a karrikinreceptorban (<i>htl3=kai2</i>) és a DLK2 receptorban is. | Végh és mtsi. (2017) |
| <i>smax1/smxl2</i> | | | Col-0 | A vonal hibás a SUPPRESSOR OF MAX2 (SMAX1) és a SMAX1-LIKE2 (SMXL2) jelátviteli elemekben. | Végh és mtsi. (2017) |
| 35S:CKX2 | | | Col-0 | A transzgenikus vonal túlexpresszálja a citokinin-oxidáz 2-t, így kb. 40%-kal alacsonyabb zeatintartalommal bír a vad típushoz képest. | Werner és mtsi. (2003) |
| <i>cyr1</i> (CRYPTOCHROME 1) | N8032 | AT4G08920.1 | Col-0 | Citokininrezisztens vonal | Deikman és Ulrich (1995) |

2. táblázat: A kutatások során felhasznált, NO-homeosztázisban érintett mutáns és transzgenikus *Arabidopsis thaliana* vonalak.

| Mutáns elnevezése | Lókuszek | Vad típusú háttér | Leírás | Referencia |
|--|---|-------------------|---|------------------------------|
| <i>nia1nia2</i> (NITRATE REDUCTASE 1 and 2) | AT1G77760.1; AT1G37130.1 | Col-0 | A NIA1 génben pontmutációt, a NIA2 génben deléciót hordozó dupla mutáns, ami a vad típus nitrát-reduktáz-aktivitásának 0,5%-át mutatja, NO-szintje alacsonyabb a vad típusénál. | Wilkinson és Crawford (1993) |
| <i>nia1nia2noa1-2</i> (NITRATE REDUCTASE 1 and 2, NO ASSOCIATED 1) | AT1G77760.1; AT1G37130.1; AT3G47450.1 | Col-0 | Tripla mutáns, ami a NIA1, a NIA2 és a NOA1 génekben hibás, NO-tartalma extrém alacsony a vad típushoz viszonyítva. | Lozano-Juste és León (2010) |
| <i>nox1</i> vagy <i>cue1</i> (NO OVEREXPRESSION 1 vagy CHLOROPHYLL a/b BINDING PROTEIN UNDEREXPRESSED 1) | AT5G33320.1 | Col-0 | NO-, L-arginin- és L-citrullin-túlermelő mutáns. A mutáció kapcsolata a NO-túlermeléssel nem ismert. | He és mtsi. (2004) |
| <i>gsnor1-3</i> (GSNO REDUCTASE 1) | AT5G43940.2 | Col-0 | 80%-kal alacsonyabb GSNOR-aktivitás és magasabb S-nitrozotiol-tartalom a mutánsban a vad típushoz képest | Feechan és mtsi. (2005) |
| <i>35S::FLAG-GSNOR1</i> | | Col-0 | A GSNOR-gén termékét túexpresszáló transzgenikus vonal, melyben a S-nitrozotiol-tartalom a vad típushoz képest kissé alacsonyabb. | Frunghillo és mtsi. (2014) |

3. táblázat: A kutatások során felhasznált, ROF-homeosztázisban érintett, aszkorbát bioszintézis mutáns és transzgenikus *Arabidopsis thaliana* vonalak.

| Mutáns elnevezése | Lókuszek | Vad típusú háttér | Leírás | Referencia |
|---|-------------|-------------------|---|-------------------------|
| <i>vtc2-1</i> (VITAMIN C DEFECTIVE 2) | AT4G26850.1 | Col-0 | A gén terméke a GDP-L-galaktóz-pirofoszforiláz enzimet kódolja, ami részt vesz az aszkorbátszintézisben. A mutáns a vad típus aszkorbáttartalmának 25-30%-át mutatja. | Conklin és mtsi. (2000) |
| <i>vtc2-3</i> (VITAMIN C DEFECTIVE 2) | AT4G26850.1 | Col-0 | A mutáns a vad típus aszkorbáttartalmának 40-50%-át mutatja. | Conklin (2001) |
| <i>miox4</i> (MYO-INOSITOL OXYGENASE 4) | AT5G33320.1 | Col-0 | A transzgenikus vonal túlexpresszálja a MIOX4 gént, aminek terméke az aszkorbátszintézisben szerepel. A levélben 2-3-szoros az aszkorbinsav-tartalom a vad típushoz képest. | Lorence és mtsi. (2004) |

