

A nitrogén-monoxid (NO) szerepe, reaktív oxigénformákkal (ROF) és auxinnal való kapcsolata réz stressz során

Doktori (Ph. D.) értekezés

Megyeriné Pető Andrea

Témavezetők:

Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna

Egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Erdei László

Egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

Növénybiológiai Tanszék

SZTE TTIK



Szeged

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A réz.....	9
2.1.1. A réz, mint esszenciális mikroelem és nehézfém.....	9
2.1.2. Réz hiány és toxicitás	10
2.1.3. A réz felvétele és transzportja a növényekben	11
2.1.4. A stressz-indukált morfológiai válasz megjelenése NF kitettség hatására	13
2.2. Az auxin	15
2.2.1. Az auxin metabolizmus és szabályozása	15
2.2.2. Az auxin transzportja és jelátvittele	18
2.2.3. Az auxin metabolizmus nehézfém stressz alatt	20
2.3. Reaktív oxigénformák (ROF).....	21
2.3.1. A ROF-k képződése réz stressz során	23
2.3.2. A ROF-k detoxifikálása	24
2.3.3. A ROF-k, mint jelmolekulák szerepe a stressz-indukálta morfológiai válaszban.....	25
2.4. A nitrogén-monoxid (NO).....	26
2.4.1. A NO metabolizmusa a növényi sejtekben	27
2.4.2. A NO kimutatásának lehetőségei növényekben	29
2.4.3. A NO szint módosításának lehetőségei	30
2.4.4. A NO jelátvittele	31
2.4.5. A NO keletkezése és szerepe nehézfém stressz során.....	34
2.4.6. A NO szerepe a növények fejlődése során.....	36
3. Célkitűzés	39
4. Anyagok és módszerek.....	40

4.1. Növénynevelés, alkalmazott kezelések	40
4.1.1. A felhasznált növényi anyag	40
4.1.2. Növénynevelési körülmények	41
4.1.3. Alkalmazott kezelések.....	41
4.2. Alkalmazott módszerek.....	41
4.2.1 Morfológiai mérések	41
4.2.2. Hisztokémiai festés	42
4.2.3. Elemanalízis	43
4.2.4. Fluoreszcens spektrofotométer.....	43
4.2.5. Fluoreszcens mikroszkópia	43
4.3. Statisztikai analízis.....	48
5. Eredmények.....	49
5.1. Az általunk alkalmazott festékek specifikitásának <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> vizsgálata	49
5.2. Az általunk használt mutáns <i>Arabidopsis</i> vonalak NO és ROF szintjeinek vizsgálata.....	52
5.3. Réz felvétel, transzlokáció és mikroelem homeosztázis vad típusú <i>Arabidopsis</i> -okban	52
5.4. A réz hatása a lúdfű növények hajtásának és főgyökérének növekedése.....	54
5.5. A réz hatása az auxin és NO metabolizmusára	58
5.6. A NO és auxin kapcsolata a réz által szabályozott szervfejlődés során	65
5.7. A NO mutánsok (<i>nox1</i> , <i>nia1nia2</i> , <i>nia1nia2noa1-2</i>) morfológiája réz stressz alatt.....	66
5.8. NO (<i>nox1</i> , <i>gsnor1-3</i> , <i>nia1nia2</i>) – és aszkorbát mutáns (<i>vtc2-1</i> , <i>vtc2-3</i> , <i>miox4</i>) <i>Arabidopsis</i> -ok réz érzékenysége és növekedési válaszai	68
5.9. A NO közvetlen részvétele a réz tolerancia kialakításában.....	70
5.10. NO és ROF-k közötti kölcsönhatás <i>Arabidopsis</i> gyökerekben réz stressz során	71
6. Eredmények értékelése	73
7. Következtetések	83
8. Irodalomjegyzék.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
9. Publikációs lista	99
10. Köszönetnyilvánítás	105

11. Összefoglalás.....	105
12. Summary.....	112

Rövidítések jegyzéke

ADHP/AmplifluTM 10-acetyl-3,7-dihidroxifenoxazin, Amplex Red;

APX, aszkorbát peroxidáz;

Asa, aszkorbinsav;

cPTIO, 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid kálium só;

Cu/Zn SOD, réz/cink szuperoxid dizmutáz;

DAF-FM-DA, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát;

DHE, dihidroetídium;

DZ, differenciális/differenciációs zóna;

EDTA, etilén-diamin-tetraecetsav;

EZ, elongációs zóna;

FDA, fluorescein diacetát;

FGY, főgyökér

FT, friss tömeg;

GR, glutation reduktáz;

GSNOR, *S*-nitrozoglutation reduktáz;

H₂DCF-DA, 2'-7'-dikloro-dihidro-fluorescein diacetát;

H₂O₂, hidrogén-peroxid;

HNO₃, salétromsav;

ICP-MS, plazma indukciós tömeg spektrométer;

L-NAME, N^G nitro-L-arginin metil észter;

MES/KCl, 2-N-morfolin-etánszulfonsav/kálium-klorid;

MIOX4, mio-inozitol oxigenáz gén;

MZ, merisztematikus zóna;

NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid foszfát;

NF, nehézfém

NO, nitrogén-monoxid;

NR, nitrát reduktáz;

$O_2^{\cdot -}$, szuperoxid gyökanion;

OGY, oldalgöckér;

OH^{\cdot} , hidroxil gyök;

$ONOO^-$, peroxinitrit;

OXI1-MAPK, oxidatív jel indukáló 1 mitogén aktivált protein kináz;

oxy-E, oxietídium;

PAT, poláris auxin transzport;

PPT, foszfoenolpiruvát/foszfát transzlokátor;

RNF, reaktív nitrogénformák;

ROF, reaktív oxigénformák;

SIN-1, 3-morfolinoszidonimin *N*-etilkarbamid;

SNP, nátrium nitroprusszid;

SOD, szuperoxid dizmutáz;

SZT, száraz tömeg;

WT, vad típus;

X-Gluc, 5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-glükoronsav

1. Bevezetés

A növényeket a környezetükben számos stresszhatás érheti, mint például a talajban felhalmozódó nehézfémek okozta stressz. A réz (Cu) egy esszenciális mikroelem a növények számára és mindemellett egy olyan redox-aktív nehézfém is, mely magasabb koncentrációban toxikus lehet. Számos növényi szervben képes akkumulálódni és irreverzibilis károsodásokat okozhat. Közvetlenül csökkentheti a fotoszintetikus aktivitást, károsíthatja a lipideket, fehérjéket és a DNS-t, valamint sejthalálhoz is vezethet. Továbbá ismeretes az, hogy a réz a növényi szervek növekedési ciklusának korai szakaszában morfológiai változásokat idézhet elő. Ilyen lehet például a sziklevelek méretének csökkenése, főgyökér megnyúlás gátlás, illetve akadályozza a gyökér apikális merisztéma sejtosztódását. Csökkenti a hajtás és gyökér biomasszát, valamint a réz toxicitás tünetei lehetnek a klorózis és nekrosis is. Mindemellett átprogramozza a gyökérszőrök fejlődését, új merisztémák képződését segítve elő. A növények képesek a nem megfelelő környezeti feltételekre a szerveik növekedésének átrendezésével reagálni. Ezt nevezzük stressz-indukált morfológiai válasznak (SIMV), mely kialakításában az auxin, etilén és a ROF-k alapvető szereppel bírnak.

Az auxin, mint pl. az indol-3-ecetsav (IES) a növényi hormonok egyike, elősegíti a fejlődési folyamatokat a hajtás és gyökérrendszerben. Nagyon alacsony IES koncentráció fokozza a gyökérsejtek elongációját, míg a hipokotil megnyúlás bizonyítottan kevésbé érzékeny rá. Különböző stressz faktorok által indukált auxin homeosztázisban bekövetkező változások szintén részben felelősek lehetnek a morfológiai változásokért. A külső (környezeti) és belső (hormonális) regulációs elemek közötti gazdag jelátviteli hálózatban szignálmolekulák teremtenek kapcsolatot az egyes komponensek között, biztosítva a fejlődési és növekedési jelek összehangolását. Az auxin, mint morfogénnek alapvető szerepe van a réz hatására bekövetkező növekedés újraprogramozásában. Más átmeneti fémekhez hasonlóan a réz kétoxidációs állapota (Cu^+ and Cu^{2+}) közötti redox ciklus katalizálja a különböző reaktív oxigénformák (ROF) képződését, melyek károsíthatják a makromolekulákat. A réz hatására hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelődhet, a NADPH oxidáz aktivitása vagy a Fenton reakció révén termelődő szuperoxid gyökáion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dizmutálódása következtében, mely szignálmolekulaként génexpresszió szabályozásához vezethet. A nitrogén-monoxid (NO), a reaktív nitrogénformák (RNF) egyike, egy diffúzibilis gáz jelmolekula a növényekben, mely fiziológiai szerepe széleskörű. Részt vesz

a normál fejlődési folyamatokban, és szerepet játszik a biotikus és abiotikus stressz válaszokban is. Elmondható, hogy a RNF-k szerepét számos fiziológiai folyamatban felderítették növényekben, vagyis a NO és reakciótermékei nem specifikus, inkább általános, multifunkcionális jelmolekuláknak tekinthetők. Kutatási eredmények engednek arra következtetni, hogy a RNF-k, mint általános jelátvivő molekulák szerepet játszhatnak a stressz-indukálta morfogenetikai válaszok szabályozásában is.

Irodalomból ismert volt az auxin és a ROF-k fontos szerepe a nehézfém-indukált SIMV jelátvitelében, de mi feltételezzük, hogy a NO, mint fejlődés szabályozó molekula szintén szerepel a Cu által kiváltott stressz indukált morfológiai válaszban. Ezért vizsgálataink során a NO képződésére, működésére, szerepére, kölcsönhatásaira fókuszáltunk a réz stressznek kitett *Arabidopsis* növényekben.

Munkánk során vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a réz az idő függvényében a növények hajtás és gyökérzetére, valamint ezen folyamat háttérében milyen reakciók, hormonális és jelátviteli háttérmechanizmusok lehetnek. Megfigyeltük milyen kapcsolat létezik az auxin és nitrogén-monoxid között, valamint a reaktív oxigénformák és nitrogén-monoxid között. Ezen kívül vizsgáltuk milyen mechanizmusok vesznek részt a réz hatására létrejövő NO metabolizmus megváltozásában. A kísérletek során a morfológiai mérések, elemanalízis, hisztokémiai festés és fluoreszcens spektrofotométeres módszerek mellett legfőbbképpen fluoreszcens mikroszkópos technikát alkalmaztunk. Vizsgálatainkat vad típusú (Col-0), NO-, valamint aszkorbinsav-túltermelő és – hiányos lúdfű növényeken végeztük el.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A réz

2.1.1. A réz, mint esszenciális mikroelem és nehézfém

Korábban az oxigénmentes bioszférában a vasnak nagyon fontos szerepe volt a redox reakciókban, katalitikus folyamatokban. A cianobaktériumok és a fotoszintézis megjelenésének következtében kialakuló oxidáló légkör hatására szabadulhatott fel a réz az oldhatatlan szulfid sókból, és vált oldható Cu^{2+} formává, miközben a vas kevésbé elérhető lett az oldhatatlan vasoxidok képződése miatt (Burkhead és mtsai., 2009). Mára a réz egy esszenciális mikroelem a növények normális növekedési és fejlődési folyamataihoz. Számos fiziológiai folyamatban vesz részt, mint pl. a fotoszintetikus elektron transzport, a mitokondriális légzés, a sejtfal metabolizmus és számos hormonális jelátviteli útvonat, mint például az etilén érzékelés (Taiz és Zeiger, 2010). Mindezek mellett olyan fehérjék fontos strukturális eleme is, mint a plasztocianinok, a citokróm c oxidáz, a Cu/Zn SOD, a lakkáz, az aszkorbát oxidáz, az amin oxidáz, a fitocianin és a polifenol oxidáz (Burkhead és mtsai., 2009; Taiz és Zeiger, 2010). A réz enzimekkel kölcsönhatásba lépve részt vesz redox reakciókban, amely által reverzibilisen képes oxidálódni Cu^+ -ből Cu^{2+} formává. Példaként említhetjük meg a plasztocianinokat, amelyek a fotoszintézis fény reakciója során az elektron transzferben vesznek részt (Yruela 2009).

A réz ugyanakkor nehézfémnek is tekinthető. Nehézfémnek nevezzük mindazon elemeket, amelyek atom súlya nagyobb, mint 4 g/cm^3 , vagy legalább 5-ször nagyobb, mint a vízé (Nagajyoti és mtsai., 2010). Más irodalmi adatok szerint a nehézfémek sűrűsége elemi formában 5 g/cm^3 (Láng 2002; Sarma 2011). Ezek alapján a nehézfémek csoportjába 53 elem tartozik, a rézen kívül például az ólom (Pb), kadmium (Cd), nikkel (Ni), vas (Fe), króm (Cr), cink (Zn), és kobalt (Co) (Nagajyoti és mtsai., 2010; Sarma 2011). Több közülük esszenciális a növények számára (Zn, Fe, Mn, Mo), így a réz is. Egy nehézfém csak akkor képes pozitívan vagy negatívan befolyásolni a növények fejlődését, növekedését, ha számukra felvehető formában van jelen. Átlagosan 1-191 mg/kg réz fordul elő a talajokban (Stefanovits és mtsai., 1999). A talajban megtalálható réz koncentrációját leginkább az anyaközet félesége határozza meg, de emellett további (abiotikus és biotikus) tényezők is befolyásolják azt. Abiotikus tényezők a fém vízoldékonysága, komplexképző képessége (Láng 2002), míg biotikus tényezőnek tekinthető a növény hatása a talajra.

Köztudott, hogy a növények szerves savakat képesek kibocsájtani közvetlen környezetükbe, mellyel csökkentik a pH-t, így egyes elemek, mint a vas felvételét segítik elő. A réz a savanyú talajokban válik leginkább oldhatóvá, és a pH emelkedésével csökken az oldhatósága. A réz általában Cu^{2+} - ion formában van jelen, viszont redukzív körülmények esetén Cu^{+} - ionná alakul. Mivel a Cu erősen képes a talaj szerves anyagához, talajkolloidokhoz kötődni, ezért nehezen felvehető a növények számára, ugyanakkor vasoxidokhoz és más talajkolloidokhoz is kapcsolódhat (Stefanovits és mtsai., 1999). Hidropónikus közegben a leginkább hozzáférhető a réz, de agarban is nagyobb az elérhetősége, mint a talajban (Burkhead és mtsai., 2009).

2.1.2. Réz hiány és toxicitás

Epstein és Bloom (2005) szerint a növényi szövetek alap réz tartalma 2-50 $\mu\text{g/g}$ száraz tömeg. Agaros közegben 0,05 μM alatt jelentkeznek a hiány tünetei, míg a toxikusság szintjét 20 μM és ezen koncentráció felett állapították meg lúdfüvek esetében agaros közegben (Murphy és Taiz, 1995). Abdel-Ghany és Pilon (2008) szerint *Arabidopsis* növényekben, hidropónikus közegben 5 nM-os réz koncentráció alatt hiány, míg a 100 nM vagy magasabb koncentrációk esetén már toxicitás lép fel. Ha a szövetekben a réz koncentrációja meghaladja a 20 $\mu\text{g/g}$ -ot, az toxikus a növény számára (Burkhead és mtsai., 2009).

Növényekben rézhiányról akkor beszélünk, amikor a tipikus hiánytünetek megjelennek. Ezek a vegetatív szövetekben szárazanyagra vonatkozólag 5 $\mu\text{g/g}$ alá csökkent réztartalom mellett jelentkeznek (Burkhead és mtsai., 2009). Rézhiány esetében mindkét fotokémiai rendszer érintett, emellett a növények kisebb szénhidrát tartalommal rendelkeznek, a megtermékenyítés és pollenképződés gátolt. Legjellemzőbb tünete a gátolt lignifikáció, amelyből adódóan az ágak meghajolnak, a fiatal levelek deformálódnak, hervadhatnak. Ha a lignifikáció nem megfelelő a xilémekben, akkor a transzport hatékonysága is csökken. A rézhiány első tünetei között sorolhatjuk fel a sötétzöld leveleken megjelenő nekrotikus foltokat is, melyek a fiatal levelek csúcsainál jelennek meg először. Ezek a későbbiekben tovább terjednek a levél széleken át a levél alap felé (Taiz és Zeiger, 2010).

Az ipari, bányászati és mezőgazdasági tevékenységek hozzájárulnak a réz ökoszisztémában egyre nagyobb koncentrációban történő megjelenéséhez, így a növekvő előfordulása miatt jelentős környezetszennyező (Pilon-Smits és Pilon, 2002; Janas és

mtsai., 2010; Nagajyoti és mtsai., 2010). A galvántechika, vegyipar, festékek, tintagyártás, bőrkezelés, gyógyszerészet, textilgyártás, műtrágyagyártás vagy kohászat, papír gyártás során jellemző az előfordulása (Nagajyoti és mtsai., 2010). Azt, hogy egy ionnak milyen a károsító hatása, több tényező befolyásolja, melyek közül a fontosabbak az adott ion kémiai tulajdonságai, oldhatósága, mozgékonysága és felvehetősége. A károsító hatást meghatározza továbbá a hatás időtartama és az a koncentráció, ami a szervezetbe került. Döntő tényező lehet még magának a szervezetnek az állapota, kora és nem utolsósorban az alkalmazkodóképessége (Stefanovits és mtsai, 1999).

Nagy koncentrációjú rézkitettség esetén - egy nagyobb volumenű réztrágyázás, vagy réz tartalmú fungicidek többszöri alkalmazása következtében - a növények szervein toxicitási tünetek jelennek meg. Ilyen például a satnyulás, a hajtás és gyökér növekedésének gátlása, a levelek elszíneződése, klorózis és nekrosis (Marschner 1995; Reichman 2002). A réz többlete gátolja a vas felvételét és szállítását, így klorózis következhet be. A klorózis a lipidperoxidáció és az ebből adódó membrándezorganizáció következménye is. Ez a fém képes akkumulálódni számos növényi szervben közvetlenül okozva ez által a fotoszintetikus aktivitás csökkenését, vagy a szénhidrát tartalom növekedését, esetleg lipidek, fehérjék DNS károsodását vagy sejthalált (Shao és mtsai., 2010). Molekuláris szinten a toxicitás oka a fehérjékben a réz SH (tiol) csoportokhoz való kötődése, ami megakadályozza a fehérjék működését, táplálékhiányt indukál, károsíthatja a sejt transzport folyamatokat, és a sejt redox homeosztázisában zavart okoz (Yruela 2009). A toxikus rézkoncentrációk oldal- és főgyökér megnyúlás gátlást eredményeznek, ugyanakkor csökken a biomassza, mindemellett lecsökken a klorofill tartalom és megváltozhat a kloroplasztiszok szerkezete is. Módosul a tilakoid membrán elrendezés, a gránulák és sztróma lamellák degradálódnak, valamint intratilakoidális zárványok jelennek meg, ráadásul zavar keletkezik a fotoszintézisben is (Yruela 2005). Számos növényfajban (rizs, búza, bab és oregánó, valamint spenót leveleiben) tapasztalták réz kitettség mellett ezeket a tüneteket (Yruela 2009).

2.1.3. A réz felvétele és transzportja a növényekben

Az utóbbi évtizedben a kutatók nagy hangsúlyt fektettek a fém homeosztázis kutatására, és céljuk volt beazonosítani az eddig még csak valószínűnek tartott olyan molekuláris faktorokat, melyek részt vesznek a fémek transzportjában, eloszlásában, kelátképzésben.

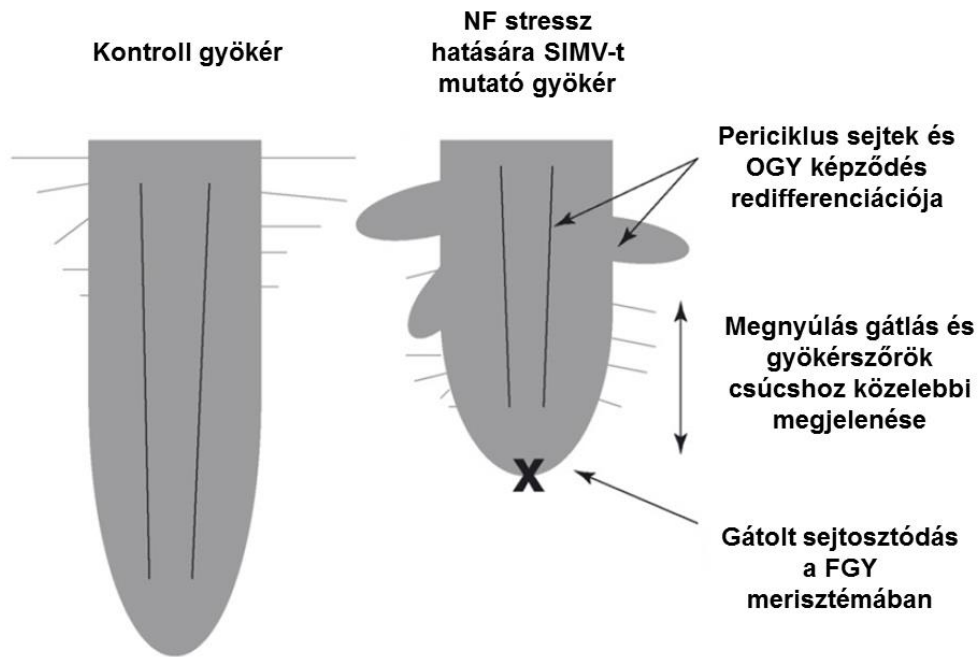
összeszerelődéséért felelős. A CCS chaperon feladatának azt feltételezik, hogy segít megbirkózni a sejteknek a réz hiányával (Yruela 2005).

Réz kitettség esetén a rézfelvételért felelős COPT1 és COPT 2 alulszabályzott, a HMA5 upregulálódik. Egy feedback mechanizmus működik, mely szabályozza a réz feltöltést és a gyökerekből való exportot. A nagy mennyiségű réz ellen a növények detoxifikációs mechanizmusokat, fejlesztettek ki. Ilyen védekezési mechanizmusok a fémfelvétel csökkentése mikorrhiza segítségével vagy extracelluláris kiválasztás révén, a plazmamembránon található fém pumpák effluxjának stimulálása, a fém transzlokációjának csökkentése, a vakuolumba, apoplastba, valamint az epidermisz- és trichóma sejtekbe történő kompartmentalizáció, a kelátképzés fitokelatinokkal, metallotioneinekkel, hősokk proteinekkel vagy szerves savakkal (Sarma 2011). Lúdfű növények esetében kimutatták, hogy elsődlegesen kelátiont használnak a réz okozta károsodások elkerüléséhez (Burkhead és mtsai., 2009). A réz többlet toxikus hatásainak csökkentését elősegítik a cistein gazdag metallotionein (MT) proteinek, és HMA5 transzporterek, melyek rézet exportálnak ki a sejtől. A szerves savak közül a citrát az, amelyik felelős a réz tolerancia kialakulásáért *Arabidopsis*-ban. A szerves savak fontos detoxifikáló faktorok, melyek megakadályozzák, hogy a szabad fémionok hosszú ideig a citoplazmában maradjanak azáltal, hogy fém-szerves sav kelátként a vakuolumba záródnak. További jelentős védelmi mechanizmus, hogy a nehézfémeknek kitett növények aktiválják a sejtjeik antioxidáns rendszerét, a fémtöbblet által okozott oxidatív stressz enyhítése érdekében (Yruela 2005).

2.1.4. A stressz-indukált morfológiai válasz megjelenése nehézfém kitettség hatására

A növények egyedülálló módon, növekedésük újraprogramozása révén képesek alkalmazkodni a szuboptimális környezeti feltételekhez, mint amilyen a réz többlete is. Először Pasternak és mtsai. (2005) figyelték meg a réz stressz növekedést serkentő hatását, hiszen a kezelt lúdfű növények oldalgyökér száma és gyökérszőr sűrűsége megnőtt a kontrollhoz képest. Ezt a fejlődési plaszticitást Potters és mtsai. (2007) stressz-indukált morfogenetikai válasznak (SIMV) nevezték el. A nehézfémek SIMV kiváltására képesnek bizonyultak, amit számos kutatás igazol (2. ábra, Potters és mtsai., 2007). A réz fent említett hatásán kívül az Pb, Zn, Cd kolibrifa fajokban, a Cr pedig búzában okozott morfogenetikai választ (Hasnai és Sabri, 1997; Yang és mtsai., 2004). A fémek elsődleges támadási pontja a gyökér, hiszen itt találkozik a növény először a fémmel. Ezért a NF-indukált morfogenetikai válasz fenotípus elsősorban a gyökérrendszerben jelenik meg,

aminek három fő tünete van: a főgyökér merisztéma sejtek osztódásának és a sejtmeignyulásnak a gátlása, valamint a periciklus sejtek redifferenciációja. Ezen sejt szintű folyamatok eredményeképpen a stressz-indukált morfogenetikai választ mutató gyökérzet főgyökere rövid, oldalgyökér száma emelkedett, gyökérszőrei pedig a csúcshoz közelebb jelennek meg (2. ábra, Potters és mtsai., 2007).



2. ábra. A gyökér nehézfém stressz-indukált morfológiai válaszát bemutató sematikus ábra; forrás: Potters és mtsai (2007).

A növekedési reorientációt parakvátal valamint H_2O_2 -dal történő kezelés hatására is megfigyelték, így feltételezték a ROF-k szerepét a stressz-indukált morfogenezis során (Pasternak és mtsai., 2005). Az alacsony aszkorbát tartalmú *vtc2* mutáns megnövekedett oldalgyökér száma szintén ezt a hipotézist támasztja alá (Olmos és mtsai., 2006). Potters és mtsai., (2007) korrelációt találtak a kadmium-indukált auxin eloszlás és oldalgyökér képződés között, és megállapították, hogy a SIMV fenotípus kialakulásának legfőbb háttérmechanizmusaként a gyökér normál auxin eloszlásának megváltozását tarthatjuk számon (Potters és mtsai., 2007).

2.2. Az auxin

Több mint 70 évvel ezelőtt elsőként fedezték fel és tanulmányozták az auxin nevű növényi növekedés szabályozó anyagot – fitohormont – mely nitrogén tartalmú indol gyűrűs szerkezettel rendelkezik. Bár a legnagyobb mennyiségben megtalálható természetes auxin az indol-3-ecetsav (IES) - az IES-t tekintjük a fő auxinnak a magasabb rendű növényekben (Normanly 2010) - ezen kívül más endogén auxinokat is azonosítottak növényekben, mint pl. a fenilecetsav (PAA), vagy 4-klórindol-3-ecetsav (4-Cl-IAA) és az indol-3-vajsav (IBA) (Taiz és Zeiger, 2010; Ljung 2013). További indol komponenseknek is van auxin-szerű aktivitása, mint például az indolpropionsav. A klórozott fenoxi- és benzoecsavak is auxin aktivitással rendelkeznek (2,4 diklórfenoxiecetsav (2,4-D), vagy az α -naftalénecetsav (α -NAA)), viszont ezeket szintetikus auxinoknak nevezzük. Azonban egyik szintetikus auxinnak sincs olyan szerteágazó aktivitása, mint az IES-nak (Erdei 2004).

Az auxin fiziológiai folyamatok széles skáláját kontrollálja. Többnyire minden növekedés és fejlődésbeli jelenséget szabályoz más hormonokkal együttesen. A legnyilvánvalóbb hatásai közé tartozik, hogy befolyásolja a sejtosztódást (serkenti citokininek jelenlétében), sejt elongációt, sejt differenciációt, sejt expanziót, apikális dominanciát, oldalgyökér képződést, virágzást és részt vesz a tropikus válaszokban is (Mashiguchi és mtsai., 2011). Szabályozza a sejtek és szövetek végső alakját és funkcióját minden magasabbrendű növényben. Kontrollálja a hajtás megnyúlást, valamint a gyökér- és gyökérszőr iniciációt is. A nagyon alacsony IES koncentráció növeli a gyökérsajt megnyúlást. Ezen kívül szerepe van a levél és termésleválás szabályozásában, a termésérésben vagy a partenokarpia indukcióját is befolyásolja. Leginkább a gibberellin hormonokkal együtt alakítja ki a virágok nemét (Erdei 2004).

2.2.1. Az auxin metabolizmus és szabályozása

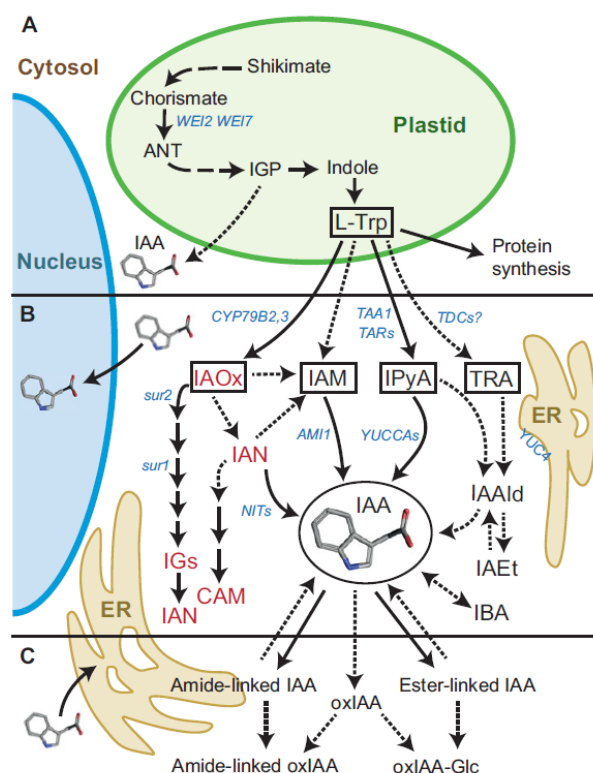
Bár az IES fontos szerepet tölt be a növények növekedése és fejlődése során, a képződése nem teljesen egyértelmű, valószínűleg az összetett útvonalak és a bioszintézis enzimek működésbeli sokszínűsége miatt (Zhao 2010; Mashiguchi és mtsai., 2011). A legfontosabb auxin szintézist végző szövetek az apikális merisztémák és a fiatal levelek (Bartel 2001; Peer és mtsai., 2011). A shikimate útvonal termeli a különböző indol komponensek bioszintéziséhez szükséges prekursorokat, az α -Tryptofánt, a fenilalanint és a tirozint (3. ábra). Ezek a prekursorok aromás aminosavak, de mellettük alkaloidok,

ligninek, flavonoidok és más aromás metabolitok is képződnek. Az IES keletkezése triptofán (Trp) függő és -független útvonalon keresztül történhet, mégis a növényekben a legfőbb útvonalnak az előbbi tekintik a kutatók. A Trp-függő auxin bioszintézis fontos az embriogenezisben, a csíranövények növekedésében, virágok fejlődésében, valamint az edénynyaláb mintázat kialakulásában (Zhao 2012). Négy Trp-ból kiinduló útvonal létezik (3. B ábra); ezek közül is talán a legfontosabb az indol-3-piruvát (IPA) keletkezésén keresztüli út, mely egy egyszerű, kétlépéses folyamat. A TRIPTOFÁN AMINOTRANSZFERÁZ (TAA1) és közeli homológjai (TAR1 és TAR2) alakítják át a triptofánt IPA-vá, ezt követően a YUCCA enzimek (YUC) szintetizálnak belőle IES-t (Zhao és mtsai., 2010; Zhao 2012). Az indol-3-acetamid képződésén keresztüli IES bioszintézis számos növényfajban megtalálható, mint pl. az *Arabidopsis*, a kukorica, a rizs és a dohány. Ezek mellett számon tartjuk a triptamin és az indol-3-acetaldoxim útvonalat az IES bioszintézisében. Ez utóbbi specifikus, csak néhány növény családban előforduló útvonalnak tekinthető (Erdei 2004). A lúdfüben és más növényekben is a Trp-független IES szintézis az indol-3-glicerol foszfátból (IGP) ágazik el, azonban ezen útvonal részletei jelenleg még nem tisztázottak.

A gyökérrendszer endogén auxin egyensúlya 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 auxin grádiens kialakításában a lokális szintézis mellett a poláris transzport is részt vesz. (Overvoorde és mtsai., 2010). A poláris és a floém alapú transzport serkenti az oldalgyökér primordiumok fejlődését, de a lokális auxin bioszintézis is nagy hatással bír ezek iniciációjára. A TAA1/TAR géncsaládban lévő mutációk csökkent IES szintet és gyökérspecifikus hibákat eredményeznek. A *wei8tar2* dupla mutáns - mely a TAA1 és a TAR2 génben is mutálódott - hibás gravitropikus választ és csökkent mértékű apikális dominanciát mutat, valamint más auxin-kapcsolt hatások is jelentkeznek benne (Stepanova és mtsai., 2008). Hasonlóképpen, a YUCCA gének expressziójában bekövetkező változások is befolyásolják az auxin bioszintézist és a gyökér fejlődését (Mashiguchi és mtsai., 2011). Más növényi hormonok, mint a citokinin és az abszizinsav is hatással vannak az auxin bioszintézisére, ezáltal a növények normál- és stressz körülmények között történő növekedésére, fejlődésére.

A transzkripciós faktorok PLETHORA családja (PLT) szerepet játszik a hajtáscsúcs IES képződésének szabályozásában. Az oldható cukrok szabályozzák a hipokotil megnyúlást a csíranövények korai fejlődése során az auxin bioszintézis befolyásolása révén. A jelátvitelt ebben az esetben a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) transzkripciós faktorok közvetítik (Lilley és mtsai., 2012).

Az indol-3-ecetsav szintje lecsökkenhet a konjugáció és a degradáció által (Normanly 2010; Rosquete és mtsai., 2012), melyet a 3. C ábra szemléltet. Az IES konjugálódhat aminosavakkal vagy cukrokkal, elraktározódhat a magokban, és felhasználódhat a korai csíranövény fejlődés során. A magok gazdag forrásai az IES-nek, ezért alkalmasak arra, hogy különböző IES konjugátumokat azonosítsanak belőlük. Ezek raktározott formáknak is tekinthetők, melyek hidrolizálódhatnak így szabad IES-se alakulnak. Az IES fő bomlástermékei a 2-oxoindol-3-ecetsav (oxIES, vagy oxIAA), valamint az oxIAA-glükóz (oxIAA-Glc) metabolitok (Novák és mtsai., 2012; Ljung 2013).



3. ábra IES metabolizmus a magasabbrendű növényekben (Ljung 2013)

(A) A triptofán, mint IES prekursor bioszintézise; (B) Triptofán függő IES bioszintézis útvonalak

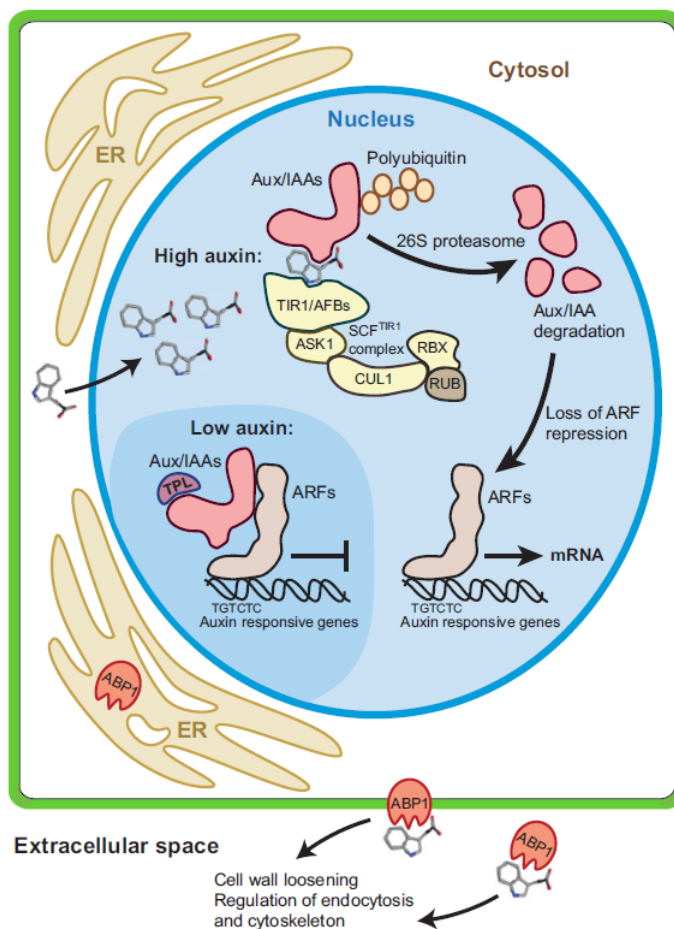
(C) Az IES degradációja és konjugációja

2.2.2. Az auxin transzportja és jelátvittele

Az auxin egy gyenge szerves sav, melynek alacsony pH-n protonálódnia kell ahhoz, hogy átjusson a membránokon. A különböző sejten belüli komponensek más-más pH-val rendelkeznek, így amíg a sejtfa apopasztikus folyadéka körülbelül 5-5,5 pH-jú, addig a citoplazma pH-ja 7 körüli. A protonált forma (IES-H) könnyen átdiffundál a membránokon, ellenben az IES⁻ csapdázódik sejten belül, és nem képes speciális transzporterek segítségével kijutni a citoplazmából. Speciális efflux szállító proteinek *Arabidopsis*-ban a PIN-FORMED (PIN) családhoz és az ATP Binding Cassette B alcsaládhoz (ABCB) tartozó fehérjék. A PIN családba 8 tag tartozik, és ezek 2 alcsaládba sorolhatók be, attól függően, hogy milyen hosszú a központi hidrofíli hurok. A PIN1 típusú, vagy hosszú fehérjék a PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 és PIN7, melyek a plazmamembránon helyezkednek el és fontos szerepet játszanak a poláris auxin transzport során (Zazimalová és mtsai., 2010). A másik alcsaládba a PIN5, PIN6 és PIN8 tartozik, melyeknek sokkal rövidebb a központi hidrofíli loop-juk (Peer és mtsai., 2011). A legfőbb influx karrierek lehetnek az AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) családba tartozó fehérjék és a PIN-szerű (PIN-LIKES; PILS) fehérjék; ez utóbbiak a citoplazma és az ER között szállítják az auxint. Az influx és efflux fehérjék a plazmamembránon helyezkednek el, és innen irányítják az auxin sejtől sejtbe történő szállítását, melyet poláris auxin transzportnak (PAT) hívunk. A poláris auxin transzport magába foglalja egyrészt a protonált auxin forma (IES-H) egy diffúzió kontrollált és pH függő felvételét a sejtbe vagy H⁺ kotranszportján keresztüli felvételt az AUX1 szállító fehérjékkel másrészt a közvetetten PIN fehérjéken keresztüli auxin efflux-ot (Gupta és Sandalio, 2012). A poláris transzportnak alapvető szerepe van a megfelelő auxin grádiens kialakításában, mely az embriogenezist, a gyökér növekedését, és az oldalgyökér képződést is irányítja (Zazimalová és mtsai., 2010; Peer és mtsai., 2011; Rosquete és mtsai., 2012; Ljung 2013; Krishnamurthy és Rathinasabapathi, 2013). A laboratóriumi gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott, poláris auxin transzportot gátló vegyület a naftilftálsav (NPA), vagy a 2,3,5-trijódbenzoesav (TIBA).

