

**Az *S*-nitrozoglutation-reduktáz által szabályozott nitrogén-  
monoxid jelátvitel részvétele a strigolaktonok/karrikinok- és a  
cinkhiány által szabályozott gyökérfejlődésben**

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Kondak Dóra**

Témavezető:

**Ördögné Dr. habil. Kolbert Zsuzsanna**

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Növénybiológia Tanszék

SZTE TTIK



Szeged

2024

# Tartalomjegyzék

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>8</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>10</b>
2.1. MINDEN, AMIT ÉRDEMES TUDNI A NÖVÉNYI NO-RÓL .....	10
2.1.1. A NO tulajdonságai.....	10
2.1.2. A NO bioszintézisének reduktív és oxidatív útvonalai.....	10
2.1.3. A növényi hemoglobinok szerepe a NO szint szabályozásában .....	12
2.1.4. NO közvetített PTM-ok .....	13
2.1.4.1. Fehérjetirozin-nitráció .....	13
2.1.4.2. Nitroalkilezés.....	15
2.1.4.3. S-nitroziláció.....	15
2.1.5. GSNO keletkezése és szerepe.....	16
2.1.6. GSNOR enzim szerkezete, szerepe .....	17
2.1.7. Nitro-oxidatív stressz .....	19
2.1.8. NO, mint multifunkcionális szabályzó molekula .....	20
2.2. STRIGOLAKTON: AZ ÚJ NÖVÉNYI HORMON .....	20
2.2.1. A SL szerkezete.....	20
2.2.2. A SL bioszintézise .....	22
2.2.3. A SL jelátvitel .....	23
2.2.4. A SL fiziológiai funkciói .....	24
2.3. KARRIKINEK A NÖVÉNYEKBEK .....	25
2.3.1. A KAR-ek szerkezete.....	25
2.3.2. A KAR keletkezés.....	25
2.3.3. A KAR jelátvitel.....	26
2.3.4. A KAR-ek fiziológiai funkciói .....	28
2.4. CINK: AZ ESSZENCIÁLIS NYOMELEM .....	28
2.4.1. A Zn előfordulása a talajban.....	28
2.4.2. A Zn felvétele a talajból .....	30
2.4.3. A Zn szerepe a növényekben.....	31
2.4.4. A Zn hiánytünetek a növényekben.....	32
2.4.5. A Zn-hiány emberekbek .....	32
2.4.6. A suboptimális Zn-ellátottsághoz való növényi alkalmazkodás.....	33
<b>3. HIPOTÉZIS ÉS CÉLOK</b> .....	<b>36</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>38</b>
4.1. FELHASZÁLT NÖVÉNYVONALAK ÉS NEVELÉSI KÖRÜLMÉNYEK 1 .....	38
4.2. ALKALMAZOTT KEZELÉSEK .....	39
4.3. MORFOLÓGIAI MÉRÉSEK .....	40
4.4. FLUORESZCENS MIKROSKÓPIA.....	41
4.4.1. A gyökér életképességének, sejtosztódásának és cinkszintjének detektálása.....	41
4.4.2. Reaktív nitrogén - és oxigénformák kimutatása.....	42
4.4.3. Mikroszkópra vonatkozó adatok .....	43
4.5. IMMUNHISZTOKÉMIAI B-GLÜKURONIDÁZ (GUS) FESTÉS .....	43
4.6. SNO TARTALOM MEGHATÁROZÁSA.....	44
4.7. ZN-TARTALOM ELEMZÉSE INDUKTÍV CSATOLÁSÚ PLAZMA TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL (ICP-MS) .....	44
4.8. GSNOR AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA SPEKTROFOTOMETRIÁS ELJÁRÁSSAL .....	45
4.9. GSNOR FEHÉRJEMENNYISÉG ÉS A FEHÉRJETIROZIN-NITRÁCIÓ ELEMZÉSE WESTERN BLOT MÓDSZERREL.....	46
4.10. NO, SL-, ZN-ASSZOCIÁLT GÉNEXRESSZIÓ ELEMZÉSE KVANTITATÍV VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓVAL .....	47

4.11.	JÓSLÁS .....	48
4.12.	STATISZTIKAI ELEMZÉS .....	48
<b>5.</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>49</b>
5.1.	EREDMÉNYEK 1.....	49
5.1.1.	<i>Vad típusú, GSNOR és SL mutáns lúdfű vonalak vizsgálata stresszmentes állapotban ...</i>	49
5.1.1.1.	Lúdfű csíranövények gyökérszerkezeti tulajdonságainak az ismertetése .....	49
5.1.1.2.	Nitrogén-monoxid és S-nitrozotiol szintek meghatározása .....	50
5.1.1.3.	NO-asszociált gének expressziójának meghatározása <i>max1-1</i> és <i>max2-1</i> csíranövényekben ...	51
5.1.1.4.	<i>Max</i> mutánsok GSNOR enzimének-gén, és fehérjeszintű vizsgálata.....	52
5.1.1.5.	SL-függő markergének expressziós mintázata <i>gsnor1-3</i> és <i>35S::FLAG-GSNOR1</i> csíranövényekben.....	53
5.1.2.	<i>rac-GR24</i> és <i>TIS108</i> kezelések <i>Col-0</i> -ban és GSNOR mutáns csíranövényekben .....	55
5.1.2.1.	Morfológiai változások kimutatása SL analóg és inhibitor kezelés hatására.....	55
5.1.2.2.	NO-asszociált gének meghatározása SL analóg és inhibitor kezelés hatására <i>Col-0</i> -ban.....	56
5.1.2.3.	GSNOR enzim mennyiségének kimutatása <i>Col-0</i> -ban SL analóg és inhibitor kezelés hatására..	58
5.1.3.	<i>GSNO</i> és <i>cPTIO</i> külső alkalmazásának hatása vad típusban és <i>max</i> mutánsokban .....	59
5.1.3.1.	Gyökérmorfológiai változások detektálása NO donor és gyökfogó kezelésre vad típusban és <i>max</i> mutánsokban.....	59
5.1.3.2.	<i>GSNO</i> vagy <i>cPTIO</i> kezelt vad típusú lúdfű SL-asszociált génjeinek relatív transzkriptszintjei ....	60
5.1.3.3.	<i>d14</i> , <i>htl-3</i> , <i>htl-3/d14</i> és <i>smax1/smxl2</i> lúdfű csíranövények NO szintjeinek a meghatározása kontroll állapotban .....	61
5.2.	EREDMÉNYEK 2.....	63
5.2.1.	<i>A Zn-hiány igazolása szerv és szövet szinten vad típusú és GSNOR túltermelő vonalban</i>	63
5.2.2.	<i>A Zn hiány hatása a GSNOR enzimre gén,- fehérje- és aktivitás szinten.....</i>	67
5.2.3.	<i>A reaktív nitrogén- és oxigénformák cinkhiány által indukált változásainak hatása a fehérjenitrációra.....</i>	68
5.2.4.	<i>Cinkhiány által kiváltott morfológiai változások és a háttérben húzódo folyamatok ...</i>	72
<b>6.</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE .....</b>	<b>77</b>
6.1.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE 1.....	77
6.1.1.	<i>A gyökérszerkezeti változások, valamint a NO-SL közötti kapcsolat stresszmentes állapotban.....</i>	77
6.1.2.	<i>SL analóg és inhibitor hatása a NO jelátvitelre.....</i>	78
6.1.3.	<i>NO donor és gyökfogó hatása a SL jelátvitelre.....</i>	80
6.1.4.	<i>SL és KAR jelátviteli mutánsok NO szintjei .....</i>	81
6.2.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE 2.....	81
6.2.1.	<i>A Zn-koncentráció alakulása szerv és szövet szinten vad típusú és GSNOR enzimet túltermelő vonalban.....</i>	81
6.2.2.	<i>A reaktív nitrogén- és oxigénformák cinkhiány által indukált változásainak hatása a fehérjenitrációra.....</i>	82
6.2.3.	<i>A gyökérmorfológiai változások háttérben lévő hormonális változások .....</i>	84
<b>7.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>85</b>
7.1.	ÖSSZEFOGLALÁS 1 .....	85
7.2.	ÖSSZEFOGLALÁS 2 .....	86
<b>8.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>88</b>
8.1.	SUMMARY 1.....	88
8.2.	SUMMARY 2.....	89
<b>9.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>91</b>

<b>10.</b>	<b>MELLÉKLET .....</b>	<b>110</b>
<b>11.</b>	<b>PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>111</b>
<b>12.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>116</b>
<b>13.</b>	<b>NYILATKOZAT .....</b>	<b>118</b>

## Rövidítések jegyzéke

ABC-FTL - ABC-formiltriciklikus lakton  
AmplexRed - 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin  
CCD - karotinoid-hasító dioxigenázok (carotenoid cleavage dioxygenase)  
CLIM - kovalensen kapcsolt intermedier molekula (covalently linked intermediate molecule)  
CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> - karbonát-gyök  
cPTIO - 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid  
Cys - cisztein  
D14 - DWARF14  
D27 - DWARF27  
DAF-FM DA - 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorofluoreszcein diacetát  
DHE - Dihidroetidium  
DHR - Dihidrorodamin 123  
DLK - D14-LIKE  
DMSO - dimetil-szulfoxid  
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav  
FAD - flavin-adenin-dinukleotid  
FDA - fluoreszcein-diacetát  
FITC - fluoreszcein-izotiocianát  
GLB - NON-SYMBIOTIC HAEMOGLOBIN  
GSH - glutation  
GSNHOH - N-hidroxi-szulfonamid  
GSNO - *S*-nitrozoglutation  
GSNOR - *S*-nitrozoglutation-reduktáz  
GSSG - glutation diszulfid  
HMB - hidroximetil-butenolid  
H<sub>3</sub>NO - hidroxilamin  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hidrogén-peroxid  
HTL3 - HYPOSENSITIVE TO LIGHT  
iNOS - indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

KAI2 - KARRIKIN INSENSITIVE 2

KAR - karrikin

MAX - MORE AXILLARY GROWTH

MES/KCL - 2-N-morfolin-etánszulfonsav/kálium-klorid

MS - Murashige-Skoog médium

NADH - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NBT/BCIP - 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát

NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - ammónia

Ni-NOR - nitrit-NO-reduktáz

NO - nitrogén-monoxid

NO<sup>+</sup> - nitrozónium kation

NO<sup>-</sup> - nitroxil-gyök

NO<sub>2</sub> - nitrogén-dioxid

NO<sub>2</sub>• - nitrogén-dioxid gyök

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - dinitrogén-trioxid

NO<sub>2</sub>-FA - nitro-zsírsav (nitro fatty acid)

NOFNiR - NO-képző nitrit-reduktáz

NOHA - N $\omega$ -hidroxil-L-arginin

NOS - nitrogén-monoxid-szintáz

nNOS - neuronális nitrogén-monoxid-szintáz

NR - nitrát-reduktáz

O<sub>2</sub> - oxigén molekula

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - szuperoxid gyökanion

•OH - hidroxil gyök

ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrit

PTM - poszttranszlációs módosítás

*rac*-GR24 - (3aR\*,8bS\*,E)-3-(((R\*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il-oxi)-metilén)-

3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno[1,2-b]furán-2

RNF - reaktív nitrogénformák

ROF - reaktív oxigénformák

SCF - SKP1-CULLIN-F-BOKSZ ubikvitin-ligáz komplex

SH - szulfhidril csoport

SL - strigolakton

SMAX-LIKE/SMXL - SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH

SNO - S-nitrozotiol

Zinpyr-1- 4',5'- Bis[bis(2-piridilmetil)aminometil]-2',7'-diklorofluoreszcein

Zinquin - 2-metil-8((4-metil-fenil)szulfonil)-6-etil-oxi-karbonil-metil-oxi)kinolin

TIS108 - 6-fenoxi-1-fenil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-hexán-1-on