4. táblázat: A kutatások során felhasznált GUS- és/vagy GFP-riporterkonstrukciókat kifejező transzgenikus *Arabidopsis thaliana* vonalak.

| Transzgenikus vonal elnevezése | NASC azonosító (ha van) | Vad típusú háttér | Leírás | Referencia |
|--|-------------------------|-------------------|---|--------------------------------|
| <i>DR5::GUS</i> | | Col-0 | Auxin-indukálható DR5:GUS-riporterkonstrukciót kifejező vonal | Ulmasov és mtsi. (1997) |
| <i>ARR5::GUS</i> | N25261 | Col-0 | Citokininválasz ARR5:GUS-riporterkonstrukciót kifejező vonal | van der Graaf és mtsi. (2001) |
| <i>ARR5::GFP</i> | N23893 | Col-0 | Citokininválasz ARR5:GFP-riporterkonstrukciót kifejező vonal | D'Agostino és mtsi. (2000) |
| <i>TCS::GFP</i> | N66322 | Col-0 | Citokininindukálható TCS:GFP-riporterkonstrukciót kifejező vonal | Zürcher és mtsi. (2013) |
| <i>CKX4::GUS</i> , <i>CKX5::GUS</i> , <i>CKX6::GUS</i> | | Col-0 | Citokinin-oxidáz gének promóterének GUS-riportergénnel fuzionáltatott konstrukcióit kifejező vonalak | Werner és mtsi. (2003, 2010) |
| <i>ACS8::GUS/GFP</i> | N31385 | Col-0 | Az etilén-szintézisben részt vevő 1-aminociklopropán-1-karboxilát szintáz enzimet kódoló ACS8 gén promóterének GUS- és GFP-riportergénekkkel fuzionáltatott konstrukcióját kifejező vonal | Tsuchisaka és Theologis (2004) |

5. táblázat: A felhasznált primerek listája

| Gén elnevezése | Lókuszt azonosító | Forward primer (5' to 3') | Reverz primer (5' to 3') |
|-----------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>ACTIN2</i> * | At3g18780 | GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG | AACGACCTTAATCTTCATGCTGC |
| <i>GAPDH2</i> * | At1g13440 | AATGGAAAATTGACCGGAATGT | CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA |
| <i>ACS2</i> | At1g01480 | GGTGGTTATGAGCGGAGGA | TACGGGGAGGGAATGAGGA |
| <i>ACS6</i> | At4g11280 | AGGCACGCTGAGATAACCAC | AATCCATCCACAAGAACAAACC |
| <i>ACS8</i> | At4g37770 | TCTTCGTATTTTTGGGGTTGG | TTTGGATAATGCCGTCTGGG |
| <i>ACO4</i> | At1g05010 | CTTGTGAAAACCTGGGGCTTC | TGTTCCCTGGTCATCTTCTCC |
| <i>ERS1</i> | At2g40940 | AACCACGAGATGAGGACACC | GCCACAAGATTGCTGCTTTT |
| <i>ERS2</i> | At1g04310 | GTTCTGTGCTTGCCCTCAGTG | ATGTGAATCGCCTCTGGTGT |
| <i>EIN4</i> | At3g04580 | TGACTTTGATTCCGTTGCTG | TCATTTCTTCTGCCTCTTCA |
| <i>CTR1</i> | At5g03730 | CAGAAAATGGTGGTGGGTCT | TGTTTGGAACTGGCTGACTG |
| <i>GSNOR1</i> | At5g43940 | ACTGATGGCGGTGTTGACTA | TTGGAACGGACGAGTTGATA |
| <i>CCD7</i> | At2g44990 | CCTCTAAACGGGTGGAACAA | CGAATGGAAAATGGGGAAG |
| <i>CCD8</i> | At4g32810 | TTGTCTTGTGCCCTCTTCC | CTCATCATTGCTTTGGTTGTG |
| <i>D14</i> | At3g03990 | GGTTTCTCAACGACGAGGAT | AACAGCAAGCGGAGCAAAT |
| <i>MAX1</i> | At2g26170 | CGGGAAGAAACCAATCAAAG | TCGGAATCAGTAAGCCTAAGATG |
| <i>MAX2</i> | At2g42620 | TGTGGTGGTTTCTTGAGTCT | TTTGTATCCCTCGGTGAACG |
| <i>TRXh3</i> | At5g42980 | CGTAGTCTTCTTCAAGG | CTTTAGCAGCACCAACCACA |
| <i>TRXh5</i> | At1g45145 | CGGTGAAGGAGAAGTGATT | ATGAAACGGCAAGGTGGAC |