A 4. ábra szemlélteti az auxin jelátvitelét. 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 auxin szint mellett a hormon egy molekuláris ragasztóként működik az AUX/IAA és a TIR1/AFB

(TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX1) között, mivel általa tud kapcsolatba lépni a represszor és a receptor. A TIR1/AFB receptor egy sejtmagi hormonreceptor (Kepinski 2005; Rosquete és mtsai., 2012). *Arabidopsis*-ban 29 AUX/IAA válasz gént találtak, és 23 ARF-et. A represszor és a koaktivátor igen nagy száma utal arra, hogy az auxin válasz is elég komplex, mely függ az auxin szinttől és specificitástól, és attól, hogy milyen erős a kapcsolat a TIR1-AUX/IAA-AUX/IAA-ARF között. A növényi hormon jelátvittele során a leucinban gazdag TIR1 F-box auxin receptor köti meg az auxint. Az IAA közvetlenül lép kapcsolatba az F-box fehérje TIR1-gyel és elősegíti az Aux/IAA transzkripcionális represszor degradációját, hogy aktiválja a különböző auxin válasz géneket (Mockaitis 2008; Mashiguchi és mtsai., 2011). Az auxin által aktivált SCF^{TIR1} komplex a kötődés után ubiquitin molekulákat kapcsol az AUX/IAA korepresszorhoz, mely ezután leválik a receptorról és degradálódik a 26S proteoszómán keresztül. Ez által a folyamat által a MYC2/ARF transzkripciós aktivátorok aktív állapotba kerülnek, majd beindul az auxin indukált gének transzkripciója, a gének expressziója. A növényekben sok F-box fehérje van, melyek nagyfokú specificitást biztosítanak a növények számára. Az F-box fehérje az SCF ubiquitin ligáz komplex tagja, melyek a szubsztrát degradációt biztosítják a proteoszóma rendszeren keresztül. Az ubiquitin lánc által kijelölt szubsztrátot degradálják. Az SCF komplex tagja a TIR1/AFB F-box proteinen kívül még a kullin (CUL1), Skp1, ASK1, RBX1. A poliubiquitin a szubsztrátot képes ubiquitinálni a 26S proteoszóma rendszeren keresztül (Taiz és Zeiger, 2010; Overvoorde és mtsai., 2010). RUB1 is hozzákapcsolódik a rendszerhez, hogy szabályozza az SCF^{TIR1} komplex működését. TIR1-et (transport inhibitor response 1) mutáns *Arabidopsis*-okkal végzett kísérletek során sikerült azonosítani, melyből kiderült, hogy működik az auxin-függő hipokotil megnyúlás és oldalgyökér képződés során is (Taiz és Zeiger, 2010). Létezik egy proteoszóma független auxin jelátvitel is, melyhez a receptor (ABP1) az ER-ben és a sejtfalban lokalizálódik, és fontos szerepe van a sejtosztódás és a sejtmegnyúlás során (Scherer 2011; Ljung 2013).



4. ábra Az auxin jelátvittele (Ljung 2013).

2.2.3. Az auxin metabolizmus nehézfém stressz alatt

Az elmúlt években különböző módszerek segítségével bebizonyították, hogy a NF terhelés hatására a szervek auxin homeosztázisa megváltozik. A DR5:GUS lúdfü riporter vonalat használva, Lequeux és mtsai. (2010) kimutatták, hogy a réz-indukált fejlődésbeli módosulások részben az auxin metabolizmus és eloszlás megváltozásán keresztül jelennek meg. Az auxin-függő DR5 expresszió a főgyökér merisztémában lecsökkent, a felsőbb gyökérszakaszokban viszont fokozódott, biztosítva ezzel az auxin újraeloszlását a gyökérrendszerben. Xu és mtsai. (2010) Cd-kezelt *Arabidopsis* csíranövények sziklevelében az auxin érzékeny DR5::GUS promóter gátolt kifejeződését tapasztalták. Egy újabb tanulmányban a réz kitettség hatására a DR5::GUS kifejeződés fokozódását tapasztalták a gyökerek merisztematikus és elongációs zónájában, valamint kimutatták, hogy a PIN1 részt vesz a réz közvetítette auxin újraeloszlásban, ellenben a PIN2 és az AUX1 nem szabályozza a folyamatot. A Cu-indukált hidrogén-peroxid akkumuláció pedig

nem járul hozzá az auxin újraeloszláshoz és a növekedés gátlásához (Yuan és mtsai., 2013). Retek csíranövényekben jelentős mértékben lecsökkent a szabad és kötött IES koncentrációja Cu^{2+} és Cr^{6+} stressz hatására, mely csökkent hajtás és gyökernövekedéshez vezetett (Choudhary és mtsai., 2010). Alumínium terhelésnek kitett kukorica gyökerek megnyúlásának gátlása összefüggésben áll a bazipetális auxin transzport gátlásával (Kollmeier és mtsai., 2009). Arzén (As^{3+}) kezelést alkalmazva vad típusú és auxin transzporter mutánsok (*aux1*, *pin1* és *pin2*) esetében kiderült, hogy ez utóbbiak sokkal érzékenyebbek az arzén stresszre a vad típusú lúdfüvekhez képest. Az auxin transzport gátlása (naftilftálsav és naftiloxiecetsav alkalmazásával) jelentősen csökkentette a növények arzén toleranciáját. Ellenben a külsőleg a rendszerhez adott IES a vad típussal ellentétben javította az *aux1* mutánsok toleranciáját (Krishnamurthy és Rathinasabapathi, 2013). A NF stresszek a lebontás módosításán keresztül is befolyásolhatják az auxin homeosztázist. Például a Cd által gátolt gyökernövekedés megnövekedett peroxidáz aktivitással jár együtt, ami nagyobb mértékű auxin lebontást eredményez (Chaoui és mtsai., 2005).

2.3. Reaktív oxigénformák (ROF)

A Föld atmoszférájában az oxigén jelentős mennyiségben 2,2 milliárd évvel ezelőtt jelent meg a cianobaktériumok fotoszintézise révén (Halliwell 2006, Molnár 1984). A növényekben és más aerob szervezetekben a fotoszintetikus elektrontranszport eredményeképpen vagy különböző normál metabolikus folyamatok során a sejtorganellek reaktív oxigénformákat termelnek, melyek a molekuláris oxigén redukciójával jönnek létre (5. ábra). A reaktív oxigénformák csoportjába a molekuláris oxigénből származó szabadgyökök, reaktív molekulák és ionok tartoznak. A molekuláris oxigén aktiválódása két úton történhet: egyrészt energia elnyeléssel, mely során az egyik párosítatlan elektron spinje megfordul, másrészt lépcsőzetes redukcióval. A reaktív oxigénformák közé szabadgyökök, mint például a szuperoxid gyökanion (O_2^-), hidroxil gyök (OH^\cdot) vagy a hidroperoxid gyök (HO_2^\cdot) tartozik, valamint nem szabadgyök molekulák is, mint a hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) tartoznak (Gill és mtsai., 2010). Nagyon sokféle szabadgyök létezik, amelyek változatos mechanizmusok révén keletkezhetnek, például ha egy nem szabadgyökhöz egyetlen elektron hozzáadódik. Szabadgyöknek nevezzük az egy vagy több párosítatlan elektront tartalmazó molekulákat (Halliwell és Gutteridge, 2006). Ezáltal az O_2 molekula is egy szabadgyök, hiszen két

párosítatlan elektront tartalmaz parallel spinekkel. Ez a legstabilabb állapot, vagy alapállapot, mely a levegőben létezik körülöttünk teljesen ártalmatlan molekulaként (Halliwell 2006). A szabadgyököknek kettős szerepük van, hogy károsak vagy hasznosak-e, az a koncentrációjuktól függ. Magas koncentrációban károsíthatnak biomolekulákat, míg mérsékelt koncentrációban az intracelluláris jelátviteli hálózatban másodlagos hírvivőként funkcionálnak különféle válaszokat közvetítve a növényi sejtekben.

Az egyes reaktív oxigénformák eltérő kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A **szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$)** mérsékelten reaktív, rövid féléletidejű forma (kb. 1 μs), és nem képes a membránokon keresztüli diffúzióra. Egy párosítatlan elektronja van; neve ellenére kevésbé gyök, mint a molekuláris oxigén. Egy elektron felvételével peroxid iont képez (O_2^{2-}), mely nem formál gyököt, valamint gyenge kötés található a két oxigén atom között. A szuperoxid gyökanion képes felvenni egy elektront és két protont dizmutálódása során, ezáltal könnyen hidrogén peroxidot képez (Halliwell 2006). A **hidrogén peroxid (H_2O_2)** viszonylag stabil, mérsékelten reaktív és viszonylag hosszú féléletidejű (1 ms) molekula (Karuppanapandian és mtsai., 2011), melynek membránokon keresztüli mozgása az akvaporinokon keresztül valósul meg (Pastori és Foyer, 2002). Képes hidroxilgyököt képezni, valamint enzimeket inaktíválni a tiol csoportjaik oxidálásával. A stressz jelátviteli válaszokban másodlagos hírvivőként játszik szerepet. Kicsi, diffúzibilis molekula, melynek kettős szerepe van: egyrészt alacsony koncentráció mellett jelként funkcionál, miszerint indukálja a védelmi gének expresszióját, aktiválja a védelmi válaszokat abiotikus stresszre, másrészt magas koncentrációban oxidatív károsodást okozhat (Qiao és mtsai., 2014). A hidrogén peroxid nehézfém stressz alatt gyorsan termelődik, így valószínűleg kulcsfontosságú molekula a jelátvitel előidőzésében és a nehézfém toleranciában a növényekben (Hossain és mtsai., 2012). A **hidroxil gyök (OH^{\cdot})** egy nagy reaktivitású oxigénforma, mely a legtöbb szerves molekulával (lipidek, DNS vagy más makromolekulával) képes reagálni képződése után akár nanomásodperceken belül. A ROF-k családjában a legreaktívabb forma, melynek képződése oxidatív stresszhez vezethet. A szuperoxid gyökanionhoz hasonlóan, a OH^{\cdot} is egy párosítatlan elektronnal rendelkezik, tehát neve ellenére szintén kevésbé szabadgyök az O_2 -hez képest. További egy elektronnal peroxid ion keletkezik. A hidroxil gyököt a legreaktívabb ROF-nak is nevezik, mivel képes számos biomolekula irreverzibilis kémiai módosítására (Vranová és mtsai., 2002). A **szinglet oxigén (1O_2)** az O_2 legreaktívabb formája, mely párosítatlan elektron hiánya miatt nem szabadgyök. Toxikus reaktív oxigénforma, mely károsítja a

kloroplasztiszt, mivel elősegíti a telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek oxidációját. A jelátvitelben is fontos szerepet játszik, valamint nagy reaktivitása miatt sejthalálhoz is vezethet. (Halliwell 2006). A **hidroperoxid gyök (HO_2^\cdot) vagy perhidroxi gyök** az O_2^\cdot protonálódásával keletkezik, diffúzióval átjut a membránokon, és lipid hidroperoxidok kialakításával képes a lipidek auto-oxidációjának indukálására. Főleg a lipidek peroxidációjában vesz részt (Karuppanapandian és mtsai., 2011).

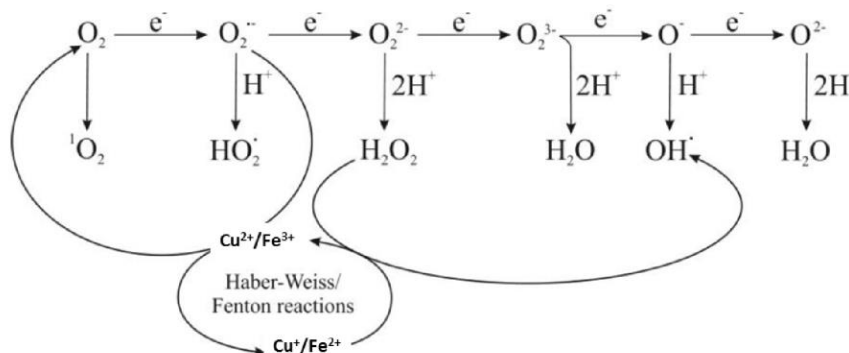
A ROF-k fő forrásai a kloroplasztisz, mitokondrium, peroxiszóma és apoplaszt-sejtfal kompartmentek, melyek a redox jelátviteli hálózathoz is lényegesen hozzájárulnak. Ezen kompartmentek közül is a kloroplasztisz az elsődleges ROF forrás. A Mehler reakción keresztül szuperoxid gyökanion és hidrogén-peroxid képződhet. A kloroplasztiszban termelődését követően a metilglioxál (MG) - mint belső közvetítő - katalizálja az oxigén fotoredukcióját, így szuperoxid képződéséhez járul hozzá. Ezért a MG hatékony detoxifikálása normál fiziológiai folyamatok, vagy abiotikus stresszek során egyike a legfontosabb növényi stressz tolerancia mechanizmusoknak (Saito és mtsai., 2011). A peroxiszómában a glikolát oxidáz hatására a glikolát oxidációja révén hidrogén-peroxid keletkezik. A xantin oxidáz peroxiszómális aktivitása során oxigénből szuperoxid gyökanion képződik, mely a szuperoxid dizmutáz (SOD) hatására hidrogén-peroxiddá dizmutálódik. A glikolát oxidáz, flavin oxidáz és a β -oxidáció is H_2O_2 keletkezéséhez vezet. A növényi mitokondrium az abiotikus stressz indukálta ROF képződés fontos forrása. A mitokondriális elektrontranszportlánc különböző dehidrogenáz komplexekből áll, melyek csökkentik az ubiquinon pool-t (Q). A plazmamembrán kötött NADPH oxidázok - csakúgy, mint a sejtfalhoz kapcsolt peroxidázok - felelősek a szuperoxid gyökanion és hidrogén-peroxid termelésért (Hossain és mtsai, 2012; Petrov és Van Breusegem 2012). NADPH-függő ROF termelést kimutattak nikkell stressznek kitett búzában, borsóban Cd-stresszre, vagy Cd és Cu terhelés során *Arabidopsis*-ban (Hao és mtsai., 2006; Rodríguez-Serrano és mtsai., 2006; Remans és mtsai., 2010).

2.3.1. A ROF-k képződése réz stressz során

Nehézfém stressz hatására drámaian megemelkedik a ROF-k képződése, és ezek a káros és nagyon reaktív molekulák más biomolekulákat képesek károsítani. A nehézfémek között különbséget tehetünk aszerint, hogy redox aktívak vagy inaktívak. A redox aktív nehézfémek közé tartozik például a Fe, Cu, Cr, Co, míg inaktív fém például a Cd, Zn, Ni vagy az Al is. Mindkét típusú fém képes oxidatív stresszt kiváltani, bár eltérő útvonalon.

Az előbbi csoportba tartozók a Fenton és Haber-Weiss reakciókat katalizálva vezetnek el nagyon toxikus reaktív oxigénformák kialakulásához, míg a redox inaktívak közvetett úton megzavarják az elektron transzportlánc működését, reakcióba lépnek az antioxidáns rendszer elemeivel, vagy épp lipid peroxidációt eredményeznek (Hossain és mtsai., 2012).

A réz, mint átmeneti fémion a Fenton és Haber-Weiss reakciókon keresztül katalizálja a ROF-k képződését (5. ábra). A Haber-Weiss reakció során a hidrogén-peroxid és a szuperoxid gyökanion vas vagy réz jelenlétében gyorsan hidroxil gyököt képez (Heyno és mtsai., 2011; Karuppanapandian és mtsai., 2011). A szuperoxid gyökanion és hidrogén-peroxid közötti nem enzimatis reakciók során OH^\cdot képződik, mely oxidatív stresszhez vezethet (Halliwell és Gutteridge, 1984). A növények hajtásrendszerére vonatkozóan a celluláris Fe és Cu pool-ok a kloroplasztiszokhoz kötöttek. A fotoszintetikus elektrontranszport egy potenciális ROF termelő. A nagyobb mennyiségű ROF-k képződése felelős a DNS, fehérjék és lipidek károsodásáért, tehát egy szigorúan szabályozott ROF szint fenntartása szükséges a sejtek normális működéséhez (Opdenakker és mtsai., 2012).



5. ábra A réz szerepe a Haber-Weiss/Fenton reakcióban, valamint a molekuláris oxigén univalens redukciója vízzé (Karuppanapandian és mtsai., 2011 nyomán).

2.3.2. A ROF-k detoxifikálása

A növények helyhez kötött életmódjukból kifolyólag nagyon érzékenyek a biotikus és abiotikus stresszre. Normál körülmények között több antioxidáns enzim és molekula tartja fenn a redox egyensúlyt a sejtekben. A különböző stresszorok viszont a ROF-k szintbeli változását idézik elő; a termelés és eliminálás közötti egyensúly felborul, indukálódik az antioxidáns védelem annak érdekében, hogy alacsonyan tartsa a ROF-k

szintjét. Oxidatív stressz történik, mikor a redox egyensúly zavart szenved a reaktív oxigénformák nagymértékű produkciója és/vagy az antioxidáns védelmi rendszer kimerülése miatt. A ROF-k gyorsan inaktíválják az enzimeket, intracelluláris organelumokat károsítanak, és membránkárosodást idéznek elő. Ezen kívül degradálják a pigmenteket, proteineket, lipideket vagy akár a DNS-t is, ami végül sejthalálhoz vezet (Karuppanapandian és mtsai., 2011; Ravet és Pilon, 2013).

A növények enzimatis és nem enzimatis védelmi rendszerrel rendelkeznek, ami képes megvédeni a sejteket az oxidatív károsodástól, és eliminálja a káros ROF-kat (Karuppanapandian és mtsai., 2011), hiszen nagy koncentrációban minden reaktív oxigénforma káros az élő szervezetekre. A toxikus oxigén szabadgyökök megemelkedett mennyisége maga után vonja az antioxidáns válasz erősödését is. Az antioxidáns védelmi rendszer enzimatis komponenseinek, mint pl. az aszkorbát peroxidáznak (APX), kataláznak (KAT), a dehidroaszkorbát reduktáznak (DHAR), guajakol-peroxidáznak, glutation reduktáznak (GR), monodehidroaszkorbát reduktáznak (MDHAR) és a szuperoxid dizmutáznak (SOD) módosul az aktivitása (De Vos és mtsai., 1992; Wang és mtsai., 2004; Lombardi és Sebastiani, 2005; Yruela 2005). A nem-enzimatis antioxidánsok közé tartozik az aszkorbinsav (AsA), a glutation (GSH), a karotinoidok, a tokoferol és a fenolok. Az antioxidáns válaszok levélben és gyökérben függnnek a réz többlet mértékétől, időtartamától, a növényfajtól és ökotípusától. A magas antioxidáns kapacitás fenntartása, mely eliminálja a káros ROF-kat, a környezeti stresszekkel szemben nagyobb fokú toleranciát eredményez (Sharma 2012).

2.3.3. A ROF-k, mint jelmolekulák szerepe a stressz-indukálta morfológiai válaszban

A réz stressz során képződő ROF-knak kettős szerepük ismert, hiszen nagy mennyiségben károsak a sejtek életfolyamataira, ugyanakkor alacsony koncentrációban másodlagos hírvivőként szerepelnek az intracelluláris jelátviteli hálózatban, ezáltal közvetítve számos választ a növényi sejtekben (Dat és mtsai., 2000; Mittler és mtsai., 2004; Sharma és mtsai., 2012). A ROF-k közül a H_2O_2 egy fontos messenger molekula a növényi sejtekben (Quan és mtsai., 2008; Petrov és Van Breusegem 2012). Réz-kezelt *Arabidopsis* növények gyökerében a H_2O_2 a $O_2^{\cdot -}$ dizmutálódása során termelődhet a NADPH oxidáz aktivitása vagy a Fenton reakció által. A H_2O_2 jelmolekulaként betöltött szerepe abban nyilvánul meg, hogy aktiválja az OXI1-MAPK kaskád, amely géneexpresszió változáshoz vezet, vagy a membránlipidek oxidatív károsodását okozhatja

az erősen toxikus OH^\cdot képződésén keresztül (Opdenakker és mtsai., 2012; Qiao és mtsai., 2014). A réz vagy akár a kadmium kezelés is megemeli a H_2O_2 szintjét, mely rövid idejű pulzálása közvetlenül ugyan nem öli meg a sejtet, viszont aktivizál lényeges válaszokat, mint a sejtelongáció csökkenése (Maksymiec 2007). A környezeti stresszek hatására kialakuló morfológiai válaszok jelátvitelében a hormonok mellett a ROF-k is kulcsfontosságú elemnek tekinthetők, hiszen befolyásolják a sejtosztódást, megnyúlást, valamint a differenciációt, ezáltal módosítva a növények morfológiáját (Potters és mtsai., 2009). Yuan és mtsai. (2013) kutatásai alapján, a réz stressz hatására bekövetkező auxin újraeloszlás szabályozásában a képződő H_2O_2 nem játszik szerepet, vagyis ez a ROF nem befolyásolja a réz-indukált gyökérmegnyúlás gátlást. A többi reaktív oxigénforma növekedésben betöltött jelátvivő szerepe kevésbé tanulmányozott. Feltehetően a hidroxil gyök sem csak az oxidatív stressz kialakulásához járul hozzá, hanem fontos szerepe van a gyökér és hipokotil növekedése vagy a csírázás folyamatában (Apel és Hirt, 2004).

2.4. A nitrogén-monoxid (NO)

A nitrogén-monoxidot először 1772-ben Joseph Priestley egy toxikus molekulaként írta le, mely a közlekedés vagy az ipari tevékenység során felszabaduló szennyező gázok egyik komponense. Felismerték 1987-ben, hogy a NO egy, az emberi szervezetben is megtalálható vérnyomást és szívműködést szabályozó jelátvivő molekula (Ignarro és mtsai., 1987). Ekkor került a figyelem középpontjába ez a kisméretű, gáz halmazállapotú molekula, melyet 1992-ben a Science folyóirat az „Év Molekulája”-ként említett (Koshland 1992). Jelentősége tovább fokozódott, mikor 1998-ban Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott és Ferid Murad orvosi Nobel-díjat kapott a NO, mint jelmolekula felfedezéséért. Növényekben való képződését először 1979-ben publikálták (Klepper 1979), majd az intenzív kutatásnak köszönhetően bizonyítást nyert, hogy a NO egy sokrétű funkcióval bíró jelátvivő molekula, hiszen szabályozza a növények növekedését, fejlődését és biotikus valamint abiotikus stresszválaszok szabályozó komponense is (Corpas és Barroso, 2013; Ahmad és Wani, 2014).

A NO jelátvivő funkció betöltéséhez elengedhetetlen tulajdonságokkal rendelkezik, hiszen kisméretű, töltés nélküli, lipidoldékony és nagy a diffúzibilitása, ami lehetővé teszi a membránokon keresztüli gyors mozgását, így nem kötődik receptorhoz. Félélettideje a legtöbb reaktív oxigénformához képest hosszú (3-6 s), ugyanakkor szabadgyök tulajdonságú és redox aktív is. Három, biológiai rendszerekben gyorsan egymásba alakuló

formája a nitrozónium kation (NO^+), a nitroxil anion (NO^-) és a nitrogén-monoxid gyök (NO^\cdot).

Biológiai rendszerekben a NO^\cdot gyorsan reagál a molekuláris oxigénnel (O_2), a szuperoxid gyökanyionnal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) és átmeneti fémekkel. A NO^\cdot reakciója oxigénnel különböző NO_x komponenseket eredményez, mint például a nitrogén-dioxid (NO_2^\cdot), a dinitrogén-trioxid (N_2O_3) és a dinitrogén-tetraoxid (N_2O_4), melyek reagálhatnak aminokkal vagy tiolokkal, vagy hidrolizálódnak nitrit (NO_2^-) és nitrát (NO_3^-) végű metabolitokká. A NO^\cdot és $\text{O}_2^{\cdot-}$ közötti reakció eredménye a peroxinitrit (ONOO^-) egy erős oxidálószer, mely sejt károsodásokat okozhat magasabb koncentrációban (Delledonne és mtsai., 2001). Fiziológiai pH-n gyorsan peroxinitrites savvá (ONOOH) alakul, mely hamar NO_3^- -tá és a nagyon reaktív hidroxil gyökké (OH^\cdot) bomlik. A NO átmeneti fémeket tartalmazó enzimekkel komplexeket képezhet, így képződik például a vas-nitrozil komplex. A folyamat által megváltozik a célfehérjék szerkezete és működése (Hayat és mtsai., 2010).

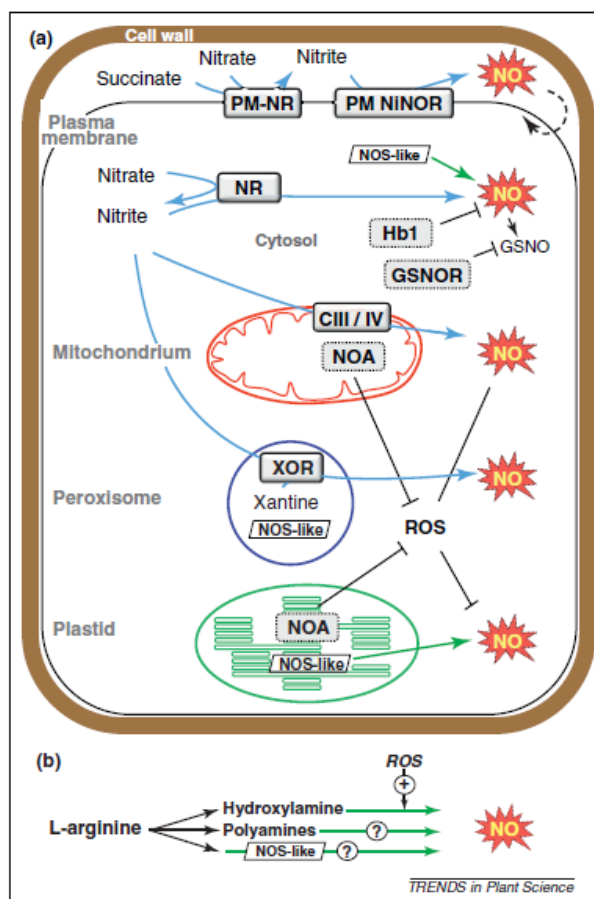
Az elmúlt években a reaktív oxigénformák analógiájára bevezetésre került a reaktív nitrogénforma (RNF) kifejezés, ami a nitrogén-monoxidot (NO) és reakciótermékeit foglalja magába. A molekulacsoport legjellemzőbb tagjai a N_2O_3 , NO_2^\cdot , a peroxinitrit (ONOO^-), az *S*-nitrozotiolok (RSNO) és az *S*-nitrozoglutation (GSNO) (Molassiotis és Fotopoulos, 2011). A reaktív nitrogénformák lehetnek gyök jellegűek, mint a NO^\cdot és a NO_2^\cdot , vagy nem gyökös molekulák, mint a salétromos sav (HNO_2), a N_2O_3 , a N_2O_4 , a nitrónium ion (NO_2^+), a ONOO^- vagy a ONOOH . Ezen kívül ide sorolhatók még az alkil peroxinitritek (ROONO), a nitroxil anion, valamint a nitrozónium kation (Hayat és mtsai., 2010).

2.4.1. A NO metabolizmusa a növényi sejtekben

Ellentétben az állati rendszerekkel, ahol a NO bioszintézisének útvonalai jól ismertek, a növényekben ez sokkal összetettebb, és csak részben felderített. A növényi sejtekben képződhet NO enzimaktivitás révén vagy nem enzimatis utakon keresztül (Saldago és mtsai., 2013).

A nem enzimatis folyamat során a nitrit spontán redukálódik NO -dá az apoplasztban, savanyú pH mellett illetve aszkorbinsav vagy fenol jelenlétében. Ez az útvonal a nitrit dizmutációjának felel meg NO -dá és nitráttá. A jelenleg rendelkezésünkre álló ismeretek szerint hét különböző enzimatis útvonalon képződhet NO a növényekben (6. ábra), melyek között oxidatív és redukatív folyamatokat is megkülönböztetünk (Gupta és

mtsai., 2011). Az oxidatív útvonal elegendő O_2 mellett, redukzív útvonal csökkent O_2 szint mellett történik.



6. ábra A különböző NO bioszintézis útvonalak sejten belüli elhelyezkedése (Gupta és mtsai., 2011).

(NO = nitrogén monoxid, PM-NR = Plazmamembrán kötött nitrát reduktáz, PM NINOR = Plazmamembrán kötött nitrit:nitrogén-monoxid reduktáz, NR = Nitrát reduktáz, NOS-like = Nitrogén-monoxid szintáz szerű enzim, Hb1 = hemoglobin 1, GSNO = S-nitrozoglutation, GSNOR = S-nitrozoglutation reduktáz, CIII/IV = mitokondriális elektrontranszportlánc III-as és IV-es komplexe), NOA = NO társult protein, XOR = xantin oxidoreduktáz, ROS = reaktív oxigénformák)

A **reduktív enzimátikus útvonalak** során nitritből (NO_2^-) képződik NO. Ide tartozik a plazmamembrán kötött nitrát reduktáz (**PM-NR**) enzim és a szintén a membránban lokalizált nitrit:NO reduktáz (**Ni:NR**) gyökerekben (Stöhr és mtsai., 2001). Ez utóbbi gyökérspecifikus enzim fontos feladata a talajban a nitrát elérhetőség érzékelése. Azonban a citoszólikus NR (**cNR**) is gyorsan megjelenik, mint fő forrása a NO-nak (Xu és Zhao, 2003), mely elegendő O_2 szint mellett működik. A NR nagy affinitással rendelkezik a nitráthoz, katalizálja a nitrát NADP(H)-függő redukcióját nitritté, majd a nitrit képes tovább redukálódni ammóniává a nitrit reduktáz (**NiR**) segítségével. Maga a NR képes a nitritet NO-dá tovább alakítani (Xu és Zhao, 2003). Ez viszont limitált folyamat, mert csak akkor működik, ha a nitrát koncentrációja magasabb, mint a nitrité (Bellin és mtsai., 2013).

A NO_2^- -ből történő NO szintézis reduktív enzimátikus útvonala a **mitokondriális elektron transzportlánc**on keresztül is megvalósulhat a mitokondrium belső membránjában, anoxiás körülmények között. Ilyen oxigénhiányos körülmények között a mitokondriumok jelentős mennyiségű NO-t képeznek a nitrit redukciója által. A peroxisómális xantin oxidoreduktáz (**XOR**) is nitritből képez NO-t kimondottan anaerob körülmények mellett NADH felhasználásával (Mur és mtsai., 2012). Az **oxidatív NO bioszintézis** egyik lehetősége a nitrogén-monoxid szintáz (**NOS**) - szerű enzim aktivitása, bár ennek az enzimnek a létezését a magasabbrendű növényekben az erőfeszítések ellenére még nem sikerült azonosítani. Legújabban Foresi és mtsai. (2010) az állati NOS közeli homológját azonosították az egysejtű zöld alga *Osterococcus tauri*-ből, mely 42%-os hasonlóságot mutat a humán NOS szerkezetével. A NO-szintáz állati sejtekben L-arginint oxidál L-citrullinná miközben NO-t generál (Saldago és mtsai., 2013). Az emlősökben 3 különböző NOS izoforma létezik: a neuronális nNOS, endotheliális eNOS és az indukálható iNOS, melyeket 3 különböző gén kódol. A három izoformának különbözik a lokalizációja, szabályozása és katalitikus tulajdonsága is. A poliaminok (**PA**), mint pl. a spermin és a spermidin NO képződést okoznak, és a hatás gyors megjelenése miatt közvetlen kapcsolat feltételezhető a PA és a NO között, bár a pontos mechanizmus jelenleg még ismeretlen (Gupta és mtsai., 2011). *Arabidopsis*-ban a réz amino oxidáz (CuAO) enzim közvetíti az abszcizinsav által indukált NO poliaminokból történő felszabadulását (Wimalasekera és mtsai 2011; Saldago és mtsai, 2013, Bellin és mtsai, 2013). Továbbá NO képződhet a hidroxilamin oxidációja révén is, bár ennek a vegyületnek a növényekben való természetes előfordulása nem bizonyított (Gupta és mtsai., 2011).

A NO keletkezése mellett az eltávolítása is hozzájárul az intracelluláris NO szint precíz szabályozásához. A NO reakciója szuperoxid gyökionnal, oxigénnel, glutationnal és hemoglobinnal a NO eliminációjához vezet. A NO bioszintézise és degradációja révén alakulhat ki egy NO egyensúly vagy homeosztázis a növényekben (He és mtsai., 2012; Saldago és mtsai., 2013; Freschi 2013).

2.4.2. A NO kimutatásának lehetőségei növényekben

Napjainkban kilenc különböző specifikus eljárás ismeretes a NO szint növényekben történő meghatározására (Tarpey és mtsai., 2004; Mur és mtsai., 2012). Egy nagyon népszerű módszer ezek közül a kemilumineszcencia, mely a NO-t gáz fázisban képes detektálni. Szintén gáz fázisban vizsgálható a NO a lézer-fotoakusztikus

spektroszkópia (LPAD) vagy a hangolható diódás lézer abszorpciós spektroszkópia (TDLAS) segítségével. Az EPR (elektro paramágneses rezonancia) spektroszkópia talán a legrugalmasabb módszer. Egyike azoknak, melyet már a 90-es évek előtt is használtak a NO metabolizmus tanulmányozására növényekben. Fő előnye a valós idejű meghatározás, és gyenge specifitása javítható gyökfogók használatával (Pagnussat és mtsai., 2002; Hayat és mtsai., 2010). A NO koncentráció meghatározására használható a hemoglobin módszer és különböző NO-szenzitív elektródok (amperometria) is. A számos módszer közül mégis a fluoreszcens festékek felhasználásával történő NO detektálás a legkedveltebb (Mur és mtsai., 2012), hiszen nem invazív, egyszerű, és lehetővé teszi a NO *in situ* detektálását a szövetekben, sejtekben. A diaminofluorescein (DAF) festékcsalád tagjain kívül manapság már más NO-specifikus fluorofórok is rendelkezésre állnak. A rodamin B alapú festék a NO mellett a ONOO^- -t és a OH^- -t is kimutatja (Mur és mtsai., 2012). Egy másik NO fluoreszcens próba az Europium(III) kelát, mely specifitásának bizonyítása még várat magára (Chen és mtsai., 2011).

2.4.3. A NO szint módosításának lehetőségei

Ahhoz, hogy tanulmányozni tudjuk a NO részvételét bizonyos fiziológiai folyamatokban, szükséges a növény endogén NO szintjének módosítása. Bevert módszer a **NO enzimatis forrásainak gátlása**, ami csökkent NO szintet eredményez. A nitrát reduktáz enzim gátlószereként ismeretes a wolframát, melyet széleskörűen használnak a növénybiológiai kutatásokban. Bár fontos szem előtt tartani, azt a tényt, hogy a wolframát nem specifikus NR inhibitor, hiszen számos más hatása is ismert, melyek nem köthetők a NR aktivitásának gátlásához (Xiong és mtsai., 2012). A NOS-szerű enzimek gátolhatók arginin analógokkal, mint a N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA; Kolbert és mtsai., 2008a) vagy a N^G -nitro-L-arginin-metilészter (L-NAME, Neill 2003), melyek az állati rendszerekben gyakran alkalmazott inhibitorok. Viszont a NOS enzimek létezése a magasabbrendű növényekben még vitatott, ezért óvatos következtetéseket kell levonni ezen gátlószerek használatával szerzett eredményekből. A leggyakoribb, NO szintet módosító kísérleti eljárás a **kémiai NO donorok és gyökfogók** alkalmazása. A NO donor vegyületek közé tartoznak az úgy nevezett NONOat-ok (Keefer és mtsai., 1996; spermidin vagy dietilamin-NONOat (1,1-dietil-2-hidroxi-2-nitrozohidrazin /DEANO/)), a *S*-nitro-*N*-acetilpenicillamin (SNAP), a nátrium nitroprusszid (SNP) és *S*-nitrozoglutation (GSNO) (Mur és mtsai., 2012). Ezenkívül a NO szintézis kiváltására használható az apocinin nevű gyulladás-csökkentő tulajdonságú növényi vegyület is (Tossi és mtsai., 2009; Hermes és

mtsai., 2013). A legtöbb kutatásban az SNP-t használják a NO felszabadítására, mely egy vas-nitrozil vegyület (He és mtsai., 2004; Dong és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2013). A donor vegyület fény általi bomlásának terméke a NO^+ , de melléktermékként kálium ferricianid és kálium ferrocianid is képződik, mely befolyásolhatja többek között a növény fotoszintetikus elektrontranszportjának működését (Wodala 2009). Fontos körütekintően dönteni arról, hogy melyik kémiai NO donorral dolgozunk, hisz mindegyik más NO képződést és melléktermékeket eredményez, melyeknek más-más hatásai lehetnek (Wodala 2009, Mur és mtsai., 2012). A kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetranetilimidazolin-1-oxid-3-oxid (PTIO) és karboxilált formája (karboxi-PTIO) a leggyakrabban használt NO gyökfogó molekulák, melyek a nitronil-nitroxidok közé tartoznak (Neill és mtsai., 2003). A PTIO vagy cPTIO reakcióba lép a NO gyökkel, mely reakció során PTI illetve cPTI és NO_2 keletkezik, vagyis a NO eliminálódik (Goldstein és mtsai., 2003). Egy ritkábban alkalmazott NO gyökfogó a hemoglobin (Hb), mely képes módosítani a NO szintet mind a növényi-, állati-, és baktérium sejtekben. Az *Arabidopsis* AtHb1 oxigén jelenlétében reagál a NO-dal, ami methemoglobin és nitrát keletkezéséhez vezet. (Crawford és Guo, 2005).

A biokémiai, farmakológiai vizsgálatokat célszerű **genetikai** megközelítéssel kombinálni. Léteznek a NO-ot a vad típusnál nagyobb mértékben termelő mutáns *Arabidopsis* növények, mint pl. a *nox1/cue1* (Crawford és Guo, 2005), a *gsnor1-3/hot5-2* (Feechan és mtsai., 2005) vagy a *rcd1* (Ahlfors és mtsai., 2009). Továbbá elterjedt a csökkent endogén NO tartalommal bíró *Arabidopsis* növények használata, mint pl. a *nia1nia2* (Wilkinson és Crawford, 1993; Kolbert és mtsai., 2008a) vagy a *nia1nia2noa1-2* (Lozano-Juste és León., 2010).