Tm - olvadáspont

Zn<sup>2+</sup> - cinkion

ZnSO<sub>4</sub> - cinkszulfát

ZSM - Cink Érzékelő Motívum

PBS - phosphate buffer saline

PIN - PINNOID

PJ - propídium-jodid

## 1. Bevezetés

A növényekben főként redukzív útvonalak által keletkező nitrogén-monoxid (NO) poszttranszlációs módosításokon (PTM) keresztül szabályozza a növény élettani folyamatait stresszmentes, valamint abiotikus/biotikus veszélyforrásnak kitett növényekben egyaránt. A PTM-ok olyan molekulák keletkezéséhez járulnak hozzá, mint az *S*-nitrozotiolok (SNO) vagy a 3-nitrotirozin, amelyek jelátviteli folyamatok vagy nitro-oxidatív stressz kialakításában vesznek részt. Az SNO-k képviselője a *S*-nitrozoglutation (GSNO) melynek enzimatis lebonatását a ciszteinben (Cys) gazdag *S*-nitrozoglutation-reduktáz (GSNOR) enzim végzi, ezáltal közvetlenül közreműködik a SNO/NO szintek regulációjában. A NO más növekedésszabályzó molekulákkal (pl. strigolakton, karrikin) együttműködve alakítja ki a gyökérzet optimális szerkezetét. A strigolaktonok (SL) a növényi fitohormonok egy új osztályának terpenoid lakton szerkezetű képviselőjeként a gyökérfejlődés számos pontjában szerepet tölt be. A SL-kal hasonló szerkezetű, de eltérő keletkezésű karrikinok (KAR) a SL-kal párhuzamos jelátviteli útvonalat járnak be. Mindkét molekula az F-box MORE AXILLARY GROWTH 2 (MAX2) fehérjecsaldon keresztül, bár különböző transzkripciós represszor család tagjain keresztül önállóan vagy egymással együttműködve irányítják a növények fejlődését és növekedését. Munkám első felében a NO, SL és a KAR molekulák közötti jelkölcsonhatását tanulmányoztam *Arabidopsis thaliana* gyökérrendszerében GSNOR, SL és KAR mutáns vonalak felhasználásával.

A növények szesszilis életmódjukból adódóan nem képesek kitérni a kedvezőtlen környezeti feltételek elől, mint például a talajok nem megfelelő tápanyag ellátottsága. A mikroelemek közé tartozó cink (Zn) optimálisnál alacsonyabb talajbéli hozzáférhetősége a növényeken keresztül az emberben is hozzájárul a hiánytünetek kialakulásához. A cinkszegény mezőgazdasági területen termesztett gabonanövények termésének minőségi és mennyiségi romlása legnagyobb gondot a fejlődő országok esetében okoz, ahol a népesség ételmszer és/vagy tápanyaghiányban szenved. Ez a probléma mára már a világ minden pontján megfigyelhető. Disszertációm második felében betekintést nyerhetünk a szuboptimális cinkellátottságnak kitett *Arabidopsis* csíranövények GSNOR-közvetített jelátvitel háttérében álló gyökérmorfológiai, molekuláris, valamint a reaktív oxigén- és nitrogénformák szintjeiben bekövetkező változások mechanizmusába.



Eredményeim a NO/GSNO és a SL-ok, valamint a KAR-ek között, a gyökérrendszer regulációjában fontos új szabályozó folyamatok és kapcsolatok megértéséhez járulnak hozzá. Emellett további részletekkel gazdagítják a cinkhiány molekuláris mechanizmusáról rendelkezésünkre álló ismereteket.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Minden, amit érdemes tudni a növényi NO-ról

#### 2.1.1. A NO tulajdonságai

A NO gáz halmazállapotú,  $\pi_2$  pályáján egy párosítatlan elektront tartalmazó szabadgyök. Hozzávetőlegesen 3-5 másodperces félélet idővel rendelkezik. Szabadgyök (NO•) jellegéből adódóan elektronfelvétellel (nitrozónium kation, NO<sup>+</sup>) vagy -leadással (nitroxil-gyök, NO<sup>-</sup>) képes energetikailag kedvezőbb állapotot felvenni. Kis mérete (kétatomos molekula), töltés nélküli jellege és hidrofób tulajdonsága hatékony mozgékonyt biztosít a sejtek vizes fázisában, mint például a citoplazmában, de szabadon mozoghat a membránok lipid rétegén keresztül is (Stamler és mtsai., 1992; Wojtaszek, 2000). A NO számos molekulával képes reakcióba lépni: átmeneti fémekkel, különösképpen a fehérjék hem vas és vas-kén központjaival, a fehérjék cisztein és tiol oldalláncaival, reaktív oxigénformákkal (ROF) (hidrogén-szulfid, hidrogén gáz, molekuláris oxigén (O<sub>2</sub>), szuperoxid gyökanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és lipidekkel.

A NO-eredetű molekulák, mint a nitrogén-dioxid (NO<sub>2</sub>), dinitrogén-trioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>), SNO-ok a reaktív nitrogénformák (RNF) közé tartoznak (Begara-Morales és mtsai., 2018).

#### 2.1.2. A NO bioszintézisének redukzív és oxidatív útvonalai

Az endogén NO bioszintézisét már az 1980-as évek közepén leírták az állati szervezetben. Ennek a folyamatnak a katalizátora a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzim, amely flavin-adenin-dinukleotid (FAD), flavin-mononukleotid, tetrahydropterin, kalcium, kalmodulin kofaktorok és oxigén jelenlétében működik. Az elektronokat a reakcióhoz a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) biztosítja. Állatokban három eltérő típusú NOS izoformát azonosítottak: neuronális NOS (nNOS), endoteliális NOS (konstitutív), valamint indukálható NOS (iNOS). Az oxidatív útvonal során L-arginin-ből kiindulva N $\omega$ -hidroxil-L-arginin (NOHA) köztiterméken keresztül közvetlenül L-citrullin és NO keletkezik (Alderton és mtsai., 2001). A NOHA

hidroxilaminná ( $\text{H}_3\text{NO}$ ) alakulva is képes reaktív oxigénformák ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) jelenlétében NO-t és L-citrullint képezni (Corpas és mtsai., 2022).

A sikeres állati NO szintézis kutatások hatására a növénybiológusok érdeklődése is a növényi NOS vizsgálatok felé fordultak. Számos növényfajban megfigyeltek NOS-szerű aktivitást. Borsóból (*Pisum sativum*) izolált peroxiszómában L-citrullin képződése az állati NOS-hoz hasonló útvonalon történik, és érzékeny az L-arginin inhibitorokra (Corpas és mtsai., 2004). Közvetett bizonyítékok mutatják, hogy az emberi nNOS heterológ gének expressziója teljes mértékben aktív rizsben (*Oryza sativa* L.) és lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) is, ami arra utal, hogy a növényi sejtek rendelkeznek az összes szükséges kofaktorral a működéséhez (Cai és mtsai., 2015). 2003-ban Guo és munkatársai egy publikációban az *AtNOS1* génként azonosították a lúdfü mitokondriális glicin dekarboxiláz komplex P fehérjéjét, mint lehetséges iNOS-t. Azonban Chandok és munkatársai ugyanebben az évben megcáfolták ezt az állítást, bár az *AtNOS1* gén közvetve részt vesz a NO szintézisében, így átnevezték NO-asszociált (*AtNOA1*) génre.

Egy közelmúltbeli kutatás tisztázta a soha véget nem érő vitát a növényi NOS jelenlétéről. 1000 növényből álló (1 KP) nemzetközi multidiszciplináris konzorcium által generált transzkripciós adatbázis segítségével, valamint nyilvánosan elérhető növényi genomok felhasználásával több, mint 1300 fajban keresték az emberi nNOS-hoz hasonló szekvenciákat. Szárazföldi növények genomjában és/vagy transzkriptomjában nem találtak NOS homológokat. Azonban 265 alga faj vizsgálata során 15 tipikus NOS-t találtak (Jeandroz és mtsai., 2016). Ezek többsége a zöldalgák között fordult elő. Ezek az eredmények megerősítették L. Lamattina kutatócsoportjának (Foresi és mtsai., 2010) korábbi eredményeit, akik egy funkcionális NOS-t azonosítottak *Ostreococcus tauri*-ban (egysejtű zöldalga). Újabb kutatási eredmények azt sugallják, hogy a *Chlamydomonas* egysejtű zöldalgában található NO-képző nitrit-reduktáz (NOFNiR) rendszer, amely a nitrit NO-dá történő redukciójáért felelős, NO forrásként szolgálhat a magasabbrendű növények számára is (Chamizo-Ampudia és mtsai., 2017).

Növényekben a NO bioszintézisének kulcsenzime a citoszólikus, alegységenként FAD-dal (b5-típusú citokróm vas) és molibdén kofaktorokkal rendelkező homodimer szerkezetű nitrát-reduktáz (NR). A nitrát nitritté történő redukálásához elektrondonorként NADPH helyett nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NADH) használ fel. Arabidopsisban a NR enzimet *NIA1* és a *NIA2* gének kódolják. Mindkét izoforma a NADH-ot részesíti előnyben az elektrondonorként szolgáló NADPH-tal szemben,

azonban a *NIA2* főként a nitrát redukciójában vesz részt, míg a *NIA1* a NO szintézisében (Mohn és mtsai., 2019). A plazmamembránban kötött nitrit-NO-reduktáz (Ni-NOR) fiziológias körülmények között akkor aktív, amikor a citoszolban a nitrát szintje jelentősen magasabb, mint a nitrit szintje (Mohn és mtsai., 2019). A nitrit nem enzimatis reakciók révén is NO-dá redukálódhat, amelyhez az elektronforrást a mitokondriális elektron transzportlánc biztosítja, valamint végbemehet az apoplazt savas pH-ján vagy a plasztiszokban a karotinoidok közvetítésével fényfüggő reakció révén.

Bár a redukzív útvonalak dominálnak a növényekben, magasabbrendű fajokban a NO képződése oxidatív módon is megtörténhet. Ezen folyamatok egy része L-argininre épül, és hasonló folyamatok zajlanak le, amint azt már az állatok esetében említettem. A poliamin bioszintézis során is felszabadulhat NO, amely az arginint használja kiindulópontként, azonban ez a folyamat még további kutatásokat igényel (Corpas és mtsai., 2022).

A magasabbrendű növények számos NO-forrással rendelkeznek: a redukzív útvonal mellett az oxidatív, enzimatis és nem enzimatis folyamatok is biztosítják a NO keletkezését. Különösen fontos megjegyezni, hogy a növényi sejtekben olyan molekulák is közvetlenül felszabadíthatják az NO-ot, mint például a GSNO, a nitrozírsavak (NO<sub>2</sub>-FA) és a nitrozomelatonin, amelyek új szereplőknek számítanak a NO anyagcserejének hálózatában (Corpas és mtsai., 2022).

### **2.1.3. A növényi hemoglobinok szerepe a NO szint szabályozásában**

A növények hemoglobinjai az állati hemoglobinnal hasonló szerkezetűek (Gupta és mtsai., 2011), azonban oxigén iránt alacsonyabb affinitással rendelkeznek. Elsődleges szerepük nem az oxigén szállítása és diffúziójának elősegítése (Hebelstrup és mtsai., 2007; Gupta és mtsai., 2011), hanem a NO nitráttá történő oxidálása, ezáltal a lokális NO szint szabályozása. A növényi hemoglobinok két fő csoportja a szimbiotikus és nem szimbiotikus hemoglobinok. Előbbiek nitrogén-fixáló baktériumokkal endoszimbionta kapcsolatban lévő növények gyökérgümőiben találhatóak legnagyobb mennyiségben (Appleby, 1992). A leghemoglobint azonosították elsőként, mint szimbionta hemoglobint. Utóbbiakat három filogenetikai osztályba sorolják, lúdfűben az első osztályt a *GLB1*, másodikat a *GLB2*, harmadikat a *GLB3* gének kódolják (Trevaskis és mtsai., 1997; Watts és mtsai., 2001). Az első osztályba tartozó hemoglobintokat

fitohemoglobin1-nek is nevezik. A *GLB1* és a *GLB2* gének között funkcionális és expressziós mintázatbeli eltérések is megfigyelhetők.