6. táblázat: *In vitro* S-nitrozilált fehérjék kontrollkörülmények között nőtt, 7 napos vad típusú *Arabidopsis thaliana* növényekben. A fehérjekivonatot 1 mM GSNO-val kezeltük. A fehérjéket nanoLC-MS/MS-sel vizsgáltuk tripszines emésztést követően. A MASCOT keresőmotort használtuk a fehérjék azonosítására az elsődleges szekvencia-adatbázisokból. A kapott spektrumokat a Progenesis QI szoftverbe (4.0-s verzió; Nonlinear Dynamics) töltöttük be az MS1 intenzitásalapú kvantifikáció céljából. Azonosító szám: a TAIR adatbázisban szereplő azonosító. A molekulatömeg kDa-ban van megadva. A táblázat tartalmazza a legnagyobb egyezést mutató peptidet, a talált egyedi peptidok teljes számát, valamint a megbízhatósági pontszámot. “not det. (nem meghatározott)”=a proteint csak az Asc+ mintában detektáltuk.

| Fehérje | kDa | Azonosító | peptidek száma | +Asc/-Asc arány 1. ism. | +Asc/-Asc arány 2. ism. | +Asc/-Asc arány 3. ism. |
|---|-----|-------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chaperone protein htpG family protein | 94 | AT2G04030.1 | 2 | not det. | 13186.87 | not det. |
| pyruvate dehydrogenase E1 beta | 44 | AT1G30120.1 | 2 | 3695.41 | 21343.26 | 5402.19 |
| Ribosomal protein L1p/L10e family | 24 | AT2G27530.1 | 2 | 112.16 | 119.61 | 2158.88 |
| carbonic anhydrase 2 | 36 | AT5G14740.1 | 3 | 870.96 | 155.93 | 340.60 |
| Ribosomal protein L1p/L10e family | 24 | AT1G08360.1 | 3 | 55.81 | 284.34 | 514.56 |
| vacuolar ATP synthase subunit C (VATC) / V-ATPase C subunit / vacuolar proton pump C subunit (DET3) | 43 | AT1G12840.1 | 2 | 37.73 | 390.12 | 272.29 |
| Lactate/malate dehydrogenase family protein | 36 | AT1G04410.1 | 2 | 11500.93 | 123.77 | 165.69 |
| rotamase CYP 3 | 18 | AT2G16600.1 | 4 | 73.20 | 1252.78 | 203.61 |
| rotamase cyclophilin 2 | 19 | AT3G56070.1 | 3 | 116.25 | 167.97 | 176.44 |
| chaperonin 60 beta | 64 | AT1G55490.1 | 4 | 68.02 | 130.63 | 283.74 |
| Ribosomal protein L35Ae family protein | 13 | AT1G07070.1 | 2 | 38.05 | 142.90 | 407.12 |
| Transketolase | 80 | AT3G60750.1 | 2 | 202.30 | 37.40 | 419.81 |
| Ribosomal L22e protein family | 14 | AT3G05560.1 | 2 | 6.84 | 213.59 | 321.61 |
| chaperonin-60alpha | 62 | AT2G28000.1 | 8 | 28.97 | 52.06 | 163.84 |
| ascorbate peroxidase 1 | 27 | AT1G07890.1 | 3 | 66.44 | 57.48 | 86.03 |
| rotamase CYP 4 | 28 | AT3G62030.1 | 5 | 94.73 | 45.39 | 90.81 |
| ATP synthase subunit beta | 54 | ATCG00480.1 | 3 | 22.15 | 84.21 | 78.03 |
| glutamine synthetase 2 | 47 | AT5G35630.1 | 3 | 79.68 | 34.77 | 68.51 |
| phosphoglycerate kinase 1 | 50 | AT3G12780.1 | 2 | not det. | 32.34 | 48.44 |
| triosephosphate isomerase | 27 | AT3G55440.1 | 2 | 38.32 | 48.41 | 49.12 |
| Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein | 94 | AT1G56070.1 | 7 | 16.63 | 56.96 | 54.13 |
| methionine adenosyltransferase 3 | 42 | AT2G36880.1 | 3 | 141.45 | 37.42 | 37.61 |
| Cobalamin-independent synthase family protein | 84 | AT5G17920.1 | 8 | 47.53 | 28.25 | 50.98 |
| fructose-bisphosphate aldolase 2 | 43 | AT4G38970.1 | 2 | 18.46 | 29.33 | 60.66 |
| photosynthetic electron transfer B | 24 | ATCG00720.1 | 5 | 20.12 | 16.71 | 63.08 |
| Enolase | 48 | AT2G36530.1 | 9 | 14.49 | 49.01 | 50.44 |
| S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase | 53 | AT4G13940.1 | 4 | 3.75 | 25.36 | 63.04 |
| photosystem II subunit P-1 | 28 | AT1G06680.1 | 4 | 427.59 | 26.28 | 34.37 |
| catalase 3 | 57 | AT1G20620.1 | 2 | 6.95 | 44.04 | 39.34 |
| rotamase cyclophilin 5 | 18 | AT4G34870.1 | 5 | 367.91 | 23.62 | 22.25 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit | 48 | AT1G42970.1 | 2 | 118.29 | 15.66 | 41.79 |
| ribulose-bisphosphate carboxylase | 53 | ATCG00490.1 | 20 | 93.51 | 18.19 | 30.06 |
| RAB GTPase homolog E1B | 52 | AT4G20360.1 | 3 | 25.27 | 15.02 | 27.86 |