2.4.4. A NO jelátvittele

A NO-ot kis mérete, valamint lipidoldékony tulajdonsága kiválóan alkalmassá teszi jelátviteli folyamatok szabályozására. Napjainkban számos kutatócsoport foglalkozik a NO szignalizáció növényi növekedés-fejlődésben, valamint abiotikus és biotikus stresszválaszokban betöltött szerepének tanulmányozásával, mégis sok még a nyitott kérdés ezzel kapcsolatban.

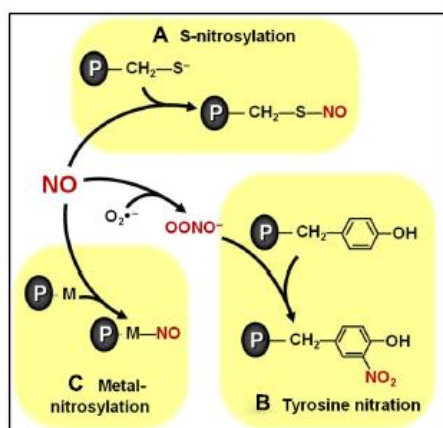
Az állati rendszerekben legjobban ismert NO szignalizációs útvonal a **cGMP**-n keresztül valósul meg. A NO reakcióba lép a szolubilis guanilát cikláz (sGC) enzimben található hem vassal, és a vas-hisztidin kötés felbomlása az enzim szerkezetének és funkciójának megváltozását okozza; az enzim aktiválódik és cGMP képződik. Sokáig

kérdéses volt a sGC enzimek létezése a növényekben, de mára világossá vált, hogy a növényi sejtekben számos ilyen enzim működik. Mulaudzi és mtsai., (2011) *Arabidopsis thaliana*-ban azonosítottak egy fehérjét (AtNOGC1), mely NO által befolyásolt sGC aktivitással rendelkezik.

Számos fiziológiai folyamatban (pl. biotikus stressz válaszok) bizonyították a NO és a Ca^{2+} közötti jelátviteli kapcsolat létezését a növényekben. A NO felszabadulása számos esetben Ca^{2+} -függő folyamat, ugyanakkor a NO is képes szabályozni a Ca^{2+} intracelluláris raktárakból történő felszabadulását illetve a sejtbe történő influxát. Továbbá a NO modulálja a Ca^{2+} szignalizációban szereplő gének expresszióját (Jeandroz és mtsai., 2013).

A NO jelátvitel a mitogén-aktivált protein kináz (**MAPK**) kaszkádon keresztül is megvalósulhat. A kaszkád elemei szerepelnek többek között abiotikus és biotikus stresszekben, a sejtciklus szabályozásában és az egyedfejlődésben. NO kezelést követően dohányban a MAPK kaszkád aktivációját figyelték meg (Clarke és mtsai., 2000; Capone és mtsai., 2004; Kumar és Klessig, 2000), valamint uborka járulékos gyökérfejlődése során szintén NO-által kiváltott MAPK kaszkád aktivációt írtak le (Pagnussat és mtsai., 2004).

A leginkább tanulmányozott jelátvitel folyamatok a **NO-függő poszttranszlációs módosulások** (PTM), melyek által a NO módosítja a fehérjék aktivitását és sejtbeli funkcióját. Jelenleg a NO-függő PTM-eknek három útvonala ismert: az *S*-nitroziláció, a tirozin nitráció és a fém nitroziláció (Freschi 2013, 7. ábra).



7. ábra A NO-függő poszttranszlációs módosítások három fő útvonala (Freschi 2013)

Az ***S*-nitroziláció**, vagyis a célfehérjék cisztein aminosavának kovalens módosítása a fiziológiai szempontból egyik legjelentősebb folyamat. Az *S*-nitroziláció során a NO reverzibilisen kötődik a célfehérje ciszteinjében levő tiol (SH) csoporthoz, így *S*-nitrozotiol

képződik (SNO). Az *S*-nitroziláció szerepét leírták a szalicilsav, etilén, abszcizinsav, citokinin és auxin által közvetített jelátvitelben (Freschi 2013; París és mtsai., 2013). Az *S*-nitrozilált fehérjék azonosítása *in situ* és *in vitro* egyaránt lehetséges a biotin switch technológiával. Az elsőként beazonosított *S*-nitrozilált fehérje az *Arabidopsis thaliana* hemoglobinja (AHb1) volt. Megfigyelték, hogy a reakció eredményeként csökkent az NO szint és nőtt az *S*-nitrozohemoglobin termelés (Perazzolli és mtsai., 2004; Romero-Puertas és mtsai., 2013). Az *S*-nitroziláció során kialakuló S-NO kötés nagyon labilis, és ez lehetőséget biztosít a denitrozilációra (Begara-Morales 2013). A denitroziláció az *S*-nitrozilációs jel megszüntetését eredményezi, így szabályozza a jelátvitel „ki/be kapcsolását”. Ilyen denitroziláz aktivitást mutattak ki két fő enzimátikus rendszernél: a glutation/*S*-nitrozoglutation reduktáz (GSH/GSNOR) és a tioredoxin/tioredoxin reduktáz (Trx/TrxR) (París és mtsai., 2013). A NO *S*-nitroziláció által szabályoz számos olyan fehérjét, melyek aktivitása alapvetően fontos a celluláris működésekben (Astier és mtsai., 2012). Ilyen fehérje például a NON-EXPRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENE1 (NPR1), mely kulcs szabályzóként működik a szalicilsav jelátvitelében patogéntámadás esetén (Leitner és mtsai., 2009; Astier és mtsai., 2012). A NADPH-oxidáz *S*-nitrozilációja során a növények képesek szabályozni az oxidatív stressz következtében fellépő sejthalált (Yun és mtsai., 2011; Mur és mtsai., 2012).

A tirozin nitráció egy peroxinitrit-függő folyamat, mely a szuperoxid gyökanyon és a nitrogén-monoxid reakciója során keletkezik. A ONOO⁻ egy erősen toxikus molekula, mely hidroxil gyököt képes képezni, ami más makromolekulák károsodását vagy akár sejthalált is okozhat (Mur és mtsai., 2012). A tirozin nitráció folyamata során egy NO₂ csoport adódik a tirozin aromás aminosav gyűrűjében az egyik ortho állású szénatomhoz, mely végül 3-nitrotirozin képződéséhez vezet. Korábban irreverzibilis folyamatnak tartották a nitrációs reakciót, újabban azonban felmerült a tirozin denitrálás lehetősége, ami történhet akár enzimátikusan akár nem-enzimátikusan is (Astier és Lindermayr, 2012). A legtöbb, eddig azonosított, nitráción átesett fehérje a fotoszintézishez és a nitrogén metabolizmushoz kapcsolódik (Molassiotis és Fotopoulos, 2011). Kimutatásuk történhet kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel, immunoblottal vagy immunoprecipitációval, MALDI-TOF MS és LC-MS/MS technikákkal. Ez utóbbi eljárást felhasználva 127 db, nitrálódott fehérjét azonosítottak *Arabidopsis thaliana*-ban (Lozano-Juste és mtsai., 2011). A nitráción átesett fehérjék száma növényfajonként, és akár szervenként is változó lehet.

A tirozin nitráció egy fehérje működését háromféleképpen módosíthatja: funkciónyeréssel (pl. citokróm-c esetében), funkcióvesztéssel (pl. ferredoxin NADP reduktáz esetében) vagy úgy, hogy nincs hatással a fehérjére. A leggyakoribb következmény a működésbeli gátlás (Corpas és Barroso, 2013; Corpas és mtsai., 2013). A tirozin nitrációt leginkább stressz körülmények között tanulmányozták növényekben és megállapították, hogy stressz hatására megnő a nitrálódott fehérjék mennyisége, vagyis fokozódik a tirozin nitráció, ami a nitrozatív stressz biomarkere (Corpas és mtsai., 2013).

Az ún. **fém nitroziláció** során a NO képes kölcsönhatásba lépni olyan fehérjékkel, melyek átmeneti fémeket (pl. Zn, Cu, Fe) tartalmaznak. A reverzibilis reakció során fém-nitrozil komplexek képződnek. Ez a PTM kimutatható infravörös spektroszkópiával, EPR-rel vagy krisztallográfiás módszerrel. Célfehérjék lehetnek a hem tartalmú fehérjék, mint a már fentebb említett sGC vagy a citokróm P450 vagy Fe-S klusztter fehérjék, mint pl. a mitokondriális akonitáz (Hayat és mtsai., 2010; Kovács és Lindermayr, 2013).

2.4.5. A NO keletkezése és szerepe nehézfém stressz során

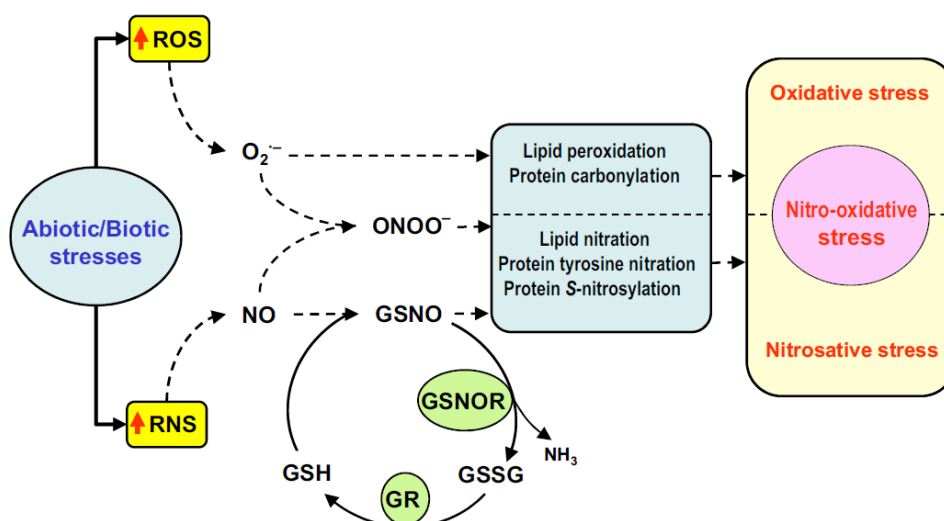
A különböző nehézfémek NO képződésre gyakorolt hatása eltérő, hiszen számos esetben NF-indukált NO akkumulációt tapasztaltak, míg mások a NO tartalom csökkenését detektálták. *In vitro* rendszerekben (szója és lúdfű sejtszuspenzió) a Fe és a Cd indukálta a NO produkcióját (Gould és mtsai., 2003; Arnaud és mtsai., 2006). *In vivo*, Bartha és mtsai. (2005) Cd, Cu valamint Zn által kiváltott NO képződést detektáltak borsó és indiai mustár gyökércsúcsában. Továbbá NO képződést okozott Cd kezelés lúdfű, búza és árpa gyökereiben, réz kitétség *Panax ginseng* járulékos gyökereiben vagy *Clamidomonas* algában. Ezzel ellentétben azonban NO csökkenés volt megfigyelhető többek között Al kezelés hatására *Arabidopsis*-ban, Cd hatására borsóban és rizsben (lásd referenciák Xiong és mtsai., 2010-es cikkéből). Ezek a látszólag ellentmondó eredmények arra utalnak, hogy a nehézfémek NO metabolizmusra gyakorolt hatása függ a fémek koncentrációjától, a kezelés időtartamától, a növény korától és fajától (Groppa és mtsai., 2008).

A NO nehézfém toleranciában betöltött szerepének tanulmányozása során Yu és mtsai. (2005) igazolták a NO réz stresszre gyakorolt enyhítő hatását rizs levelekben. Továbbá a NO javítja a réz toleranciát paradicsom csíranövények esetében (Dong és mtsai., 2013). A külsőleg alkalmazott NO (SNP formájában) védő hatással rendelkezett a toxikus Pb szintnek kitett lúdfű növényeken (Phang és mtsai., 2011).

Manapság úgy gondolják, hogy NO elsősorban a nehézfém-indukált **oxidatív stressz mérséklésével** járul hozzá a toleranciához. A NO oxidatív stresszt csökkentő hatása három módon valósulhat meg: (1) a NO eliminálja a Fenton-reakcióban szereplő vasat (Laspina és mtsai., 2005) (2) szabályozza az antioxidánsok aktivitását valamint (3) közvetlenül reakcióba lép a ROF-kal. Kopyra és mtsai. (2003) azt tapasztalták, hogy exogén NO (SNP formájában) enyhítette a nehézfémek okozta gyökérnövekedés gátlást részben a megnövelt SOD aktivitásnak köszönhetően. Rizs levelekben az exogén NO megakadályozta a H_2O_2 és a lipid peroxidációs termék, a malondialdehid felhalmozódását, csökkentette az aszkorbát és glutation szinteket, és fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását (Hsu és Kao, 2004). Valamint nehézfém kitettség alatt a NO indukálja a SOD, APX, DHAR, GPX, KAT aktivitását (lásd referenciák Saxena és Shekhawat, 2013-as cikkéből). Az oxidatív stressz csökkentése mellett a **nehézfémek felhalmozódásának limitálásában** is fontos szerepe van a nitrogén-monoxidnak. Az akkumulációt csökkentő mechanizmusok egyike során a NO fokozza a kallóz sejtfalba rakódását, valamint a pektin és hemicellulóz szinteket, amelyek poligalakturonsav tartalmukból adódóan megkötik a fémeket, így elzárják azt a sejtek érzékenyebb régiójától, a citoszoltól (Ernst és mtsai., 1992). A NO másik fém szintet csökkentő stratégiája a vakuólumba történő elzárás, amit a fém metallotioneinekhez és fitokelatinokhoz való kötődése előz meg. A NO a sztómák záródását is indukálja, ezáltal csökken a transzspiráció, gátlódik a fémek transzlokációja a gyökerekből a szenzitívebb hajtásba (García-Mata és mtsai., 2001). A NO képes a fémtoleranciát okozó **gének expressziójának** indukálására is (Grün és mtsai., 2006). Az egyik legfontosabb antioxidáns, a glutation génexpressziójának stimulálása által kétféle útvonalon is csökkenteni tudja a nehézfém stresszt, hiszen a glutation amellett, hogy fontos antioxidáns, a fémmegkötő tulajdonságáról ismert fitokelatinok prekursora is (Hossain és mtsai., 2012). A ferritin génexpresszióját pozitívan befolyásolva pedig a NO segíti a vas homeosztázis helyreállítását a nehézfém kezelt növényekben (Murgia és mtsai., 2002). Továbbá a NO-ról bebizonyosodott, hogy az IES-oxidáz enzim aktivitását gátolva hozzájárul egy **optimális auxin szint** fenntartásához a kadmium terhelt növényekben (Xu és mtsai., 2010).

A NO **közvetlenül képes reakcióba lépni a ROF-k** egyes képviselőivel, ezáltal befolyásolva azok metabolizmusát a nehézfém stressz alatt. Azonos szöveti lokalizáció esetén a NO és a O_2^- egymással reagálva peroxinitritet képeznek (Qiao és mtsai., 2014). Ez a reakció amellett, hogy a kevésbé káros peroxinitrit keletkezik végső soron a O_2^-

kioltásához vezet. A ONOO⁻ szint növekedése azonban maga után vonja a lipid és a fehérje nitráció fokozódását, ami másodlagos, ún. nitrozatív stressz kialakulását indukálja (Corpas és mtsai., 2011; Arasimowicz-Jelonek és Floryszak-Wieczorek, 2011). A ROF és NO közötti másik lényeges kölcsönhatás során kis mólsúlyú antioxidáns, a glutation *S*-nitrozilációt szenved, aminek következtében *S*-nitrozoglutation képződik. A GSNO-t egy körfolyamat során a GSNO-reduktáz alakítja GSSG-vé, ami a glutation reduktáz aktivitása révén GSH-vá redukálódik vissza (Corpas és Barroso, 2013). A GSNO *S*-nitrozilációs folyamatokat indukál, melyek megváltoztatják az enzimek szerkezetét és működését, így hozzájárulhatnak a nitrozatív stressz kialakulásához. A legújabb nomenklatúra szerint nitro-oxidatív stresszről beszélünk, hiszen a két másodlagos stressz hatás egymással szorosan kölcsönhatva jelentkezik (8. ábra, Copras és Barroso, 2013).



8. ábra Az abiotikus és biotikus stressz hatására képződő reaktív oxigén- és nitrogénformák közötti kölcsönhatás, azaz a nitro-oxidatív stressz (Corpas és Barroso, 2013).

2.4.6. A NO szerepe a növények fejlődése során

Elmondható, hogy a NO szerepét számos fiziológiai folyamatban felderítették növényekben, vagyis a NO nem specifikus, sokkal inkább általános, multifunkcionális jelmolekulának tekinthető.

A magasabbrendű növényekben a NO alapvető szerepet tölt be a növekedés és fejlődés során (Astier és mtsai., 2012). Szabályozza a magvak csírázását (Bethke és mtsai.,

2006; Belenghi és mtsai., 2007), a főgyökér elongációját, a gravitropikus választ (Hu és mtsai., 2005), az oldal- és járulékos gyökerek iniciációját (Correa-Aragunde és mtsai., 2004; Zhao és mtsai., 2007), a gyökérszőrök képződését (Lombardo és mtsai., 2006), a sztómazáródást (Neill és mtsai., 2002), valamint a virágzást (He és mtsai., 2004). Ezeken kívül a pollentömlő növekedése (Prado és mtsai., 2004), a gyümölcsérés, és az öregedés (Leshem és mtsai., 1998; Corpas és mtsai., 2004) szintén a NO által szabályozott fejlődési folyamatok. Továbbá a NO egy lényeges komponens számos abiotikus stressz során is (Corpas és mtsai., 2011).

A növekedési-fejlődési folyamatok egyik fő irányítója az auxin, melynek hatása sok esetben a NO közvetítésével nyilvánul meg. Pagnussat és mtsai (2002, 2003) korai munkáikban megállapították, hogy a NO elengedhetetlen a gyökér fejlődéséhez, valamint auxin-indukált NO szint növekedést figyeltek meg a járulékos gyökerek fejlődése során. Szintén az első NO-auxin kapcsolattal foglalkozó munkák egyikében felismerték a nem-szimbionta hemoglobin (ns Hb) szabályozó szerepét (Hunt és mtsai., 2002). A szerzők nagymértékben módosult auxin által irányított gyökérfejlődést tapasztaltak egy ns Hb-t túltermelő transzgenikus lúdfű vonalban, és eredményeiket a Hb által csökkentett NO szint következményeként magyarázták. Később paradicsom növényekben bizonyították a NO részvételét az auxin által kiváltott oldalgyökérfejlődés során (Correa-Aragunde és mtsai., 2004). A NO elősegíti az auxin által szabályozott sejtosztódás aktivációt, de nem befolyásolja a sejtciklus folyamatát lucerna növényekben (Ötvös és mtsai., 2005). Az *Arabidopsis* oldalgyökér primordiumaiban az exogén auxin kezelés hatására NO produkció történt, mely a nitrát reduktáz enzim aktivitásától függőnek bizonyult (Kolbert és mtsai., 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 mtsai., 2008b).

Az auxin NO képződésre gyakorolt hatásai mellett maga a NO is befolyásolja az auxin metabolizmusát, transzportját és jelátvitelét. Kadmium terhelésnek kitett gyökerekben a NO csökkenti az indol-3-ecetsav (IES) oxidáz aktivitását, ezáltal segít fenntartani a gyökér auxin homeosztázisát (Xu és mtsai., 2010). A NO képes gátolni az akropetális auxin transzportot *Arabidopsis* növények gyökerében az auxin efflux fehérje PIN-FORMED 1 (PIN1) csökkentésével a proteoszóma-független poszt transzkripciós mechanizmusok révén (Fernández-Marcos és mtsai., 2011). A legújabb eredmények

bizonyítékot szolgáltatottak a NO auxin jelátvitelt befolyásoló szerepére. Terrile és mtsai. (2012) kimutatták ugyanis, hogy a TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) auxin receptor fehérje 140-es és 480-as cisztein aminosava *S*-nitrozilálódni képes. Ez a NO általi poszttranszlációs módosulás elősegíti a TIR1 AUX/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) fehérjékkel való interakcióját. Ez utóbbi molekulacsoport az auxin jelátvitel represszora, mely a TIR1-gyel való kölcsönhatás következtében proteasómális degradációt szenved el. Az *S*-nitroziláció következtében tehát a represszor lebomlik, így az auxin-függő génexpresszió elindul.

A fentiekből is látható, hogy a réz többlete morfogenetikai válasz kialakulását idézi elő elsősorban a gyökérrendszerben. A SIMV jelátvitel azonosított szabályozó molekulái az auxin és a ROF. Mivel a NO, mint multifunkcionális szignál számos gyökérfejlődési folyamatot szabályoz és szorosan együttműködik az auxinnal és a reaktív oxigénformákkal is, feltételezhetjük, hogy a stressz-indukált morfogenetikai válasz szabályozásában is részt vesz. A Ph.D. munkám során ennek a hipotézisnek a tesztelésére vállalkoztam.

3. Célkitűzés

Kísérleteink fókuszpontjában a NO molekula állt. Vizsgáltuk képződését, szignáltranszdukciós útvonalban betöltött szerepét és más reaktív molekulákkal (ROF) való kapcsolatát réz terhelés hatására megjelenő morfológiai válasz során.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az idő függvényében (rövid és hosszabbtávú kísérletek) hogyan alakul a réz-indukált morfológiai válasz, hajtásra és gyökérre nézve?
- Van-e szerepe az auxinnak és a nitrogén-monoxidnak a réz-indukált morfológiai változások jelátvitelében?
- Milyen jellegű kölcsönhatás működik az auxin és a NO között réz stressz alatt?
- Milyen mechanizmusokkal magyarázhatóak a réz hatására a NO metabolizmusban bekövetkező változások?
- Milyen kapcsolat áll fenn a NO és a ROF-k között a réz tolerancia mechanizmusában, illetve hogyan vesznek részt a ROF-ok a stressz indukált morfológiai válasz kialakulásában?

Kísérleteinket *Arabidopsis thaliana* L. növények felhasználásával végeztük, melyekben a gyökérrendszer fejlődése mikroszkóp alatt jól tanulmányozható. A NO szerepének, valamint enzimatikus forrásának felderítése céljából a vad típus (Col-0) mellett, NO- valamint aszkorbinsav-túltermelő és -hiányos növényeket is használtunk.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növénynevelés, alkalmazott kezelések

4.1.1. A felhasznált növényi anyag

A kísérletek során Col-0 vad típusú, *nialnia2* dupla- és *nialnia2noal-2* tripla mutáns, valamint *nox1* (*cue1*) és *gsnor1-3* növényeket használtunk. Ezek mellett *vtc2-1* és *vtc2-3* és *miox4* *Arabidopsis thaliana* L. növényekkel dolgoztunk. Az auxin függő génexpresszió vizsgálatához DR5::GUS transzgenikus lúdfű növényeket alkalmaztunk. Minden felhasznált *Arabidopsis* vonal Kolumbia ökotípusú háttérrel rendelkezik.

Arabidopsis-ban a nitrát-reduktáz (NR) enzimet két gén kódolja: NIA1 és a NIA2. A *nialnia2*, dupla mutáns esetén a NIA1 génben egy pont mutáció van, míg a NIA2 génben deléció található, így a mutáns a vad típusú növény NR enzimaktivitásának csak 0,5%-át mutatja (Wilkinson és Crawford, 1993). A *nialnia2* növények amellet, hogy csökkent NO tartalommal bírnak, a vad típushoz képest kevesebb arginint és nitritet tartalmaznak (Modolo és mtsai., 2006). Losano-Juste és Léon 2010-es közleményükben mutatták be a *nialnia2-noal-2* tripla mutáns lúdfűvet, melyet a *nialnia2* és a *noal* *Arabidopsis*-ok keresztezésével hoztak létre, így ebben a NOS (AtNOA1)- és a NR (NIA/NR) által közvetített NO bioszintézis is hibás, ezért a vad típus gyökerét tekintve alacsonyabb NO szinttel rendelkezik. A *nox1*(*cue1*) egy olyan NO-túltermelő mutáns, amely magasabb L-arginin, L-citrullin és NO tartalommal rendelkezik a vad típushoz képest. A CUE1 (chlorophyll a/b binding protein underexpressed 1) gén, a kloroplasztisz belső membránjában található foszfoenolpiruvát/foszfát transzlokátort kódolja (He és mtsai., 2004; Crawford és Guo, 2005). A *gsnor1-3* *Arabidopsis* növények S-nitrozoglutation reduktáz (GSNOR) aktivitása 80%-kal alacsonyabb, mint a vad típusú növényeké. Magasabb össz S-nitrozotiol, nitrát és NO szintekkel rendelkezik (Feechan és mtsai., 2005; Rustérucci és mtsai., 2007; Lee és mtsai., 2008). A *vtc2-1* és *vtc2-3* típusú mutáns lúdfűvek alacsonyabb aszkorbinsav tartalommal rendelkeznek a vad típushoz képest (Conklin és mtsai, 2000). A *vtc2-1* növények a vad típus aszkorbinsav szintjének 25-30%-át, míg a *vtc2-3* növények annak 40-50%-át tartalmazzák (Conklin 2001). A mio-inozitol oxigenáz (MIOX4) gén túlexpresszált a *miox4* transzgenikus *Arabidopsis*-okban, ami így 2-3-szoros aszkorbinsav akkumulációt eredményez a leveleikben (Lorence és mtsai., 2004). A DR5::GUS transzgenikus lúdfű növényekben a nagy auxin érzékenysé

DR5 válaszelemet fuzionáltatták a β -glükoronidáz génnel, így a növények szubsztrátfestésével az auxin-függő génexpresszió *in situ* vizsgálható (Ulmasov és mtsai., 1997). A mintavételek minden esetben a növények 7 és 17 napos korában történtek.

4.1.2. Növénynevelési körülmények

Az *Arabidopsis* magokat 1 percig 70%-os etanollal (Reanal, Budapest, Magyarország), majd 20 percen át 30%-os (v/v) nátrium hipoklorit oldattal történő mosás után steril desztillált vízzel öblítettük öt alkalommal. Ezt követően a steril magokat szilárd $\frac{1}{2}$ erősségű MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajra ültettük ki. A táptalaj pH-ját 5.7-5.8-ra állítottuk be. A 7 napos kísérletekhez a Petri csészéket 24 óráig 4°C-on tartottuk, majd függőlegesen egy nevelőkamrában (FITOCLIMA S66PLH; Aralab, Portugália) nőttek a növények ellenőrzött körülmények között 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitás, 16/8 nappal és éjjel periódus, 55-60% relatív páratartalom és 25 \pm 2°C hőmérséklet mellett.

4.1.3. Alkalmazott kezelések

Réz kezelésként 5, 25 és 50 μM réz-szulfát (CuSO_4 ; Reanal, Budapest, Magyarország) oldatot adtunk a táptalajokhoz. Ezek mellett 1mM N^G -nitro-L-arginin-metilésztert (L-NAME) NOS inhibitorként, 1mM Na-wolframátot (Reanal, Budapest; Magyarország) NR gátlószereként alkalmaztunk. NO donorként 10 illetve 100 μM nátrium-nitroprusszidot (SNP), NO gyökfogóként 50 illetve 100 μM 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxidot (cPTIO) adtunk a táptalajhoz. A poláris auxin transzport gátlószereként 10 μM naftilftálsavat (NPA) alkalmaztunk. A magokat a már bekezelt táptalajokra helyeztük el, vagyis a kezelések minden esetben 7 illetve 17 napig tartottak.

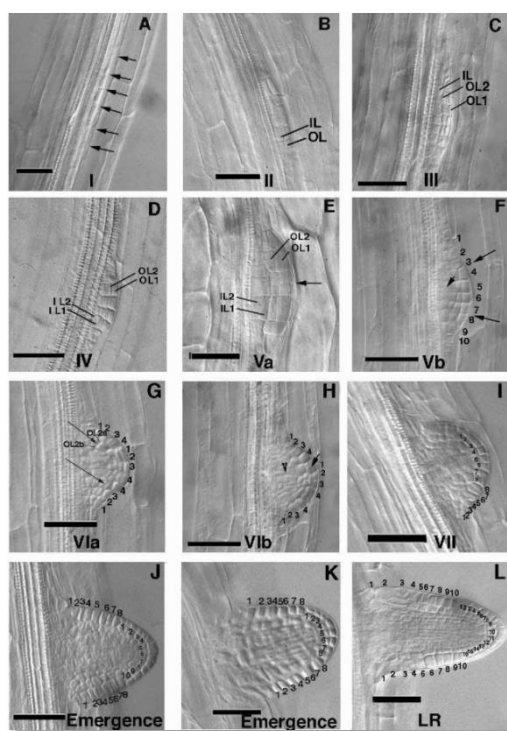
A legtöbb esetben a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) által forgalmazott vegyszereket használtunk, az ettől eltérő eseteket feltüntettem.

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1 Morfológiai mérések

A morfológiai méréseket manuálisan egy mérce segítségével végeztük el a főgyökerek hossza esetén. A FGY-k hosszát mm-ben fejeztük ki. A hipokotil hossz, a levélnyél hossz, a sziklevel átmérő és a levélszám megállapításához a laborunkban

található Zeiss Axiowert 200M típusú (Carl Zeiss, Jena, Németország) mikroszkóp 5-szörös objektívét használtuk, és az adatokat szintén mm-ben fejeztük ki. A legöregebb valódi levelek és a sziklevek területét Analyzing Digital Images program használatával mértük, valamint a 7 napos *Arabidopsis*-ok sziklevel területének becsléséhez a kör területére vonatkozó $r^2\pi$ képletet alkalmaztuk, mivel azok kör alakú szerveknek tekinthetők. Mindkét szerv adatait mm²-ben fejeztük ki. Az OGY-k számolását DR5::GUS transzgenikus 17 napos növényeken végeztük el. Az OGY-k fejlettségi állapotához Malamy és Benfey (1997) által leírt stádiumokat vettük alapul (9. ábra; A-H<VII. stádium; I=VII. stádium; J-L>VII. stádium; az ábra anyaga 2-6 hetes növényeken készült). A friss tömeg méréséhez egész csíranövényeket használtunk fel, és minden esetben 10 növényt mértünk le kezelésenként. A morfológiai megfigyelésekhez az előbb említett mikroszkópon kívül a Zeiss Axioskope 2000-C (Carl Zeiss, Jena, Németország) sztereomikroszkópot is használtuk.



9. ábra Az OGY-k fejlődési stádiumai Malamy és Benfey (1997) szerint.

4.2.2. Hisztokémiai festés

A DR5::GUS transzgenikus csíranövényeket 15 órán keresztül 37°C-on Eppendorf-csővekben inkubáltuk 1,5 ml 1 mM-os X-Gluc festékben, mely láthatóvá teszi a növények β -glükuronidáz aktivitását. A festéshez 0,1 M-os nátrium fosztát puffert (NaH_2PO_4 ; pH

7,0; Reanal, Budapest, Magyarország), 10 mM EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav), 0,1% (v/v) Triton X-100-at (LOBA-Chemie) és 1mM kálium-ferricianidot ($K_3Fe(CN)_6$) használtunk Jefferson és mtsai. (1987) módszere alapján. A mintákat 70% -os (v/v) etanollal mostuk, majd mikroszkóp tárgylemezre helyeztük őket.

4.2.3. Elemanalízis

A 2 hetes vad típusú (Col-0) *Arabidopsis* növények elemtartalom meghatározása a tanszékünkön található induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICP-MS, Thermo Scientific XSeries II, Asheville, USA) segítségével történt. A 14 napos csíranövények gyökerét és hajtását szeparáltuk és desztillált vízzel mostuk. Megközelítőleg minden kezelésnél 1000 csíranövényt használtunk fel a megfelelő száraztömeg eléréséhez. A 72 órás 70°C-on történő szárítás után salétromsavat (65%, w/v; Carlo Erba) és hidrogén-peroxidot (30%, w/v; Reanal, Budapest, Magyarország) adtunk a mintákhoz, ezt követően pedig egy mikrohullámú roncsoló (MarsXpress CEM, Matthews, USA) segítségével 200°C-on, 1600 W teljesítmény mellett, 15 percen keresztül roncsoltuk a növényi részeket. A mintákat - miután kihültek - kihígítottuk desztillált vízzel és elvégeztük az elemanalízist ICP-MS készülékkel. A réz és más mikroelemek, mint például Fe, Zn, Mn, Mo, B koncentrációit $\mu g\ g^{-1}$ száraz tömegben (SZT) fejeztük ki; és mindemellett hajtás: gyökér arányt számoltunk.

4.2.4. Fluoreszcens spektrofotométer

A DAF-FM, DCF és APF fluorofórok specifikálásának vizsgálatára *in vitro* a fluoreszcens spektrofotométer (Hitachi F-4500, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) szolgált. Minden esetben az excitációs hullámhossz 490 nm volt. Az emisszió DAF-FM és APF esetében 515 nm, míg a DCF fluoreszcens emissziója 525 nm-en vettük fel.

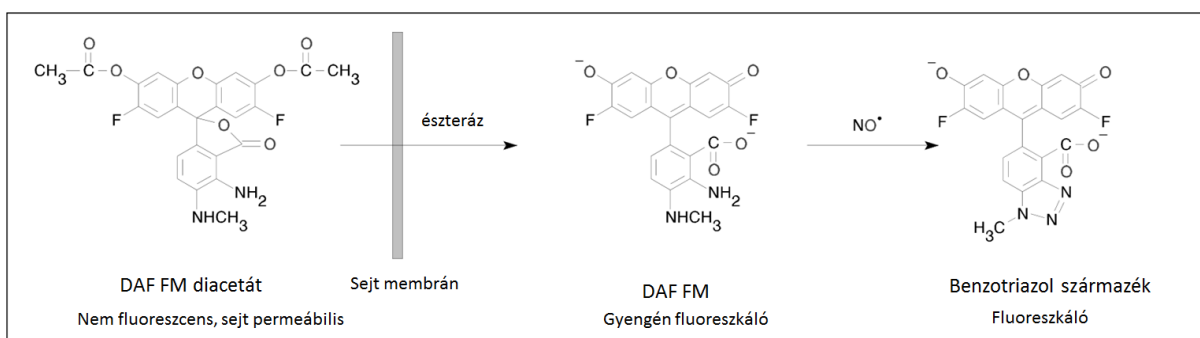
4.2.5. Fluoreszcens mikroszkópia

A RNF és ROF molekulák detektálását specifikus, fluoreszcens mikroszkópos technikával (Zeiss Axiowert 200M típusú mikroszkóp) végeztük el. A sziklevelek vizsgálata esetén ötszörös (FLUAR $\times 5/0.12$ NA) nagyítást alkalmaztunk, míg a gyökér különböző zónáit tízszeres objektívvel (FLUAR $\times 10/0.25$) vizsgáltuk. A különböző festékekhez különböző filter szettekét alkalmaztunk: 9-es szűrő (exc.: 450-490 nm; em.: 515- ∞ nm); 10-es filter (exc.: 450-495 nm; em.: 515-565 nm); 20HE szűrő (exc.: 535-585

nm; em.: 600-655 nm). A mintákról nagy felbontású (1300*1030 dpi) felvételeket készítettünk a mikroszkóphoz csatlakoztatott CCD kamera (Axiocam HR, HQ) segítségével. A gyökér merisztéma, elongációs zóna és differenciációs zóna esetében egységesen 45 µm-es sugarú kört alkalmaztunk a pixel intenzitás meghatározásához. A szikleveleknél középen helyeztünk el egy 600 µm sugarú kört, mellyel körülbelül lefedtük a teljes felületet, és így vizsgáltuk a fluoreszcens emisszió intenzitását. A fluoreszcencia intenzitásának megállapítását az Axiovision Rel. 4.8 nevű szoftver (Carl Zeiss Inc., München, Németország) segítségével végeztük. Kezelésenként 15-20 növénytel dolgoztunk.

NO detektálása

A lúdfüvek sziklevelének és gyökerének NO szintjét egy NO-specifikus fluoreszcens festékkel, a pH- és fotóstabil 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetáttal (DAF-FM DA) tettük láthatóvá (Corpas és mtsai., 2009). A festék membrán permeábilis, melynek az acetil csoportjait az intracelluláris észterázok hasítják le. Az így keletkező molekula könnyen reagál a N_2O_3 -dal, amely a NO oxidációs terméke. A reakció során egy fluoreszcens benzotriazol molekula (excitáció $\lambda=495$ nm, emisszió 515 nm) képződik (10. ábra). A zöld színű fluoreszcencia intenzitása arányos a szövetek NO tartalmával.



10. ábra Reakció séma a NO detektálására DAF FM DA-val

Forrás: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp23841.pdf>

Egész csíranövényeket vákuum infiltráltunk 10 percen keresztül, a festék szövetekbe történő bejutásának elősegítése érdekében, és 30 percen át inkubálódtak 10 µM DAF-FM DA festékkoldatban, sötétben, $25 \pm 2^\circ C$ -on. Mindig annyi festék oldatot használtunk, amennyi jól ellepi a növényeket a Petri csészékben (1,5-2 ml). A festék törzsoldatát 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) pufferben hígítottuk ki. A festést követően kétszer

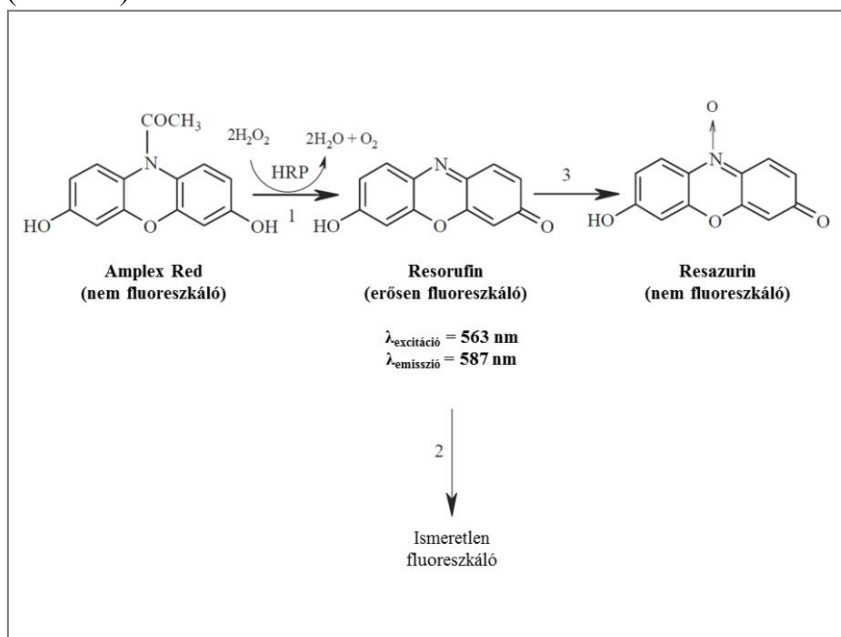
mostuk a növényeket 30 perc alatt Tris-HCl pufferrel, majd mikroszkóp tárgylemezre tettük azokat szintén Tris-HCl pufferben. A kísérletek során a 10-es szűrő szettet használtuk.