Az oxigénnel telített fitoglobinnal, a NO-ot nitráttá alakítja, és metfitoglobinnal-é válik, amelyet később a methemoglobin-reduktáz redukál (Igamberdiev és mtsai., 2006). Az így létrejött nitrát a NR szubsztrátjává válik, ami nitrit képződését eredményezi. Ezután a nitrit a mitokondriumba belépve NO előállítására fordítódik. Ezt a nitrit-nitrát-NO visszacsatolást fitoglobinnal-NO ciklusnak nevezik, amelynek működése korlátozott mennyiségű adenosin-trifoszfát termelést eredményez (Stoimenova és mtsai., 2007).

#### **2.1.4. NO közvetített PTM-ok**

##### **2.1.4.1. Fehérjetirozin-nitráció**

A növények élettani folyamatait, mind normális, mind stresszállapotban, a NO és annak származékai poszttranszlációs módosításain (főként nitráció és nitroziláció) keresztül szabályozzák (1. ábra). A biológiai rendszerekben a fehérjék, a zsírsavak és a nukleinsavak az elsődleges célponjai a nitrációnak. A tirozinnitrációja a legáltalánosabb aminosav módosítás a fehérjék között, de a triptofán, fenilalanin hisztidin aminosavakat is érintheti. Növényekben a nitráció központi molekulája a ONOO<sup>-</sup>, mely a NO és a O<sub>2</sub><sup>-</sup> közötti gyorsan lezajló reakcióból származik (León, 2022). A O<sub>2</sub><sup>-</sup> biológiai élettartama jóval rövidebb, mint a NO-é, és a negatív töltése miatt membránokon keresztül való diffúziója is nehezebb, amelyhez anion-csatornák jelenléte szükséges (Kolbert és mtsai., 2017). Ennek alapján feltételezhető, hogy a környező sejtekből érkező NO a O<sub>2</sub><sup>-</sup> keletkezési helyénél fog ONOO<sup>-</sup>-et képezni. A ONOO<sup>-</sup> hosszabb felezési életidővel (Siegel és mtsai., 2015) ugyanakkor hasonló diffúziós távolsággal rendelkezik, mint a O<sub>2</sub><sup>-</sup> vagy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A NO-hoz viszonyítva rövidebb diffúziós távolságra képes jutni, azonban reaktívabb molekulának számít (Kolbert és mtsai., 2017).

A tirozinnitrációja két lépésben történik, mely során a tirozin molekula aromás gyűrűjének orto pozíciójához kovalensen egy nitro csoport kapcsolódik. Elsőként egy átmeneti termék, a tirozin gyök képződik a tirozin oxidációja révén. Az oxidációban hidroxil (OH) és karbonát (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) gyökök vesznek részt, amelyek legalább három

útvonalon származhatnak a ONOO<sup>-</sup>-ből. 1) Instabil peroxinitrites sav keletkezik a ONOO<sup>-</sup> protonálásával, amely optimális pH-n <sup>•</sup>OH és nitrogén-dioxiddá (NO<sub>2</sub>) homolizálódik. 2) A ONOO<sup>-</sup> vizes közegben reagálva a szén-dioxiddal, nitrozoperoxikarboxilátot képez, amely CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> és nitrogén-dioxid gyökre (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>) bomlik. 3) A ONOO<sup>-</sup>-ből származó NO oxidálásával keletkező nitrit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal együtt, peroxidázok hatására <sup>•</sup>OH és <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> gyököket produkál. A második lépés során, a tirozin gyök NO<sub>2</sub>-dal reagálva 3-nitrotirozint képez (Souza és mtsai., 2008). A 3-nitrotirozin kialakulásának eredményeként a nitrált fehérje szerkezete, működése és funkciója is megváltozik a fehérjét felépítő aminosavak fizikai és kémiai tulajdonságainak (mint pl. a redoxpotenciáljuknak, hidrofób/hidrofil tulajdonságaiknak és savi disszociációs állandójuknak) a módosításán keresztül (Sabadashka és mtsai., 2021). Növényekben a nitráció a fehérjék funkcióvesztéséhez vezet, ami azt sugallja, hogy a nitrációnak főként a lebontásban van szerepe (Kolbert és mtsai., 2017).

Stresszmentes növények proteomjában bizonyos mértékű nitráció mutatható ki, ami azt jelzi, hogy a növények rendelkeznek fiziológiás nitroproteommal. Ezt számos növényfajban mint pl. indiai mustárban (*Brassica juncea*), olajrepcében (*Brassica napus*), borsóban, lóbabban (*Lotus japonicus*), keserűnarancsban (*Citrus aurantium*) és paprikában (*Capsicum annum*) már leírták (Kolbert és mtsai., 2017). Továbbá kontroll körülmények között nevelt Arabidopsis csíranövényekben 127 nitrált fehérjét azonosítottak (Lozano-Juste és mtsai., 2011).

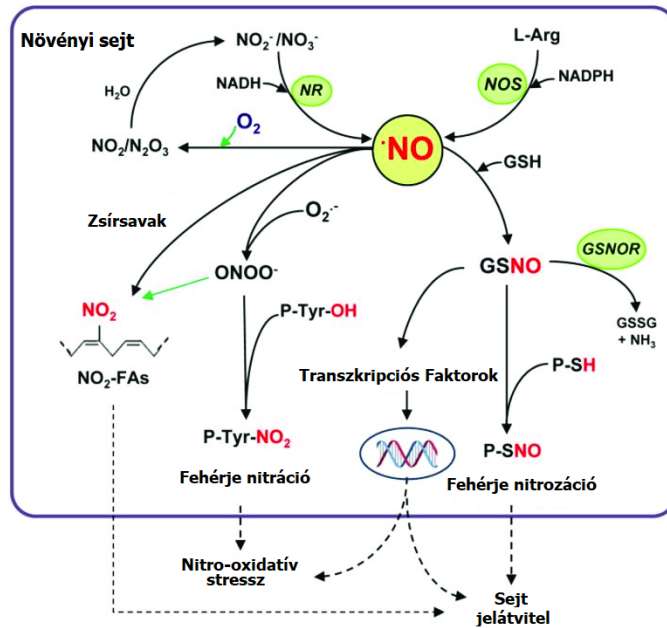
Állatokban a tirozinnitráció reverzibilis folyamat, amelyet a denitráz enzim katalizál és ennek eredményeként jelátviteli szereppel is bírhat (Sabadashka és mtsai., 2021) míg a növényekben nem azonosították ezt az enzimet. A tirozin nitrálás szelektív folyamatnak tekinthető, annak ellenére, hogy nem találtak olyan konszenzus szekvenciát a célfehérjéken, ami biztosítaná ezt a specifitást. Ehelyett számos tényező biztosítja, mint a tirozin aminosav centrifugális-centripetális helyzete a fehérje 3D-s szerkezetében, a célfehérje szubcelluláris elhelyezkedése, valamint a fehérje másodlagos szerkezete (Yeo és mtsai., 2015; Bartesaghi és Radi, 2018). Érdekes módon a teljes tirozin készletnek csupán 1-2%-a célpontja az *in vivo* nitrálásnak (Bartesaghi és mtsai., 2007) ami arra utal, hogy a folyamat erősen szelektív. A 3-nitrotirozin alacsony száma a több tirozin aminosavat tartalmazó növényi enzimekben megerősíti ezt (Lozano-Juste és mtsai., 2011; Begara-Morales és mtsai., 2015).

#### 2.1.4.2. Nitroalkilezés

Azokat a reaktív lipideket, amelyek a telítetlen zsírsavak és a RNF-k kölcsönhatásából származnak, nitro-zsírsavaknak, nitrolipideknek vagy nitroalkéneknek nevezzük (Freeman és mtsai., 2008). Ezek a molekulák képesek NO felszabadítására és módosíthatják az antioxidáns válaszokkal kapcsolatos gének expresszióját (Schopfer és mtsai., 2005; Gorczynski és mtsai., 2007; Mata-Pérez és mtsai., 2016; Padilla és mtsai., 2017). A nitrozsírsavak erőteljes elektrofilek, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni nukleofilekkel, például a glutationnal (GSH) (Jobbagy és mtsai., 2019) és bizonyos fehérje aminosav-maradványokkal. Az ilyen nitrozsírsav-addíció a fehérjecélpontokhoz úgynevezett nitroalkilezést generál (Geisler és Rudolph, 2012) amely egy reverzibilis az *S*-nitrozilációhoz hasonló, újabb NO-függő PTM-nak tekinthető (Aranda-Caño és mtsai., 2019; Jobbagy és mtsai., 2019).

#### 2.1.4.3. *S*-nitroziláció

A tirozinnitrációja mellett az *S*-nitroziláció az egyik legjobban tanulmányozott PTM magasabbrendű növényekben (Corpas, 2017; Begara-Morales és mtsai., 2015). *S*-nitrozilációnak nevezzük egy NO-csoport reverzibilis kovalens kötését egy fogékony cisztein aminosav szulfhidril (SH) csoportjához. Az *S*-nitroziláció elnevezés alternatívájaként egy kémiaiilag orientáltabb kifejezést, az *S*-nitrozáció bevezetését javasolták. Ebben az értelemben, a fehérjék cisztein aminosav tiol csoportjának az oxidálásában a NO<sup>+</sup> vesz részt (Gupta és mtsai., 2020). Arabidopsis proteomjában 1195 endogén *S*-nitrozilált peptidet azonosítottak, amelyek 926 fehérjéhez tartoznak. Kolbert és Lindermayr (2021) 15-15 fehérje vizsgálata során 60 és 123 cisztein és tirozin aminosavat azonosítottak, mint potenciális célpontjai az *S*-nitrozilációnak és nitrációnak.



**1. ábra:** a nitrogén-monoxid (NO) metabolizmusát mutatja be (Corpas és Palma, 2018). A NO redukív és oxidatív útvonalakon keresztül is képződhet növényekben. A NO zsírsavakkal, szuperoxid gyökionnal ( $O_2^{\cdot-}$ ) és glutationnal (GSH) reagálva reaktív oxigénformákat képez, mint a nitro zsírsavak ( $NO_2$ -FAs), peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) és a *S*-nitrozoglutation (GSNO), amelyek poszttranszlációs módosításokon keresztül jelátviteli folyamatokat indítanak el, de túlzott felhalmozódásuk a reaktív oxigénformákkal együtt nitro-oxidatív stresszt váltanak ki. További rövidítések: L-arg, L-arginin; NOS, nitrogén-monoxid-szintáz; NADPH, nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát;  $H_2O$ , víz;  $NO_2^-$ , nitrát;  $NO_3^-$ , nitrit; NR, nitrát-reduktáz; NADH, nikotinamid-adenin-dinukleotid;  $NO_2$ , nitrogén-dioxid;  $N_2O_3$ , dinitrogén-trioxid;  $NH_3$ , ammónia;  $O_2$ , molekuláris oxigén; GSSG, glutation diszulfid; GSNOR, *S*-nitrozoglutation-reduktáz; SNO, *S*-nitrozotiol; SH, szulfhidril csoport; P, fehérje; Tyr, tirozin;  $\cdot OH$ , hidroxil gyök

### 2.1.5. GSNO keletkezése és szerepe

*S*-nitrozilációs folyamatok során keletkezett molekulákat *S*-nitrozotioloknak nevezzük. Az SNO-k is képesek a fehérje tiol csoportjával reagálni, ezt transz-nitrozációnak nevezzük, és ez a folyamat magasabb molekulatömegű SNO-k keletkezéséhez vezethet, amelyek további NO felszabadításra képesek. A leggyakoribb alacsony molekulatömegű SNO a GSNO, de ebbe a családba tartozik a kevésbé tanulmányozott *S*-nitrozociszteín vagy az *S*-nitrozociszteínil-glicin. Továbbá, a GSH is képes kölcsönhatásba lépni olyan fehérjékkel, amelyek specifikus -SH csoporttal

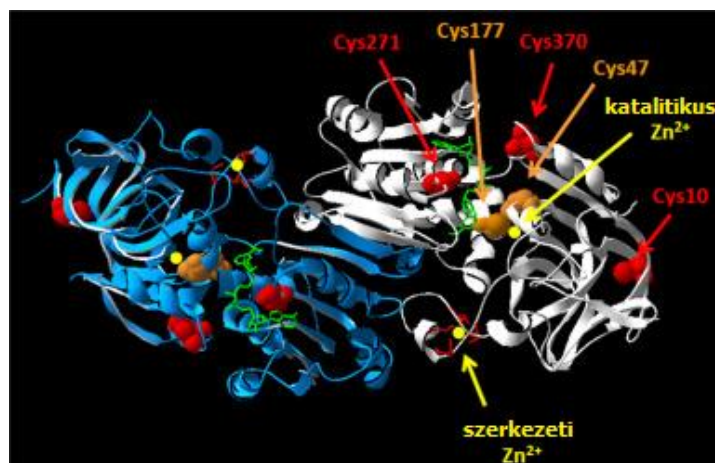


rendelkeznek, ezt a folyamatot *S*-glutathionilezésnek nevezzük (Hogg, 2002; Martínez-Ruiz és Lamas, 2007).