| | | | | | | |
|--|----|-------------|----|----------|-------|-------|
| 40s ribosomal protein SA | 32 | AT1G72370.1 | 3 | 59.78 | 11.73 | 28.98 |
| Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein | 17 | AT5G18380.1 | 2 | not det. | 26.27 | 16.40 |
| GTP binding Elongation factor Tu family protein | 50 | AT1G07920.1 | 7 | 6.16 | 11.91 | 26.36 |
| rotamase CYP 1 | 18 | AT4G38740.1 | 3 | 5.28 | 79.64 | 24.38 |
| tubulin alpha-4 chain | 50 | AT1G04820.1 | 4 | 31.38 | 9.14 | 19.84 |
| ribosomal protein S15A | 15 | AT1G07770.1 | 3 | 3.84 | 22.02 | 20.69 |
| cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase | 46 | AT1G65930.1 | 4 | 13.77 | 6.02 | 26.56 |
| ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A | 20 | AT1G67090.1 | 4 | 9.79 | 7.21 | 22.83 |
| ADP/ATP carrier 1 | 41 | AT3G08580.1 | 5 | 4.36 | 12.35 | 18.26 |
| Ribosomal protein L22p/L17e family protein | 20 | AT1G27400.1 | 3 | 24.18 | 12.20 | 14.49 |
| Ribosomal L27e protein family | 16 | AT4G15000.1 | 2 | 6.46 | 26.05 | 12,58 |
| Ribosomal protein L14p/L23e family protein | 15 | AT1G04480.1 | 2 | 28.21 | 4.46 | 21.65 |
| ribosomal protein 5B | 23 | AT2G37270.1 | 2 | 18.77 | 10.05 | 9.71 |
| Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein | 30 | AT2G17360.1 | 2 | 6.01 | 6.94 | 13.74 |
| Glycine cleavage T-protein family | 44 | AT1G11860.1 | 3 | 3.42 | 36.03 | 11.64 |
| cell division cycle 48 | 89 | AT3G09840.1 | 5 | 7.05 | 4.88 | 13.90 |
| carbonic anhydrase 1 | 37 | AT3G01500.1 | 5 | 11.49 | 6.48 | 9.32 |
| Ribosomal protein L4/L1 family | 48 | AT5G02870.1 | 2 | 9.58 | 6.06 | 6.94 |
| rubisco activase | 52 | AT2G39730.1 | 12 | 5.24 | 5.24 | 9.39 |
| ribosomal protein S2 | 27 | ATCG00160.1 | 2 | 11.01 | 3.71 | 8.81 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 | 37 | AT1G13440.1 | 5 | 3.73 | 4.02 | 8.95 |
| Ribosomal protein S13/S15 | 17 | AT3G60770.1 | 2 | 1.62 | 5.99 | 7.27 |