O₂⁻ detektálása

A szuperoxid gyökanion vizualizálására a dihidroetídium (DHE) festék szolgál. A szuperoxid oxidálja a DHE-t, amelyből egy specifikus fluoreszcens termék az oxyetídium (oxy-E) keletkezik. A folyamathoz két O₂⁻ szükséges és intermediereként etídium gyök keletkezik. Az oxy-E elég stabil molekula, nem redukálódik glutation, aszkorbát vagy NADPH hatására sem (Sandalio és mtsai., 2008). A DHE-t 10 µM-os koncentrációban használtuk 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) pufferben felvéve (Sandalio és mtsai., 2008). A festék narancssárga színnel jelzi a O₂⁻ jelenlétét. Egész csíranövényeket sötétben inkubáltunk fél órán keresztül 37°C-on 2 ml festékoldatban, majd Tris-HCl pufferrel kétszer mostuk le őket. Megfigyeléseinkhez 9-es filtert használtunk.

A H₂O₂ fluoreszcens meghatározása

A H₂O₂ *in situ* detektálására 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin (ADHP, Amplex Red (AR) vagy AmpifluTM) fluoreszcens festéket alkalmaztunk. Ez a festék a H₂O₂ jelenlétét piros színnel jelzi. Az AR egy nem fluoreszcens molekula, mely HRP (tormaperoxidáz, horse radish peroxidase) jelenlétében H₂O₂ által oxidálódik. A folyamat eredményeként resorufin keletkezik, mely már egy erősen fluoreszkáló termék (exc.: 563 nm; em.: 587 nm). Ha a resorufin tovább oxidálódik, akkor egy nem fluoreszkáló resazurin keletkezik (11. ábra).

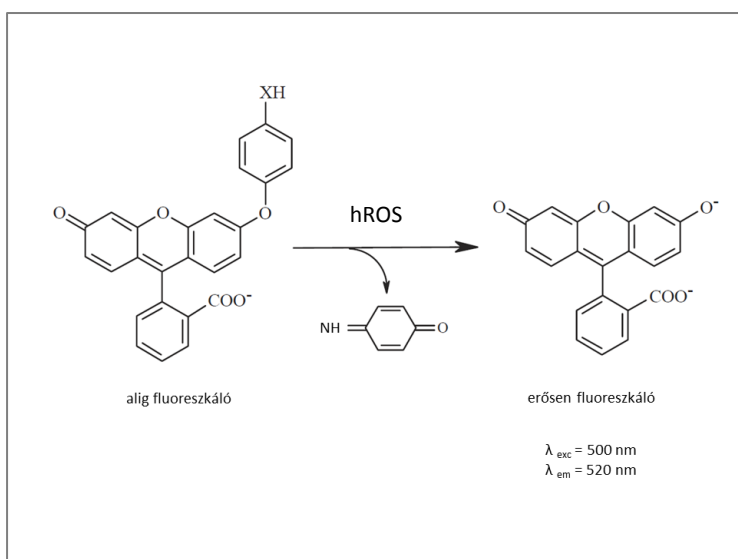


11. ábra. Reakció séma a H₂O₂ detektálására Amplex Red-del (Gomes és mtsai., 2005).

Ez a további oxidáció akkor jöhet létre, ha a H_2O_2 koncentrációja jóval magasabb az Amplex Red koncentrációjánál (Gomes és mtsai., 2005). A növények kis Petri-csészékben, 2 ml 50 μM ADHP festékoldatban inkubálódtak 30 percen keresztül szobahőmérsékleten, sötétben. A festéket 50 mM nátrium-foszfát pufferben (pH 7,5) vettük fel. A mintáinkat az inkubációs idő lejártá után egyszer mostuk pufferrel (Gomes és mtsai., 2005). A mikroszkópos felvételekhez 20HE szűrőt használtunk.

A ONOO^- vizsgálata

A peroxinitrit (ONOO^-) a NO és O_2^- reakciója során keletkezik (Gaupels és mtsai., 2011), mely aminofenil fluoreszcein (APF) festéssel detektálható. A festék fluoreszcencia intenzitása a nagy reaktivitású oxigénformákkal (hidroxil gyök, peroxinitrit és hypoklorit) történő reakció során jelentősen megemelkedik (12. ábra). Az APF nem reagál sem NO -dal, sem O_2^- -dal sem pedig H_2O_2 -dal (Gomes és mtsai., 2005). Egy órán keresztül 10 mM-os koncentrációjú 2 ml festékoldattal sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintáinkat, majd kétszer mostuk le őket 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) pufferrel (Corpas és mtsai., 2009). A megfigyeléseket 10-es filter szettal végeztük.

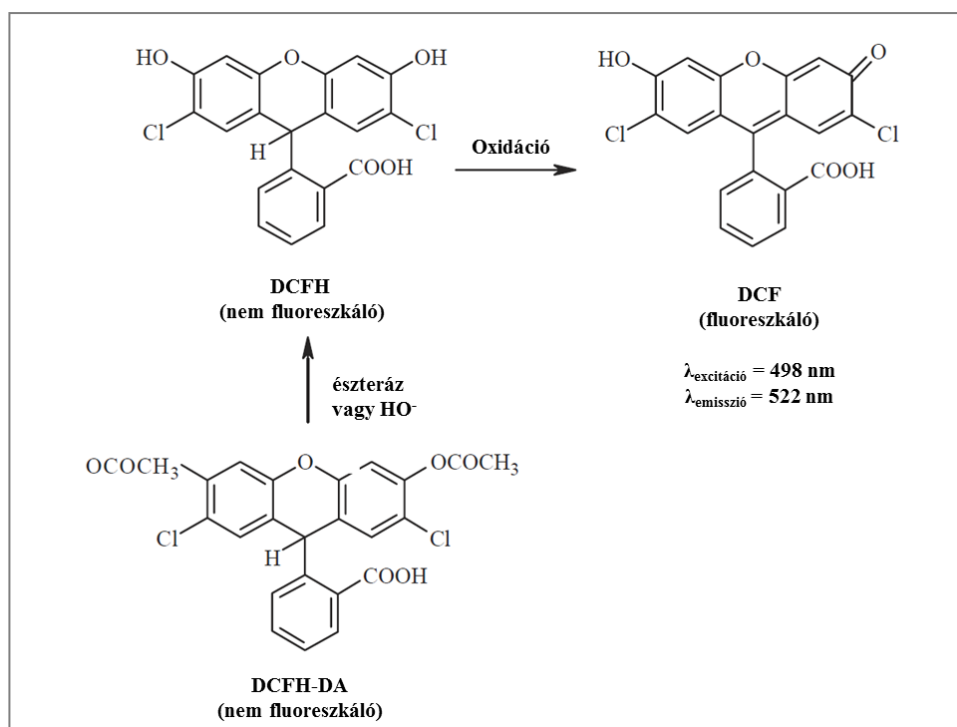


12. ábra APF reakciósémája nagy reaktivitású oxigénformákkal (Setsukinai és mtsai., 2003).

Az intracelluláris ROF tartalom *in situ* detektálása

Ahhoz, hogy megfigyelhessük a növények intracelluláris ROF tartalmát 2'-7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetátot ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) alkalmaztunk 10 μM koncentrációban. Az inkubálás 37°C-on történt 15 percig 2 ml festékoldatban, majd a

mintákat 4-szer mostuk le 20 percen belül 2-N-morfolin-etánszulfon sav/kálium-klorid pufferrel (10^{-3} M MES/KCl, pH 6,15). A fluoreszcencia emisszió detektálásához a 10-es szűrő szettet használtuk. A DCF-DA molekula képes bejutni a sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok hidrolizálják, így felszabadul a DCF (2',7'-diklorofluoreszcein) (13. ábra). Ez a molekula pedig a sejten belül csapdázódik. A peroxidokkal, különösen a hidroperoxidokkal való reakciója során egy fluoreszcens DCF származék jön létre (exc.: 480 nm, em.: 530 nm) (Sandalio és mtsai., 2008). A H_2DCF -DA az intracelluláris oxigéngyökök széles körben elterjedt markere, mind állati, mind növényi szövetekben. Korábban H_2O_2 specifikusnak tartották, jelenleg inkább egy általános oxidatív stressz indikátornak vélik, hiszen számos ROF-val reakcióba lép, mint pl. a H_2O_2 , hidroxil gyök, szuperoxid gyök vagy a peroxinitrit (Karlsson és mtsai., 2010).



13. ábra A H_2DCF -DA reakciósémája (Gomes és mtsai., 2005).

Az életképesség fluoreszcens meghatározása

Fluoreszcein diacetát (FDA) festéket alkalmaztunk a sejtek életképességének meghatározására. A fluoreszcein diacetát egy membrán permeábilis fluorofór, amit a sejten belüli észterázok alakítanak fluoreszkáló formává. Csak azok a sejtek mutatnak

fluoreszcenciát, melyekben az észterázok jól működnek, vagyis az FDA az élő sejteket festi meg (Vaňková és mtsai., 2001). A csíranövényeket sötétben $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on 2 ml-ben inkubáltuk 30 percen keresztül, majd 20 perc alatt 4-szer MES/KCl (10^{-3} M, pH 6,15) pufferrel történt a minták lemosása. A festékből származó fluoreszcencia emisszió megjelenítéséhez a 10-es szűrőt alkalmaztunk.

4.3. Statisztikai analízis

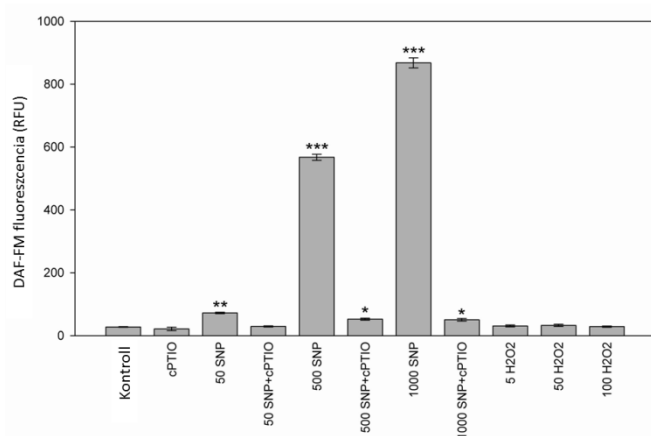
A feltüntetett adatok minden esetben minimum két biológiai ismétlés átlag és szórásértékei (SE). A statisztikai kiértékeléshez SigmaStat 11. szoftvert és Duncan-tesztet ($p < 0,05$) használtuk. Ez esetben a statisztikailag szignifikáns különbségeket eltérő betűkkel jelöltük a diagrammokon. Néhány esetben Student-féle páros t-próbát végeztünk Microsoft Excel szoftver segítségével. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük ($p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$).

5. Eredmények

5.1. Az általunk alkalmazott festékek specifitásának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata

Az *in vivo* és *in situ* mikroszkópia az utóbbi évtizedekben széleskörben elterjedt hatékony, egyszerű módszer, mely gyors eredményekkel szolgál. Sejten belül láthatóvá tehetünk molekulákat, és a térbeli információ mellett pontos képet kaphatunk az adott pillanatbeli állapotról. Az általunk vizsgálni kívánt reaktív oxigén- és nitrogénformák fluoreszcens festékekkel detektálhatóak, melyek specifitását *in vivo* és *in vitro* is ellenőriztük.

A DAF-FM festék NO-specifitását spektrofotométeren és fluoreszcens mikroszkópos módszerrel is ellenőriztük. Az *in vitro* mérések során 50, 500, 1000 μM NO donort (SNP) pozitív kontrollként és 200 μM NO gyökfogót (cPTIO) negatív kontrollként alkalmaztunk. Az SNP DAF-FM fluoreszcenciára gyakorolt hatása koncentrációfüggő volt, a cPTIO pedig szignifikánsan csökkentette az SNP-indukált DAF-FM fluoreszcenciát. A H_2O_2 (5, 50 és 100 μM) festékoldathoz való hozzáadása nem befolyásolta a DAF fluoreszcenciát (14. ábra). A fluoreszcens mikroszkópos eljárás során az SNP (100 μM) fokozta a DAF-FM fluoreszcenciáját *Arabidopsis* FGY csúcsokban, a cPTIO (100 μM) pedig jelentős mértékben lecsökkentette (1. táblázat).

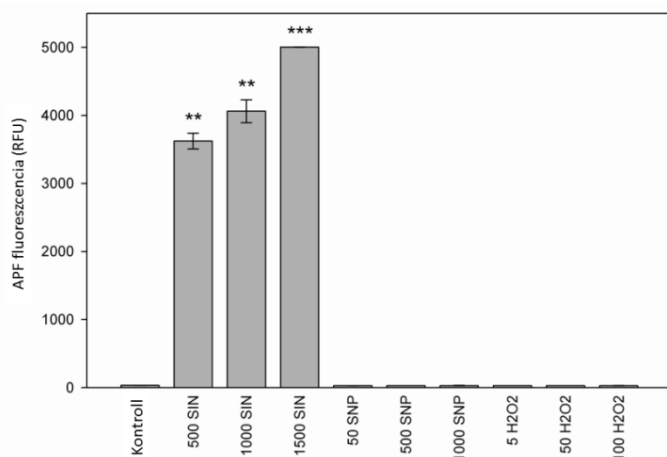


14. ábra A fluoreszcencia emisszió változásai DAF-FM oldatokban SNP, cPTIO vagy H_2O_2 hozzáadásának hatására (n=6, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

	DAF-FM fluoreszcencia (A.U.)	
Kontroll	11,12 ± 1,02	
cPTIO	8,41 ± 0,58	**
SNP	50,83 ± 2,21	***
SNP+cPTIO	15,97 ± 1,05	**

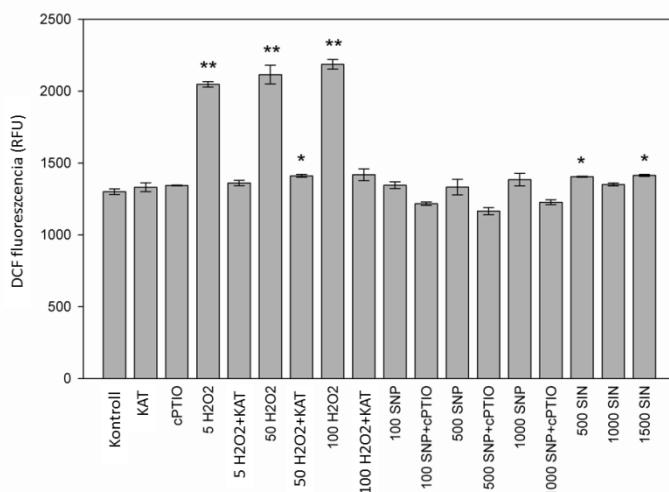
1. táblázat Fluoreszcens fotókon mért DAF-FM fluoreszcencia értékek (n=20, ± SD, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Az APF festék működésének bizonyításához peroxinitrit donorként a 3-morfolinoszidonimin *N*-etilkarbamidot (SIN-1) használtuk 0,5; 1 és 1,5 mM –os koncentrációban; emellett pedig SNP-t (50, 500 és 1000 μ M) és H₂O₂-t (5, 50 és 100 μ M) adtunk a festékkoldatokhoz. A SIN-1 alkalmazása mellett lényegesen megemelkedett a festék fluoreszcencia intenzitása, míg az SNP és a H₂O₂ nem befolyásolta az APF fluoreszcenciáját (15. ábra).



15. ábra A relatív fluoreszcencia értékek változása APF oldatokban SIN-1, SNP vagy H₂O₂-hozzáadása után (n=6, *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

A H₂DCFDA-t az intracelluláris ROF-k vizsgálatára kívántuk használni, ezért a festék specifitásának vizsgálata céljából peroxinitrit donort - (SIN-1), SNP-t, cPTIO-t, katalázt és hidrogén-peroxidot alkalmaztunk a rendszerben. A hidrogén-peroxid koncentráció-függő módon növelte az *in vitro* mérések során a DCF fluoreszcenciáját, viszont kataláz hozzáadásával fluoreszcencia intenzitás csökkenést tapasztaltunk. Az NO-donor (50, 500, 1000 μ M SNP) és/vagy gyökfogó (200 μ M cPTIO) használata nem okozott szignifikáns változást. A peroxinitrit donor (0,5; 1 és 1,5 mM SIN-1) mérsékelten növelte meg a DCF fluoreszcenciáját, bár nem koncentráció-függő módon (16. ábra).



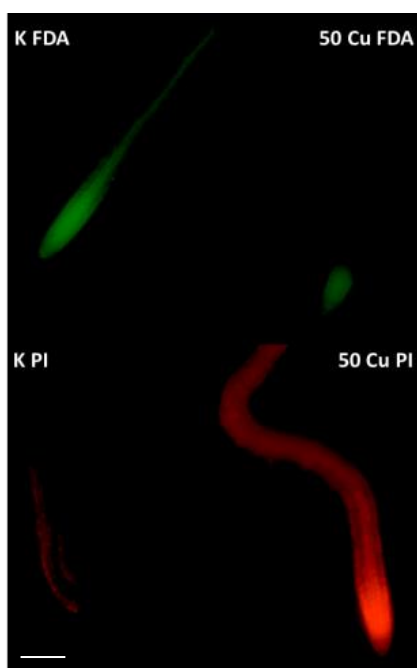
16. ábra Relatív fluoreszcencia intenzitás DCF oldatokban (n=6, *p≤0,05; **p≤0,01).

Az Amplex Red fluoreszcens festék H_2O_2 -specifitását pozitív és negatív kontroll használatával igazoltuk. Az *Arabidopsis* csíranövényeket 10mM H_2O_2 -dal kezeltük, negatív kontrollként 200 U/ml katalázt (KAT) használtunk, valamint megvizsgáltuk a H_2O_2 és kataláz együttes hatását is. A H_2O_2 megemelte az Amplex Red fluoreszcenciáját a FGY csúcsokban, a KAT viszont erőteljesen csökkentette (2. táblázat).

	Rezorufin fluoreszcencia	
Kontroll	$24,67 \pm 5,77$	
H_2O_2	$236,71 \pm 8,95$	***
KAT	$25,44 \pm 3,12$	
H_2O_2 +KAT	$23,59 \pm 2,86$	

2. táblázat Fluoreszcens fotókon mért rezorufin fluoreszcencia értékek (n=20, \pm SD, ***p<0,001).

A gyökér- és sziklevél sejtek életképességét FDA festékkel detektálhatjuk, míg a nem életképes sejtek Evans Blue-val, Trypan blue-val (TB), vagy propídium jodid (PI) festékkel vizsgálhatók (Vanková és mtsai., 2001; Rounds és mtsai., 2011 Davey és mtsai., 2011). A nem életképes sejtek detektálására mi a PI-t alkalmazzuk (17. ábra). Jól látható, hogy a réz okozta stressz következtében a sejtek elvesztik életképességüket, membrán integritásuk lecsökken. A PI fluoreszcens festék narancs-vörös színnel jelzi a nem életképes sejteket.



17. ábra FDA-val (zöld), propídium jodiddal (vörös) jelölt kontroll és réz kezelt (50 μM Cu) *Arabidopsis* gyökerekről készített mikroszkópos felvételek (mérce = 150 μm)

5.2. Az általunk használt mutáns *Arabidopsis* vonalak NO és ROF szintjeinek vizsgálata

Az általunk alkalmazott mutáns *Arabidopsis* növények FGY csúcsaiban kimutattuk a NO, H₂O₂ és a teljes intracelluláris ROF szinteket. A *nox1* és *gsnor1-3* növényekben megközelítőleg 2-szeres NO akkumuláció figyelhető meg vad típushoz viszonyítva, és a NR-deficiens *nia1nia2* gyökerek, valamint a tripla mutáns *nia1nia2noa1-2* gyökerek csak ~40% illetve ~33%-át tartalmazzák a vad típus NO szintjének (3.a táblázat). A csökkent aszkorbinsav tartalmú *vtc2-1* mutáns H₂O₂ és össz ROF tartalma kissé nagyobb, bizonyult a vad típuséhoz képest, míg a *vtc2-3* gyökerei nyilvánvalóbb ROF akkumulációt mutattak. Ezen mutánsokkal ellentétben a *miox4* növények kissé alacsonyabb H₂O₂ és össz ROF –függő fluoreszcenciával rendelkeztek, mint a vad típus (3.b táblázat).

A		B		
	NO (vad típus%)		H ₂ O ₂ (vad típus%)	intracelluláris ROF (vad típus%)
WT	100 ± 3,04	WT	100 ± 6,97	100 ± 6,17
<i>nox1</i>	215,7 ± 2,15 ***	<i>vtc2-1</i>	111,64 ± 8,09 n.s.	119,07 ± 12,49 n.s.
<i>gsnor1-3</i>	170,20 ± 2,32 ***	<i>vtc2-3</i>	133,87 ± 6,73 *	138,2 ± 9,03 n.s.
<i>nia1nia2</i>	39,45 ± 0,99 ***	<i>miox4</i>	90,17 ± 3,83 n.s.	90,69 ± 13,64 n.s.
<i>nia1nia2noa1-2</i>	32,91 ± 0,71 ***			

3. táblázat (A) Nitrogén-monoxid tartalom (DAF-FM fluoreszcencia pixel intenzitás a vad típus %-ban kifejezve) a kezelést nem kapott vad típusú és mutáns (*nox1*, *gsnor1-3* és *nia1nia2*, *nia1nia2noa1-2*) *Arabidopsis* csíranövények FGY csúcsaiban. (B) H₂O₂ és össz ROF szintek (rezorufin és DCF fluoreszcencia pixel intenzitása a vad típus %-ban kifejezve) a kezeletlen vad típusú, *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* FGY csúcsaiban. A szignifikancia hiányát (n.s.) és a szignifikáns különbségeket jelöltük (n=10; *P≤0.05, ** P≤0.01, ***P ≤ 0.001).

5.3. Réz felvétel, transzlokáció és mikroelem homeosztázis vad típusú *Arabidopsis*-okban

ICP-MS alkalmazásával meghatároztuk a vad típusú kontroll és réz kezelt (5, 25, 50 µM CuSO₄) lúdfüvek mikroelem koncentrációját (4. táblázat). A réz mellett a vas, cink, mangán, molibdén és bór koncentrációját is kimutattuk.

Mikroelem koncentrációk ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SE}$)

CuSO ₄	Hajtás						
	0 μM	5 μM		25 μM		50 μM	
Cu	17,39 \pm 0,43	82,23 \pm 0,70	***	234,5 \pm 1,96	***	514,2 \pm 1,27	***
Fe	628,7 \pm 3,31	438,6 \pm 1,43	***	494,6 \pm 3,20	***	431,2 \pm 2,35	***
Zn	204 \pm 5,05	169,8 \pm 0,95	**	168,5 \pm 1,36	**	196,6 \pm 0,45	n.s.
Mn	129,2 \pm 0,26	136,9 \pm 0,35	***	113,9 \pm 0,60	***	120,2 \pm 0,11	***
Mo	12,91 \pm 0,02	9,68 \pm 0,03	***	9,604 \pm 0,01	***	7,563 \pm 0,04	***
B	80,31 \pm 0,15	66,2 \pm 0,58	***	40,19 \pm 0,32	***	55,87 \pm 0,36	***

CuSO ₄	Gyökér						
	0 μM	5 μM		25 μM		50 μM	
Cu	26,14 \pm 0,54	78,93 \pm 0,91	***	194,1 \pm 16,51	***	280,8 \pm 5,99	***
Fe	1860 \pm 6,52	2151 \pm 18,99	***	3409 \pm 10,55	***	2692 \pm 9,41	***
Zn	269,3 \pm 1,31	144 \pm 0,88	***	121,5 \pm 0,07	***	160,1 \pm 0,89	***
Mn	146,4 \pm 0,94	173,1 \pm 0,66	***	124,5 \pm 0,94	***	129,5 \pm 0,24	***
Mo	13,7 \pm 0,04	16,92 \pm 0,04	***	14,78 \pm 0,10	***	13,86 \pm 0,09	n.s.
B	123,9 \pm 0,89	79,95 \pm 0,69	***	25,8 \pm 0,39	***	71,87 \pm 1,18	***

CuSO ₄	Hajtás: Gyökér						
	0 μM	5 μM		25 μM		50 μM	
Cu	0,665	1,041	***	1,208	**	1,831	***
Fe	0,338	0,203	***	0,145	***	0,160	***
Zn	0,757	1,179	***	1,386	***	1,227	***
Mn	0,882	0,790	***	0,914	***	0,928	**
Mo	0,942	0,572	***	0,649	***	0,545	***
B	0,648	0,828	***	1,557	***	0,777	**

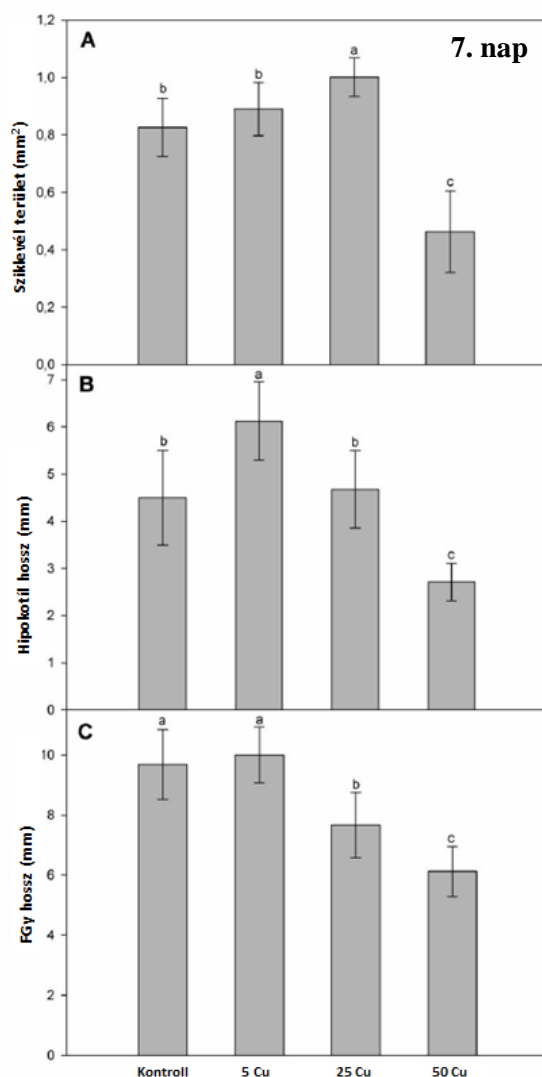
4. táblázat A kontroll és rézkezelt (5, 25 és 50 μM) *Arabidopsisok* mikroelem koncentrációi ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) és hajtás:gyökér arányai. A szignifikancia hiányát (n.s.) jelöli, a csillagok pedig a szignifikáns különbségeket mutatják (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Kontroll növényekben a gyökér mutatott magasabb réz koncentrációt hajtáshoz viszonyítva, viszont a fémkezelés hatásaként a réz akkumuláció jelentősebb volt a hajtás rendszeren belül. A kezelt növények hajtás rendszerében vas tartalom csökkenés volt

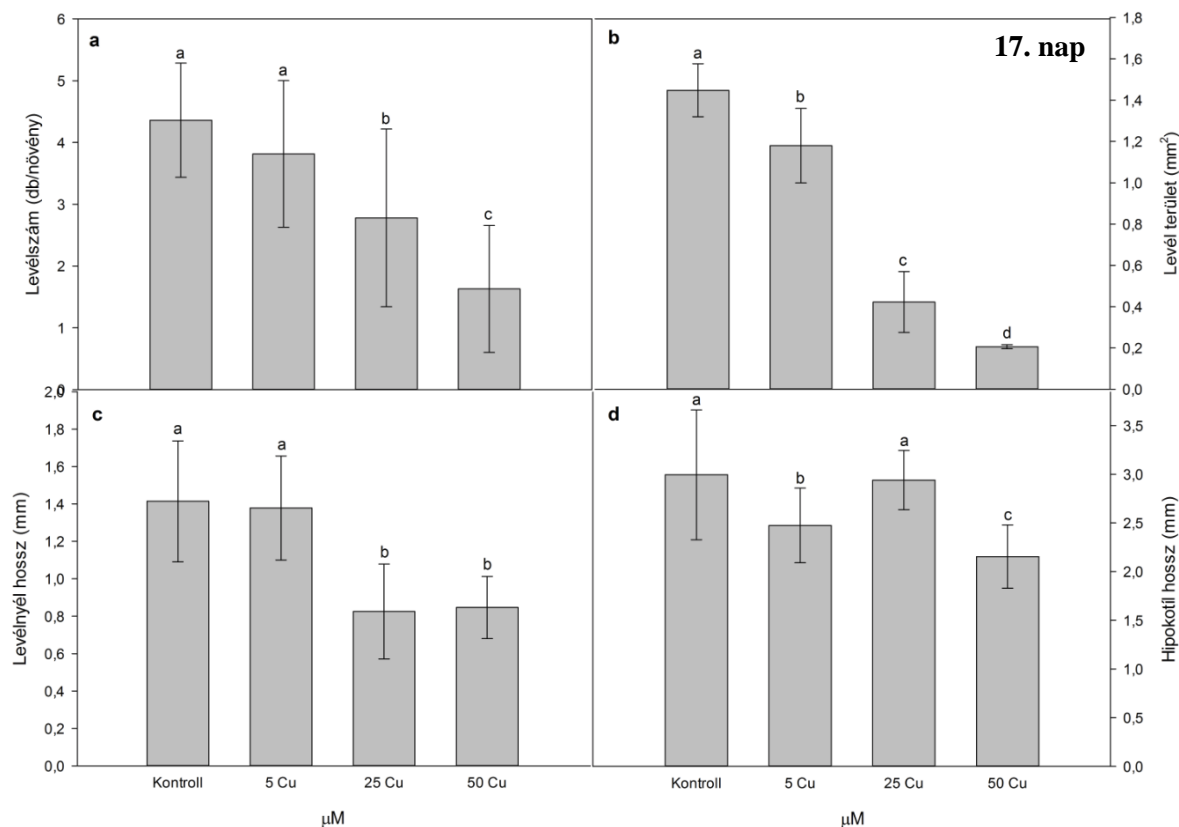
megfigyelhető, bár a vas mikroelem koncentrációja a gyökérben szignifikáns mértékben emelkedett. Megállapítható, hogy a hajtás: gyökér arány réz hatására módosult. A réz kezelés gyökérben befolyásolta a cink homeosztázisát is, mivel kontroll növények cink tartalmához viszonyítva a réz terhelés hatására lecsökkent a koncentrációja és a hajtás: gyökér arány szignifikánsan megnőtt. Enyhe réz kitettség (5 μM) a mangán és molibdén tartalom gyökérbeli emelkedését váltotta ki, míg a hajtásban csökkenést tapasztaltunk. Továbbá a Cu kezelés mindkét szervben lecsökkentette a bór koncentrációját (4. táblázat).

5.4. A réz hatása a lúdfű növények hajtásának és főgyökérének növekedésére

A réz hajtás- illetve gyökérnövekedést módosító hatásának időbeli alakulását szándékoztuk feltérképezni, ezért rövidebb (7 napos) és hosszabb távú (17 napos) kísérleteket állítottunk be *Arabidopsis* növényekkel. A rövid távú vizsgálatoknál összehasonlítva a kontroll körülmények között növekedett növényeket az alacsony rézkoncentráció (5 μM) mellett nőtt csíranövényekkel, azt tapasztaltuk, hogy kismértékben, statisztikailag nem szignifikáns módon nőtt a sziklevél területe, míg az 50 μM Cu jelentős csökkenést eredményezett ezen paraméternél. A 25 μM réz esetében a sziklevél méretének szignifikáns növekedése volt megfigyelhető (18. a ábra). A hipokotil megnyúlás fokozódott alacsony réz koncentráció mellett, de a 25 μM Cu nem befolyásolta a sziklevél alatti szárrész megnyúlását. A 17 napos vizsgálataink során az alacsony koncentrációjú réz kitettség (5 μM Cu) a rövid távú kezeléssel szemben nem befolyásolta az *Arabidopsis*-ok levelének számát és a levéllyél hosszát, viszont szignifikánsan gátolta a levelek kiterjedését és a hipokotil elongációt (19. a-d ábra). Az általunk legmagasabb koncentrációban alkalmazott réz kezelés rövid és hosszú távon egyaránt jelentős mértékű változásokat okozott. Többek között erőteljesen lecsökkentette a hipokotil hosszát a 7 napos csíranövények esetén (18. b ábra), míg a 25- és 50 μM rézzel kezelt 17 napos növények hajtás morfológiáját tekintve a levelek számának redukciója mellett (19. a ábra) jelentősen csökkent a levelek területe is (19. b ábra).

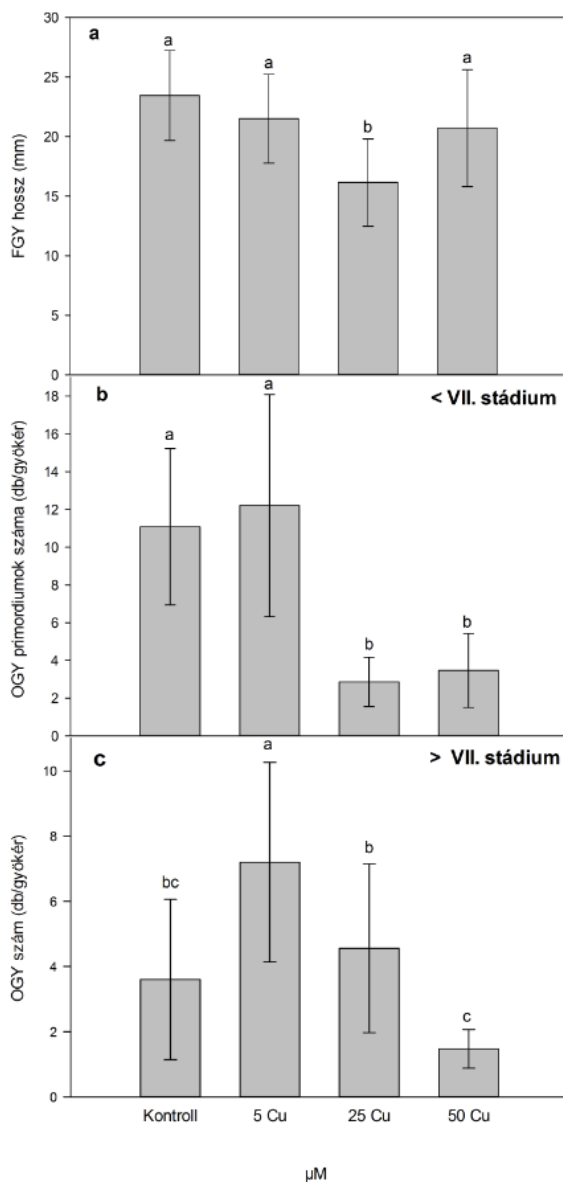


18. ábra. (A) Hét napos 0, 5, 25, 50 μM réz jelenlétében nőtt vad típusú *Arabidopsis* csíranövények sziklevél területe, (B) hipokotíl hossza és (C) főgyökér hossza. Az értékek 20 növény átlagait mutatják \pm S.E. A különböző betűk a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0.05$).



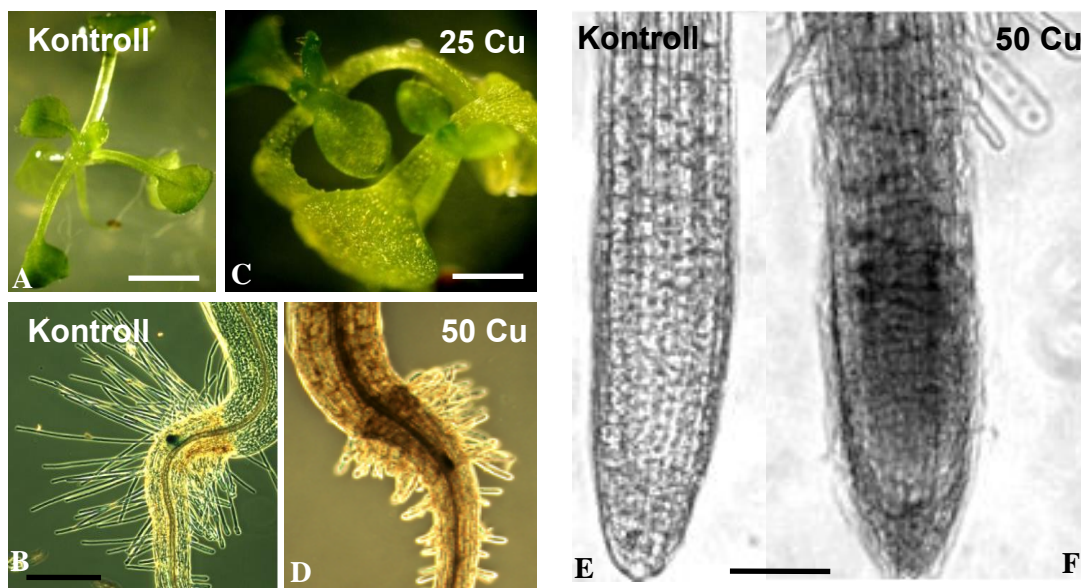
19. ábra A 0, 5, 25 és 50 µM réz-szulfát jelenlétében nőtt 17 napos *Arabidopsis*-ok levél száma (a), levél területe (b), levélnyel hossz (c) és hipokotil hossza (d). Az értékek 20 növény átlagait mutatják \pm S.E. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0.05$).

A gyökernövekedést vizsgálva elmondható, hogy egy hetes, 25 és 50 µM koncentrációjú réz kitettség esetén erőteljesen csökkent a főgyökér hossz (18. c ábra), míg hosszabb távon az 50 µM réz csupán enyhe redukción okozott, és a legjelentősebb gátló hatással a 25 µM Cu bírt (20. a ábra). A nagyobb koncentrációjú Cu kezelések hatására az oldalgyökök iniciációs folyamatai szignifikáns mértékben gátlódtak (20. b ábra), azonban az OGY fejlődés későbbi fázisát a 25 µM Cu enyhén indukálta, de az 50 µM-os kezelési koncentráció kismértékben gátolta (20. c ábra).



20. ábra 17 napos kontroll és réz kezelt (5-, 25-, 50 μM Cu^{2+}) lúdfű növények FGY hossza (a) és oldalgyökér száma (b, c). Az OGY-k fejlettségi állapotát Malamy és Benfey (1997) szerint határoztuk meg. Az értékek 20 növény átlagait mutatják \pm S.E. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($P < 0.05$).