A GSNO, a NO és a GSH tripeptid szerkezetű (glutaminsav-cisztein-glicin) antioxidáns O<sub>2</sub>-függő reakciója révén keletkezik. A GSNO egy meglehetősen stabil intracelluláris NO raktár és transzportforma. A GSNO-ból felszabaduló NO fehérjékkel reagálva transz-nitrozációs folyamatokat indít el (Jedelská és mtsai., 2020). A GSNO funkciója, hogy pufferként működve fenntartsa a fehérjék *S*-nitrozációjának szintjét. A GSNO szintje függ a keletkezésétől (NO, GSH és O<sub>2</sub> elérhetősége) és lebontásától (Broniowska és mtsai., 2013) (enzimatis és nem enzimatis útvonalak). Az UV-fény, a magas hőmérséklet vagy a lúgos környezet a GSNO nem enzimatis degradációjához vezet. Az GSNOR enzim katalizálja az GSNO enzimatis lebontását (Sakamoto és mtsai., 2002; Achkor és mtsai., 2003).

#### **2.1.6. GSNOR enzim szerkezete, szerepe**

A GSNOR evolúciósan erősen konzervált enzim emlősökben, élesztőben és növényekben (Liu és mtsai., 2001). Az alkohol-dehidrogenázok Zn-függő, közepes láncú III. osztályába (ADH3; EC 1.1.1.1) tartozik (Martinez és mtsai., 1996). Citoszólikus, homodimer szerkezetű, alfa hélixből és béta redőkből felépülő, alegységként egy struktúrális és egy katalitikus funkciót ellátó cinkiont (Zn<sup>2+</sup>) tartalmaz. Arabidopsisban a GSNOR enzim sem intermolekuláris, sem intramolekuláris redox-érzékeny diszulfid hidakat nem tartalmaz (Lindermayr, 2018). Ciszteinben gazdag, a növényekben előforduló 14-16 ciszteinből 13 erősen konzervált. A ciszteinek fontos szerepet játszanak a redox jelátvitelben azáltal, hogy reverzibilis és irreverzibilis redox módosítások célpontjai. A fehérje felszínén elhelyezkedő három cisztein (Cys10, Cys271, Cys370) közvetlen hozzáférést biztosít a transzláció utáni módosítások számára (Xu és mtsai., 2013). A Cys47, Cys177 és Cys271 a szubsztrátkötő helyen található, ahol a Cys47 és Cys177 koordinálja a katalitikus Zn<sup>2+</sup>-t hisztidin69-el és a vízzel. A szerkezeti Zn<sup>2+</sup>-t a Cys99, Cys102, Cys105 és Cys113 koordinálják (2.ábra).



**2. ábra:** Arabidopsis GSNOR enzim 3D-s szerkezete. Piros és narancssárga nyilakkal jelölve a nitrogén-monoxid és hidrogén-peroxid számára hozzáférhető cisztein (Cys) aminosavak láthatók. Citromsárga nyilak jelzik az enzim szerkezeti és katalitikus cinkionjait ( $Zn^{2+}$ ) (Lindermayr, 2018).

Arabidopsis *GSNOR* génjének cDNS-e 1140 bázispárból áll, és egy 42,5 kDa-os molekulatömegű, 379 aminosavból álló fehérjét kódol. Az *AtGSNOR* szekvenciája 90%-os azonosságot mutat a paradicsomból és a kukoricából származó GSNOR-ral, és nagyfokú homológiát mutat az állati és élesztő GSNOR szekvenciákkal (Lindermayr, 2018).

A GSNOR szövet-specifikus és szubcelluláris elhelyezkedését a GSNOR-GFP transzgenikus Arabidopsis vonal felhasználásával tanulmányozták. A vizsgálat eredményei szerint a GSNOR-GFP jelenléte intenzív fluoreszcenciát mutatott a gyökér apikális merisztémájában, a gyökércsúcsban, a szíromlevél vaszkuláris szöveteiben, a portokban, a porzószállban, a pollenben, a bibében, a magházban és a magvakban (Xu és mtsai., 2013). Az *AtGSNOR* gén PCR vizsgálata kimutatta, hogy az expressziója szignifikánsan megtalálható minden szervben, kivéve az érett pollent. Arabidopsis GSNOR enzime a sejtmagban (kivéve a nukleolusz) és a peroxisómában található (Lindermayr, 2018).

A GSNOR által végzett GSNO redukció egy visszafordíthatatlan folyamat, amely során a termékek már nem képesek nitrozilációt végezni a fehérjéken. Az első lépésben a GSNOR NADH jelenlétében létrehoz egy instabil köztiterméket, a N-hidroxiszulfonamidot (GSNH<sub>2</sub>OH). A következő lépésben a GSH mennyiségétől függően eltérő termékek keletkezhetnek. Nemcsak a GSH, hanem a NADH is befolyásoló tényező (Staab és mtsai., 2008). Normál GSH mennyisége mellett, glutation diszulfid (GSSG) és H<sub>3</sub>NO képződik (Staab és mtsai., 2008). Ha a GSH mennyisége alacsonyabb, akkor a

GSNHOH spontán módon glutation szulfidaminná alakul. Később glutation szulfinsavvá hidrolizálhat, aminek során ammónia ( $\text{NH}_3$ ) is keletkezik (Staab és mtsai., 2008). Legújabb eredmények azt mutatják, hogy a GSNOR mellett az aldo-keto reduktázok is kulcsfontosságú szerepet játszanak a NO homeosztázisában. Ezt támasztja alá, hogy GSNOR hiányos növényekben megemelkedett az aldo-keto reduktázok családjában tartozó azon fehérjék száma és aktivitása, amelyek NADPH-függő aktivitással rendelkeznek a GSNO és az *S*-nitroso-koenzim A redukciójában (Treffon és mtsai., 2022).

A GSNOR a GSNO eltávolításával fontos szerepet játszik az RNF anyagcseréjében, az intracelluláris NO szint egyensúlyának fenntartásában, valamint a *S*-nitroso fehérjék és GSNO közötti transznitrozációs egyensúly szabályozásában. A cisztein-származékok módosíthatók NO-dal (*S*-nitroziláció), cisztein/glutation (*S*-ciszteinilezés/*S*-glutationiláció), ROF-kal (szulfénsav, szulfinsav és szulfonsavak), amelyek diszulfidkötéseket képezhetnek (Lindermayr, 2018). A GSNOR aktivitása érzékeny az *S*-nitrozilációra, de redukáló környezetben a funkció helyreállhat, ami azt sugallja, hogy a katalitikus inaktivációját az *S*-nitroziláció okozza (Frunghillo és mtsai., 2014; Guerra és mtsai., 2016). Lúdfüben a Cys10, Cys271 és Cys370 ciszteinek az *S*-nitroziláció célpontjai. Az *At*GSNOR *S*-nitrozilációja enyhe szerkezeti változásokat okoz az enzimen, amelyek csökkentik az aktivitását (Guerra és mtsai., 2016). ROF-k közvetlenül is képesek befolyásolni a GSNOR-t. Élesztőben a ROF-ok jelenléte gátolta az enzim működését (Men és Wang, 2007). Lúdfüben (Kovacs és mtsai., 2016) és burmai szőlőben (Bai és mtsai., 2012) a GSNOR és a ROF közötti összefüggés arra utal, hogy általános mechanizmus áll fent a ROF és a NO jelátvitel között.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés hatására megfigyelték a GSNOR aktivitás csökkenését, amely részben a katalitikus  $\text{Zn}^{2+}$  elvesztésének köszönhető (Kovacs és mtsai., 2016).

### **2.1.7. Nitro-oxidatív stressz**

A reaktív nitrogén- és oxigénformák egy időben és helyben termelődnek a sejtekben, ezáltal külön-külön és egymással kölcsönhatásban is jelátviteli folyamatokat indíthatnak el (Hancock és Neill, 2019). Az RNF-k túlzott felhalmozódását nitrozatív stressznek nevezik, ezt a fogalmat 2003-ban vezették be (Neill és mtsai., 2003). Egy másodlagos stressz állapotot jelent, ahol nem csak az RNF-k, hanem a ROF-k is túltermelődnek (Valderrama és mtsai., 2007). Az oxidatív stressz paraméterei közé

sorolják a fehérjék karboxilációját, a lipidek peroxidációját és a szulfhidrilek-oxidációját (Fedorova és mtsai., 2014). Hasonló módon a nitrozatív stressznek is van markere, ami a fehérjéktirozin-nitrációja (Corpas és mtsai., 2007). A kataláz, aszkorbát-peroxidáz, monodehidroaskorbát-reduktáz és szuperoxid-diszmutáz antioxidáns enzimek negatív hatással vannak a tirozinnitrációra, és segítik a NO és ROF-k közötti kapcsolatot, főként stressz alatt. Természetesen az oxidatív stressz és a nitrozatív stressz nem zárják ki egymást. Így a nitro-oxidatív stressz megfelelő kifejezésnek tekinthető a felhalmozódó RNF és a ROF káros hatásaiból eredő események leírására (Corpas és mtsai., 2013).

### **2.1.8. NO, mint multifunkcionális szabályzó molekula**

Az első kutatások a légköri NO-ot vizsgálták, mint légszennyező gázt, amely érintkezik a föld feletti növényi szervekkel, és befolyásolja azok élettani folyamatait (Leshem és Haramaty, 1996). Ma már tudjuk, hogy a NO és reakciótermékei alapvető szerepet játszanak a fitofiziológiai folyamatokban, kezdve a csírázástól, a gyökérnövekedés és a virágzás szabályozásán át egészen a biotikus (pl. vírus, baktérium és gombakórokozók) és abiotikus (pl. szárazság, hőmérséklet, UV-fény, nehézfémek, hipoxia) stresszválaszban betöltött szerepéig.

Az elmúlt 40 év kutatásainak eredményei alapján bátran kijelenthető, hogy a NO egy többfunkciós szabályzó molekula, amely a növényi életciklus minden pontján jelen van (Kolbert és mtsai., 2019a).