| ribosomal protein 1 | 45 | AT1G43170.1 | 8 | 2.02 | 6.86 | 7.54 |
| Ribosomal protein L18ae/LX family protein | 21 | AT2G34480.1 | 2 | 2.88 | 3.97 | 5.99 |
| Ribosomal protein L19e family protein | 25 | AT1G02780.1 | 2 | 93.66 | 14.34 | 3.33 |
| Ribosomal protein S13/S18 family | 18 | AT1G22780.1 | 2 | not det. | 2.28 | 5.68 |
| Ribosomal protein S3Ae | 30 | AT3G04840.1 | 6 | 5.07 | 4.28 | 3.62 |
| photosynthetic electron transfer C | 24 | AT4G03280.1 | 2 | 4.41 | 2.28 | 6.00 |
| Ribosomal protein L2 family | 28 | AT2G18020.1 | 5 | 4.40 | 4.47 | 3.41 |
| Eukaryotic initiation factor 4A-2 | 47 | AT1G54270.1 | 2 | 15.30 | 2.79 | 3.36 |
| Ribosomal protein L24e family protein | 19 | AT3G53020.1 | 3 | 4.19 | 2.84 | 3.26 |
| Ribosomal protein S8e family protein | 25 | AT5G20290.1 | 2 | 44.05 | 3.67 | 2.23 |
| ribosomal protein L18 | 21 | AT3G05590.1 | 2 | 15.30 | 1.90 | 2.61 |
| nucleolin like 1 | 59 | AT1G48920.1 | 5 | 14.92 | 4.05 | 1.81 |
| ribosomal protein L5 | 24 | AT4G16720.1 | 2 | 57.39 | 7.90 | 1.30 |
| actin 7 | 42 | AT5G09810.1 | 6 | 1.66 | 1.34 | 1.83 |

7. táblázat: *In vivo* S-nitrozilált fehérjék Arabidopsis csíranövényekben. A fehérjéket nanoLC-MS/MS-sel vizsgáltuk tripszines emésztést követően. A MASCOT keresőmotort használtuk a fehérjék azonosítására az elsődleges szekvencia-adatbázisokból. A kapott spektrumokat a Progenesis Q1 szoftverbe (4.0-s verzió; Nonlinear Dynamics) töltöttük be az MS1 intenzitásalapú kvantifikáció céljából. Azonosító szám: a TAIR adatbázisban szereplő azonosító. A molekulatömeg kDa-ban van megadva. A táblázat tartalmazza a legnagyobb egyezést mutató peptidet, a talált egyedi peptidok teljes számát, valamint a megbízhatósági pontszámot. Az +Asc és –Asc közötti arány az egyes fehérjék S-nitrozációjának intenzitását jelenti. “not det. (nem meghatározott)”= a proteint csak az Asc+ mintában detektáltuk.