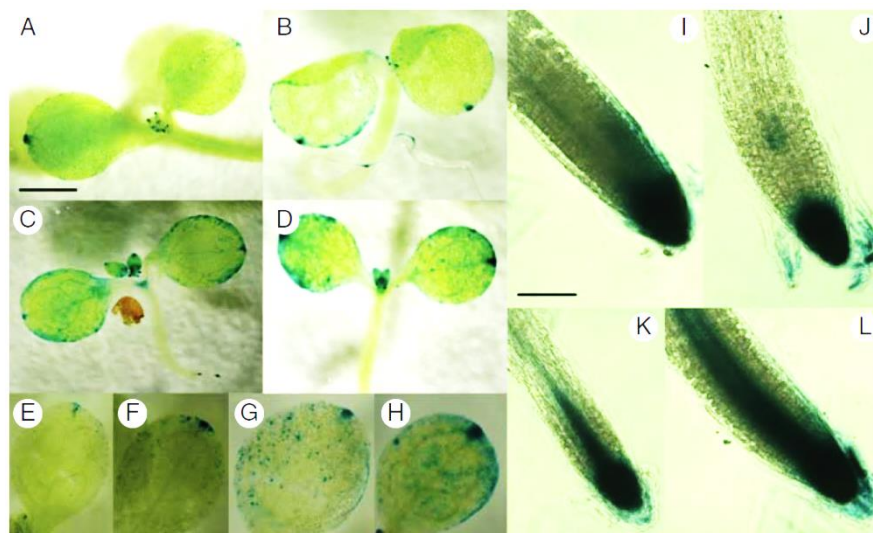
A 21. ábra szemlélteti a hajtás növekedés réz-indukált gátlását, a gyökérszőrök hosszának és számának csökkenését. A FGY hossz redukciójának egyik következménye, hogy a gyökérszőrök a gyökércsúchoz közelebb helyezkednek el.



21. ábra Kontroll (A, B, E) és 25 (C) vagy 50 μM (D, F) Cu-kezelt *Arabidopsis*-ok hajtásrendszeréről, gyökérszöveiről és FGY csúcsairól készült reprezentatív sztereomikroszkópos és fénymikroszkópos felvételek. Mércse= 5 (A); 1 (B, C) és 0,5 (E, F) mm.

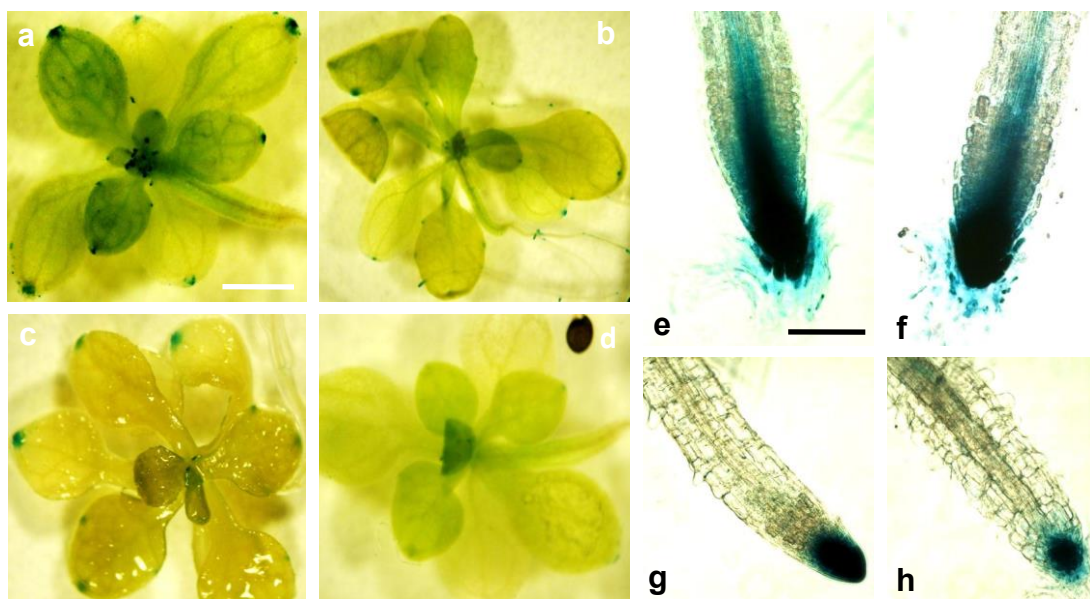
5.5. A réz hatása az auxin és NO metabolizmusára

Az *Arabidopsis* növények hajtás- és gyökérrendszerében tanulmányoztuk az auxin indukálható DR5::GUS gén expresszióját rövid és hosszú távú rézkezelések során. A 7 napos kontroll növények sziklelevelében, a DR5 expresszió csak a levélcúcsra korlátozódott. (22. ábra A, E).



22. ábra Hét napos X-Gluc-kal festett DR5::GUS *Arabidopsis* növények hajtásrendszere (A-D), sziklevele (E-H) és FGY csúcsa (I-L). A, E, I=kontroll, B, F, J=5 μM Cu, C, G, K= 25 μM Cu, D, H, L=50 μM Cu. Mércse=1 mm (A-H), 0,5 mm (I-L).

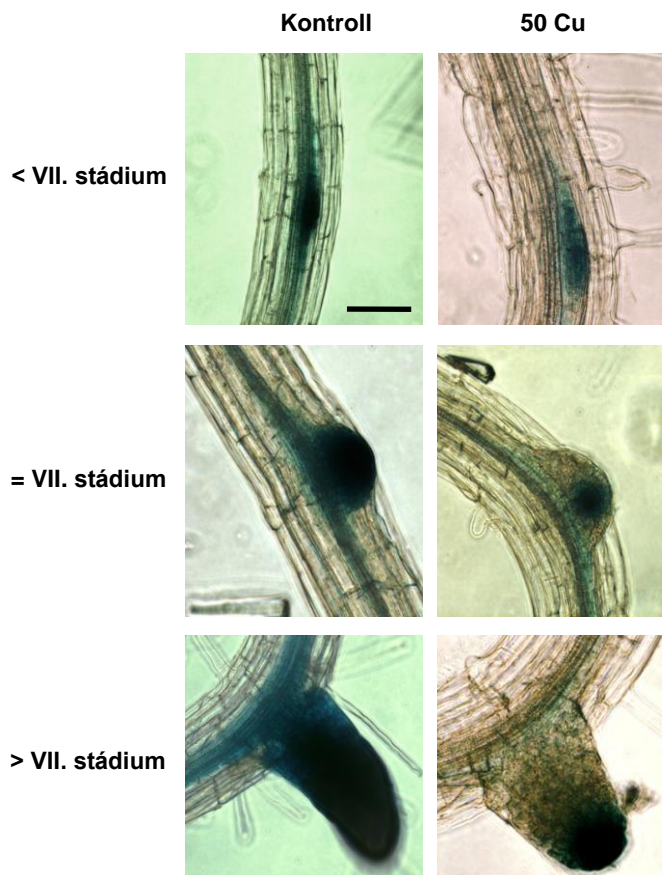
Ugyanezt a mintázatot tapasztaltuk a 17 napos növényeknél is, vagyis hogy kontroll körülmények között a riporter gén fúzió expressziója a hajtás apikális merisztémájában, a levél primordiumokban és az idősebb levelek csúcsainál volt látható (23. a ábra). A rövid távú rézkezelésnek kitett növényeknél a sziklevélben fokozódott a DR5::GUS expresszió (22.b-d, f-h ábra). Hosszútáv során az alacsonyabb réz koncentrációk kis mértékben befolyásolták az auxin indukált génexpressziót (23. b,c ábra), amíg az 50 μM Cu hatására a DR5::GUS expressziós szintje lecsökkent vagy az szinte el is tűnt a hajtásból (23. d ábra).



23. ábra 17 napos DR5::GUS *Arabidopsis*-ok X-Gluc festődési mintázata a hajtásrendszerben (a-d) és a gyökércsúcsokban (e-h). a,e= kontroll, b,f= 5 μM Cu, c,g= 25 μM Cu, d,h= 50 μM Cu. Mércse= 1 illetve 0,5 mm.

A 7 napos növények főgyökér csúcsaiban a réz kitettség magasabb DR5::GUS expressziót eredményezett (22. ábra i-l). A 17 napos gyökerek auxin szintjeit a réz épp ellentétes módon befolyásolta. A kontroll gyökércsúcsokban az auxin válasz DR5 gén a gyökérsüvegben és a merisztémában expresszáldott és ezt a mintázatot az 5 μM réz nem befolyásolta (23. e, f ábra). Ezzel ellentétben a nagyobb koncentrációjú rézkezelések komolyabb gén kifejeződés csökkenéshez járultak hozzá a FGY csúcsában (23. g, h ábra). A DR5::GUS expressziót az OGY-k különböző fejlettségi állapotaiban is megvizsgáltuk a 17 napos növények esetében. Az auxin érzékeny génexpresszió kontroll növények esetében minden fejlettségi állapotú OGY primordiumban bizonyítottan jelen volt, az 50 μM Cu

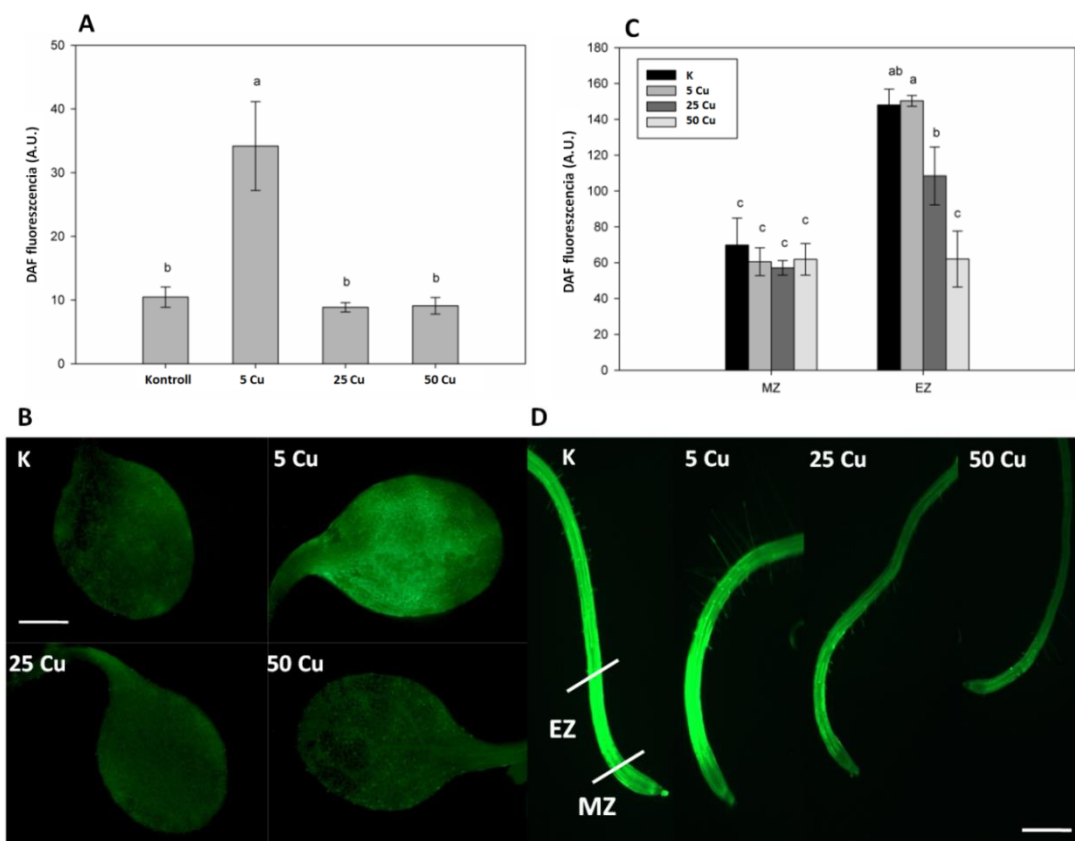
kezelés hatására viszont erőteljes csökkenés mutatkozott. Megállapítható, a VII. stádiumnál nagyobb, azaz, idősebb OGY csúcsokban a DR5 expresszió megmaradt, mely így további növekedést tesz lehetővé (24. ábra).



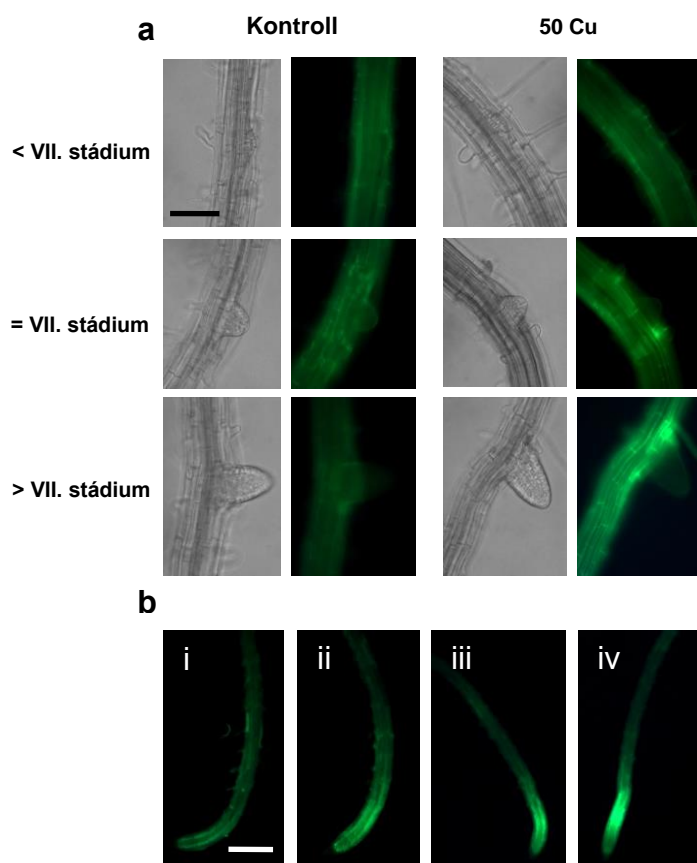
24. ábra Kontroll vagy 50 μM rézkezelt 17 napos DR5::GUS *Arabidopsis*-ok X-Gluc festődése a különböző stádiumú oldalgyökerekben. Az OGY-k fejlődési stádiumait Malamy és Benfey (1997) szerint határoztuk meg. Mércse = 0,5 mm.

Az auxin jelátvitel egyik lehetséges komponense a NO, ezért ezen molekula szintjét is tanulmányoztuk csíranövények esetében sziklevelekben és főgyökérben, a 17 napos növényeknél pedig levelekben, főgyökerekben és oldalgyökerekben. Érdekes módon rövid távú kísérleteknél az alacsony Cu koncentráció (5 μM) szignifikáns növekedést okozott a NO-specifikus fluoreszcenciában sziklevel esetén, míg az erőteljesebb réz kitettség (25 és 50 μM) lényegesen nem csökkentette le a NO szinteket a kontrollhoz viszonyítva (25. a,b ábra). A hosszabb távú eredmények alapján elmondható, hogy a réz kezelt növények leveleiben nem volt detektálható lényeges változás a NO tartalomban a kontroll mintákhoz hasonlítva (nem közölt adat).

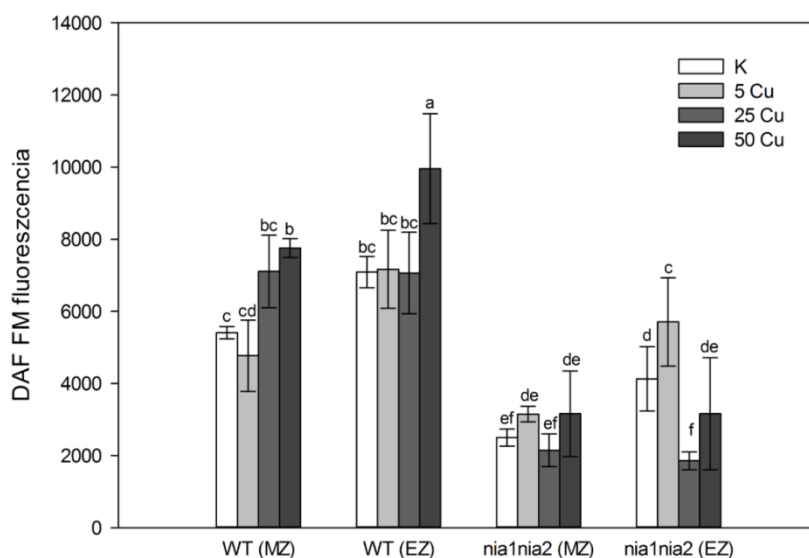
Megvizsgálva a 7 napos csíranövények főgyökér merisztémáját, elmondható, hogy a növények NO szintje nem módosult a 25 és 50 μM kezelések hatására, de az elongációs zóna nitrogén-monoxid tartalma lényegesen lecsökkent (25. c,d ábra). A 17 napos növények vizsgálatánál azt is megállapítottuk, hogy a NO szintje a rézkezelt lúdfüvek különböző fejlődési állapotú oldalgyökereiben hasonló volt a vad típusú növényekéhez képest (26. a ábra). Az 50 μM rézkezelés a gyökér merisztematikus zónájában (MZ) szignifikáns NO tartalom növekedést eredményezett (26. b és 27. ábra). Kontroll körülmények mellett a FGY elongációs zónája (EZ) kissé magasabb NO fluoreszcenciát mutatott, mint a MZ, viszont az 50 μM réz hatására lényegesen megemelkedett az EZ NO szintje (26. b és 27. ábra). A *nialnia2* mutáns növények FGY-nek mindkét zónájában a NO tartalom alacsonyabb volt vad típushoz hasonlítva, és ezen növények gyökerei nem mutattak réz-indukált NO képződést.



25. ábra NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia intenzitása) 7 napos, kontroll és rézzel kezelt vad típusú *Arabidopsis* sziklelelben (A) és főgyökérének merisztematikus és elongációs zónájában (D). A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik ($n=10$; $p<0.05$). Reprezentatív floreszcens mikroszkópos felvételek a kontroll és réz kezelésnek kitett növények szikleleléről (B) és főgyökércsúcsáról (D). MZ=merisztematikus zóna, EZ=elongációs zóna Mércse=1mm.



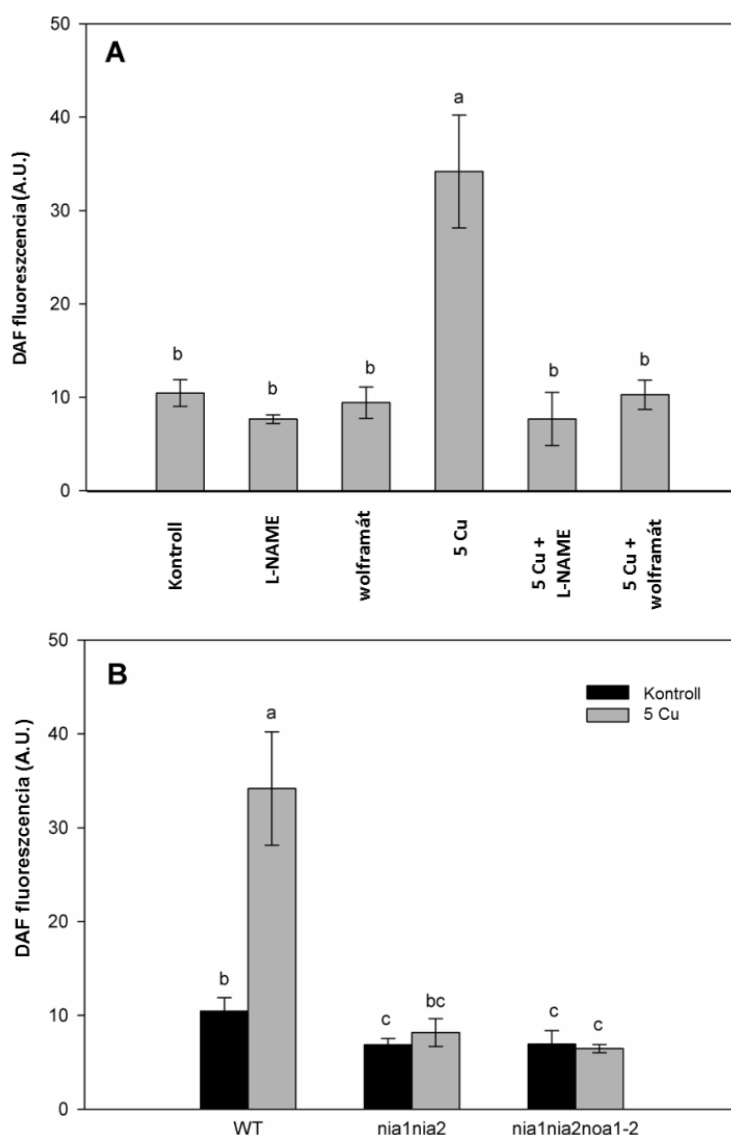
26. ábra (a) DAF-FM-mel jelölt kontroll és 50 μM rézzel kezelt *Arabidopsis*-ok különböző fejlődési állapotú (<VII., =VII., >VII. stádium) OGY-ei. Az OGY-k fejlődési stádiumait Malamy és Benfey (1997) szerint határoztuk meg. Mércse= 0.5 mm. (b) Reprezentatív fotók a DAF-FM-fel festett kontroll (i) és 5 (ii), 25 (iii) valamint 50 μM (iv) rézzel kezelt *Arabidopsis*-ok főgyökércsúcsairól. Mércse= 1 mm.



27. ábra NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia) a vad típusú és *nialnia2* mutáns gyökök merisztematikus (MZ) és elongációs (EZ) zónájában. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($P < 0.05$).

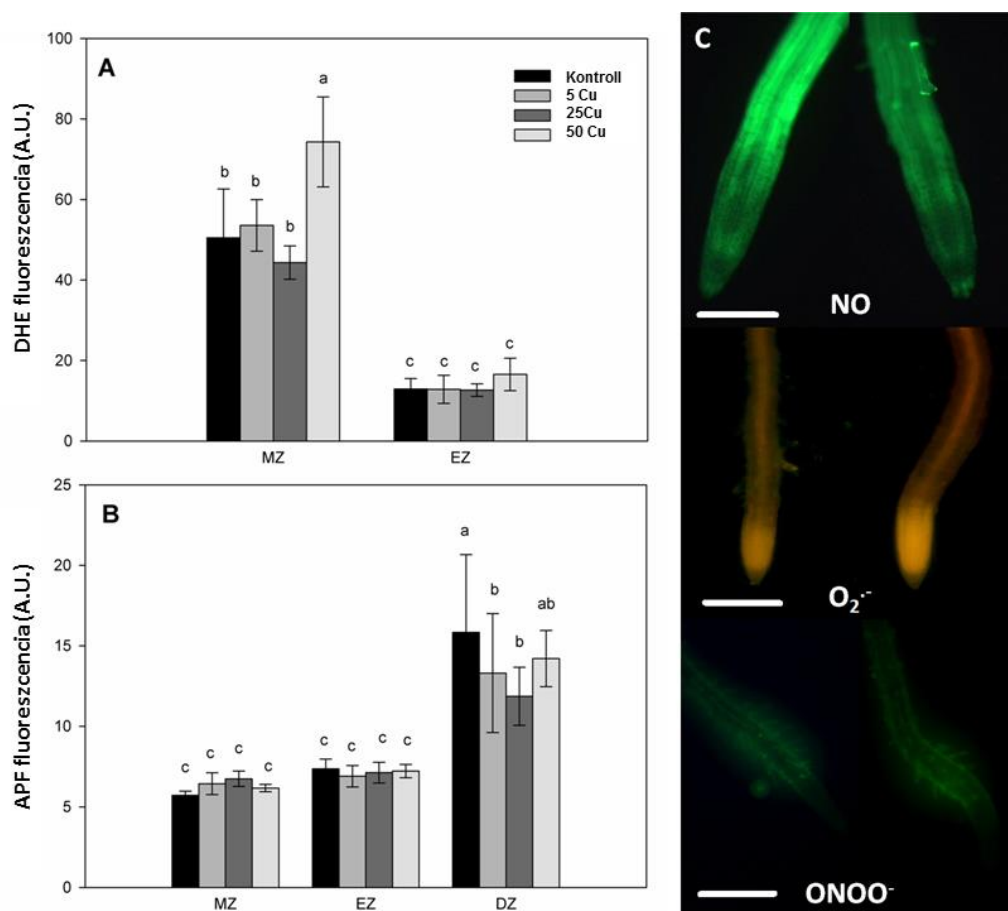
A hét napos csíranövények szikleveleiben megjelenő 5 μM réz-indukált NO lehetséges enzimátikus forrását biokémiai és genetikai módszerekkel vizsgáltuk (25. b ábra). A biokémiai vizsgálatok során vad típusú lúdfű növényeket kezeltünk L-NAME-val,

a NOS enzim inhibitorával valamint wolframáttal, mint a NR gátlószerével. Ezen kísérletek mellett a genetikai vizsgálatokhoz NO hiányos dupla (*nialnia2*) és tripla mutáns (*nialnia2noa1-2*) növényeket használtunk fel. Az L-arginin analóg L-NAME és a NR gátlószer wolframát kezelés is szignifikánsan lecsökkentette a NO szinteket a csak Cu kezelt növényekhez képest (28. a ábra). A kezeletlen *nialnia2* és *nialnia2noa1-2* *Arabidopsis*-ok szikleveleiben alacsonyabb nitrogén-monoxid szinteket figyelhettünk meg, és a vad típussal ellentétben réz-indukált, NO akkumuláció nem volt detektálható a mutáns vonalak szikleveleiben (28. b ábra).



28. ábra (A) NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia) hét napos, vad típusú kontroll és különböző inhibitorokkal kezelt *Arabidopsis*-ok szikleveleiben. (B) Kontroll és 5 μ M Cu-kezelt vad típusú és mutáns növények szikleveleiben mért NO-kapcsolt fluoreszcencia. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($n=10$, $p<0.05$).

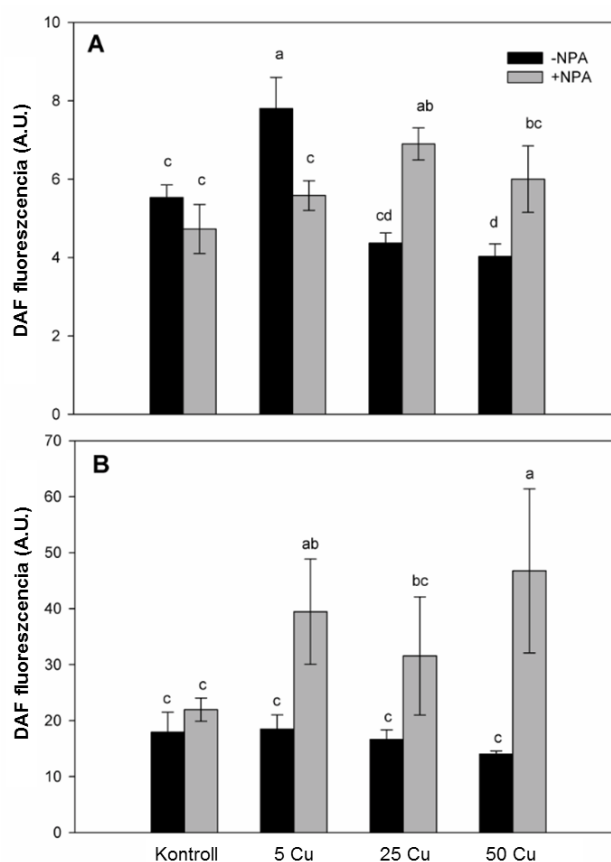
Festési eljárásokkal megvizsgáltuk annak a lehetőségét is, hogy vajon a réz kitettség hatására szuperoxid gyökanyon képződik-e, mely a NO-dal reagálva és peroxinitritet képezve, hozzájárulhat a NO szintek gyökércsúcsban észlelt csökkenéséhez. A $O_2^{\cdot-}$ -függő fluoreszcencia maximális intenzitást mutatott a FGY merisztematikus zónájában, míg az elongációs zóna területén nem detektáltunk $O_2^{\cdot-}$ akkumulációt réz kezelés alatt (29. a ábra). A $ONOO^-$ jelenléte pedig a differenciációs zónában (DZ) volt megfigyelhető, azaz a gyökérszörök megjelenésének területén (29.b ábra). A különböző molekulák szöveti eloszlását az 29. c ábra mutatja be.



29. ábra (A) Szuperoxid szintek (DHE fluoreszcencia) és (B) peroxinitrit szintek (APF fluoreszcencia) a kontroll és réz kezelt *Arabidopsis*-ok merisztematikus (MZ), elongációs (EZ) és differenciációs (DZ) főgyökér zónáiban. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($n=10$; $p<0.05$). (C) a NO, $O_2^{\cdot-}$ és $ONOO^-$ különböző szöveti lokalizációja a főgyökérben. Baloldalon a kontroll, jobb oldalon az 50 μ M rézzel kezelt gyökércsúcsok láthatók. Mércse= 1 mm ($O_2^{\cdot-}$ és $ONOO^-$), 0.5 mm (NO).

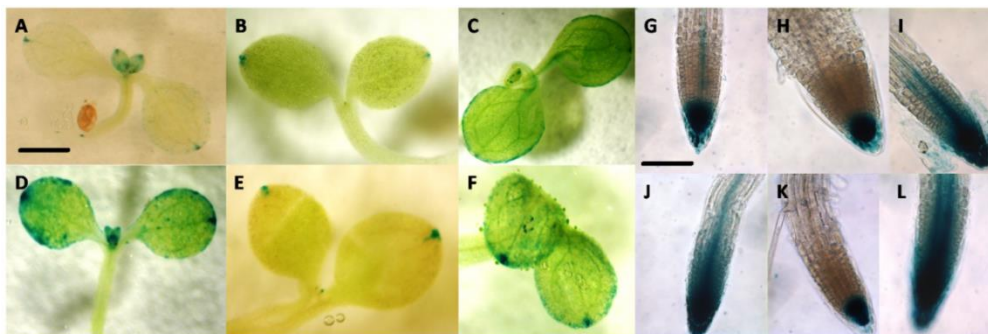
5.6. A NO és auxin kapcsolata a réz által szabályozott szervfejlődés során

Ezek után arra voltunk kíváncsiak, hogy a réz stressznek van-e hatása az auxin és NO kapcsolatára a szervfejlődés során. Sziklevelekben az auxin transzportját gátló naftilftálsav (NPA) lecsökkentette az 5 μM réz indukált NO akkumulációt, de a magasabb rézkoncentrációk esetén az NPA kezelés szignifikánsan megemelte a NO szinteket (30.a ábra). A csíranövények CuSO_4 -tal és NPA-val történő együttes kezelése a főgyökerek EZ-jában jelentős mértékű NO szint emelkedést okozott (30.b ábra).



30. ábra NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia) a 7 napos kontroll és rézkezelt *Arabidopsis*-ok (A) sziklevelében és (B) FGY-ében 10 μM NPA kezeléssel vagy anélkül. A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($n=10$; $p<0.05$).

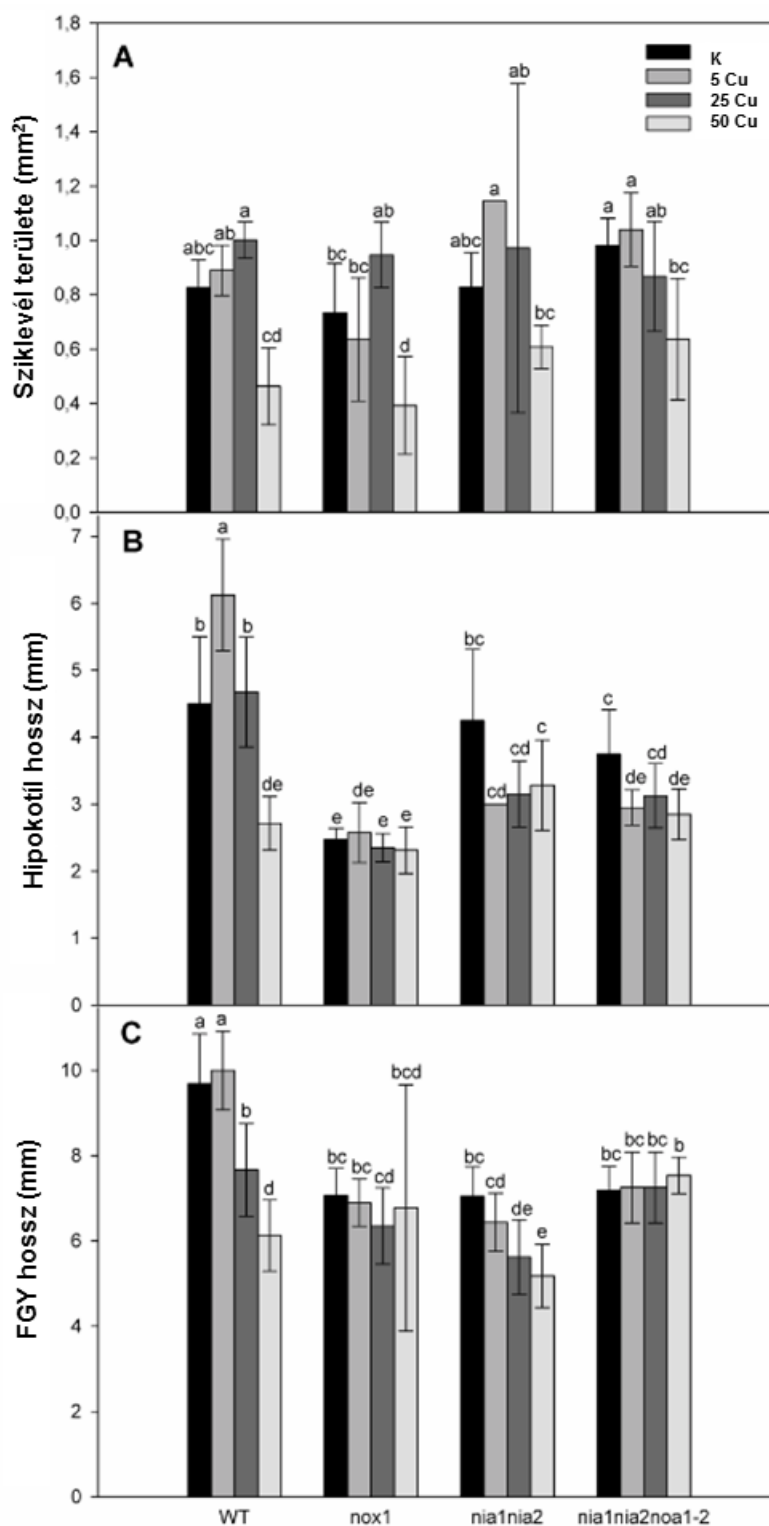
Az SNP formájában külsőleg alkalmazott NO kezelés meglehetősen lecsökkentette a Cu-indukált DR5 gén expressziót a sziklevelekben és FGY-ben is. A rézkezelések mellett alkalmazott NO gyökfogó cPTIO kiterjedtebb X-Gluc festődési mintázat alakított ki a FGY-ek csúcsaiban, illetve kontrollszerű mintázat volt megfigyelhető a szikleveleknél (31. a-l ábra).



31. ábra A DR5::GUS auxin érzékeny riporter gén expressziója a 7 napos kontroll és réz jelenlétében nőtt *Arabidopsis* sziklevelében (A-F) és főgyökér csúcsaiban (G-L). Kontroll: A,G; 100 μM SNP: B,H; 100 μM cPTIO: C,I; 50 μM Cu: D,J; 50 μM Cu+SNP: E,K; 50 μM Cu+cPTIO: F, L. Mércse=1 mm.

5.7. A NO mutánsok (*nox1*, *nia1nia2*, *nia1nia2noa1-2*) morfológiája réz stressz alatt

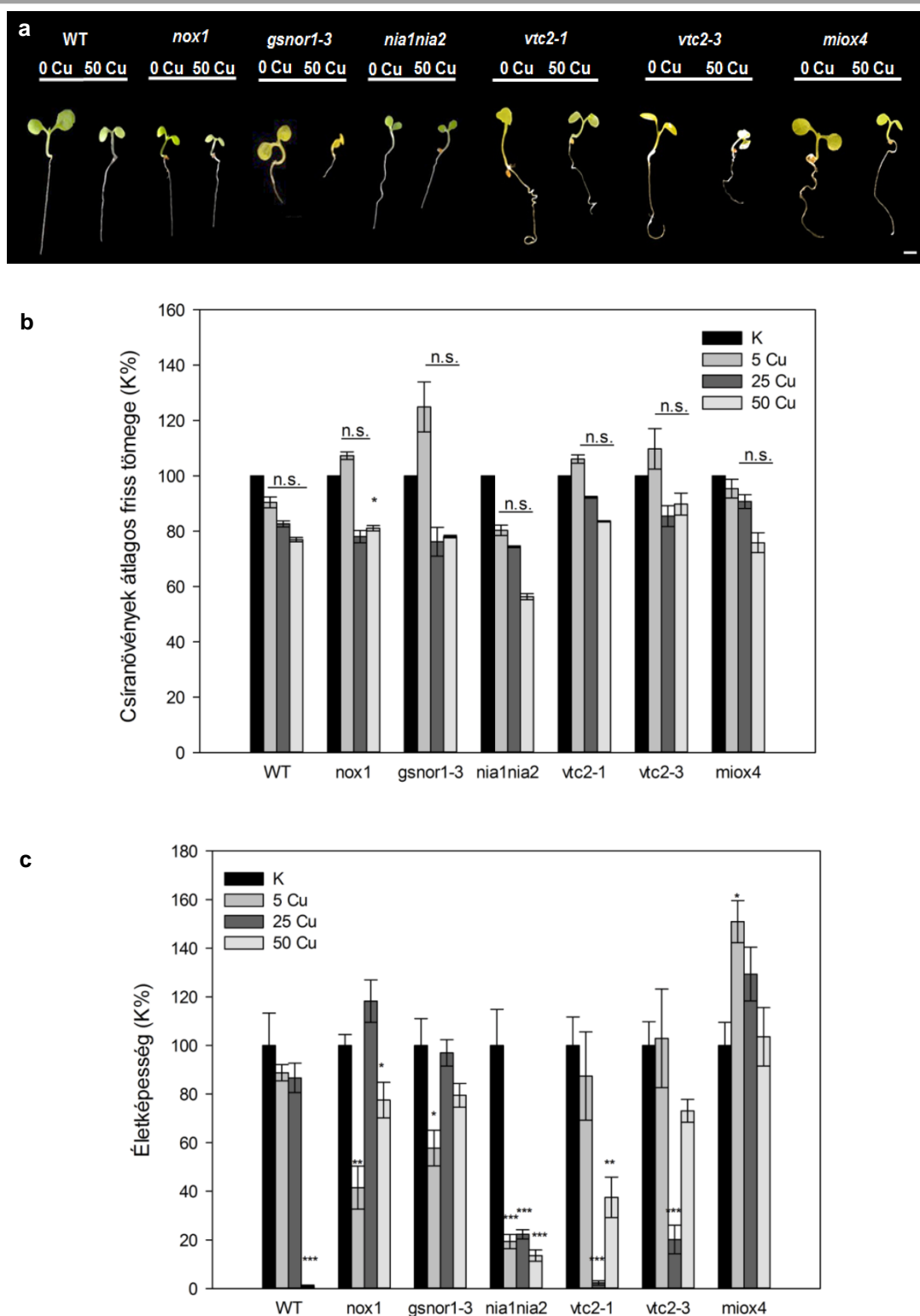
Annak felderítése érdekében, hogy vajon van-e szerepe a NO-nak a réz-indukált morfológiai válaszok jelátvitelében, mutánsokkal történő vizsgálatokat végeztünk el. A NO-ot túltermelő *nox1*, és a csökkent NO tartalommal bíró *nia1nia2*, illetve *nia1nia2noa1-2* vonalakban hasonlítottuk össze a réz hatására megjelenő növekedési változásokat. A kontroll körülmények között nevelkedett csíranövények sziklevel területét tekintve szignifikáns különbségek voltak tapasztalhatóak a mutánsok között, de ezek a különbségek nem bizonyultak jelentősnek a vad típushoz képest. A *nox1* növényeknél az 50 μM Cu okozott jelentősebb sziklevelterület csökkenést, és a NO-hiányos lúdfüvek esetében a réz-indukált csökkenés mérsékeltebb volt (32. a ábra). A kontroll *nox1* és tripla mutáns csíranövények hipokotil hosszai a vad típusénál jelentősen rövidebbek voltak, míg a *nia1nia2* hipokotilok esetében nem volt kimutatható szignifikáns eltérés. A csökkent NO szintet mutató mutánsokban minden általunk alkalmazott réz koncentráció rövidebb hipokotilt eredményezett, habár a *nox1*-nél a réznek nem volt hatása a sziklevel alatti szárrész megnyúlására (32.b ábra). Kontroll körülményeket tekintve minden mutáns vonalnál lényegesen rövidebb FGY hosszak voltak megfigyelhetők a vad típushoz képest, azonban a különböző mutánsok gyökérhosszai között nem volt szignifikáns különbség. A vad típus és az NO-hiányos dupla mutáns (*nia1nia2*) csíranövények esetében réz kezelés hatására egy jelentős FGY hossz csökkenés volt mérhető, viszont a *nox1* és a *nia1nia2noa1-2* esetében réz-indukált FGY rövidülést nem tapasztaltunk (32.c ábra).