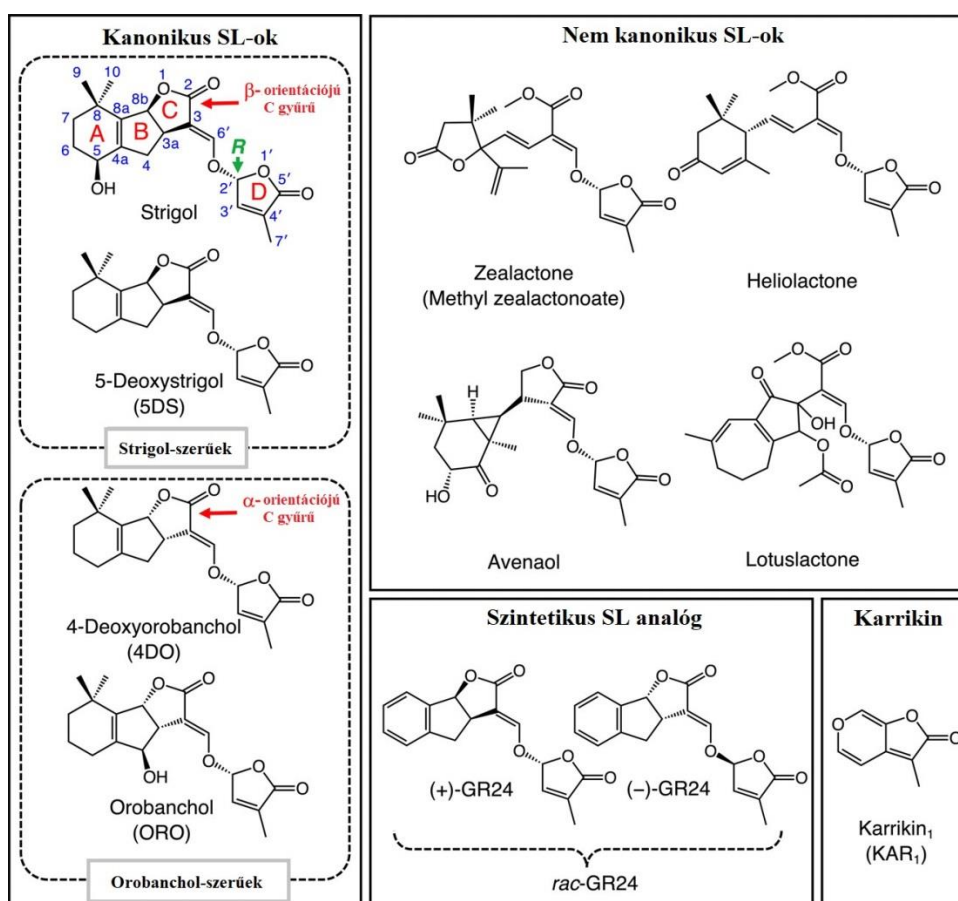
## **2.2. Strigolakton: az új növényi hormon**

### **2.2.1. A SL szerkezete**

A természetes SL-ok triciklusos laktonjához (ABC gyűrű) egy butenolid (D gyűrű) enoléter kötéssel keresztül kapcsolódik. A C-D rész a négy gyűrűből erősen konzervált és nélkülözhetetlen a biológiai aktivitáshoz, míg az A és B gyűrűk eltérő oldalláncokat tartalmaznak, ami jelentős eltéréseket eredményez a különböző SL-ok biológiai hatékonyságában (Mangnus és Zwanenburg, 1992). A SL-at szerkezetileg két nagy csoportba sorolhatjuk, a kanonikus és a nem kanonikus (metil-karlaktonoát, heliolakton,

zealakton) SL-ok közé (3. ábra). A nem kanonikus SL-ok nem tartalmazzák az ABC gyűrűrendszert. A kanonikus SL-on belül a C gyűrű sztereokémiája alapján megkülönböztetünk strigol-szerűeket (strigol és acetátja, szorgomol, sorgolakton, strigon, 5-deoxistrigol), ebbe a csoportba tartozóknak a C gyűrűje  $\beta$  orientációjú, az orobanchol szerűeknek (orobanchol és acetátja, fabacil-acetátja és solanakol)  $\alpha$  orientációjú C gyűrűjük van (Mashiguchi és mtsai., 2021).

A mesterséges SL-ok között találhatóak SL analógok, például a *rac*-GR24, amelyek hatása megegyezik a természetes biológiailag aktív SL-ok hatásával. Emellett léteznek gátló vegyületek is, például a 6-fenoxi-1-fenil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-hexán-1-on (TIS108), amelyek hatékonyan gátolják a P450 monooxygenáz enzimet, így megakadályozzák a karlakton oxidációjának lépéseit (Ito és mtsai., 2013).



**3. ábra:** A strigolaktonok (SL-ok) és a hozzájuk kapcsolódó molekulák, a *rac*-GR24 (szintetikus SL analóg) és a karrikinek (KAR) szerkezetét és csoportosítását mutatja be (Mashiguchi és mtsai., 2021).

### 2.2.2. A SL bioszintézise

A SL-ok bioszintézise konjugált kettős kötéseket tartalmazó terpenoid pigmentekből, a karotinoidokból indul ki. A növény képes szintetizálni és felhalmozni mind a cisz- és mind a transz-konfigurációjú karotinoid formát, és SL bioszintézisre felhasználni. A karotinoidok kettős kötésének oxidatív hasítása indítja el a szintézist a plasztiszban (Alder és mtsai., 2012). Arabidopsisban három MAX gén vesz részt a SL bioszintézis útvonalában: a CCD7 (AtMAX3) és a CCD8 (AtMAX4) karotinoid-hasító dioxigenázok, és az AtMAX1 (CYP711A1) citokróm P450 monooxigenáz (Selwal és mtsai., 2023). CCD-nek azonos a szerkezete-, az állatoktól a növényekig bezárólag, beleértve a baktériumokat is. Aktív központjukban négy hisztidinnel körülvett vasion aktiválja a karotinoid hasításához szükséges oxigént. A DWARF27 (D27) karotin izomeráz az all-transz- $\beta$ -karotinból reverzibilis folyamat során 9-cisz- $\beta$ -karotint állít elő, amit a CCD7 a C9'-C10' kettős kötésnél hasítva egy 27 szénatomos 9-cisz- $\beta$ -apo-10'-karotinná és egy 13 szénatomos, illékony molekulává a  $\beta$ -iononá alakít át. A CCD8 a 9-cisz- $\beta$ -apo-10'-karotinból karlakton (C19) és a C8 vegyületet, heptanalátot képez (Jia és mtsai., 2018). A karlakton karbonil csoportot nem tartalmazó, trioxigénezett molekula. Szerkezete hasonló a SL-hoz, azonban hiányzik belőle a B és C gyűrű. A bioszintézis központi metabolitja, és előfutára a kanonikus és nem kanonikus SL-nak. A P450 enzim a citoszolban katalizálja a karlakton egymást követő oxidációját, aminek eredményeként karlaktonsav keletkezik, először a 19-hidroxikarlaktonon, majd valószínűleg a 19-oxokarlaktonon keresztül. A mai napig vannak még ismeretlen elemei az útvonalnak. A karlaktonsav metil-karlaktonoáttá történő átalakításában egy ismeretlen metil-transzferáz enzim vesz részt. A Lateral Branching Oxidoreductase metil-karlaktonoáttól még nem azonosított hidroxilezett metil-karlaktonoátot képez (Selwal, 2023).

A növények alapvetően rendkívül alacsony SL szinttel rendelkeznek (Sato és mtsai., 2005), azonban a gyökerekben található SL mennyisége jóval magasabb, mint a hajtásban. A gyökérből a föld feletti szervekbe a xilém rendszeren keresztül szállítódik (Kohlen és mtsai., 2011, Seto és mtsai., 2012). Egyféle növényfaj képes többféle SL-t szintetizálni és különböző fajok eltérő típusú és mennyiségű SL-t termelnek (Cardoso és mtsai., 2011; Xie és mtsai., 2013).

### 2.2.3. A SL jelátvitel

A SL érzékelése hasonlóan más hormonokhoz, a SL specifikus kötődésén alapul a receptorához, a DWARF14-hez (D14). Ez a kötődés a D14 konformációváltását eredményezi, lehetővé téve a SL jelátvitel további komponenseivel való kapcsolatot. A D14 a SKP1-CULLIN-F-BOX (SCF) ubikvitin ligáz komplexszel kölcsönhatásba lépve SL transzkripciós represszorokat, a SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH (SMAX-LIKE/SMXL 6,7,8,) fehérjéket toboroz, és azok 26S proteasómális degradációját végzi. Az Arabidopsis SCF komplexének leucinban gazdag F-Box fehérjéjét MORE AXILLARY GROWTH 2-nek (MAX2) nevezzük (Tang és Chu, 2020). A SL-függő génexpresszió szabályozását a represszorok lebomlása irányítja. A SL D14-hez való kötődése után a receptor  $\alpha/\beta$ -hidroláz enzim aktivitásának következtében elvágja a molekula enol-éter hídját, ami ABC-formiltriciklikus laktonra (ABC-FTL) és D gyűrűre (hidroximetil-butenolid, HMB) bomlik. Az ABC-FTL szabaddá válik, míg az HMB kovalensen kapcsolódik a D14-hez, és így a "kovalensen kapcsolt intermedier molekula" (CLIM) nevet kapja. Kezdetben azt javasolták, hogy ez a katalitikus reakció megváltoztatja a D14 konformációját, ami elősegíti a D14 interakcióját más komponensekkel a SL jelátvitel útvonalán. A D14 hidroláz aktivitása nagyban függ az erősen konzervált katalitikus szerin/hisztidin/aszpartát jelenlététől. Ezeknek az aminosavaknak a hiánya a D14 aktivitás és az SL iránti érzékenység elvesztését eredményezi. Az SL molekula lebomlásán alapuló SL jel érzékelése korábban ismeretlen volt a fitohormonok világában (Mashiguchi és mtsai., 2021).

2019-ben egy új modell bevezetését javasolták az SL jel érzékelésére. Megfigyelték, a SL és a D14 közötti kölcsönhatás során a receptor olvadáspontjának ( $T_m$ ) csökkentését, amit összefüggésbe hoztak a D14 konformáció változásával. Azt javasolták, hogy nem a D14 hidroláz aktivitása, hanem  $T_m$  csökkenése váltja ki a receptor konformáció változását. Ezt a tényt alátámasztja, hogy GR24 (SL analóg) kezelés hatására a D14  $T_m$ -ja azonnal csökkent és visszaállt a normál hőmérsékletre, míg a hidrolízis folyamata zajlott. Biológiai inaktív SL analóg a debranone jelenlétében a D14 enzimaktivitása alacsony maradt, viszont továbbra is megfigyelhető volt a receptor  $T_m$  eltolódása (Ren és mtsai., 2019).

Shabek kutatócsoportja bebizonyította, hogy az SCF komplex részt vesz a D14 hidrolízisének szabályozásában. Az SCF komplex C-terminális doménjében található  $\alpha$ -hélix két konformációs állapotot képes felvenni: nyitott állapotában megköti a D14-et,

ezzel gátolja az enzimaktivitását, míg zárt állapotában lehetővé teszi a hidrolízis folyamatát (Shabek és mtsai., 2018).

#### **2.2.4. A SL fiziológiai funkciói**

A strigolaktonokat az 1960-as években fedezték fel, mint növényparazita magvak csírázását segítő komponenst. Elsőként a névadó boszorkánygyom (*Stigra lutea*), majd Orobanche és Phelipanche nemzetségek esetén is felfigyeltek ezen tulajdonságára (Cook és mtsai., 1966; Bouwmeester és mtsai., 2003; Xie és mtsai., 2010). A SL-ok gyökér exudátumként a talajba kerülve, mint kémiai jelek segítik a szimbióta kapcsolatok kialakítását arbuskuláris mikorrhiza gombákkal tápanyaghiányos (főként foszfor hiányos) körülmények között. Ebben a kölcsönösen előnyös kapcsolatban a hormon serkenti a gombahifák elágazását, a gomba segíti a gyökér vízfelvételét és az ásványi anyagokhoz való hozzáférést, cserébe pedig, szénhidrátokat kap a növénytől (Akiyama és mtsai., 2005; Besserer és mtsai., 2008; Xie és mtsai., 2010; Cheng és mtsai., 2013; Gutjahr és Parniske, 2013). A strigolaktonokat, mint a növényi fitohormonok egy új osztályát 2008-ban azonosították (Wu és mtsai., 2012). Magasabbrendű növényekben (lúdfű, borsó, paradicsom, petúnia) növekedésszabályzóként gátolja a hajtáselágazást, befolyásolja a szár másodlagos növekedését, a szeneszenciát, részt vesz a biotikus és abiotikus stresszre adott válasz kialakításában. Gyökérmorfológia tekintetében a SL gátolja a járulékos- és oldalgyökéreképződést, serkenti az elsődleges gyökérnövekedést és a gyökérszőrök megnyúlását (Kumar és mtsai., 2019). A gyökérszerkezet kialakítása szigorúan szabályozott folyamatok által megy végbe, több hormon, köztük az auxin, által is. A strigolaktonok szerepet játszanak az auxin bioszintézisének és áramlásának szabályozásában. A strigolaktonok a poláris auxin transzportot biztosító PINNOID (PIN) fehérjék átrendeződésén keresztül megváltoztatják a gyökérfejlődéshez szükséges auxin optimumot. A PIN fehérjék átrendeződése következtében a gyökércsúcsban megemelkedett auxin szint segíti a merisztéma és az átmeneti zóna méretének növekedését, ezáltal növeli a főgyökérhosszt. Hasonló kapcsolat figyelhető meg gyökérszőrök fejlődésének szabályozásában. Továbbá a gyökérszőrök növekedésére az etilén pozitív hatással van akár az auxin szintjének befolyásolása révén is. A megnyúlási zónában az oldalgyökér primordiumok, valamint a járulékos gyökerek fejlődését az auxin-strigolakton kölcsönhatás gátolja azáltal, hogy csökkentik a periciklus auxin



szintjét. A citokininek negatívan befolyásolják az oldalgökér képződést, amelynek oka az auxin transzporttal való interferencia lehet az oldalgökér primordiumokban (Wani és mtsai., 2021).