| Fehérje | kDa | Azonosító | peptidek száma | +Asc/-Asc arány 1. ism. | +Asc/-Asc arány 2. ism. | +Asc/-Asc arány 3. ism. |
|---|-----|--------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chaperone protein htpG family protein | 94 | AT2G04030.1 | 2 | not det. | not det. | not det. |
| Lactate/malate dehydrogenase family protein | 36 | AT1G04410.1 | 2 | 17.16 | 2.22 | 3.94 |
| 40s ribosomal protein SA | 32 | AT1G72370.1 | 3 | 28.80 | 2.38 | 3.59 |
| methionine adenosyltransferase 3 | 94 | AT2G36880.1 | 3 | 8.31 | 4.62 | 1.97 |
| Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein | 17 | AT5G18380.1 | 2 | 5.62 | 2.85 | 2.98 |
| photosynthetic electron transfer B | 24 | ATCG00720.1 | 5 | 4.21 | 2.77 | 2.84 |
| ADP/ATP carrier 1 | 41 | AT3G08580.1 | 5 | 2.12 | 2.40 | 3.51 |
| ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1 | 20 | AT1G67090.1 | 4 | 15.46 | 1.89 | 2.62 |
| RAB GTPase homolog E1B | 52 | AT4G20360.1 | 3 | 26.01 | 2.48 | 2.08 |
| Ribosomal protein L22p/L17e family protein | 15 | AT1G27400.1; | 3 | 7.44 | 2.54 | 2.08 |
| Ribosomal protein L18ae/LX family protein | 20 | AT2G34480.1 | 2 | 11.15 | 2.03 | 2.43 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C | 37 | AT1G13440.1 | 5 | 3.06 | 3.06 | 1.93 |
| Cobalamin-independent synthase family protein | 84 | AT5G17920.1 | 8 | 1.61 | 2.06 | 3.00 |
| Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein | 94 | AT1G56070.1 | 7 | 4.19 | 2.75 | 1.86 |
| rubisco activase | 52 | AT2G39730.1 | 12 | 4.46 | 2.11 | 2.16 |
| Ribosomal protein L4/L1 family | 45 | AT5G02870.1 | 2 | 3.07 | 2.94 | 1.66 |
| Ribosomal protein L19e family protein | 25 | AT1G02780.1 | 2 | 5.92 | 2.07 | 1.78 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit | 48 | AT1G42970.1 | 2 | 1.49 | 2.64 | 2.04 |
| ATP synthase subunit beta | 54 | ATCG00480.1 | 3 | 3.34 | 2.21 | 1.88 |
| GTP binding Elongation factor Tu family protein | 50 | AT1G07920.1 | 7 | 2.57 | 1.92 | 1.74 |
| ribosomal protein 1 | 45 | AT1G43170.1 | 8 | 3.62 | 1.49 | 1.92 |
| tubulin alpha-4 chain | 50 | AT1G04820.1 | 4 | 1.26 | 3.60 | 1.47 |
| Ribosomal protein S3Ae | 30 | AT3G04840.1 | 2 | 1.67 | 1.44 | 2.29 |
| Ribosomal protein L24e family protein | 19 | AT3G53020.1 | 3 | 2.43 | 1.83 | 1.60 |
| ribulose-bisphosphate carboxylases | 53 | ATCG00490.1 | 20 | 3.71 | 1.66 | 1.56 |
| Ribosomal protein S13/S15 | 17 | AT3G60770.1 | 2 | 2.84 | 1.80 | 1.28 |