32. ábra Hét napos kontroll és rézkezelt vad típusú és NO mutáns *Arabidopsis* növények sziklevél területe (A), hipokotil (B) és főgyökér hossza (C). A különböző betűk, a szignifikáns különbséget jelölik a Duncan-féle teszt alapján ($n=10$; $p<0.05$).

5.8. NO (*nox1*, *gsnor1-3*, *nialnia2*) – és aszkorbát mutáns (*vtc2-1*, *vtc2-3*, *miox4*) *Arabidopsis*-ok réz érzékenysége és növekedési válaszai

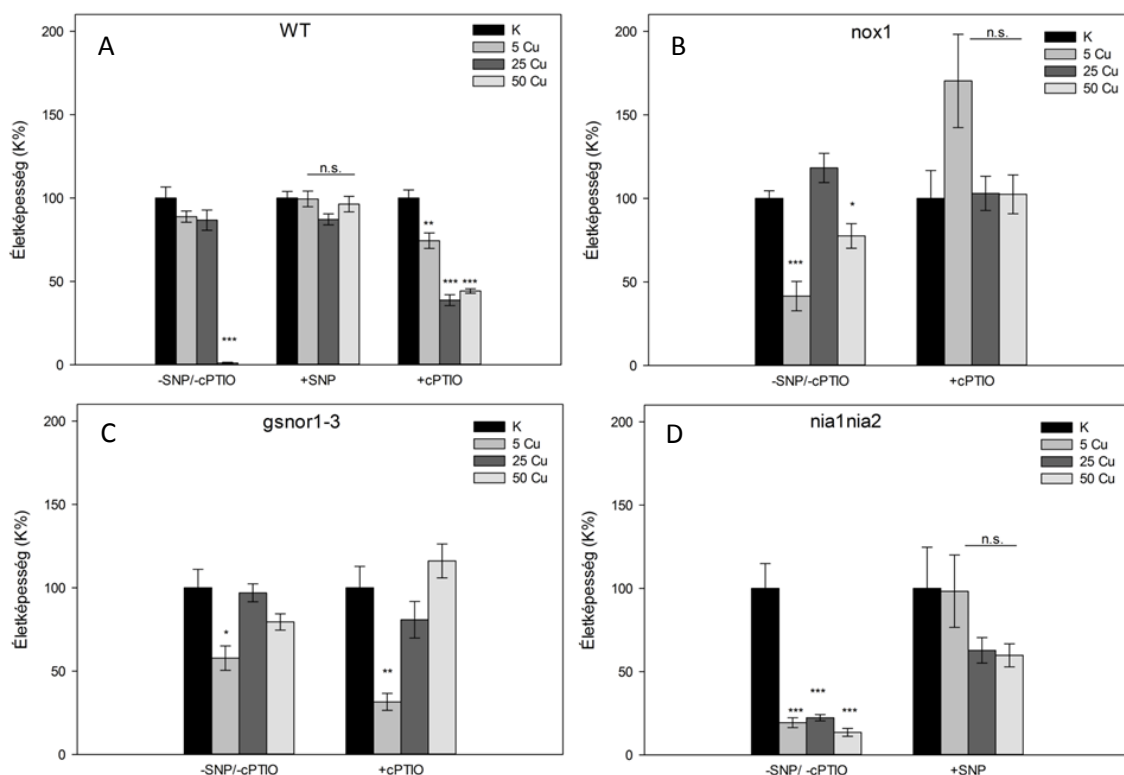
A következőkben azt szeretnénk tudni, hogy a megváltozott NO és aszkorbát (ezáltal megváltozott ROF) tartalmú mutáns lúdfüvek milyen mértékű réz érzékenységet mutatnak a vad típusú növényekhez képest. A csíranövények friss tömege és a gyökérmerisztéma életképessége alapján következtettünk a réz tűrőképességre. Kontroll körülmények között a NO-túltermelő és NO-hiányos mutánsok sziklevél és gyökér méretei kisebbek voltak, mint a vad típusú növényeké, viszont a *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* hajtás, és gyökér méreteik tekintetében Col-0-hoz hasonlóan mutatkoztak (33. ábra). Vad típussal ellentétben, a NO túltermelő *nox1* és *gsnor1-3* frisstömege enyhe növekedést mutatott 5 μM CuSO_4 hatására, a nagyobb koncentrációjú réz kitettség azonban a vad típusú növényekhez hasonló mértékű frisstömeg csökkenést eredményezett. Az 50 μM rézkezelt *nialnia2* növényekben Col-0-hoz viszonyítva a tömegvesztés erőteljesebb volt. A két *vtc* mutáns esetében az alacsony réz koncentráció kismértékű frisstömeg gyarapodást váltott ki, míg a magasabb koncentrációk a vad típushoz hasonló friss tömeg csökkenést okoztak. A *miox4* mutáns friss tömeg csökkenése is hasonlóképpen alakult, mint a Col-0-é de a *nialnia2* növényekénél enyhébbnek bizonyult (33. b ábra). Megvizsgálva a gyökerek életképességét réz kezelés hatására, azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú növények merisztéma sejtjeiben csak az általunk legnagyobb koncentrációban alkalmazott réz kezelés esetén történt szignifikáns csökkenés, míg *nox1* növényekben az életképesség az 5 μM kezelést követően lecsökkent, és a magasabb koncentrációk mellett kisebb mértékű csökkenés figyelhető meg. A *gsnor1-3* csíranövények gyökereiben hasonló tendencia volt tapasztalható, bár a magasabb koncentrációk nem befolyásolták a MZ sejtjeinek életképességét jelentős mértékben. Erőteljesebb érzékenység volt megfigyelhető a *nialnia2* növényeknél, mert az összes általunk alkalmazott réz koncentráció a gyökércsúcsok életképesség vesztéséhez vezetett. Az aszkorbinsav hiányos *vtc* mutánsokban 25 és 50 μM CuSO_4 hatására jelentős mértékű volt a sejtek életképesség vesztése. A réz kitettség nem csökkentette le az alacsonyabb ROF tartalmú növények (*miox4*) életképességét, sőt az 5 μM réz még javított is rajta (33. c ábra).



33. ábra (a) Hét napos kontroll és rézkezelte vad típusú, valamint mutáns *Arabidopsis* csíranövényekről készült reprezentatív sztereomikroszkópos felvételek. Mércse= 1 mm. Kontroll és réz terhelésnek kitett vad típusú és mutáns (*nox1*, *gsnor1-3*, *nia1nia2*, *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4*) csíranövények átlagos friss tömegei kontroll %-ban kifejezve (b) valamint életképessége a gyökérmerisztémában (c). A szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük a Student-féle T-próba alapján ($n = 10$, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$). n.s.=nincs szignifikáns különbség a kontrollhoz képest.

5.9. A NO közvetlen részvétele a réz tolerancia kialakításában

Ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani, vajon a mutánsok eltérő rézérzékenysége a megváltozott NO szintjeik következménye-e, a vad típusú és mutáns növények gyökerének endogén NO tartalmát NO donor (SNP) és NO gyökfogó (cPTIO) használatával vizsgáltuk meg. A külsőleg alkalmazott NO meggátolta a réz-indukált életképesség csökkenést Col-0 gyökércsúcsokban, míg a gyökfogóval történő kezelés életképesség csökkenést eredményezett (34.a ábra). A NO túltermelő *nox1*-ben a NO eltávolítása jobb életképességet eredményezett, különösen az 5 és 50 μ M réz-kezelt gyökerekben (34.b ábra). A *gsnor1-3* mutánsokban az 50 μ M réz és a cPTIO együttes alkalmazása életképesség javuláshoz vezetett, de a *gsnor1-3* lúdfüvek cPTIO-val lecsökkentett NO tartalma nem okozott életképesség javulást az 5 μ M réz kezelés esetében (34.c ábra). A rézkezelt *nialnia2* mutánsokban a hozzáadott SNP megnövelte a merisztéma sejtek életképességét (34. d ábra).



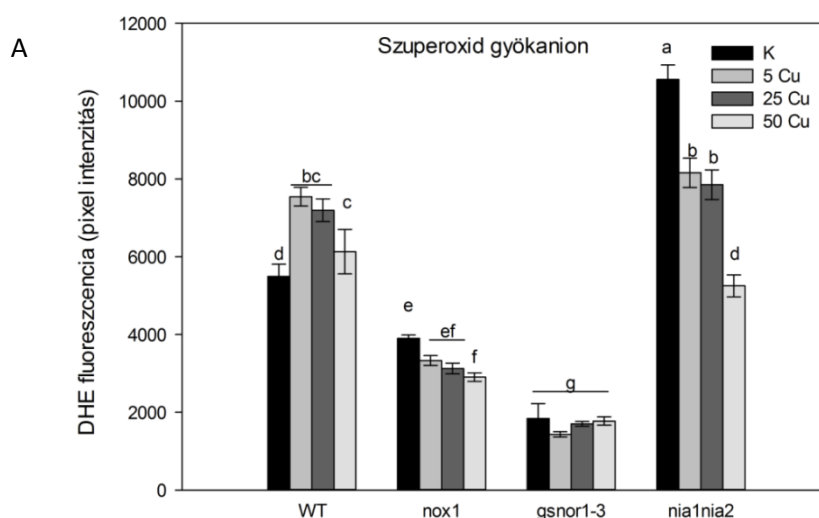
34. ábra Hét napos vad típusú (A), *nox1* (B), *gsnor1-3* (C) és *nialnia2* (D) *Arabidopsis* csíranövények gyökércsúcsainak életképessége. A szignifikancia hiányát „n.s.” felirattal jelöltük, a csillagokkal jelölt oszlopok pedig szignifikánsan különböznek egymástól a Student-féle T-próba alapján ($n = 10$, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$).

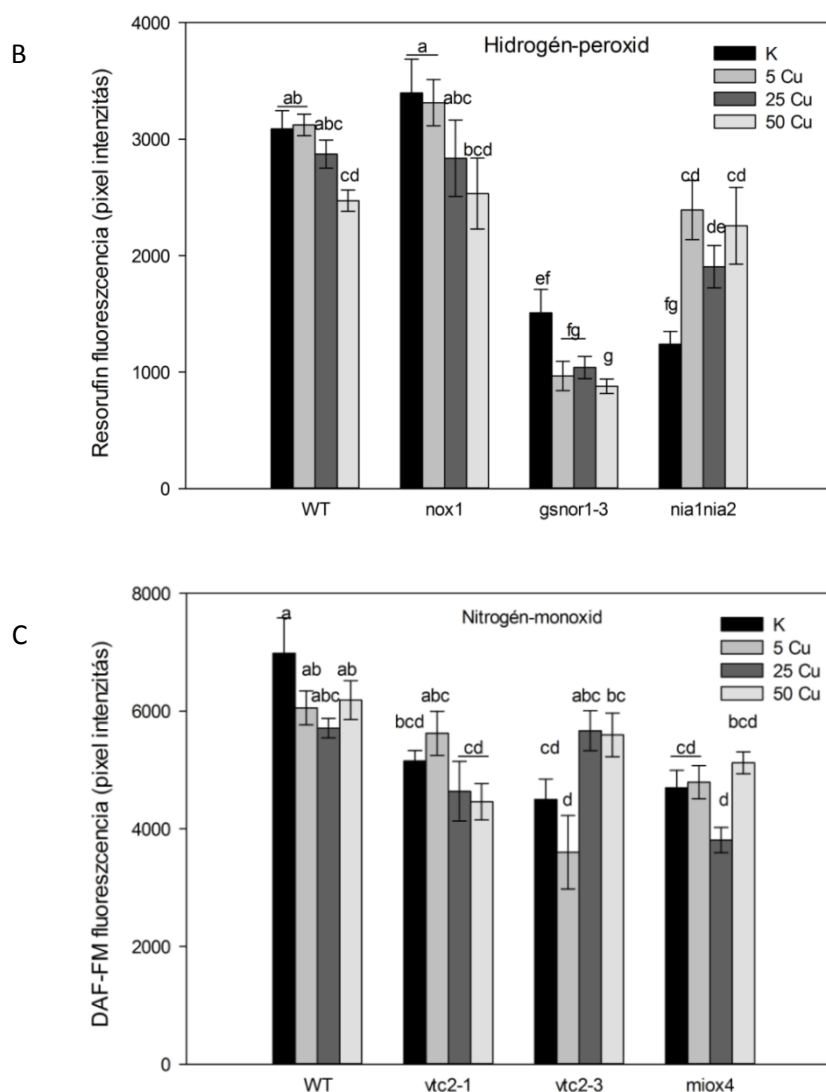
5.10. NO és ROF-k közötti kölcsönhatás *Arabidopsis* gyökerekben réz stressz során

A NO-ROF kölcsönhatás vizsgálata céljából tanulmányoztuk a különböző ROF-k (O_2^- és H_2O_2) szintjeit a NO túltermelő és csökkent NO tartalmú mutánsok gyökereiben, valamint detektáltuk a NO jelmolekula szintjét az aszkorbát túltermelő és –hiányos (csökkent és megnövelt ROF tartalommal bíró) mutánsokban. Stresszmentes körülmények között a NO túltermelő, *nox1* és *gsnor1-3*, mutánsok gyökereinek O_2^- szintjei alacsonyabbak, míg a NO hiányos mutánsé (*nia1nia2*) magasabb volt a vad típuséhoz képest. Réz kezelés mellett a szuperoxid gyökanion szintek megemelkedtek a vad típusú gyökerekben és lecsökkentek a NO túltermelő (*nox1*) és NO hiányos (*nia1nia2*) növények esetén (35. a ábra).

Továbbá a *gsnor1-3* gyökerekben nem volt megfigyelhető szignifikáns O_2^- fejlődés vagy elimináció (35.a ábra). Csupán a *nia1nia2* mutánsok gyökereiben detektáltunk szuperoxid szint redukcióval egyidejű réz-indukált H_2O_2 felhalmozódást. A vad típusú és a NO túltermelő növényeknél a hidrogén-peroxid szint lecsökkent réz kezelés hatására (35. b ábra).

A nem kezelt *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* lúdfüvek gyökerében szignifikánsan alacsonyabb NO szinteket mértünk a vad típushoz viszonyítva, bár a mutánsok között nem volt jelentős különbség. A réz NO metabolizmusra gyakorolt hatása pedig nem bizonyult jelentősnek a megváltozott aszkorbát szintekkel rendelkező mutánsokban (35. c ábra).





35. ábra Szuperoxid gyökanion szint (A, DHE fluoreszcencia pixel intenzitása) és hidrogén-peroxid szint (B, resorufin fluoreszcencia pixel intenzitása) vad típusú és NO mutáns *Arabidopsis*-okban. (C) NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia pixel intenzitása) a 0, 5, 25 és 50 μ M rézkezelésnek kitett vad típusú és Asa mutáns lúdfüvek gyökér merisztémaiban. A különböző betűkkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan-féle teszt alapján ($n = 10$, $p \leq 0.05$).

6. Eredmények értékelése

Környezeti stressz feltételek mellett, mint amilyen a réz kitettség is, a növények túlélésének alap feltétele, hogy a növekedés és fejlődésről erőforrásait képesek legyenek átcsoportosítani a védekezési mechanizmusokra. Így a nehézfém kitettség, mint stresszor legjellemzőbb hatása a legtöbb növényi szerv növekedésének gátlása. Emellett azonban bizonyos esetekben fejlődési indukció is megfigyelhető, hiszen újabb merisztémák is kialakulhatnak, amelynek következtében megváltozik a stressz kezelt növények gyökérarchitektúrája, ami a tűrőképesség fokozódását eredményezheti. Munkánk során, a réz, mint környezetszennyező nehézfém gyökérfejlődésre gyakorolt hatását, és annak hormonális és jelátviteli mechanizmusait tanulmányoztuk. Elsősorban mikroszkópiás módszerekkel dolgoztunk, melyek során az *Arabidopsis* csíranövényeinket különböző fluoreszcens festékekkel jelöltük. Az alkalmazott fluorofórok specifitását illetően merültek fel kritikák, ezért elsőként *in vivo* és *in vitro* ellenőriztük azokat.

Kísérleteink alapján a DAF-FM DA megfelelő indikátornak bizonyult a NO szintjének *in situ* vizsgálatára. Az aminofenil-fluoreszcein festék érzékeny a peroxinitritre, de nem lép reakcióba NO-dal vagy H₂O₂-dal. A peroxinitriten kívül az APF a OH⁻ és hipoklorit szintek kimutatására is alkalmazható (Cohn és mtsai., 2009). Eredményeink alapján a DCF nem használható a H₂O₂ detektálásra, mint ahogy azt más irodalom állítja, viszont érzékenynek mondható ONOO⁻-re. A festék széleskörben elterjedt; az oxidatív stressz minőségi markereként és az intracelluláris oxidánsok markereként is használható állati és növényi szövetekben egyaránt (Sandalio és mtsai., 2008). Továbbá az Amplex Red érzékenynek, ezáltal használhatónak bizonyult a H₂O₂ szint kimutatására. A FDA a sejtek életképességének megfelelő indikátora, hiszen a festék fluoreszcencia intenzitásának csökkenése azonos szöveti lokalizációt mutatott az elhalt sejteket jelző propídium jodid festődéssel. Vagyis összességében elmondható, hogy a fent említett fluorofórok nagy biztonsággal alkalmazhatóak a NO, a különböző ROF molekulák valamint az életképesség detektálására a kísérleti rendszerünkben.

A festékek specifitásának ellenőrzését követően megvizsgáltuk a NO és ROF szinteket a mutáns *Arabidopsis*-ok gyökércsúcsaiban, annak érdekében, hogy igazoljuk a mutációk ezen molekulák szintjeire gyakorolt hatását (3.a táblázat). A *nox1* gyökércsúcsokban a vad típushoz képest jelentősen megemelkedett NO szinteket

detektáltunk, ami a magasabb L-arginin koncentrációnak köszönhető oxidatív NO szintézis eredménye lehet (He és mtsai., 2004). A *gsnor1-3* növények a GSNO reduktáz enzimben deficiensek, így nem működik bennük az enzim által közvetített NO elimináció (Feechan és mtsai., 2005), mely egy nagyon magas NO szintet eredményez (vad típus NO szintjének 170%-a). A nitrát reduktáz hiányos *nialnia2* dupla mutáns növények lényegesen alacsonyabb NO tartalommal rendelkeznek a vad típushoz képest, mely a NR enzim NO szintézisben való részvételére utal a nem stresszelt lúdfüvekben. A *nialnia2noal-2* növényekben a NO szintézis oxidatív és reduktív útvonala is hibás, ami a *nialnia2* mutánsban tapasztaltnál kissé jelentősebb mértékű NO szint redukciónak eredményezett a gyökerekben. Feltételezhetjük tehát, hogy az oxidatív NO bioszintézis is hozzájárul a gyökerek bazális, endogén NO szintjének kialakításához. Lozano-Juste és León (2010) hasonló módon csökkent NO szinteket detektáltak a *nialnia2* és *nialnia2noal-2* gyökerekben. A *vtc2-3* mutáns nagyobb aszkorbát koncentrációval rendelkezik, mint a *vtc2-1* (Conklin 2001), mégis – hasonlóan Barth és mtsai., (2010) munkájához - a *vtc2-1* mutáció okozott nagyobb mértékű H₂O₂ - és össz ROF-tartalom növekedést a Col-0-hoz képest. Ellenben a *miox4* gyökerekben a megemelkedett aszkorbinsav tartalmak mellett alacsonyabb H₂O₂ és intracelluláris ROF szintek voltak kimutathatóak (3. b táblázat). A statisztikailag nem szignifikáns különbségeket tekintetbe véve, arra lehet következtetni, hogy a nem stresszelt *Arabidopsis*-ok gyökerében az aszkorbinsav részt vesz a ROF-k szintjének szabályozásában, de emellett az antioxidáns rendszer más elemei (pl. glutation és enzimek) is szabályozzák a folyamatot.

Vad típusú növényeket felhasználva meghatároztuk a hajtás és gyökérrendszer mikroelem koncentrációit (Cu, Fe, Zn, Mn, Mo, B) és azok szöveti eloszlását agaron nőtt lúdfüvekben (4. táblázat). Az eredmények alapján elmondható, hogy a csíranövények képesek felvenni és akkumulálni a táptalajban levő réz egy részét és elszállítani azt a hajtásrendszerükbe. Feltételezhetően a réz a nikociánaminnal komplexet képez és a xilémen keresztül szállítódik a hajtásba (Burkhead és mtsai., 2009). A réz kitettség jelentősen módosítja a csíranövények mikroelem homeosztázisát is. A hajtás vastartalmának réz-indukált csökkenése a két fémion közötti kompetíciónak köszönhető (Lequeux és mtsai., 2010). A gyökerek cink tartalmát a rézkezelés negatívan befolyásolja, hiszen mindkét ion ugyanazokat a transzporter molekulákat, a ZINC-REGULATED TRANSPORTERS, IRON-REGULATED TRANSPORTER-LIKE PROTEINS (ZIP, Wintz és mtsai., 2003) használja. A réz terhelésnek kitett növények Mn, Mo és B tartalma

alacsonyabbnak mutatkozott, mint a kontroll esetében. Ennek az lehet az oka, hogy a réz képes befolyásolni ezen elemek felvételének mértékét (Lidon és Henriques, 1993). Általánosságban elmondható, hogy a réz kitettség jelentősen módosítja a vizsgált mikroelemek hajtás-gyökér eloszlását a csíranövényekben, felborítva ezáltal a szervek elemhomeosztázisát.

A réz kitettség gyökér- és hajtásfejlődésre gyakorolt hatásait a kezelési időtartam függvényében, 7 és 17 napos *Arabidopsis* növények felhasználásával határoztuk meg. A rövidebb időtartamú kísérleteinkben a legalacsonyabb (5 μM -os) rézkoncentráció kissé megnövelt sziklevél területet, hipokotil- és FGY hossznövekedést eredményezett, míg a komolyabb rézkitettség (50 μM) szignifikáns gátlást okozott a hajtás és gyökérfejlődésben (18. ábra). **Hosszabb távon** (17 nap) a hajtásrendszeren belül a levelek száma, területe, a levélnyel hossz és hipokotil hossz lecsökkent (19. ábra), amely jelentős réz-indukált sejtosztódás, sejt expanzió és sejt elongáció gátlásra utal (Jiang és mtsai., 2000; Alaoui-Sossé és mtsai., 2004). A réz által kiváltott erőteljes hajtásnövekedés gátlás feltehetően a szénhidrát tartalom növekedésének és a fotoszintetikus aktivitás csökkenésének eredménye lehet (Maksymiec és Baszynski, 1998). A **rövid távú** kísérleteinkben a gyökérrendszer a hajtásnál érzékenyebbnek bizonyult a rézkitettségre, mivel a növekedését a 25 μM Cu^{2+} gátolta, míg a hajtás paraméterei esetében ez a rézkoncentráció nem rendelkezett ilyen hatással. Pasternak és mtsai. (2005) munkájában a réznek szintén kismértékű gátló hatása volt a sziklevél expanziójára. A gyökér nagyobb érzékenysége az oka az, hogy a felvett réz nagy része a gyökérben akkumulálódik (Lequeux és mtsai., 2010). Érdekes módon **hosszú távú** réz többlet esetén a FGY növekedése csak kis mértékben gátlódott, annak ellenére, hogy nagy mennyiségű réz halmozódott fel benne (4. táblázat). A gyökérmegnyúlás gátlásának elmaradása egy akklimatizációs folyamat aktiválódását sugallja hosszabb időtartamú réz kitettség esetén. Ellentétben az elongációval, az oldalgyökér iniciációt lehetővé tevő sejtosztódás rézkitettségre érzékenynek bizonyult (20. b ábra). A 25 μM rézkezelte növények gyökérrendszerében a stressz-indukált morfológiai válasz (Pasternak és mtsai., 2005; Potters és mtsai., 2009) tünetei voltak láthatóak, mint például megnyúlás gátlás, gyökérszőr képződés csúcsához közelebbi megjelenése, és az oldalgyökerek számának kis mértékű növekedése (20. c ábra és 21. ábra). Lequeux és mtsai. (2010) hasonló eredményeket közöltek, miszerint az *Arabidopsis*-ok teljes oldalgyökér sűrűsége rézkezelés hatására megemelkedett. Azonban fontos megemlíteni, hogy ebben a tanulmányban nem vizsgálták elkülönülten a különböző oldalgyökér

fejlődési stádiumokat. Kísérleteinkből nyilvánvalóvá vált, hogy az OGY-ek fejlődésének korai lépései, melyek sejtosztódás által vezéreltek (20. b ábra), érzékenyebbek rézre, mint a főként sejt megnyúlás irányította későbbi események (20. c ábra). A SIMV fejlődése függ a rézkezelés koncentrációjától és időtartamától, hiszen csak hosszabb időtartamú, közepes erősségű (25 μ M) stressz váltotta ki a megjelenését. A SIMV megjelenése feltehetően az akklimatizációs folyamat alap eleme, mivel a kisebb levél méretek és a több oldalgyökér hozzájárulhat a jobb vízellátáshoz, ezáltal pedig a növény túléléséhez.

Az auxin metabolizmusának és transzportjának megváltozása nagyon fontos szerepet játszik a nehézfémek által előidézett fejlődési válaszokban (Potters és mtsai., 2009). Mivel a fejlődési folyamatok főleg olyan morfogének által vezéreltek, mint például az auxin, ezért vizsgáltuk *in vivo* az auxin indukálható DR5 promóter expresszióját a DR5::GUS transzgenikus *Arabidopsis*-okban.

A **rövidebb időtartamú** réz kezelés esetén a kontrollhoz képest fokozottabb auxin-függő génexpressziót tapasztaltunk a csíranövények szikleveleiben és gyökerében is. Lequeux és mtsai. (2010) eredményeihez hasonlóan a rézkezelést kapott csíranövényekben a DR5 promóter aktivitása nyilvánvalóbb volt a merisztéma feletti gyökérrégióban. A nagyobb nagyítású mikroszkópos felvételeinken azonban az is látható, hogy az auxin-függő génexpresszió a merisztéma területén is fokozódik, hasonlóan a NaCl-dal kezelt lúdfű gyökeréhez (Wang és mtsai., 2009). A réz által szabályozott gének transzkriptom analízise feltárta, hogy az auxin bioszintetikus gének (pl. IAA amid szintáz, triptofán szintáz) expressziója réz kezelésre adott válaszokban indukálódik (Zhao CR és mtsai., 2009), mely felelős lehet a réz többlet alatti auxin szint növekedésért. **Hosszabb távon** (17 nap), a réz más környezeti stresszfaktorokhoz (pl. só, Cd) hasonlóan a DR5 expresszió csökkenését váltja ki az *Arabidopsis* levelekben (Xu és mtsai., 2009). Hasonlóan Lequeux és mtsai. (2010) eredményeihez, az auxin-függő génkifejeződés csökkenése jellemző a réz-kezelt növények FGY merisztémájában is, mely az auxin szint csökkenésére utal (23. ábra). Hasonlóan a főgyökér csúcsokhoz, a réz kezelés erőteljes DR5 expresszió csökkenést okozott a különböző fejlettségű OGY-kben is (24. ábra). A réz stressz auxin szignál transzdukciós útvonallal való kapcsolatát bizonyítja az auxin által szabályozott SHY2/IAA3 gének réz okozta down-regulációja (Zhao CR és mtsai., 2009).

A nitrogén-monoxid, mint az auxin jelátvitel alapvető komponense, különböző fejlődési folyamatokat szabályoz a növényekben. Többek közt megemlíthetjük a

hajtásnövekedést, FGY megnyúlást, OGY vagy járulékos gyökérképződést, gravitropikus elhajlást (He és mtsai., 2004; Pagnussat és mtsai., 2002; Correa-Aragunde és mtsai., 2004; Lombardo és mtsai., 2006).

A rövid távú kísérleteink során megállapítottuk, hogy Cu^{2+} hatásaként a NO szintekben is történnek változások mindkét szervben. Sziklevelekben az 5 μM Cu^{2+} okozott jelentős NO akkumulációt, míg a nagyobb mértékű nehézfém terhelés lecsökkentette az NO tartalmat (25. ábra). Eredményeinkhez hasonlóan, réz-indukált NO képződést találtak a *Chlamydomonas reinhardtii* sejt szuszpenzióban, *Brassica juncea*, *Pisum sativum* és *Panax ginseng* gyökerekben is (Bartha és mtsai., 2005; Tewari és mtsai., 2008; Zhang és mtsai., 2008; Xiong és mtsai., 2010). Kontroll körülmények között a NO-kapcsolt fluoreszcencia jelentős szöveti specifitást mutat a FGY-ekben, mivel sokkal magasabb NO szintek detektálhatók az EZ-ben a MZ-hoz viszonyítva. Illés és mtsai. (2006) is a MZ-hoz képest magasabb NO-függő fluoreszcencát mértek az átmeneti zóna disztális részében. A FGY elongációs zónájában a réz kezelés lényeges NO csökkenést okozott, míg a merisztematikus zóna NO tartalmát nem befolyásolta (25. c ábra). Nehézfém okozta NO szint csökkenés figyelhető meg többek között a borsó leveleiben és gyökereiben is (Rodríguez-Serrano és mtsai., 2009), habár meg kell jegyezni, hogy az alkalmazott NF koncentrációjának, a kezelési feltételeknek, a növények korának és a vizsgált szövetek fajtájának függvényében más és más lehet a NO képződésére gyakorolt hatás (Xiong és mtsai., 2010). A nitrogén-monoxid szintekben bekövetkező változások lehetséges mechanizmusait genetikai és biokémiai módszerekkel is megvizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a sziklevelekben az L-arginin és NR-függő bioszintetikus útvonal is felelős lehet a réz indukálta NO akkumulációért. Ezt támasztja alá az is, hogy a vad típussal összehasonlítva a *nia1nia2noa1-2* sziklevelek – melyekben mindkét NO szintetikus útvonal hibás - csökkent NO tartalmat mutattak (28.b ábra). Ámbár a nitrát reduktáz főként a gyökerekben működik, a NR-függő NO szintézisre a növények föld feletti részeiben is van bizonyíték (Bright és mtsai., 2006; Sang és mtsai., 2008; Xu és mtsai., 2010).

A gyökér megnyúlási zónájának NO tartalom csökkenése kapcsán azt feltételeztük, hogy a Cu^{2+} -indukált szuperoxid gyökkanion eliminálja a NO-t a peroxinitrit képződését eredményező reakción keresztül. Hasonló diffúziós rátával rendelkezik a két molekula, így Yamasaki és mtsai., (2011) szerint nagy valószínűséggel reakcióba lépnek egymással,

amennyiben a szöveti lokalizációjuk megegyezik. Eredményeink viszont nem támasztják alá ezt a hipotézis, mivel az elongációs zónában sem a O_2^- szint emelkedés, sem a három molekula kolokalizációja nem volt megfigyelhető a réz-kezelt növények főgyökerében (29. ábra). A réz-indukált NO szint csökkenés háttérmechanizmusa feltehetően egyik vagy mindkét NO bioszintetikus útvonal (L-arginin-és/vagy nitrát függő) alulszabályozottsága lehet, amit például alumínium kitettség alatt már megfigyeltek (Tian és mtsai., 2007; Wang HH és mtsai., 2010). A rövid távon tapasztalt réz-indukált NO szint csökkenéssel ellentétben, **a hosszabb időtartamú** Cu kitettség (17 napig tartó), jelentős növekedést eredményezett (26. b ábra). Ez a jelenség azzal a ténnyel magyarázható, hogy a nehézfém terhelés koncentrációja mellett a kezelés időtartama is befolyásolja annak NO képződésre gyakorolt hatását (Xiong és mtsai., 2010). Fernandez- Marcos és mtsai. (2011) szerint a NO negatívan szabályozza a FGY megnyúlását, így ezen jelmolekula réz hatására megemelkedett szintje hozzájárulhat a gyökérnövekedés gátlásához a PIN FORMED 1 (PIN1)-közvetített auxin transzport és a DR5 expressziójának csökkentése által.

Gyökerekben a NO fő enzimatisz forrása a nitrát reduktáz, és ez az enzim termeli a NO-t stressz körülmények között, mint pl. alumínium kitettség, ozmotikus stressz vagy patogén támadás (Wang HH és mtsai., 2010; Kolbert és mtsai., 2010; Oliveira és mtsai., 2010). Emiatt megvizsgáltuk genetikai módszert felhasználva ezen enzim lehetséges részvételét a réz-indukált NO felszabadulás kapcsán. A vad típussal ellentétben a NR-deficiens dupla mutáns, *nia1nia2* FGY-ében nem figyelhettük meg a réz okozta NO produkciót, ami a NR réz-indukált NO szintézisben betöltött alapvető szerepére utal (27. ábra).

További kísérleteinkkel célunk volt feltárni a hormonális (auxin) és szignalizációs komponensek (NO) közötti kapcsolatot a réz-indukált morfológiai válaszok jelátvitelében. **Rövid távú** kísérleteinkben elsőként az auxin NO szintekre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Ehhez az auxin transzport gátlószerét (NPA) alkalmaztuk a réz kezelésekk mellett és mindkét szervben kimutattuk a NO szinteket. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az auxin transzport szükséges az 5 μ M réz által kiváltott NO akkumulációhoz sziklevekben, vagyis az auxin pozitívan szabályozza az NO szintézisét enyhe rézkitettség mellett. Ellenben a magasabb réz koncentrációk esetében az auxin hiánya okozott NO szint növekedést. Azok a növények, amelyekben a NPA lecsökkentette az auxin szintet, szignifikánsan magasabb NO fluoreszcenciát mutattak a

gyökérben, összehasonlítva azokkal a növényekkel, amelyeket csak rézzel kezeltünk. Ez azt sugallja, hogy az auxin negatívan szabályozza a NO szintet a FGY-ben (30. ábra). Ezen megállapítások látszólag ellentmondanak a legtöbb publikált eredménnyel, melyek a NO-t az auxin szignál transzdukció egy pozitív szabályozó komponensének írják le (Correa-Aragunde és mtsai., 2007 hivatkozásai). Habár az említett publikációk más fiziológiai folyamatokra vonatkoznak, mint például a járulékos vagy oldalgyökök fejlődésére. Kísérleti rendszerünkben a külsőleg hozzáadott indol-3-ecetsav (10^{-6} M) nem váltott ki NO képződést sem a sziklevelekben sem a FGY-kben. A NO auxin-függő génexpresszióra gyakorolt hatását biokémiai úton, kémiai NO donor vagy gyökfogó hozzáadásával vizsgáltuk a réz-kezelt *Arabidopsis* növények hajtásában és gyökerében. Amikor az endogén NO szinteket donor alkalmazásával növeltük, az auxin-érzékeny génexpresszió jelentősen lecsökkent a sziklevelekben és a főgyökök csúcsaiban egyaránt. Ez a réz-indukált morfológiai változások hormonális (auxin) és jelátviteli komponensei (NO) között fennálló gátló kapcsolatot feltételez (31. ábra). Ezen eredményeket genetikai vizsgálatokkal is alátámasztottuk, melyek során a Cu által okozott növekedési választ hasonlítottuk össze vad típusú, NO-túltermelő (*nox1*) és NO hiányos (*nia1nia2* és *nia1nia2nox1-2*) lúdfű csíranövényekben. A vizsgált fejlődési események citológiai háttérmechanizmusai eltérőek, hiszen a sejtosztódás főként a sziklevel kiterjedéséért illetve növekedéséért, a sejt megnyúlás pedig a hipokotil és főgyökér növekedéséért felelős. A NO többlet esetén kisebb sziklevel méretek figyelhetők meg, a NO hiányos mutánsok pedig kissé nagyobb sziklevelekkel rendelkeznek a vad típushoz képest. Ráadásul a sziklevel méretének csökkenése NO többlet esetén kifejezett. Ellentétben ezzel, a hipokotil sejtek megnyúlása a NO hiányos mutánsokban nagyobb érzékenységet mutatott a vad típushoz képest, míg *nox1*-ben nem volt rézre adott morfológiai válasz. Azonban hasonlóan Lee és mtsai. (2008) eredményeihez, a *nox1* rövidebb hipokotíllal rendelkezik, mint a vad típus (32. ábra). A FGY elongációt tekintve a mutánsok viselkedése nem egyértelmű. Kontroll feltételek mellett a NO-túltermelő és NO-hiányos növények FGY hossza rövidebb, mint a vad típusúaké, melyet az irodalmi adatok is alátámasztanak (He és mtsai., 2004; Lozano-Juste és León, 2010). A rézkezelés nem okozott FGY rövidülést a *nox1* és a *nia1nia2nox1-2* mutánsban, ámbar egy erőteljes csökkenést eredményezett a NO-hiányos dupla mutáns FGY hosszában. A rézre adott különböző gyökér növekedési válaszok a NO-deficiens vonalak esetén azzal a hipotézissel magyarázhatóak, hogy egy kontrollhoz közeli NO státusz szükséges a gyökér architektúra szabályzásához. A NO

tartalom optimális szinttől való eltérése a réz által előidézett gyökér morfológiai válasz gátlását eredményezi.