## **2.3. Karrikinok a növényekben**

### **2.3.1. A KAR-ek szerkezete**

A KAR-ek és a SL-ok szerkezete hasonló, mindkét molekula tartalmaz egy specifikus butenolid laktontípust, ami egy pirán gyűrűhöz kapcsolódik. A KAR-ek kétgyűrűs szerkezetében csak szén, hidrogén és oxigén atomok találhatóak (Flematti és mtsai., 2015). A KAR-ek butenolid gyűrűje a SL-ok D gyűrűjével mutat azonosságot. Az ismert hat KAR közötti különbségeket a metil-csoportok eltérő helyzete okozza (Waters és mtsai., 2012a; Waters és mtsai., 2014). A pirán gyűrűn végzett kisebb módosítások általában csökkentik az aktivitását, ahogyan az is, ha a pirán gyűrűjük telített (Flematti és mtsai., 2010; Scaffidi és mtsai., 2012). A KAR-ek és a SL-ok butenolid része lényeges a biológiai aktivitásuk szempontjából (Fukui és mtsai., 2011).

### **2.3.2. A KAR keletkezés**

A növények helyhez kötött életmódjuk miatt kénytelenek alkalmazkodni a változó környezeti feltételekhez. A tűzveszélynek kitett területeken élő növényfajoknál alkalmazkodást figyeltek meg a tűz által okozott erőforrás csökkentésének következtében. A növényi anyag égetése/égése során keletkező füst pozitív hatással van több mint 1200 növényfaj, 80 különböző nemzetség, köztük az Arabidopsis csírázására is (Chiwocha és mtsai., 2009). Elsőként ezeknél a fajoknál fedezték fel, hogy a füstben és hamuban jelenlévő karrikin nevű bioaktív komponensek fontos szerepet játszanak a nyugalmi állapotban lévő magvak csírázásának aktiválásában (Staden és mtsai., 2000). A karrikinok a növényi anyagok (cellulóz, szénhidrátok) égése vagy hevítése során képződnek (Flematti és mtsai., 2011). A füstben és a hamuban számos KAR található (KAR1-től KAR6-ig jelölve), azonban a KAR1 a legelterjedtebb és biológiailag a legaktívabb (Nelson és mtsai., 2012; Flematti és mtsai., 2009).

### 2.3.3. A KAR jelátvittele

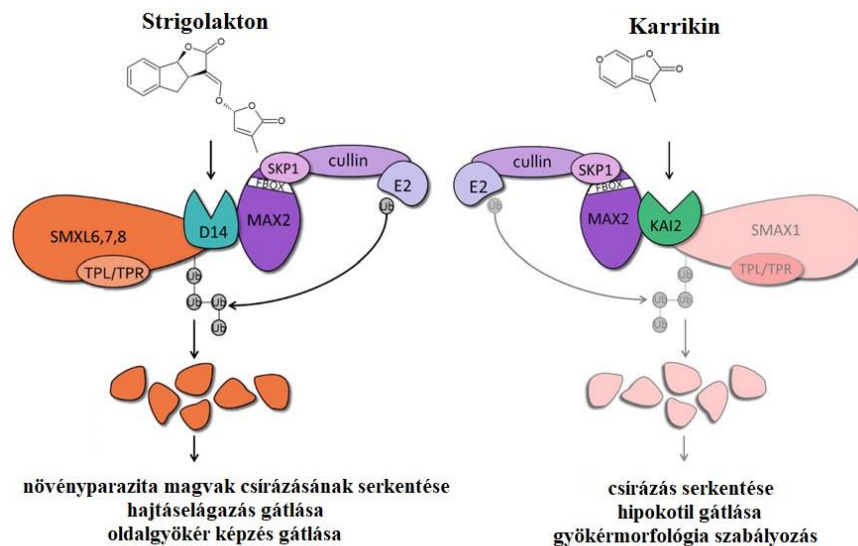
Arabidopsisban két gént azonosítottak, amelyek részt vesznek a KAR jelátvitel kialakításában, a KARRIKIN INSENSITIVE 2/HYPOSENSITIVE TO LIGHT (KAI2/HTL) és a MAX2 (Sun és mtsai., 2022).

A KAI2 receptor a SL D14-hez hasonlóan az  $\alpha/\beta$  hidrolázok családjába tartozik, konzervált katalitikus triáddal rendelkezik, amely a szerin-hisztidin-aszparaginsav aminosavak hidrolitikus enzimekre jellemző kombinációja. A KAI2 jelátvitel módja kevésbé világos, mint a D14 jelátvitel. A hidrofób zseb, amelyben a katalitikus triád található, kisebb, mint a D14-nél, ami arra utal, hogy kisebb molekulák kötődhetnek hozzá. A KAR kémiai tulajdonságai miatt nem számítunk a hidrolízisére, azonban, éppen úgy, mint a D14 esetében, a KAI2-nek is szüksége van a katalitikus triádra a funkciójához. A KAI2 elsősorban magokban és csíranövényekben fejeződik ki, de kifejezett növényekben is jelen van. Magokban a KAI2 transzkript szintje akár 100-szor nagyobb lehet, mint a D14-é, ami lehetővé teszi a KAI2 domináns szerepét. Ezzel szemben a csíranövényekben a D14 kifejeződése enyhén magasabb, mint a KAI2-é, ami azt jelzi, hogy a későbbi fejlődési szakaszokban, mint például a virágzás és a rügyek növekedése, a D14 a dominánsabb (De Cuyper és mtsai., 2017). Evolúciós szempontból úgy vélik, hogy a KAI2 ősi, hiszen már a Charophyte zöldség és a mohák (máj- és szarvasmohák) is legalább egy KAI2 homológot tartalmaznak. A D14 csak a magas növényekben található, ami azt sugallja, hogy a D14 valószínűleg egy gén-duplikáció eredménye. Annak ellenére, hogy a KAI2 és a D14 hasonlóságot mutatnak szerkezetük és funkciójuk tekintetében, eltérő szerepet játszanak a növényi fejlődésben és a hormonális jelátvitelben (Wang és mtsai., 2022). A filogenetikai elemzés azt mutatja, hogy a D14/KAI2 fehérjecs család a szárazföldi növényekben két ősi ágból, az eu-KAI2-ből és a DDK-ből származik. Az eu-KAI2 fehérjék konzervált szerkezettel rendelkeznek a májmohák DDK ágában és a szárazföldi növényekben. Általánosan feltételezik, hogy az eu-KAI2 fő szerepe egy jelenleg ismeretlen endogén KAI2-ligand (KL) érzékelése, és a KAR érzékelése "felkapaszkodott" ezen az útvonalon, amikor előnyösé vált a füstvegyületek észlelése. A SL érzékelésének egyik lehetséges magyarázata a mohák DDK ágának evolúciós fejlődése. A maghéjas növényekben a DDK duplikációját követően két ág alakult ki. Az elsőbe a kanonikus D14 típusú SL-ok (D14-LIKE, DLK), DLK4 fehérjék, a másodikba a DLK2 és DLK3 fehérjék tartoznak. Arabidopsisban csak a DLK2-t tanulmányozták, melynek eredményei nem egyértelműek, de úgy tűnik, hogy

a DLK2 és DLK3 receptorok egy új jellegű molekulához tartoznak, azonban azt sem lehet kizárni, hogy SL receptorokként is működnek (Machin és mtsai., 2020).

Bár a SL-nak és a KAR-nek eltérő az eredetük, rendkívül hasonló érzékelési és jelátviteli komponenseken osztoznak, ideértve a MAX2-t. A KAI2 és a MAX2 fehérje közötti kölcsönhatás során a szupresszor SMXL fehérjék lebontásra kerülnek. Ennek eredményeként a KAR jelátviteli transzkripciós faktorok szabadulnak fel. Arabidopsisban az SMXL fehérjék nagyjából 1000 aminosavból állnak és nyolc családra oszthatóak. A különböző SMXL tagok eltérő specifitással és aktivitással rendelkeznek, amelyek funkcionális megkülönböztetést végeznek a SL és KAR között. A SMXL1/2 a karrikin, a SMXL6/7/8 a strigolakton jelátvitelt közvetítik. Azonban a legújabb kutatások azt feltételezik, hogy az SMXL2 Arabidopsisban mindkét jelátviteli útvonalban részt vesz. Az SMXL3/4/5 fehérjék a floém fejlődésében vesznek részt, függetlenül a strigolakton és a karrikin jelenlététől. A karrikin és a SL mellett számos más növényi hormon, köztük az auxin, a gibberellin vagy a jázmonátok is az F-box fehérjéken keresztül szabályozzák a jelátviteli útjaikat (Machin és mtsai., 2020)

A KAI2 és a D14 párhuzamos jelátviteli útvonalon, az F-box protein MAX2-n és az SMXL család különböző tagjainak szabályzásán keresztül eltérő növekedési folyamatokat irányítanak (4.ábra).



**4. ábra:** a strigolakton és a karrikin jelátviteli útvonalát mutatja be (De Cuyper és mtsai., 2017 alapján). A strigolakton érzékelésében a D14 (DWARF14), a karrikinében a KAI2 (KARRIKIN INSENSITIVE 2) receptorok vesznek részt. Mindkét molekula esetén a MAX2 (MORE AXILLARY GROWTH 2) SKP1-CULLIN-F-BOX ubikvitin (Ub) ligáz komplex vesz részt a SMAX-LIKE/SMLX (SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH) represszor család különböző tagjainak a lebontásában.

### 2.3.4. A KAR-ek fiziológiai funkciói

A karrikinek, akár önmagukban, akár a strigolaktonnal együttműködve, befolyásolják a növények fejlődését és növekedését. Korábban a SL-nak tulajdonított néhány gyökérmorfológiai tulajdonság valójában a KAR-ek által szabályozódik, vagy pedig a kettőjük kölcsönhatása révén jön létre. A legfrissebb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a KAI2 finomra hangolja a gyökérfejlődést azáltal, hogy szabályozza az auxin és etilén szinteket. A KAI2 elégtelen működése oldalgyökérnövekedéshez és gyökérszörképződés csökkenéséhez vezet lúdfű csíranövényben (Hamon-Josse és mtsai., 2022). A legtöbb tanulmány a KAR-ek és a gyökérszörök közötti kapcsolatot vizsgálja. Villaécija-Aguilar és munkatársai megállapították, hogy a KAI2 mellett a MAX2 is szükséges a gyökérször növekedéséhez elegendő foszfátszint mellett. A *kai2* és a *max2* mutánsok rövidebb gyökérszörének kialakításához az auxin áramlásában, valamint az etilén bioszintézisben és jelátvitelben résztvevő gének fokozott expressziója járult hozzá. Azonban *d14* SL receptor mutánsnál ezek a morfológiai és molekuláris változások nem következtek be, ami arra utal, hogy a SL jelzés nem vesz részt a folyamatban (Villaécija-Aguilar és mtsai., 2022). Lúdfű mellett lóbabban is leírták a KAR közvetített jelátvitel és az etilén bioszintézis közötti kapcsolatot a gyökérfejlődés során. Lóbab *smax1* mutáns vonala rövidebb főgyökérrel, hosszabb gyökérszörrel és magasabb etilén szinttel rendelkezik, mint a vad típus. Lúdfű *smax1/smx12* dupla mutánsa szintén rövidebb főgyökérrel és hosszabb gyökérszörrel rendelkezik. Mindkét növényvonalban megfigyelhető a KAR/KL jelátvitel utáni etilén szint emelkedése (Carbonnel és mtsai., 2020).

## 2.4. Cink: az esszenciális nyomelem

### 2.4.1. A Zn előfordulása a talajban

A cink elsősorban geokémiai és pedokémiai bomlási folyamatok során jut a talajba olyan kőzetekből, amelyek cink-oxidokat, szulfátokat, szulfidokat, karbonátokat, szilikátokat és foszfátokat tartalmaznak. A Zn mennyisége a talajban több tényezőtől is függ, például a talaj típusától, az időjárástól, az éghajlattól, valamint a talajképződést befolyásoló domináns tényezőktől (Saeed és Fox, 1977). Ezen felül a Zn-források közé

tartoznak a légköri folyamatok (bozóttüzek, vulkáni tevékenységek), élőlények bomlása, levélfelszínről való lemosódás, valamint az emberi tevékenységek (Sturikova és mtsai., 2018).

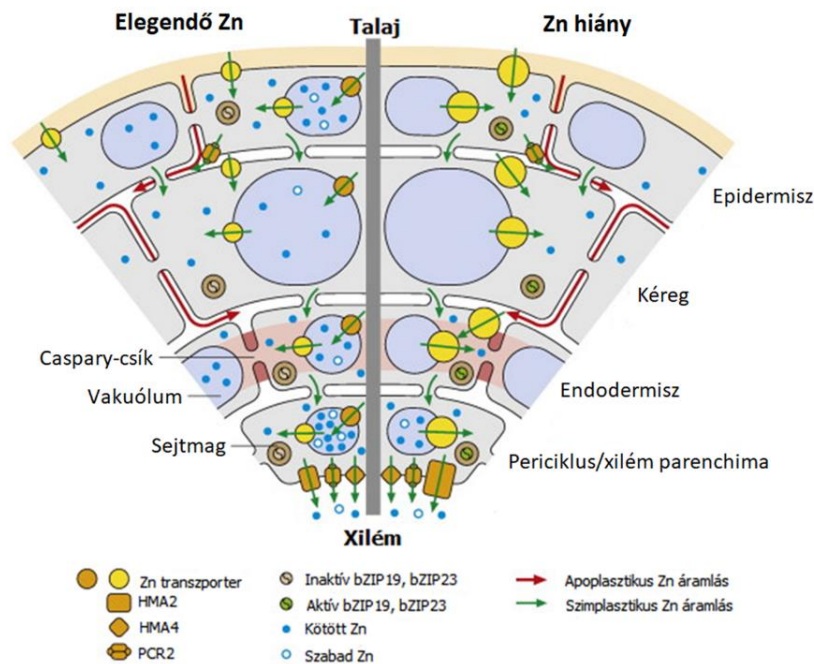
A talaj cinkje három formában fordul elő: (1) vízoldható kationként ( $Zn^{2+}$ ), amely szerves anyagokhoz is kötődhet; (2) cserélhető formában, amikor az agyagtartalmú kolloidokra, huminokra, valamint alumínium és vas hidroxidokra tapad; (3) oldhatatlan komplexek és ásványok formájában (Babula és mtsai., 2010; Montalvo és mtsai., 2016). A Zn növények számára való elérhetőségét befolyásoló egyéb tényezők közé tartozik például a talaj agyagtartalma, pH-ja, a talajban található szerves anyagok aránya, a kalcium-karbonát tartalma, a rizoszférában jelen lévő mikroorganizmusok aktivitása, a talajnedvesség, a foszfor és a nitrogén koncentrációja, valamint az éghajlati feltételek. A cink eloszlását és elérhetőségét a növények számára leginkább a talaj pH-értéke határozza meg, mivel ez befolyásolja a Zn-ionok mozgékonyosságát (Sturikova és mtsai., 2018). Az optimális Zn-elérhetőség 5-6 pH-jú talajokon van a növények számára (Hafeez és mtsai., 2013). A pH 7,5 feletti értékek esetén a Zn-elérhetősége gyorsan csökken, amely a Zn-formájának változásával függ össze a talajoldatban (Cao és mtsai., 2004). A cink hiánya jellemzően lúgos, meszes, homokos, tőzezes, magas foszfor- és szilíciumtartalmú talajok esetén jelentkezik (Alloway, 2004; 2008a). Ezekre a talajokra jellemző, hogy a Zn szorosan kötődik a talajban található kalcium-karbonáthoz amivel oldhatatlan formát képez. Az okok között, amelyek felelősek lehetnek a Zn-hiány előfordulásának növekedéséért, szerepelnek a magas terméshozamok elérése érdekében alkalmazott intenzív vetésforgók, szerves trágyák helyett alkalmazott műtrágyák, különösen a foszfátrágyák túlzott használata, amely foszfor-indukálta Zn-hiányhoz vezethet, valamint a rossz minőségű öntözővíz (Das és Green, 2016).

Magyarországon a talajok Zn-ellátottsága nemzetközi viszonylatban gyenge, a vizsgált talajok 46%-a cinkben szegény. A Zn-hiányos területek főként az ország északnyugat-délkeleti átlóján helyezkednek el, különösen Békés és Fejér megyékben, amelyek az ország legfontosabb kukoricatermő területei közé tartoznak. A talajtípusok szerinti eloszlás alapján a homoktalajok általában 30 mg/kg körüli, az erdőtalajok 70-115 mg/kg a csernozjomtalajok 120-150 mg/kg Zn-tartalommal rendelkeznek (<https://www.agronaplo.hu/szakfolyoirat/2009/03/szantofold/magyarorszag-talajainak-zn-ellatottsagaa-visszapotlas-lehetosegei>).

#### 2.4.2. A Zn felvétele a talajból

A növények számára elérhető össz Zn-szint a talajoldatoknak csak nagyon kis részét (<1 mg/kg) képezi (Kabata-Pendias, 2000). A gyökerek elsősorban  $Zn^{2+}$  ionok vagy szerves savakkal alkotott komplex formájában veszik fel a Zn-et a talajoldatból (Palmgren és mtsai., 2008), majd a xilémen keresztül szállítják a növény föld feletti részeibe. A talajból történő cinkfelvételt a ZIP (cink szabályozó transzporter (ZRT) -vas szabályozó transzporterhez (IRT) hasonló fehérje) fehérjecsalád transzporterei közvetítik, amelyeket rizs, árpa (*Hordeum vulgare*) és lúdfű esetében azonosítottak (Milner és mtsai., 2013; Bashir és mtsai., 2013; Tiong és mtsai., 2014). Ezek a transzporterek a sejtek plazmamembránjában, a központi hengerben és a tonoplastban helyezkednek el. A ZIP fehérjék széles körben megtalálhatóak az élőlényekben, nemcsak növényekben, hanem protozoákban, gombákban, gerinctelen és gerinces állatokban is. A ZIP fehérjék általában 322 és 478 aminosavból állnak, akár 6-9 transzmembrán domént is tartalmazhatnak, de legáltalánosabb a 8. Változatosságuk a III. és IV. transzmembrán domének közötti aminosavak számából ered, ezt a szakaszt „változó régió”-nak nevezik. Ebben a régiójában az IRT1, IRT2, ZIP1, ZIP4, ZRT1 és ZRT2 több hisztidint tartalmaz. Ezzel ellentétben a ZIP2 és ZIP3 csak egyetlen egyet. Lúdfűben az *AtZIP1*, *AtZIP3* és *AtZIP4* kifejeződése specifikus Zn-hiányra adott válaszként. *AtZIP1* és *AtZIP3* a gyökérben, a *AtZIP4* gén mind a hajtásokban, mind a gyökérben indukálódik, ha nem megfelelő a Zn-ellátottság (Ajeesh Krishna és mtsai., 2020). A cink transzportja a rizodermás és kortikális sejtekből a xilémben specializált fehérje transzporterek, a HMA2 és HMA4 (nehézfém-ATPáz) segítségével történik. Ezek a fehérjék a vaszkuláris köteg sejteinek plazmamembránján helyezkednek el, mind a gyökérben, mind a hajtásban (Hussain és mtsai., 2004). Lúdfű esetében a növényi kadmiumrezisztencia (PCR) transzporter családból származó *AtPCR2* részt vesz a cink gyökér-hajtás transzlokációjában (Song és mtsai., 2010). A cink kationként az apoplastikus útvonalon keresztül is szállítható olyan területeken, ahol a Caspary-csíkos endodermisz nem fejlődött ki teljesen (White és mtsai., 2002). Arabidopsisban két fém tolerancia fehérje (MTP) az *AtMTP1* és az *AtMTP3* vesz részt a Zn vakuólumba történő szállításában és tárolásában (Desbrosses-Fonrouge és mtsai., 2005; Arrivault és mtsai., 2006; Kawachi, és mtsai., 2009). A Zn-ionok transzportja a hajtáson keresztül az asszimilációs szervbe (főként a magokba) a floémában történik (Deinlein és mtsai., 2012). A floém enyhén lúgos kémhatású, ezért a Zn leggyakrabban fémkelátorként

funkcionáló nikotinaminhoz kötődve szállítódik benne (Curie és mtsai., 2009; Nishiyama és mtsai., 2012). A föld feletti növényi részben a cink részben az idősebb levelekből a fejlődő növényi szervekbe tevődik át (Nishiyama és mtsai., 2012). A növények képesek a cinkformákat a leveleken (kutikulán, sztómán) keresztül is felvenni, azonban ennek a mechanizmusa még nem teljesen ismert (Fernández és Brown, 2013) (5. ábra).



**5. ábra:** az ábrán egy elégséges elátottságú (bal oldali) és egy cinkmentes (jobb oldali) gyökér keresztmetszete látható a cink áramlásának útvonalaival a talajoldatból a xilémig a folyamatban résztvevő transzporterekkel együtt (Sinclair és Krämer, 2012).

### 2.4.3. A Zn szerepe a növényekben

A cink a 17 alapvető elem egyike, amelyek nélkülözhetetlenek a növények normális növekedéséhez és fejlődéséhez. Ellentétben más átmeneti fémionokkal, mint például a réz és a vas, nem megy át redox reakciókon a sejtekben annak köszönhetően, hogy telített d elektronalhéjjal rendelkezik (Auld és Bergman, 2008). Ezért nagyrészt divalens kationként viselkedik a sejtekben és erős tendenciát mutat stabil tetraédres komplexek kialakítására, leggyakrabban nitrogén, oxigén vagy kén csoportokkal (Leuci és mtsai., 2020). Az egyetlen olyan fém, amely több mint 300 enzim kofaktora (Rink, 2000), például az alkohol-dehidrogenáznak (EC 1.1.1.1), szuperoxid-diszmutáznak (EC

1.15.1.1), szénsav-anhidráznak (EC 4.2.1.1) és RNS polimeráznak (EC 2.7.7.6), amellett, hogy szerkezeti, katalitikus és szabályzó funkciót is ellát. Olyan enzimek és fehérjék szerkezeti stabilitásában és/vagy szabályzásában játszik szerepet, amelyek főként a szénhidrát-anyagcserével, a fotoszintézissel, a cukrok keményítővé történő átalakításával, a fehérje és auxin anyagcserével, a pollenképződéssel, a biológiai membránok integritásának fenntartásával és bizonyos kórokozók okozta fertőzésekkel szembeni ellenálló képességben vesznek részt (Das és Green, 2016). A növények génexpressziójának szabályzásának és fenntartásának köszönhetően alakul ki a növények környezeti stresszhez való toleranciája, ami cinkfüggő (Cakmak, 2000).