A további kísérleteink során a megváltozott NO anyagcserével rendelkező mutáns csíranövények (*nox1*, *gsnor1-3* és *nia1nia2*) réz toleranciáját tanulmányoztuk. Ezek a növények kisebb hajtás és gyökér méreteket valamint friss tömeget mutattak a vad típushoz képest, ami egy optimális NO szint szükségességét feltételezi a megfelelő növekedéshez (33. ábra). Továbbá a *gsnor1-3* mutáns törpe fenotípusa arra utal, hogy a GSNOR-függő NO eltávolítás szükséges az optimális fejlődéshez (Lee és mtsai., 2008). He és mtsai. (2004) munkája igazolja ezen eredményeket, mivel ők azt tapasztalták, hogy a magas NO szint - amit SNP kezeléssel értek el - növekedés gátlást eredményezett *Arabidopsis*-okban és egy optimális SNP koncentráció az, ami a hajtásnövekedést elősegíti. Borsó levelekben is az NO aktuális szöveti koncentrációjától függő ellentétes hatásokat figyeltek meg (Leshem és Haramaty, 1996). A gyökérrendszerben szintén koncentráció-függő a NO növekedést indukáló hatása, mivel a kémiai NO donorral előidézett magas NO szintek növekedés gátlást okoztak (Gouvêa és mtsai., 1997; Pagnussat és mtsai., 2002). Dowdle és mtsai. 2007-ben közölt eredményeivel egybehangzóan a *vtc2-3* növények vad típus-szerű hajtás és gyökér méreteket mutattak kontroll feltételek mellett. A nem kezelt *miox4* növények is vad típushoz hasonló méretekkal rendelkeztek, ami Alford (2009) eredményeivel összhangban van. Ez arra utal, hogy a módosított aszkorbát tartalmak és az ebből következő enyhén megváltozott ROF szintek nem befolyásolják jelentős mértékben a lúdfű csíranövények korai fejlődését. Epstein és Bloom (2005) szerint, az alap réz tartalom a növényekben $2-50 \mu\text{g g}^{-1}$ száraz tömeg, és az agaros közegben a réz koncentráció $20 \mu\text{M}$ (1.27 ppm) felett tekinthető toxikusnak (Murphy és Taiz, 1995). Ezeket alapul véve, az általunk alkalmazott legalacsonyabb CuSO_4 koncentráció ($5 \mu\text{M}$) csak enyhe réz tartalombeli növekedést eredményezett ($\sim 80 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$; 4. táblázat), és nem bizonyult toxikusnak a Col-0 csíranövények számára. Sőt, az $5 \mu\text{M}$ réz kezelésnek enyhe növekedésserkentő hatása volt (a friss tömegek nem-szignifikáns növekedése), bár ehhez a hatáshoz a növényekben megemelkedett NO és ROF szintek voltak szükségesek. Az NO hiányos növények esetén a réznek erőteljesebb növekedést gátló hatását figyeltük meg vad típushoz képest, mely a NO növekedés fenntartása során játszott szerepét tükrözi abiotikus stressz körülmények között. Ezt támasztja alá az is, hogy a *nia1nia2* csíranövények fokozott réz-indukált sejtmegnyúlás gátlást mutattak a FGY növekedésük során (32. ábra).

Ezt követően megvizsgáltuk a gyökér merisztéma sejtek életképességét, amiből a réz toleranciára következtettünk. Enyhe stressz során a magas NO szintek fokozták az érzékenységet, míg nagyobb réz koncentrációk esetén a toleranciát segítették elő. Ez azt jelenti, hogy a NO szignalizációs szerepe függ a stressz erősségétől. Kismértékű rézkitettség során a *nox1* növényekben a NO életképességre gyakorolt negatív hatása visszafordítható a magas NO tartalom eliminálásával (34.b ábra). A nitrogén-monoxid hozzájárulása az abiotikus és biotikus stressz toleranciához számos kutatócsoport által bizonyított. Többek között a *gsnor1-3* növényekben a magas S-nitrozotiol szint hozzájárult a hő- és szelenit toleranciához (Lee és mtsai., 2008; Lehotai és mtsai., 2012), továbbá a *nialnia2* mutánsok kevésbé ellenállóak olyan stresszorokkal szemben, mint a vízhiány, fagyás vagy szelenit kitettség (Zhao MG és mtsai, 2009; Lozano-Juste és León 2010; Lehotai és mtsai., 2012). Nemrégiben izoláltak egy NO túltermelő paradicsom mutánst (*shr*), amelyben a betegségellenállóság megemelkedett NO képződéssel társult (Negi és mtsai., 2010). A *vtc2-1* és *vtc2-3* lúdfüvek esetén a sejtéletképesség lecsökkent a rézkitettség hatására, viszont a *miox4* gyökerek sejtjei életképesebbnak bizonyultak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a csökkent aszkorbát tartalom következtében kialakult magasabb ROF szint rézérzékenységhez vezet, míg az aszkorbinsav túltermelés eredményeképp létrejött kisebb ROF tartalom a réz toleranciának kedvez. A magasabb ROF szintek megzavarják a sejt redox állapotát, mely oxidatív károsodáshoz vezet (Potters és mtsai., 2010). Ez valószínűsíthetően fokozza a réz érzékenységet. A *vtc2* mutánsok érzékenyebbnak bizonyultak a környezeti stresszekre, mint a hő-, só- vagy fotooxidatív stressz (Smirnoff 2000; Müller-Moulé és mtsai., 2004; Larkindale és mtsai., 2005).

Biokémiai kísérleteket végeztünk annak igazolására, hogy a NO részt vesz-e a réztolerancia kialakításában. Ezek során a növények NO szintjét exogén NO donor (SNP) és NO gyökfogó (cPTIO) alkalmazásával módosítottuk, és detektáltuk a vad típusú és NO mutáns növények életképességét a gyökér merisztémában. Az eredmények alapján elmondható, hogy a NO javítja a réz okozta sejtkárosodásokat erős réz stressz esetén, mivel a NO-kezelt vad típusú növények jobb életképességet mutattak (34. ábra). A NO túltermelő mutáns nagyfokú réztűrése és a *nialnia2 Arabidopsis* fokozott érzékenysége szintén alátámasztja a NO stresszt enyhítő hatását (39. ábra). Cui és mtsai. (2010) hasonló eredményei szerint, a NO kezelés csökkentette a lipid peroxidáció mértékét és növelte a gyökerek friss tömegét a réz-kezelt paradicsom növényekben. Egy másik tanulmány szerint az SNP-vel és rézzel egyidejűleg kezelt *Panax ginseng* növények kisebb mértékű

sejthalált szenvedtek el, és a membránok oxidatív károsodása is enyhébb volt (Tewari és mtsai., 2008). Dong és mtsai. 2013-ban publikált eredményei szerint a külsőleg alkalmazott NO kezelés növelte a réz toleranciát paradicsom növényekben. Saját eredményeink arra is rámutatnak, hogy a gyökérsejtek életképessége alapján meghatározott réztűrés kialakulásához szigorúan szabályozott NO balansz szükséges, mivel az optimális szintnél kisebb vagy annál nagyobb NO tartalom sejtkárosodást idézhet elő.

További kísérleteinkben a lehetséges kapcsolatot vizsgáltuk a NO és a ROF-k között réz stressz alatt mikroszkópos módszerrel. Magasabb NO szinthez csökkent szuperoxid gyökáion szint társult a kontroll állapotú *Arabidopsis* gyökércsúcsokban, és ez fordítva is igaznak bizonyult, vagyis a csökkent NO tartalmat mutató *nia1nia2* gyökérmerisztémájában a vad típusnál magasabb szuperoxid szint volt mérhető. Ez arra utal, hogy stressz mentes körülmények között a NO képes negatívan szabályozni a $O_2^{\cdot-}$ szintjét, feltehetően a $ONOO^-$ képződéséhez vezető kémiai reakció által (Koppenol és mtsai., 1992) vagy az antioxidánsok, mint például a szuperoxid dizmutáz aktivitásának módosításán keresztül (Wang L és mtsai., 2010). Opdenakker és mtsai. (2012) szerint a NADPH oxidáz felelős a réz-indukált $O_2^{\cdot-}$ akkumulációjáért vad típusú *Arabidopsis* gyökerekben. NO többlet esetén (*nox1*, *gsnor1-3*), a réz nem képes megemelni a szuperoxid szintet, valószínűleg azért, mert a NADPH oxidáz inaktíválódik NO-függő S-nitroziláció következtében (Yun és mtsai., 2011). A réz hatásaként a H_2O_2 szintek lecsökkentek NO többlet jelenlétében, amiből arra következtethetünk, hogy a megemelkedett NO szint hatására az antioxidáns gének (pl. glutathion peroxidáz vagy a glutathion transzferáz) expressziója fokozódott, így ROF detoxifikáció történt (Polverari és mtsai., 2003). Az előbb említett antioxidáns enzimek a NO-függő S-nitroziláció által is szabályozottak (Lyndermayr és mtsai., 2005). Továbbá, a NO hiány esetében, a szuperoxid szint csökkenése H_2O_2 képződéssel járt együtt, ami lehetséges SOD-függő detoxifikációt feltételez. A megváltozott aszkorbát metabolizmus és ennél fogva a megváltozott reaktív oxigénforma tartalom (a *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* mutánsok) a vad típusnál alacsonyabb nitrogén-monoxid szintet eredményezett, mely arra utal, hogy a ROF-k szigorúan szabályozott szintje hat a NO metabolizmusra stressz mentes körülmények között. A réz-indukált, nem szignifikáns változásokat figyelembe véve a ROF-k hatása a NO metabolizmusra réz stressz alatt elhanyagolhatónak mondható (35.d ábra).

7. Következtetések

A gyökérzet növekedésének fenntartása a különböző stresszhatások során alapvető fontosságú a növény túlélése szempontjából. Ezért munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a réz, mint környezeti stresszor gyökérfejlődésre gyakorolt hatásait, valamint ezen folyamat hormonális és jelátviteli háttérmechanizmusait, különös tekintettel a nitrogén-monoxid jelmolekula képződésére, szerepére, kölcsönhatásaira.

Munkánk során kapott eredményeinkből a következő főbb következtetések vonhatók le:

- A réz-indukált morfológiai válasz megjelenése az *Arabidopsis* növényekben függ a fémterhelés időtartamától és koncentrációjától. Hosszú távon az *Arabidopsis* réz stressz által kiváltott fejlődési indukciót (OGY szám gyarapodást) mutat.
- A rövid és a hosszabb időtartamú réz terhelés egyaránt megváltoztatja az auxin és a NO metabolizmusát. Rövid távon a réz többlet auxin szint növekedést, ugyanakkor NO szint csökkenést okoz a csíranövények gyökerében, míg hosszabb távon ezzel ellentétes irányú változás történik.
- A réz-indukált SIMV szignál transzdukciójában szereplő hormonális- és jelkomponens, azaz az auxin és a NO között kölcsönösen negatív kapcsolat áll fenn.
- Sziklevelekben a réz-indukált NO akkumulációért mindkét feltételezett enzimátikus NO bioszintézis útvonallal (L-arginin és NR-függő) felelős, míg a NO csökkenés a FGY-ben a peroxinitritről és szuperoxid gyökanion képződésétől függetlenül történik. Hosszabb távon a rézkezelt gyökerekben bekövetkező NO szintézisért a NR enzim aktivitása a felelős.
- A NO részt vesz a tolerancia kialakításában nagyobb mértékű réz terhelés esetén, azáltal, hogy szabályozza a szuperoxid gyökanion és a H_2O_2 réz stressz során történő képződését. A NO-dal ellentétben a ROF-k fokozzák a réz érzékenységet az *Arabidopsis* csíranövényekben.

8. Irodalomjegyzék

- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008)** MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis J of Biol Chem* 283:23 15932-15945.
- Ahlfors R, Brosché M, Kollist H, Kangasjärvi J (2009)** Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 58:1-12.
- Ahmad P, Wani MR (2014)** Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: Volume 2. doi 10.1007/978-1-4614-8600-8_5. p.137-159.
- Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint M-L, Epron D, Badot P-M (2004)** Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 166:1213–1218.
- Alford SR (2009)** Molecular characterization of two *myo*-inositol oxygenases in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Apel K, Hirt H (2004)** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2011)** Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – From physiology to pathophysiology. *Phytochem* 72:681-688.
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F (2006)** An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis* AtFer1 ferritin gene expression. *The J Biol Chem* 281(33):23579-23588.
- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O, Wendehenne D (2012)** Protein S-nitrosylation: What's going on in plants? *Free Rad Biol Med* 53:1101–1110.
- Astier J, Lindermayr C (2012)** Nitric Oxide-Dependent Posttranslational Modification in Plants: An Update *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15193-15208; doi:10.3390/ijms131115193.
- Bartel B, LeClere S, Magidin M, Zolman BK (2001)** Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *J Plant Growth Regul* 20:198-216.
- Barth C, Gouzd ZA, Steele HA, Imperio RM (2010)** A mutation in GDP-mannose pyrophosphorylase causes conditional hypersensitivity to ammonium, resulting in *Arabidopsis* root growth inhibition, altered ammonium metabolism, and hormone homeostasis. *J Exp Bot* 61:379–394.
- Bartha B, Kolbert Zs, Erdei L. (2005)** Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 9-12.

- Begara-Morales, JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Mata-Pérez C, Leterrier M, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ (2013)** Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* 64, doi: 10.1093/jxb/ert006.
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007)** Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 282:1352-1358.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H (2013)** Nitric oxide as a mediator for defense responses. (*MPMI*) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26 (3): 271-277.
- Bernal M., Casero D., Singh V., Wilson G.T., Grande A., Yang H., Dodani S.C., Pellegrini M., Huijser P., Connolly E.L., Mechant S.S., Krämer U. (2012)** Transcriptome Sequencing Identifies SPL7-Regulated Copper Acquisition Genes FRO4/FRO5 and the Copper Dependence of Iron Homeostasis in Arabidopsis *The Plant Cell* 24: 738-761.
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL (2006)** Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *J Exp Bot* 57:517-526.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ. (2006)** ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45: 113-122.
- Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009)** Copper homeostasis. *New Phytol* 182:799–816.
- Capone R, Tiwari BS, Levine A (2004)** Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5):425-428.
- Chaoui A, Ferjani EE (2005)** Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *C. R. Biologies* 328: 23–31.
- Chen YG, Guo WH, Ye ZQ, Wang GL, Yuan JL (2011)** A europium(III) chelate as an efficient time-gated luminescent probe for nitric oxide. *Chemical Communications* 47:6266-6268.
- Choudhary SP, Bhardwaj R, Gupta BD, Dutt P, Gupta RK, Kanwar M, Dutt P (2010)** Changes induced by Cu²⁺ and Cr⁶⁺ metal stress in polyamines, auxins, abscisic acid titers and antioxidative enzymes activities of radish seedlings. *Braz. J. Plant Physiol* 22(4):263-270.
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000)** NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal* 25(5) 667-677.
- Cohn CA, Pedigo CE, Hylton SN, Simon SR, Schoonen MAA (2009)** Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions *Geochemical Transactions* 10:8. doi:10.1186/1467-4866-10-8.

- Conklin PL (2001)** Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ* 24:383–394.
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000)** Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154:847–856.
- Corpas FJ, Barroso JB (2013)** Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* 199:633–635.
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA (2004)** Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* 136: 2722–2733.
- Corpas FJ, Hayasi M, Mano S, Nishimura M, Barroso JB. (2009)** Peroxisomes are required for nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 151: 2083–2094.
- Corpas FJ, Leterrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM, Barroso JB (2011)** Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci* 181:604–611.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2013)** Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions *frontiers in Plant Science* 4:29.
- 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, Lanteri ML, Garcia-Mata C, ten Have A, Laalt AM, Graziano M, Lamattina L. (2007)** Nitric oxide functions in auxin, abscisic acid, and lipid signaling pathways. *Plant Cell Monographs* 5: 113–130.
- Crawford NM, Guo F-G. (2005)** New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science* 10: 195–200.
- Cui XM, Zhang YK, Wu XB, Liu CS (2010)** The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ* 56:274–281.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Montagu MV, Inzé D, Breusegem FV (2000)** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.* 57:779–795.
- Davey HM, Hexley P (2011)** Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environmental Microbiology* 13(1): 163–171.
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H (1992)** Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol* 98: 853–858.
- Delledonne M (2005)** NO news is good news for plants. *Curr Opinion Plant Biol* 8:390–396.

- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001)** Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci* 98:13454–13459.
- Dong Y-X, Wang X-F, Cui Y-M (2013)** Exogenous nitric oxide involved in subcellular distribution and chemical forms of Cu^{2+} under copper stress in tomato seedlings *J of Integr Agriculture* doi: 10.1016/S2095-3119(13)60367-6.
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N (2007)** Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 52:673–689.
- Epstein E, Bloom AJ (2005)** Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Erdei L (2004)** Növényélettan JATEPress Szeged, 105-174.
- Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H (1992)** Metal tolerance in plants. *Acta Bota Neerl.* 41: 229-248.
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005)** A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *PNAS* 102:8054–8059.
- 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. *PNAS* 108:18506-18511.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Calo 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. *The Plant Cell* 22: 3816-3830.
- Freschi L (2013)** Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *frontiers in Plant Science* 4:398 doi: 10.3389/fpls.2013.00398.
- García-Mata C, Lamattina L (2001)** Nitric oxide induces stomatal closure and enhances eht adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 126:1196-1204.
- Gaupels F, Spiazzi-Vandelle E, Yang D, Delledonne M (2011)** Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response *Nitric Oxide* 25 222–228.
- Gill SS, Tuteja N (2010)** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Phys and Biochem* 48:909-930.
- Goldstein S, Russo A, Samuni A (2003)** Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, and O_2^- *The Journal of Biological Chemistry* 278:51 50949-50955.
- Gomes A, Fernandes E, Lima J L.F.C. (2005)** Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65:45-80.
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003)** Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26:1851-1862.

- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães CAN, Martins IS (1997)** NO.–releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* 21:183–187.
- Groppa MD, Rosales EP, Iannone MF, Benavides MP, (2008)** Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69: 2609–2615.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006)** Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* 57:507-516.
- Gupta DK, Sandalio LM (2012)** Metal toxicity in plants: perception, signaling and remediation. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* doi 10.1007/978-3-642-22081-4_12.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2011)** On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16 (3):160-198.
- Halliwell B (2006)** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Phys*, 141:312–322.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984)** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006)** Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Clarendon Press, Oxford
- Hao F, Wang X, Chen J (2006)** Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Sci* 170:151-158.
- Hasnain S, Sabri AN (1997)** Growth stimulation of Triticum aestivum seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonas strains. *Environ. Pollut.* 97, 265–273.
- Hayat S, Mori M, Pichtel J, Ahmad A (2010)** Nitric oxid in plant physiology. *Wiley Blackwell*
- He H, Zhan J, He L, Gu M (2012)** Nitric oxide signalling in aluminium stress in plants. *Protoplasma* 249:483-492.
- He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Gio F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei Z-M (2004)** Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305:1968-1971.
- Hermes VS, Dall'Asta P, Amaral FP, Anacleto KB, Arisi ACM (2013)** The regulation of transcription of genes related to oxidative stress and glutathione synthesis in *Zea mays* leaves by nitric oxide *Biol Plantarum* 57(4):620-626.
- Heyno E, Mary V, Schopfer P, Krieger-Liszkay A (2011)** Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes *Planta* 234:35-45.
- Hossain MA, Piyatida P, T. da Silva JA, Fujita M (2012)** Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants : central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Hindawi Publ. Corp. J. of Botany* doi:10.1155/2012/872875.
- Hsu YT, Kao CH, (2004)** Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 42:227–238.

- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W. (2005)** Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137: 663-670.
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2002)** Increased level of hemoglobin1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 99(26):17197-17202.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987)** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 61:866-879.
- Illés P, Schlicht M, Pavlovkin J, Lichtscheidi I, Baluška F, Ovečka M. (2006)** Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production. *J Exp Bot* 57: 4201-4213.
- Janas K.M., Zielińska-Tomaszewska J., Rybaczek D., Maszewski J., Psmyk M.M., Amarowicz R., Kosińska A. (2010)** The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings *J of Plant Phys* 167: 270-276.
- Jeandroz S, Lamotte O, Astier J, Rasul S, Trapet P, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francis V, Ma W, Berkowitz GA, Wendehenne D (2013)** There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. *Plant Phys* 163:459-470.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987)** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jiang W, Liu D, Li H (2000)** Effects of Cu^{2+} on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci Total Environ* 256:59-65.
- Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI (2010)** What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.* 428: 183–190
- Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011)** Reactive oxygen species in plants: their generation signal transduction, and scavenging mechanisms. (*AJCS*) *Australian J of Crop Sci* 5(6):709-725.
- Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA (1996)** 'NONOates' (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology* 268:281-293.
- Kepinski S, Leyser O (2005)** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor *Nature* 435:446-451.
- Klepper LA (1979)** Effects of certain herbicides and their combinations on nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiol.* 64:273-275 doi:10.1104/pp.64.2.273.
- Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L (2008 a)** Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordial. *J Plant Physiol* 165:967-975.

- Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L (2008 b)** Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generations are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum* L. *Physiol Plant* 133:406-416.
- Kolbert Zs, Ortega L, Erdei L (2010)** Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *J Plant Physiol* 167:77-80.
- Kollmeier M, Felle HH, Horst WJ (2000)** Genotypical differences in aluminium resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminium? *Plant Physiol* 122:945–956.
- 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.
- Kopyra M, Gwózdź EA (2003)** Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* 41:1011-1017.
- Koshland DE (1992)** The molecule of the year. *Science* 258: 1861.
- Kovács I, Lindermayr C (2013)** Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *frontiers in Plant Science* 4:137 doi: 10.3389/fpls.2013.00137.
- Krishnamurthy A, Rathinasabapathi B (2013)** Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* *Plant, Cell and Environment* 1-12.
- Kumar D, Klessig DF (2000)** Differential induction of tobacco MAP Kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(3):347-351.
- Láng F (2002)** Növényélettan, A növényi anyagcsere 1. A növények ásványos táplálkozása 119-175.
- 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.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2005)** Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress *Plant Science* 169(2): 323–330.
- 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*. *The Plant Cell* 20: 786-802.
- Lehotai N, Kolbert Zs, Pető A, Feigl G, Ördög A, Kumar D, Tari I, Erdei L (2012)** Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J Exp Bot* 63:5677–5687.

- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M (2009)** NO signals in the haze Nitric oxide signalling in plant defence *Current Opinion in Plant Biology* 12:451-458.
- 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, Haramaty E (1996)** The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J Plant Physiol* 148:258-263.
- Lidon FC, Henriques FS (1993)** Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. *J Plant Nutr* 16:1449-1464.
- Lilley JL, Gee CW, Sairanen I, Ljung K, és Nemhauser JL (2012)** An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation *Plant Physiol.* 160: 2261-2270.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005)** Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137:921-930.
- Liu W-Z, Kong D-D, Gu X-X, Gao H-B, Wang J-Z, Xia M, Gao Q, Tian L-L, Xu Z-H, Bao F, Hu Y, Ye N-S, Pei Z-M, He Y-K (2013)** Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *PNAS* 110 (4): 1548-1553.
- Ljung K (2013)** Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943-950.
- Lombardi L, Sebastiani L (2005)** Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci* 168: 797-802.
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco J, Lamattina L (2006)** Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1:28-33.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004)** Myo-inositol 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 *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:891-903.
- Lozano-Juste, J, Colom-Moreno R, León J. (2011)** *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62. 3501-3517.
- Maksymiec W (2007)** Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant* 29:177-187.
- Maksymiec W, Baszyński T (1998)** The effect of Ca^{2+} on photosynthetic activity and assimilate distribution in Cu^{2+} stressed bean plants. In: Garab G (ed) *Photosynthesis: mechanisms and effects*, Kluwer, Dordrecht, pp 2669-2672.
- Malamy JE, Benfey PN (1997)** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.

- Marschner H (1995)** Mineral nutrition of higher plants. *London, UK: Academic Press.*
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayasi K, Kamiya Y, és Kasahara H (2011)** The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *PNAS* 108 (45) 18512-18517.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004)** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Sci* 9(10): 490-498.
- Mockaitis K, Estelle M (2008)** Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008. 24:55–80.
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I (2006)** Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci* 171:34–40.
- Molassiotis A, Fotopoulos V (2011)** Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* 6:210-214.
- Molnár B (1984)** A Föld és az élet fejlődése. Nemzeti Tankönyv kiadó, Bp.
- Mulaudzi T, Ludidi N, Ruzvidzo O, Morse M, Hendricks N, Iwuoha E, Gehring C (2011)** Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity *in vitro*. *FEBS Lett.*, 585, 2693–2697.
- 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.
- Mur LAJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2013)** Striking a balance: does nitrate uptake and metabolism regulate both NO generation and scavenging? *frontiers in Plant Science* 4:288 doi: 10.3389/fpls.2013.00288.
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2012)** Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS* 5, pls052. doi:10.1093/aobpla/pls052.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Murgia I, Delledonne M, Soave C (2002)** Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 30: 521-528.
- Murphy A, Taiz L (1995)** A new vertical mesh transfer technique for metal-tolerance studies in *Arabidopsis* ecotypic variation and copper-sensitive mutants. *Plant Physiol* 108:29-38.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM, (2010)** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review *Environ Chem Lett* 8:199-216.

- 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.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT, (2002)** Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants, *J. Exp. Bot.* 53 1237-1247.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003)** Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159: 11–35. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x.
- Normanly J (2010)** Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1-17 doi: 10.1101/cshperspect.a001594.
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T és Ljung K (2012)** Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome *Plant J.* 72: 523-536.
- Oliveira HC, Saviani EE, Oliveira JFP, Salgado I (2010)** Nitrate reductase-dependent nitric oxide synthesis in the defence response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Tropical Plant Path* 35:104-107.
- Olmos E, Kiddle G, Pellny TK, Kumar S, Foyer CH (2006)** Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57(8): 1645–1655.
- 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.
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A (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, 849–860. doi:10.1111/j.1365- 313X.2005.02494.x.
- Overvoorde P, Fukaki H és Beeckman T (2010)** Auxin Control of Root Development *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1-16. doi: 10.1101/cshperspect.a001537.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003)** Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132:1241-1248.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004)** Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135:279-286.
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. (2002)** Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Phys* 129: 954-956.
- París R, Iglesias MJ, Terrile MC, Casalongué CA (2013)** Functions of S-nitrosylation in plant hormone networks. *frontiers in Plant Science*.4:294.

- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK (2005)** Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ Exp Bot* 53:299-314.
- Pastori GM, Foyer CH (2002)** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Phys* 129: 460-498.
- Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H, és Murphy AS (2011)** Seven things we think we know about auxin transport *Molecular Plant* 4(3):487-504.
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier A, Sonoda M, Lamb C, Delledone M (2004)** Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell*. 16:2785-2794. Doi:10.1105/tpc.104.025379.
- Petrov VD, Van Breusegem F (2012)** Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014.
- Phang IC, Leung DWM, Taylor HH, Burritt DJ (2011)** The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxic Environ Safety* 74:1310-1315.
- Pilon-Smits E, Pilon M (2002)** Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Rev Plant Sci* 21:439-456.
- 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.
- Potters G, Horemans N, Jansen MAK (2010)** The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. *Plant Physiol Biochem* 48:292-300.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK (2009)** Different stresses, similar morphogenetic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ* 32:158-169.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007)** Stress-induced morphogenetic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12(3):98-105.
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA (2004)** Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- Qiao W, Li C, Fan L-M (2014)** Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environ and Exp Bot* 100:84– 93.
- Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li HY (2008)** Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of reactive oxygen species network. *J Integ Plant Biol* 50:2-18.
- Ravet K, Pilon M. (2013)** Copper and Iron Homeostasis in Plants: The Challenges of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* DOI: 10.1089/ars.2012.5084.

- Reichman SM (2002)** The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals & Energy Environment foundation, pp22.
- Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. (2010)** Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *A. thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology* 37: 532–544.
- 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.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2006)** Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell and Environ* 29: 1532-1544.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM (2013)** Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *frontiers in Plant Science* 4:373 doi: 10.3389/fpls.2013.00373.
- Rosquete MR, Barbez E, Kleine-Vehn J (2012)** Cellular Auxin Homeostasis: Gatekeeping is Housekeeping. *Molecular Plant* 5: (4) 772-786.
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ (2011)** Propidium Iodide Competes with Ca^{2+} to Label Pectin in Pollen Tubes and Arabidopsis Root Hairs *Plant Phys*, 157: 175–187.
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC (2007)** S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol* 143:1282-1292.
- 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 Phytologist* doi: 10.1111/nph.12276.
- Saito R, Yamamoto H, Makino A, Sugimoto T, Miyake C (2011)** Methylglyoxal functions as Hill oxidant and stimulates the photoreduction of O_2 at photosystem I: a symptom of plant diabetes. *Plant, Cell & Environment* 34:1454-1464.
- Saldago I, Martínez MC, Oliveira C, Frungillo L (2013)** Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Braz. J. Bot.* 36(2):89-98.
- Sancenon V., Puig S., Mira H., Thiele D.J., Peñarrubia L. (2003)** Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana* *Plant Molecular Biology* 51:577-587.
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, C. Romero-Puertas M, A. del Río L (2008)** Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide *in vivo* in plant tissues *Methods Enzymol* 440: 397-409.

- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M. (2008)** Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J Integ Plant Biol* 50: 231-243.
- Sarma H (2011)** Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology *J of Env Sci and Tech* 4 (2):118-138.
- Saxena I, Shekhawat GS. (2013)** Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration *Nitric Oxide* 32:13-20.
- Scherer GFE (2011)** Auxin-binding-protein1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *Journal of Experimental Botany* 62 (10):3339–3357.
- Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T (2003)** Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species *The Journal of Biol Chem* 278(5):3170-3175.
- 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: M. Ashraf *et al.*, eds. *Plant Adapt Phytorem* doi:10.1007/978-90-481-9370-7_11.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012)** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions *J of Botany* Article ID 217037 p26 doi:10.1155/2012/217037.
- Smirnoff N (2000)** Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:1455-1464.
- Stefanovits P, Filep Gy, Fülek Gy (1999)** Talajtan, Növényi tápanyagok a talajban 191-220.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yin J, Benvente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens A és Alonso JM (2008)** TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development *Cell* 133: 177-191.
- 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.
- Taiz L, Zeiger E (2010)** Plant Physiology Fifth edition, Sunderland, Massachusetts.
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2004)** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431–R444, 10.1152/ajpregu.00361.2003.
- Terrile MC, Paris R, Calderón-Villalobos LIA, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalagué CA (2012)** Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor *The Plant Journal* 70:492-500.
- Tewari RK, Hahn E-J, Paek K-Y (2008)** Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 27:171–181.

- Tian Q-Y, Sun D-H, Zhao M-G, Zhang W-H. (2007)** Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytol* 174: 322-331.
- Tossi V, Cassia R, Lamattina L (2009)** Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves *J. Plant Physiology* 166:1336-1341.
- 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. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Vaňková R, Kuncová G, Opatrná J, Sussenbeková H, Gaudinová A, Vaněk T (2001)** Two-dimensional fluorescence spectroscopy – new tool for the determination of plant cell viability *Plant Cell Rep* 20:41-47.
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002)** Signal transduction during oxidativ stress. *J of Exp Bot* 53(372):1227-1236.
- Wang H-H, Huang J-J, Bi Y-R. (2010)** Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Sci* 179: 281-288.
- Wang L, Yang L, Yang F, Li X, Song Y, Wang X, Hu X (2010)** Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. *J Plant Physiol* 167:1298-1306.
- Wang SH, Yang ZM, Yang H, Lu B, Li SQ, Lu YP (2004)** Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:203-212.
- Wang Y, Li K, Li X (2009)** Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 166:1637-1645.
- 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, polyamineoxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *PlantSci.* 181:593–603. doi:10.1016/j.plantsci.2011. 04.002.
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C (2003)** Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* 278:47644–47653.
- Wodala B (2009)** A nitrogén-monoxid hatása borsólevelek fotoszintetikus elektrontranszportjára. Doktori (Ph.D.) értekezés.
- 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.
- Xiong J, Fu G, Yang Y, Zhu C, Tao L (2012)** Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research? *J Exp Bot* 63:1 33-41.

- Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q. (2010)** Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant Soil* 326: 321-330.
- Xu L, Yin H, Liu X, Li X (2009)** Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. *Planta* 231:449-459.
- Xu YC, Zhao BL (2003)** The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiol Biochem* 41:833-838.
- Yamasaki H, Itoh RD, Bouchard JN, Dghim AA, Hossain KK, Gurung S, Cohen MF (2011)** Nitric oxide synthase-like activities in plants. *Annual Plant Reviews* 42: 103-125.
- Yruela I (2005)** Copper in plants *Braz. J.Plant Physiol.*, 17(1):145-156
- Yruela I (2009)** Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36:409-430.
- Yu CC, Hung KT, Kao CH (2005)** Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induces NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *J Plant Physiol* 162:1319-1330.
- Yuan HM, Xu HH, Liu WC, Lu YT (2013)** Copper regulates primary root elongation through PIN1-mediated auxin redistribution *Plant Cell Physiol.* 54(5):766-78.
- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ (2011)** S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478:264–268.
- Zazimalová E, Murphy AS, Haibing Y, Hoyerová K, és Hosek P (2010)** Auxin Transproters-Why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1-14. doi: 10.1101/cshperspect.a001552.
- Zhang LP, Mehta SK, Liu ZP, Yang ZM. (2008)** Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 49: 411-419.
- Zhao C-R, Ikka T, Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D, Koyama H (2009)** Comparative transcriptomic characterization of aluminium, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 9:32.
- 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 MG, Zhao X, Wu YX, Zhang LX (2007)** Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. *Journal of Plant Physiology* 164:737-745.
- Zhao Y (2010)** Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61:49–64.
- Zhao Y (2012)** Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants *Molecular Plant* 5(2):334-338.

9. Publikációs lista

Tudományos közlemények

(*A csillaggal jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a PhD értekezéshez)

1. Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Kolbert Zsuzsanna, Erdei László. *In vivo* and *in situ* visualization of early signaling events induced by heavy metals in pea root meristem *Acta Physiologiae Plantarum* 33:(6) pp. 2199-2207. 2011 **IF: 1,639**
2. ***Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Jorge Lozano-Juste, José León, Tari Irma, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna. Involvement of nitric oxide (NO) in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings *Annals of Botany* 108:449-457, 2011 **IF: 4,030**
3. Szöllősi Réka, Kálmán Erika, Medvegy Anna, **Pető Andrea**, Varga Sz. Ilona Studies on oxidative stress caused by Cu and Zn excess in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) *Acta Biologica Szegediensis* p175-178 Vol 55, Number 1, 2011
4. Szepesi Ágnes, Gémes Katalin, Orosz Gábor, **Pető Andrea**, Takács Zoltán, Vorák Mária, Tari Irma Interaction between salicylic acid and polyamines and their possible roles in tomato hardening processes *Acta Biologica Szegediensis* p165-166 Vol 55, Number 1, 2011
5. Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings *Acta Biologica Szegediensis* p105-107 Vol 55, Number 1, 2011
6. Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Szöllősi Réka, Erdei László, Tari Irma Nitric oxide (NO) generation during vegetative/generative transition of the apical meristem in wheat *Acta Biologica Szegediensis* p95-97 Vol 55, Number 1, 2011
7. *Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Feigl Gábor, Ördög Attila, Erdei László *In vivo* and *in vitro* study of fluorophore- specificity *Acta Biologica Szegediensis* p37-41 Vol 56, Number 1, 2012
8. Lehotai Nóra, Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Feigl Gábor, Ördög Attila, Devanand Kumar, Tari Irma, Erdei László Selenite-Induced Hormonal and

Signalling Mechanisms during Root Growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Exp. Bot.* 63:(15) 5677-5687, 2012 **IF: 5,364**

9. ***Kolbert Zsuzsanna, Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Feigl Gábor, Erdei László Long-term copper (Cu^{2+}) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Growth Regulation* 68:151-159, 2012 **IF: 1,670**
10. ***Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Feigl Gábor, Tugyi Nóra, Ördög Attila, Gémes Katalin, Tari Irma, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis* *Plant Cell Reports* 32:1913-1923, 2013 **IF: 2,509**

Előadások

1. **Pető Andrea** Results in Activity Package 0. Part I. Hungary-Romania Cross-Border Co-operation Programme 2007-2013 HURO/0901/147/2.2.2. Szeged, 2-3 February, 2011
2. **Pető Andrea** Preliminary results concerning the element content of *Fusarium*-infected wheat genotypes Timisoara, 30-31 May, 2011
3. **Pető Andrea**, Krastinyté Viktorija, Kisielyté Neringa, Popescu Sorina, Mesterházy Ákos, Csiszár Jolán, Erdei László Changes in element composition in *Fusarium*-infected wheat genotypes Szeged, 15-16 May, 2012 Hungary-Romania Cross-Border Co-operation Programme 2007-2013 HURO/0901/147/2.2.2.
4. Erdei László, Vashegyi Ágnes, **Pető Andrea** Macroelement concentrations in *Fusarium*-infected maize genotypes HURO/0901/1472.2.2 Szeged-Timişoara axis for the safe food and feed SZETISA1 Book of Final Report p21
5. Kolbert Zsuzsanna, Ördög Attila, **Pető Andrea**, Vashegyi Ágnes, Erdei László Analysis of essential and non-essential elements in *Fusarium*-treated wheat and maize cultivars by ICP-MS HURO/0901/1472.2.2 Szeged-Timişoara axis for the safe food and feed SZETISA1 Book of Final Report p29

Konferencia előadások

1. Erdei László, **Pető Andrea** Food chain safety and phytoremediation. 15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, 26-30 June, 2010 Budapest, Magyarország p65
2. **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Kolbert Zsuzsanna, Erdei László The effect of heavy-metal-induced reactive oxygen- (ROS) and nitrogen species (RNS) generations on cell viability of pea roots. 2010. július 15-16. 3rd Plant NO Club International Meeting, Palacky University in Olomouc, Olmütz, Csehország p27
3. Erdei László, **Pető Andrea**, Kolbert Zsuzsanna (2010) Phytoremediation and food chain safety 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, 13-15 October, 2010 Szeged, Magyarország p25
4. **Pető Andrea** Réz indukált hajtás- és gyökérmorfológiai válaszok vizsgálata lúdfű növényekben Magyar Növénybiológiai Társaság Fiatal Növénybiológusok előadássorozata, 2011. január 17. Szeged SZBK
5. Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Erdei László A nitrogén-monoxid (NO), mint a nehézfém-indukált morfológiai válaszok regulátora Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa Szeged, 2011. augusztus 31-szeptember 2.
6. **Pető Andrea** A reaktív oxigén- és nitrogénformák, valamint az auxin kapcsolatának vizsgálata lúdfű növényeken rézkezelés hatására Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia Szeged, 2012. május 21-22.
7. Feigl Gábor, Devanand Kumar, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Szepesi Ágnes, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Studying the effect of copper in Brassica juncea and Brassica napus root tips: metabolism of reactive oxygen and nitrogen species and morphological adaptation. 7th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference, 12-15 September, 2012 Laulasmaa, Estonia
8. Feigl Gábor, Devanand Kumar, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Ördög Attila, Árpád Molnár, Kolbert Zsuzsanna, Erdei László The effect of zinc on the microelement homeostasis and the metabolism of reactive signal molecules in Brassica juncea and Brassica napus. Third Annual Workshop of COST Action FA 0905 – Mineral

improved crop production for healthy food and feed, 23-26 October, 2012 Lisbon, Portugal

9. **Pető Andrea** A nitrogén-monoxid (NO) réz stressz során játszott szerepe és a reaktív oxigénformákkal (ROF) való kapcsolata Magyar Növénybiológiai Társaság Fiatal Növénybiológusok Előadássorozata 2013. január 25. Szeged SZBK

Konferencia posztterek

1. **Pető Andrea**, Farsang Andrea, Erdei László Biológiai indikátorok a városi szennyezettség vizsgálatában: A Taraxacum officinale Weber ex Wiggers levelének nehézfém tartalom vizsgálata Szegeden 8. Magyar Ökológus Kongresszus (MOK) 2009. augusztus 26-28, Szeged, Hungary p181
2. **Kolbert Zsuzsanna, Pető Andrea**, Erdei László. In vivo imaging of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) during copper-induced root morphological responses in Arabidopsis. 3rd International Plant NO Club, 15-16 July, 2010. Olmütz, Csehország p33
3. **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Metal content and nitric oxide (NO) production in the roots of heavy metal-treated pea plants. 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research (ISIRR), 13-15 October, 2010 Szeged, Hungary p105
4. **Szőllősi Réka**, Kálmán Erika, Varga Sz. Ilona, Medvegy Anna, **Pető Andrea**, Erdei László (2010) The influence of copper excess on early development, lipid peroxidation and antioxidative system in germinating indian mustard (Brassica Juncea L.) seeds. 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, 13-15 October, 2010, Szeged, Magyarország p107
5. **Lehotai Nóra, Pető Andrea**, Feigl Gábor, Devanand Kumar, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Early responses in root meristem of Pisum sativum and Arabidopsis thaliana induced by copper and selenium Second Annual Conference and MC Meeting COST Action FA 0905, Mineral Improved Crop Production for Healthy Food and Feed. 23-26 November 2011, Venice, Italy.
6. **Lehotai Nóra, Pető Andrea**, Weisz Máté, Kolbert Zsuzsanna, Erdei László The effect of long-term copper (Cu^{2+}) exposure on reactive nitrogen- and oxygen

- species generation in two pea cultivars 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 5-8 July 2011, Budapest, Hungary
7. Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Erdei László Nitric oxide as negative regulator of auxin during copper induced morphological responses 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. 5-8 July 2011, Budapest, Hungary
 8. Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings Societas Biologiae Plantarum 10th Congress. 31 August-2 September 2011, Szeged-Hungary
 9. Erdei László, **Pető Andrea**, Krastinyté Viktorija, Kisielyté Neringa, Popescu Sorina, Csiszár Jolán Changes in element composition in Fusarium–infected wheat genotypes Second Annual Conference and MC Meeting Cost Action FA 0905; 23-26 November 2011, Venice, Italy
 10. Kolbert Zsuzsanna, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Tari Irma, Erdei László Endogenous reactive oxygen species (ROS) status and cell death in nitric oxide (NO) mutants under copper excess XXIV SPPS Congress. 21-25 August 2011, Stavanger, Norway.
 11. Kolbert Zsuzsanna, Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Feigl Gábor, Devanand Kumar, Erdei László Selenium-Induced Growth Responses and Their Hormonal Background. International Conference Plant Growth, Nutrition & Environment Interactions, 18-21 February 2012, Wien, Austria
 12. Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Feigl Gábor, Devanand Kumar, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Study of selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. by light- and fluorescence microscopy. 7th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference, 12-15 September 2012, Laulasmaa, Estonia
 13. Brunner Szilvia, Vashegyi Ágnes, **Pető Andrea**, Mesterházy Ákos, Erdei László Effects of Fusarium strains of different aggressivity on macroelement composition in kernels of maize Enhanced Nutritional Value of Plant-Derived Food or Feed 23-26 October 2012, Lisboa, Portugal

14. Kolbert Zsuzsanna, Lehotai Nóra, **Pető Andrea**, Feigl Gábor, Tugyi Nóra, Erdei László Cytokinin overproducing *ipt-161 Arabidopsis* shows altered NO generation and insensitivity to selenite BIOTECHNOLOGIA 94:(2) p. 238. 2013, Varsó, Lengyelország
15. Lehotai Nóra, Feigl Gábor, Koós Ágnes, **Pető Andrea**, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna Relationship between cytokinin and nitric oxide in selenium-treated *Arabidopsis* plants 1. Biomedica Minikonferencia: Kutatások az SZTE Biológus Tanszékein. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2013.12.13. Szeged: JATE Press, 2013. p. 51.
16. Feigl Gábor, **Pető Andrea**, Lehotai Nóra, Molnár Árpád, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna A réz és cink hatásának összehasonlítása Brassica Juncea és Brassica Napus gyökerekben: mikroelem homeosztázis, reaktív jelmolekulák metabolizmusa és morfológiai adaptáció. 1. Biomedica Minikonferencia: Kutatások az SZTE Biológus Tanszékein. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2013.12.13.

Egyéb kiadvány

1. **Pető Andrea**, Krastinyté Viktorija, Kisielyté Neringa, Popescu Sorina, Mesterházy Ákos, Csiszár Jolán, Erdei László Changes in element composition in *Fusarium*-infected wheat genotypes HURO/0901/1472.2.2 Szeged-Timişoara axis for the safe food and feed SZETISA1 Book of Final Report p10 2012

Ösztöndíj

Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj a Konvergencia Régióban

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőm *Prof. Dr. Erdei László Tanár Úrnak* a lehetőséget, hogy a Növénybiológiai Tanszéken kezdhettem el PhD munkámat és csatlakozhattam munkacsoportjához. Köszönöm a kezdetektől nyújtott támogatását, nélkülözhetetlen tanácsait, melyek végig kísérték az elmúlt éveket. Köszönöm a bizalmát, hogy bármikor segítségemre volt, és bátran fordulhattam hozzá. Köszönöm a doktori disszertáció elkészítése során nyújtott minden segítségét.

Köszönettel tartozom témavezetőm *Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának*, aki bevezetett „a NO világába”, emellett lendületes és dinamikus hozzáállásával kísérte végig PhD-s éveimet. Köszönöm a bizalmat, a támogatást és megértést, valamint a kutatás, eredmények publikálása és e doktori disszertáció mögött húzódó rengeteg segítséget.

Szeretném megköszönni tanszékvezetőnknek, *Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanárnőnek* a lehetőségeket, kedvességét, amiket munkám befejezéséhez kaptam. Köszönöm *Mainé Dr. Csiszár Jolánnak*, hogy helyet biztosított pályázatában, ezáltal támogatta munkám befejezését.

Köszönöm munkacsoportunk tagjainak, *Lehotai Nórának és Feigl Gábornak* minden segítségét, egymás támogatását, lelkesítését. Köszönöm szakdolgozóinknak a kísérletek kivitelezése során nyújtott segítséget.

Köszönöm *Ádámné Meszlényi Máriának, Hegyesiné Tandari Máriának, Kapásné Török Évának, Kispálné Szabó Ibolyának és Porkoláb Erzsébetnek* a hasznos tanácsokat és a vidám hangulatot a laboratóriumokban.

Meg szeretném köszönni a *PhD szoba* minden *egykori és jelenlegi lelkes dolgozóinak, barátaimnak* a kellemes légkört, a támogatást és segítséget, amiket az elmúlt évek során kaptam.

Köszönöm a Növénybiológiai Tanszék egykori és jelenlegi *munkatársának* minden segítségét.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatáshoz az infrastruktúra támogatásával az OTKA PD100504 pályázat járult hozzá.

11. Összefoglalás

A növényeket a környezetükben számos stresszhatás érheti, mint például a talajban felhalmozódó nehézfémek (NF) okozta stressz. A fémek elsődleges támadási pontja a gyökér, hiszen itt találkozik a növény először a fémmel. Ezért a NF-indukált morfogenetikai válasz fenotípus elsősorban a gyökérrendszerben jelenik meg. Tehát a növények képesek a nem megfelelő környezeti feltételekre a szerveik növekedésének átrendezésével reagálni, amit **stressz-indukált morfológiai válasznak** (SIMV) nevezünk.

Irodalomból ismert az auxin és a ROF-k fontos szerepe a NF-indukált SIMV jelátvitelében, és mivel a nitrogén-monoxid (NO), mint multifunkcionális szignál számos gyökérfejlődési folyamatot szabályoz és szorosan együttműködik az auxinnal és a reaktív oxigénformákkal is, feltételezhetjük, hogy a NO, mint fejlődés szabályozó molekula szintén szerepel a Cu által kiváltott stressz indukált morfológiai válaszban. A Ph.D. munkám során ennek a hipotézisnek a tesztelésére vállalkoztam. Kísérleteink fókuszpontjában a NO molekula állt. Vizsgáltuk képződését, szignáltranszdukciós útvonalban betöltött szerepét és más reaktív molekulákkal (ROF) való kapcsolatát réz terhelés (5, 25, 50 μM) hatására megjelenő morfológiai válasz során vad típusú és mutáns (*nox1*, *gsnor1-3*, *nia1nia2*, *nia1nia2noa1-2*, *vtc2-1*, *vtc2-3*, *miox4*) valamint DR5::GUS transzgenikus *Arabidopsis* növényekben. Kísérleteink kivitelezéséhez morfológiai méréseket, hisztokémiai festést, elemanalízist, fluoreszcens spektrofotométeres és fluoreszcens mikroszkópiás módszert alkalmaztunk.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az idő függvényében (rövid és hosszabb távú kísérletek) hogyan alakul a réz-indukált morfológiai válasz, hajtásra és gyökérre nézve?
- Van-e szerepe az auxinnak és a nitrogén-monoxidnak a réz-indukált morfológiai változások jelátvitelében?
- Milyen jellegű kölcsönhatás működik az auxin és a NO között réz stressz alatt?
- Milyen mechanizmusokkal magyarázhatóak a réz hatására a NO metabolizmusban bekövetkező változások?
- Milyen kapcsolat áll fenn a NO és a ROF-k között a réz tolerancia mechanizmusában, illetve hogyan vesznek részt a ROF-ok a stressz indukált morfológiai válasz kialakulásában?

Vizsgálataink során a következő eredményeket kaptuk:

Vad típusú növényeket felhasználva meghatároztuk a hajtás és gyökérrendszer mikroelem koncentrációit (Cu, Fe, Zn, Mn, Mo, B) és azok szöveti eloszlását agaron nőtt lúdfüvekben. Az eredmények alapján elmondható, hogy a csíranövények képesek felvenni és akkumulálni a táptalajban levő réz egy részét és elszállítani azt a hajtásrendszerükbe. A réz kitettség jelentősen módosítja a csíranövények mikroelem homeosztázisát és a vizsgált mikroelemek hajtás-gyökér eloszlását.

A réz kitettség gyökér- és hajtásfejlődésre gyakorolt hatásait a kezelési időtartam függvényében, 7 és 17 napos *Arabidopsis* növények felhasználásával határoztuk meg. A **rövidebb időtartamú** kísérleteinkben a legalacsonyabb (5 μM -os) rézkoncentráció kissé megnövelt sziklevél területet, hipokotil- és FGY hossznövekedést eredményezett, míg a komolyabb rézkitettség (50 μM) szignifikáns gátlást okozott a hajtás és gyökérfejlődésben az akkumulálódott réz miatt. **Hosszabb távon** (17 nap) a réz által kiváltott erőteljes hajtásnövekedés gátlás, valamint a gyökérmegnyúlás gátlásának elmaradása figyelhető meg, mely egy akklimatizációs folyamat aktiválódását sugallja hosszabb időtartamú réz kitettség esetén. Az oldalgyökér iniciációt lehetővé tevő sejtosztódás rézkitettségre érzékenynek bizonyult. A 25 μM rézkezelt növények gyökérrendszerében a SIMV tünetei voltak láthatóak. A SIMV kialakulása függ a rézkezelés koncentrációjától és időtartamától, hiszen csak hosszabb időtartamú, közepes erősségű (25 μM) stressz váltotta ki a megjelenését.

A hormonok metabolizmusának és transzportjának megváltozása nagyon fontos szerepet játszik a NF-k által előidézett fejlődési válaszokban. Mivel a fejlődési folyamatok főleg olyan morfogének által vezéreltek, mint például az auxin, ezért vizsgáltuk *in vivo* az auxin indukálható DR5 promóter expresszióját a DR5::GUS transzgenikus *Arabidopsis*-okban. A **rövidebb időtartamú** réz kezelés esetén a kontrollhoz képest fokozottabb auxin-függő génexpressziót tapasztaltunk a csíranövények szikleveleiben és gyökerében is. **Hosszabb távon** (17 nap), a réz más környezeti stresszfaktorokhoz (pl. só, Cd) hasonlóan a DR5 expresszió csökkenését váltja ki az *Arabidopsis* levelekben.

A nitrogén-monoxid, mint az auxin jelátvitel alapvető komponense, különböző fejlődési folyamatokat szabályoz a növényekben. A **rövid távú** kísérleteink során megállapítottuk, hogy Cu hatásaként a NO szintekben is történnek változások mindkét szervben. Sziklevelekben az 5 μM Cu okozott jelentős NO akkumulációt, míg a nagyobb

mértékű NF terhelés lecsökkentette az NO tartalmat. Kontroll körülmények között a NO-kapcsolt fluoreszcencia jelentős szöveti specifikitást mutat a FGY-ekben, mivel sokkal magasabb NO szintek detektálhatók az EZ-ban az MZ-hez viszonyítva. A FGY EZ-ban a réz kezelés lényeges NO csökkenést okozott, míg a MZ NO tartalmát nem befolyásolta. A NO szintekben bekövetkező változások lehetséges mechanizmusait genetikai és biokémiai módszerekkel megvizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy a sziklevelekben az L-arginin és NR-függő bioszintetikus útvonal is felelős lehet a réz indukálta NO akkumulációért.

A gyökér megnyúlási zónájának NO tartalom csökkenése kapcsán azt feltételeztük, hogy a Cu-indukált O_2^- eliminálja a NO-t a peroxinitrit képződését eredményező reakción keresztül. Eredményeink viszont nem támasztják alá ezt a hipotézis. A réz-indukált NO szint csökkenés háttérmechanizmusa feltehetően egyik vagy mindkét NO bioszintetikus útvonal (L-arginin-és/vagy nitrát függő) alulszabályozottsága lehet. **A hosszabb időtartamú** Cu kitettség (17 napig tartó), jelentős növekedést eredményezett a NO tartalmat tekintve. A NF terhelés koncentrációja mellett a kezelés időtartama is befolyásolja annak NO képződésre gyakorolt hatását.

Gyökerekben a NO fő enzimátikus forrása a NR, és ez az enzim termeli a NO-t stressz körülmények között. Emiatt megvizsgáltuk genetikai módszert felhasználva ezen enzim lehetséges részvételét a réz-indukált NO felszabadulás kapcsán. A vad típussal ellentétben a NR-deficiens dupla mutáns, *nialnia2* FGY-ében nem figyelhettük meg a réz okozta NO produkciót, ami a NR réz-indukált NO szintézisben betöltött alapvető szerepére utal.

További kísérleteinkkel célunk volt feltárni a hormonális (auxin) és szignalizációs komponensek (NO) közötti kapcsolatot a réz-indukált morfológiai válaszok jelátvitelében. **Rövid távú** kísérleteinkben elsőként az auxin NO szintekre gyakorolt hatását tanulmányoztuk NPA alkalmazásával a réz kezeléseket mellett és mindkét szervben kimutattuk a NO szinteket. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az auxin transzport szükséges az 5 μ M réz által kiváltott NO akkumulációhoz sziklevelekben, vagyis az auxin pozitívan szabályozza az NO szintézisét enyhe rézkitettség mellett. Ellenben a magasabb Cu koncentrációk esetében az auxin hiánya okozott NO szint növekedést. Azok a növények, amelyekben a NPA lecsökkentette az auxin szintet, szignifikánsan magasabb NO fluoreszcenciát mutattak a gyökérben, összehasonlítva azokkal a növényekkel, amelyeket csak rézzel kezeltünk. Ez azt sugallja, hogy az auxin negatívan szabályozza a NO szintet a FGY-ben. Kísérleti rendszerünkben a külsőleg

hozzáadott indol-3-ecetsav (10^{-6} M) nem váltott ki NO képződést sem a sziklevekben sem a FGY-kben. A NO auxin-függő génexpresszióra gyakorolt hatását biokémiai úton is megvizsgáltuk. Amikor az endogén NO szinteket donor alkalmazásával növeltük, az auxin-érzékeny génexpresszió jelentősen lecsökkent a sziklevekben és a FGY-k csúcaiban egyaránt. Ez a réz-indukált morfológiai változások hormonális (auxin) és jelátviteli komponensei (NO) között fennálló gátló kapcsolatot feltételez. Ezen eredményeket genetikai vizsgálatokkal is alátámasztottuk, melyek során a Cu által okozott növekedési választ hasonlítottuk össze vad típusú, NO-túltermelő (*nox1*) és NO hiányos (*nialnia2* és *nialnia2noal-2*) csíranövényekben. A NO többlet esetén kisebb sziklevel méretek figyelhetők meg, a NO hiányos mutánsok pedig kissé nagyobb sziklevelekkel rendelkeznek a vad típushoz képest. Ráadásul a sziklevel méretének csökkenése NO többlet esetén kifejezett. Ellentétben ezzel, a hipokotil sejtek megnyúlása a NO hiányos mutánsokban nagyobb érzékenységet mutatott a vad típushoz képest, míg *nox1*-ben nem volt rézre adott morfológiai válasz. Azonban a *nox1* rövidebb hipokotillal rendelkezik, mint a vad típus. A FGY elongációt tekintve a mutánsok viselkedése nem egyértelmű. Kontroll feltételek mellett a NO-túltermelő és NO-hiányos növények FGY hossza rövidebb, mint a vad típusúaké. A rézkezelés nem okozott FGY rövidülést a *nox1* és a *nialnia2noal-2* mutánsban, habár egy erőteljes csökkenést eredményezett a NO-hiányos dupla mutáns FGY hosszában. A rézre adott különböző gyökér növekedési válaszok a NO-deficiens vonalak esetén azzal a hipotézissel magyarázhatóak, hogy egy kontrollhoz közeli NO státusz szükséges a gyökér architektúra szabályzásához. A NO tartalom optimális szinttől való eltérése a réz által előidézett gyökér morfológiai válasz gátlását eredményezi.

A további kísérleteink során a megváltozott NO anyagcserével rendelkező mutáns csíranövények (*nox1*, *gsnor1-3* és *nialnia2*) réz toleranciáját tanulmányoztuk. Ezek a növények kisebb hajtás és gyökér méreteket valamint friss tömeget (FT) mutattak a vad típushoz képest, ami egy optimális NO szint szükségességét feltételezi a megfelelő növekedéshez. A *vtc2-3* és *miox4* növények vad típus-szerű hajtás és gyökér méreteket mutattak kontroll feltételek mellett. Tehát a módosított aszkorbát tartalmak és az ebből következő enyhén megváltozott ROF szintek nem befolyásolják jelentős mértékben az *Arabidopsis*-ok korai fejlődését. Az általunk alkalmazott legalacsonyabb CuSO_4 koncentráció ($5 \mu\text{M}$) csak enyhe réz tartalombeli növekedést eredményezett ($\sim 80 \mu\text{g g}^{-1}$ SZT), és nem bizonyult toxikusnak a Col-0 csíranövények számára. Sőt, az $5 \mu\text{M}$ réz kezelésnek enyhe növekedésserkentő hatása volt (a FT-k nem-szignifikáns növekedése),

bár ehhez a hatáshoz a növényekben megemelkedett NO és ROF szintek voltak szükségesek. A NO hiányos növények esetén a réznek erőteljesebb növekedést gátló hatását figyeltük meg vad típushoz képest, mely a NO növekedés fenntartása során játszott szerepét tükrözi abiotikus stressz körülmények között.

Ezt követően megvizsgáltuk a gyökér MZ sejtjeinek életképességét, amiből a réz toleranciára következtettünk. Enyhe stressz során a magas NO szintek fokozták az érzékenységet, míg nagyobb réz koncentrációk esetén a toleranciát segítették elő. Ez azt jelenti, hogy a NO szignalizációs szerepe függ a stressz erősségétől. Kismértékű rézkitettség során a *nox1* növényekben a NO életképességre gyakorolt negatív hatása visszafordítható a magas NO tartalom eliminálásával. A *vtc2-1* és *vtc2-3* lúdfüvek esetén a sejtéletképesség lecsökkent a rézkitettség hatására, viszont a *miox4* gyökerek sejtjei életképesebbnak bizonyultak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a csökkent aszkorbát tartalom következtében kialakult magasabb ROF szint rézérzékenységhez vezet, míg az aszkorbinsav túlermelés eredményeképp létrejött kisebb ROF tartalom a réz toleranciának kedvez. A magasabb ROF szintek megzavarják a sejt redox állapotát, mely oxidatív károsodáshoz vezet. Ez valószínűsíthetően fokozza a réz érzékenységet.

Biokémiai kísérleteket végeztünk annak igazolására, hogy a NO részt vesz-e a réztolerancia kialakításában. Ezek során a növények NO szintjét exogén NO donor (SNP) és NO gyökfogó (cPTIO) alkalmazásával módosítottuk, és detektáltuk a vad típusú és NO mutáns növények életképességét a gyökér MZ-ban. Az eredmények alapján elmondható, hogy a NO javítja a réz okozta sejtkárosodásokat erős réz stressz esetén, mivel a NO-kezelt Col-0 növények jobb életképességet mutattak. A NO túlermelő mutáns nagyfokú réztűrése és a *nialnia2 Arabidopsis* fokozott érzékenysége szintén alátámasztja a NO stresszt enyhítő hatását. A réztűrés kialakulásához szigorúan szabályozott NO balansz szükséges, mivel az optimális szintnél kisebb vagy annál nagyobb NO tartalom sejtkárosodást idézhet elő.

Ezt követően a lehetséges kapcsolatot vizsgáltuk a NO és a ROF-k között réz stressz alatt mikroszkópos módszerrel. Magasabb NO szinthez csökkent $O_2^{\cdot-}$ szint társult a kontroll állapotú *Arabidopsis* gyökércsúcsokban, és ez fordítva is igaznak bizonyult, vagyis a csökkent NO tartalmat mutató *nialnia2* MZ-ban a vad típusnál magasabb $O_2^{\cdot-}$ szint volt mérhető. Ez arra utal, hogy stressz mentes körülmények között a NO képes negatívan szabályozni a $O_2^{\cdot-}$ szintjét, feltehetően a ONOO⁻ képződéséhez vezető kémiai reakció által vagy az antioxidánsok, mint például a szuperoxid dizmutáz (SOD)

aktivitásának módosításán keresztül. A Cu hatásaként a H_2O_2 szintek lecsökkentek NO többlet jelenlétében, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy a megemelkedett NO szint hatására az antioxidáns gének (pl. glutathion peroxidáz vagy a glutathion transzferáz) expressziója fokozódott, így valószínűleg ROF detoxifikáció történt. Továbbá, a NO hiány esetében, a O_2^- szint csökkenése H_2O_2 képződéssel járt együtt, ami lehetséges SOD-függő detoxifikációt feltételez. A megváltozott aszkorbát metabolizmus és ennél fogva a megváltozott ROF tartalom (a *vtc2-1*, *vtc2-3* és *miox4* mutánsok) a Col-0-nál alacsonyabb NO szintet eredményez, mely arra utal, hogy a ROF-k szigorúan szabályozott szintje hat a NO metabolizmusra stressz mentes körülmények között. A réz-indukált, nem szignifikáns változásokat figyelembe véve a ROF-k hatása a NO metabolizmusra réz stressz alatt elhanyagolhatónak mondható.

Munkánk során kapott eredményeinkből a következő főbb következtetések vonhatók le:

- A réz-indukált morfológiai válasz megjelenése az *Arabidopsis* növényekben függ a fémterhelés időtartamától és koncentrációjától. Hosszú távon az *Arabidopsis* réz stressz által kiváltott fejlődési indukciót (OGY szám gyarapodást) mutat.
- A rövid és a hosszabb időtartamú réz terhelés egyaránt megváltoztatja az auxin és a NO metabolizmusát. Rövid távon a réz többlet auxin szint növekedést, ugyanakkor NO szint csökkenést okoz a csíranövények gyökerében, míg hosszabb távon ezekkel ellentétes irányú változások történnek.
- A réz-indukált SIMV szignál transzdukciójában szereplő hormonális- és jelkomponens, azaz az auxin és a NO között kölcsönösen negatív kapcsolat áll fenn.
- Sziklevelekben a réz-indukált NO akkumulációért mindkét feltételezett enzimátikus NO bioszintézis útvonal (L-arginin- és NR-függő) felelős, míg a NO csökkenés a FGY-ben a peroxinitritről és szuperoxid gyökanion képződésétől függetlenül történik. Hosszabb távon a rézkezelt gyökerekben bekövetkező NO szintézisért a NR enzim aktivitása a felelős.
- A NO részt vesz a tolerancia kialakításában nagyobb mértékű réz terhelés esetén, azáltal, hogy szabályozza a szuperoxid gyökanion és a H_2O_2 réz stressz során történő képződését. A NO-dal ellentétben a ROF-k fokozzák a réz érzékenységet az *Arabidopsis* csíranövényekben.

12. Summary

Introduction

Plants are exposed to a number of stress factors in their environment, such as stress caused by accumulated heavy metals (HMs) in the soil. The primary point of attack of metals is the root, as this is where the plant first encounters the metal. That is why HM-induced morphogenetic response phenotype appears primarily in the root system. Consequently, plants are able to react to unfavourable environmental conditions by rearranging their organ development, which is called **stress-induced morphological response** (SIMR).

The important role of auxin and ROSs in heavy metal induced SIMR signal transduction is already known, and as NO, being a multifunctional signal, regulates a number of root developmental processes and acts closely together with auxin and reactive oxygen species, it can be assumed that NO as a development regulating molecule also appears in the stress-induced morphological response triggered by Cu. In my PhD work, I set out to test this hypothesis. Consequently, it was the NO molecule that was in the focal point of the experiments. Its generation, its role played in the signal transduction pathway and its relationship with other reactive molecules (ROS) were examined in the course of morphological responses appearing as a result of copper stress (5, 25, 50 μM) in wild-type and mutant (*nox1*, *gsnor1-3*, *nia1nia2*, *nia1nia2noa1-2*, *vtc2-1*, *vtc2-3*, *miox4*) and DR5::GUS transgenic *Arabidopsis*. For carrying out our experiments we applied morphological measurements, histochemical staining, element analysis, fluorescence spectrometer and fluorescence microscopy methods.

During our work, we were looking for the answers to the following questions:

- With relation to time (short and long term experiments), how does the copper-induced morphological response appear with respect to shoot and root?
- Do auxin and nitric oxide play a role in the signal transduction of copper-induced morphological responses?
- What kind of interactions appear between auxin and NO under copper stress?
- What mechanisms can explain the changes appearing in the NO metabolism due to the effect of copper?

- What relationship is there between NO and ROSs in the copper tolerance mechanism, and how do ROSs contribute to the appearance of stress-induced morphological responses?

Results

With the usage of wild-type plants, the microelement concentrations (Cu, Fe, Zn, Mn, Mo, B) of the shoot- and the root system and their tissue distribution were determined in case of *Arabidopsis* growing on agar. Based on the results, it can be stated that seedlings are capable of absorbing and accumulating part of the copper present in soil and transfer it to their shoot systems. Exposure to copper significantly modifies the microelement homeostasis of seedlings and the shoot-root distribution of the examined microelements.

The effect of copper exposure on root and shoot development was determined with relation to treatment time, using 7- and 17-day *Arabidopsis* plants. In the **shorter term** experiments, the lowest copper concentration (5 μ M) resulted in increased cotyledon area and increased hypocotyls and PR length, while higher copper exposure (50 μ M) caused significant inhibition on shoot and root development because of the accumulated copper. In the **longer term** (17 days), it was observed that copper-induced strong shoot growth inhibition and root elongation inhibition did not occur, which suggests the activation of the acclimatization process in the case of longer term copper exposure. Cell division enabling lateral root initiation proves to be sensitive to copper exposure. In the root systems of 25 μ M copper-treated plants, symptoms of SIMR were detected. The appearance of SIMR depends on the concentration and length of time of copper treatment, as it was only longer term, medium-strength (25 μ M) stress that generated its appearance.

The change in hormone metabolism and transport plays an essential role in HM-induced developmental responses. As developmental processes are mainly controlled by morphogenes like auxin, we examined *in vivo* the inducible DR5 promoter expression of auxin in DR5::GUS transgenic *Arabidopsis*. In case of **shorter term** copper treatment, compared to the control, a more intense auxin dependent gene expression was found in both the cotyledons and the root of seedlings. In the **longer term** (17 days), copper – similarly to other environmental stress factors (e.g. salt, Cd) – triggered the decrease of DR5 expression in *Arabidopsis* leaves.

Nitric oxide, as a basic component of auxin signal transduction, controls various developmental processes in plants. In our **shorter term** experiments, it was found that as a result of Cu, certain changes also took place in NO levels in both organs. In cotyledons, 5 μ M Cu caused significant NO accumulation, while the higher HM load decreased the NO content. In the control situation, the NO-specific fluorescence shows significant tissue specificity in PRs, as much higher NO levels can be detected in the EZ compared to the MZ. In the EZ of the PR, the copper treatment caused a significant NO decrease, while the NO content of the MZ was not affected. The possible mechanisms of changes happening in NO levels were examined with genetic and biochemical methods, and it was found that in cotyledons both the L-arginine and NR dependent biosynthetic pathways can be responsible for copper-induced NO accumulation.

Based on the NO content decrease in the elongation zone of the root, it was hypothesized that Cu-induced O_2^- eliminates NO through the peroxynitrite generating reaction. Our results, however, do not support this hypothesis. The background mechanism of the copper-induced NO level decrease is assumed to be the down-regulation of either or both biosynthetic pathways (L-arginine and/or nitrate dependent). The **longer term** Cu exposure (for 17 days) resulted in a significant growth regarding the NO content. Apart from the concentration of HM stress, the length of treatment also has an effect on NO generation.

In roots, the main enzymatic source of NO is NR, and this is the enzyme that produces NO under stress conditions. Therefore, the possible participation of this enzyme in copper-induced NO release was examined by genetic method. Contrary to the wild type, in the PR of the NR deficient double mutant *nialnia2*, copper-induced NO production could not be detected, which refers to the basic role that NR plays in copper-induced NO synthesis.

In our further studies, the objective was to explore the relationship between hormonal (auxin) and signal (NO) components in the signal transduction of copper-induced morphological responses. In the **short term** experiments, it was the effect of auxin on NO levels that was first studied with the application of NPA besides copper treatment and NO levels were detected in both organs. Based on the results, it was concluded that auxin transport is necessary for 5 μ M copper-induced NO accumulation in cotyledons, that is auxin controls the NO synthesis positively in case of low copper exposure. However, in

case of higher Cu concentration, it was the lack of auxin that caused NO level increase. Those plants in which NPA decreased the auxin level showed a significantly higher NO fluorescence in the root, compared to those plants that were only treated with copper. This suggests that auxin controls the NO level in the PR negatively. In our experiment, exogenous indol-3-acetic acid (10^{-6} M) induced NO generation neither in cotyledons, nor in the PR. The effect of NO on auxin-dependent gene expression was examined through biochemical methods as well. When the endogenous NO level was enhanced by donor application, auxin sensitive gene expression decreased significantly in cotyledons and PR tips alike. This implies an inhibitory link between the hormonal (auxin) and signal (NO) components of copper-induced morphological changes. These findings were confirmed with genetic examination as well, during which Cu-induced growth response was compared in wild-type, NO over-producer (*nox1*) and NO deficient (*nia1nia2* and *nia1nia2noa1-2*) seedlings. In case of NO excess, smaller cotyledon sizes can be measured, while NO deficient mutants have slightly bigger cotyledons compared to the wild type. What is more, the decrease in the size of cotyledons is more pronounced in case of NO excess. Contrary to this, the elongation of hypocotyl cells in NO deficient mutants shows greater sensitivity compared to wild type, while in *nox1*, there was no morphological response given to copper. However, *nox1* has shorter hypocotyl than the wild type. Regarding PR elongation, the behaviour of mutants is not obvious. Under control conditions, the PR length of NO over-producer and NO deficient plants is shorter than that of the wild type. Copper treatment did not induce PR shortening in the *nox1* and *nia1nia2noa1-2* mutants, however, it caused an expressed reduction in the PR length of the NO deficient double mutant. The various root growth responses given to copper in case of NO deficient lines can be explained by the hypothesis that close control NO status is necessary for the regulation of the root architecture. The deviation of NO content from the optimal level results in the inhibition of copper-induced root morphological response.

In our further experiment, the copper tolerance of mutant seedlings (*nox1*, *gsnor1-3* and *nia1nia2*) with altered NO metabolism was studied. These plants showed smaller shoot and root sizes and fresh weight (FW) when compared to the wild type, which supposes the necessity of an optimal NO level for proper growth. The *vtc2-3* and *miox4* plants showed wild type-like shoot and root sizes under control conditions. Consequently, the modified ascorbate content and the slightly modified ROS levels resulting from this do not influence significantly the early development of *Arabidopsis*. The lowest CuSO_4 concentration (5

μM) that was applied resulted only in a slight growth in copper content (~80 μg g⁻¹DW), and it did not prove to be toxic for the Col-0 seedlings. On the contrary, the 5 μM copper treatment had a slight growth enhancing effect (non-significant increase of FWs), however, for this effect to manifest, increased NO and ROS levels were necessary in the plants. In case of NO deficient plants, a stronger growth inhibitory effect of copper was observed, compared to the wild type, which reflects its role played in the maintenance of NO growth under abiotic stress conditions.

After that, the vitality of the MZ cells of the root was examined, from which conclusions for copper tolerance could be drawn. In case of mild stress, high NO levels enhanced sensitivity, while in case of higher copper concentration, tolerance was fostered. This means that the signalling function of NO depends on the strength of stress. Under slight copper exposure in *nox1* plants, the negative effect of NO on vitality can be reversed by eliminating high NO content. In case of *vtc2-1* and *vtc2-3 Arabidopsis*, cell vitality decreased as a result of copper exposure, however, *miox4* root cells proved to be more vital. Based on this, it can be assumed that the higher ROS level, having formed as a result of decreased ascorbate content, leads to copper sensitivity, while the lower ROS content, caused by ascorbic acid overproduction, favours copper tolerance. Higher ROS levels disturb the redox state of cells, which leads to oxidative damage. This presumably increases copper sensitivity.

Biochemical experiments were conducted in order to prove whether NO participates in the formation of copper tolerance. In the course of this, the NO level of plants was modified by applying exogenous NO donor (SNP) and NO scavenger (cPTIO), and the vitality of wild type and NO mutant plants in the root MZ was detected. Based on the results, it can be stated that NO improves copper-induced cell damage under strong copper stress, as NO treated Col-0 plants showed better vitality. The high degree of copper tolerance of the NO over-producer mutant and the increased sensitivity of the *nia1nia2 Arabidopsis* also prove the stress mitigating effect of NO. In order for copper tolerance to be formed, a rigidly regulated NO balance is required, as NO content that is higher or lower than the optimal level may lead to cell damage.

As the next step, the possible relationship between NO and ROSs under copper stress was examined by microscopic observation. Higher NO level was accompanied by lower O₂⁻ level in the control state *Arabidopsis* root tips, and this proved to be true the

other way round as well, i.e. in the *nia1nia2* MZ that showed lower NO content, higher $O_2^{\cdot-}$ level could be detected than in the wild type. This refers to the fact that under stress free conditions NO is capable of controlling the $O_2^{\cdot-}$ level negatively, presumably through the chemical reaction leading to $ONOO^-$ generation or through the modification of the activity of antioxidants such as superoxide dismutase (SOD). As a result of Cu, the H_2O_2 levels reduced in the presence of NO excess, based on which it can be assumed that, as a consequence of higher NO level, the expression of antioxidant genes (e.g. glutathione peroxidase or glutathione transferase) increased, so probably it was ROS detoxification that took place. Furthermore, in case of NO deficiency, the $O_2^{\cdot-}$ level reduction was accompanied by H_2O_2 generation, which supposes a possible SOD-dependent detoxification. The altered ascorbate metabolism and, therefore, the altered ROS content (*vtc2-1*, *vtc2-3* and *miox4* mutants) resulted in lower NO content than in the Col-0, which refers to the fact that a rigidly regulated level of ROSs has an effect on the NO metabolism under stress free conditions. Considering the copper-induced, non-significant changes, the effect of ROSs on NO metabolism under copper stress is inessential.

The following conclusions can be drawn from the findings of our work:

- The appearance of copper-induced morphological response in *Arabidopsis* plants depends on the duration and concentration of metal stress. In the long term, the *Arabidopsis* shows copper stress induced developmental induction (increased number of LR).
- Both shorter and longer term copper stress alters the auxin and NO metabolism. In the short term, copper causes excess auxin level increase, while the NO level decreases in seedling roots; in the longer term, the changes are opposite to this.
- The hormonal and signal component in copper-induced SIMR signal transduction, i.e. auxin and NO, are in a mutually negative relationship.
- In cotyledons, both assumed enzymatic NO biosynthetic pathways (L-arginine and NR dependent) are responsible, while NO decrease happens in the PR independently from the generation of peroxynitrite and superoxide radicals. In the longer term, the activity of the NR enzyme is responsible for NO synthesis generated in copper-treated roots.
- In case of stronger copper stress, NO participates in forming the tolerance by regulating the generation of superoxide radicals and H_2O_2 during copper stress. In contrast with NO, ROSs increase copper sensitivity in *Arabidopsis* seedlings.