#### **2.4.4. A Zn hiánytünetek a növényekben**

Az optimálisnál (30-200  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$  száraz tömeg) (Marschner, 2012) alacsonyabb vagy magasabb cinkbevitel, hasonlóan más mikrotápanyagokhoz, hiány- vagy mérgezési szimptomákat okoz. A Zn-hiány a talajokban és növényekben a leggyakoribb mikrotápanyag hiány.

A növények Zn-hiánya lassítja a fotoszintézist és a nitrogén anyagcserét, csökkenti a triptofán szintézisét, a virágzást és a gyümölcsfejlődést, meghosszabbítja a növekedési időszakot, ami késleltetett éréshez vezet; csökkenti a terméshozamot és rontja a termék minőségét, valamint az tápanyagok szuboptimális felhasználásához vezet. Látható tünetei közé tartozik a világoszöld, sárga vagy kifakult foltok megjelenése az idősebb levelek erei között, valamint a fiatal levelek kisebb mérete. Súlyosabb esetekben az internodális távolság olyannyira lerövidül, hogy úgy tűnik, mintha az összes levél ugyanabból a pontból nőne ki (Das és Green, 2016). Jelentősen befolyásolja a gyökérrendszert, beleértve annak fejlődését és a talajból való víz- és tápanyagfelvételt (Fageria, 2004). A Zn-hiányos növények nem növekednek jól, gyengék, kókadtt megjelenésűek, rövid és vékony szárúak.

#### **2.4.5. A Zn-hiány embereknél**

Becslések szerint körülbelül a megművelt talajok egyharmada alacsony mennyiségű cinket tartalmaz világszerte, ami a növénytermesztés és a betakarított gabonák tápanyagminőségének romlását eredményezi (Alloway, 2008b; Cakmak,



2008). Szoros földrajzi átfedés figyelhető meg a cinkhiányos talajok és az emberek cinkhiányos állapota között különösen a fejlődő országok esetében. A világ lakosságának mintegy egynegyedét érinti. A cink jelen van minden testrészben, magába foglalva a szerveket, szöveteket, csontokat, folyadékokat és sejteket is. Egy átlagos felnőtt testben 2-3 gramm Zn található (Das és Green, 2016). Az ajánlott napi cinkbevitel az étrendünk során 15 mg/nap. A cink az emberi egészség szempontjából olyan alapvető fontosságú elem, hogy még enyhe hiánya is tüneteket okozhat. Általános tünetek közé sorolják az étvágytalanságot, az ízérzékelés és a szaglás elvesztését, a töredezett körmöket, a száraz viszketű bőrt, a hajhullást és az immunrendszer védekezőképességének csökkenését. (Keen és Gershwin, 1990; Tapiero és Tew, 2003). Terhes nőknél csökkentheti a magzat agysejtjeinek a számát, ezáltal befolyásolja a magzat fejlődését. Felnőtt férfiaknál prosztatamegnagyobbodáshoz vezethet, ami kihat a reprodukív funkcióra és a termékenységre. Csecsemőknél és kisgyermeknél számos tünetet okozhat, többek között hasmenést, tüdőgyulladást, alacsony növekedést, gyenge immunrendszert, visszamaradott mentális fejlődést, törpe növekedést, károsodott kognitív funkciókat, viselkedési problémákat, memóriazavarokat, problémákat a térbeli tanulással, valamint neuronális atrófiát. (Bhowmik és mtsai., 2010).

A cink malnutrició (tápanyaghiány) lehetséges megoldása lehet az étrendkiegészítés, az ételmiszer-dúsítás vagy a biofortifikáció, amely során a növényfajták tápanyagtartalmát nemesítéssel, génmódosítással vagy agronómiai gyakorlatokkal növelik (Das és Green, 2016).

#### **2.4.6. A szuboptimális Zn-ellátottsághoz való növényi alkalmazkodás**

A növények számos mechanizmussal rendelkeznek annak érdekében, hogy alkalmazkodni tudjanak a talaj alacsony Zn-ellátottságához a Zn-szint sejten belüli optimalizálása révén. Fitogenetikai elemzések, arra utalnak, hogy a Zn-hiány válasz evolúciósan konzerválódott a szárazföldi növények között, valószínűleg a talaj cink elérhetőségének változásaira válaszolva (Castro és mtsai., 2017).

A Zn-hiány válaszában molekuláris mechanizmusával kapcsolatos legújabb kutatások azt mutatják, hogy bZIP családon belül az F-csoportba tartozó bZIP19 és bZIP23 transzkripciós faktorok közvetlenül képesek a Zn-ionhoz kapcsolódni, ezáltal a Zn intracelluláris érzékelőjeként és a Zn-hiány válasz központi szabályozójaként funkcionálnak lúdfű modellorganizmusban. Ezeket a transzkripciós faktorokat egy 40-

80 aminosavból álló konzervált bZIP (leucin cipzár) tartomány jellemez, amellyel dimerként specifikus DNS szekvenciákkal kapcsolódnak, valamint egy ciszteinben és hisztidinben gazdag motívum, amellyel közvetlenül képesek a  $Zn^{2+}$  ionokat kötni. Ezt a régiót Cink Érzékelő Motívumnak (ZSM) nevezték el és 69%-os aminosav azonosságot mutat a bZIP19 és 23 között. *In vitro* fehérje kötési vizsgálatokkal kimutatták, hogy a bZIP19/23 két cinkiont képes kötni. A Zn kötődése ZSM szakaszhoz váltja ki a szükséges konformációs változást annak érdekében, hogy elindítsa a Zn érzékelésének a mechanizmusát és leállítsa a transzkripció aktivitást (Lilay és mtsai., 2021; Assunção, 2022).

Cinkhiány esetében a bZIP19/23 olyan célgéneket fognak aktiválni, amelyek a Zn homeosztázisában, felvételében, szállításában és elosztásában töltenek be szerepet. A bZIP19/23 a célgén promóterén elhelyezkedő 10 bázispárból álló nem tökéletes palindrom szekvenciához, az úgynevezett cisz-regulációs elem Zinc Deficiency Response Element-hez (ZDRE) kapcsolódva indítják el azok transzkripcionális aktivitását. Arabidopsisban a bZIP19/23 célgénjeinek száma kevesebb mint 20, ide tartozik pl. a ZIP transzporterek közül a *AtZIP1/3/4/5/9/10/12*, *AtIRT3*, valamint a nikotinamin szintéziséért felelős nikotinamin-szintáz (NAS) *AtNAS2/4* (Lilay és mtsai., 2021; Assunção, 2022). A *bzip19/23* kettős mutánsokban a vad típushoz képest felére csökkent ezeknek a célgéneknél a száma elegendő vagy túlzott cinkellátás mellett, ami megerősíti azt a tényt, hogy a bZIP19 és bZIP23 szerepe kifejezetten a cinkhiány válaszhoz kötődik. Arabidopsisban a *bZIP19/23* kifejeződése nem mutat átfedést egymással, *bZIP19* főként a gyökerekben expresszálódik, míg a *bZIP23* a hajtásban (Lilay és mtsai., 2019). Ennek lehetséges magyarázata a részleges redundancia lehet, a *bzip19/23* kettős mutánsok hipreszenzitív fenotípust mutatnak Zn-hiányra és nem tudnak megbirkózni a Zn-hiány okozta stresszel. A *bzip19* mutáns enyhébb fenotípus változást mutat, mint a kettős mutáns, még a *bzip23* vad típuszerű fenotípussal rendelkezik. A *bZIP19* és *bZIP23* gének kifejeződési mintázata Zn-hiány alatt *bzip19* mutáns növényekben a *bzip19/23*-mal, a *bzip23* növények a vad típussal mutatnak hasonlóságot, valamint látszólagos átfedés figyelhető meg a célgén mintázatával. Ez utalhat arra, hogy a *bZIP19* és *bZIP23* géneknél eltérő szerepük van a Zn-hiányos stressz kezelésében. Arabidopsisban a *bZIP19* és *bZIP23* minden bizonnyal génpárokat, homodimereket képeznek, amelyek az Arabidopsis genom szegmentális duplikációból származnak (Corrêa és mtsai., 2008.; Assunção és mtsai., 2010).

A növények valószínűleg sejtszinten a magban (Lilay és mtsai., 2021), szervszinten elsőként a hajtásban észlelik a Zn-hiányt, ahonnan egy feltételezett rendszerszintű cinkhiány jelzés ered a gyökérbe és aktiválja a cinkhiányos válaszreakciókat, a bZIP19 és bZIP23 aktiválásán keresztül (Sinclair és Krämer, 2012).

### 3. Hipotézis és célok

**Hipotézis 1:** A nitrogén-monoxid, a strigolaktonok és a karrikinek a növényi gyökérfejlődést szabályzó bioaktív szignálmolekulák. Irodalmi adatok alapján feltételeztük szignálkapcsolat meglétét a NO, SL és KAR között *Arabidopsis* gyökerében, ezért kísérleteink ennek vizsgálatára fókuszáltak. A munkám során *Arabidopsis thaliana* vad típusát (Col-0), GSNOR enzimben hiányos (*gsnor1-3*), ezt az enzimet túltermelő (*35S::FLAG-GSNOR1*), SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1,d14*), KAR jelátvitelben (*htl-3, smax1/smxl2*), valamint KAR és SL receptor kettős mutáns (*htl-3/d14*) 7 napos csíranövényeket használtam. A kísérleti rendszeremet farmakológiai eljárásokkal egészítettem ki, így stresszmentes körülmények mellett GSNOR enzimben mutáns vonalak esetén *rac*-GR24 SL analógot és TIS108 SL inhibitor kezelést alkalmaztam, valamint az SL mutáns növényeket GSNO NO donorral és cPTIO NO gyökfógóval kezeltem.

A genetikai és farmakológiai megközelítést alkalmazó kísérleti rendszerrel céltom volt az alábbi kérdések megválaszolása:

1. Stresszmentes körülmények között megfigyelhetők-e különbségek a gyökérzet szerkezetében vad típusú, GSNOR mutáns, illetve strigolakton bioszintézisben és jelátvitelben hibás lúdfüben? Van-e eltérés az említett növényvonalak NO és SNO szintjeiben? Ha igen, mi állhat ennek a hátterében?
2. Hogyan hat a SL analóg és SL inhibitor kezelés a vad típusú és GSNOR enzimben mutáns csíranövények gyökérszerkezetére, valamint vad típusban az NO-függő gének expressziójára, és a GSNOR enzim mennyiségére?
3. Milyen változásokat idéz elő a NO donor és a NO gyökfógó kezelés a *max* mutánsok gyökérarchitektúrájában? A fenti kezelések okoznak-e változásokat az SL-függő gének expressziójában Col-0-ban?
4. Hogyan alakul a KAR-specifikus mutáns vonalak NO szintje? Lehetnek-e célpontjai az *S*-nitrozilációnak KAR jelátviteli fehérjék?

**Hipotézis 2:** A NO jelátvitel kulcsszabályozója a GSNOR enzim, mely Zn-ionokat igényel a katalitikus aktivitásához. Ez alapján a hipotézisünk az volt, hogy az elégtelen Zn-ellátás hatást gyakorol az enzim működésére. Munkám során *Arabidopsis thaliana* vad típusának (Col-0) és a GSNOR enzimet túltermelő (*35S::FLAG-GSNOR1*) transzgenikus vonalának a segítségével tanulmányoztam kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) táptalajon nevelt egyhetes növények Zn megvonásának hatását a GSNOR közvetített NO jelátvitelre.

Kísérleteim során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Kimutatható-e egy hét elteltével a cinkhiány az *Arabidopsis* vonalakban szövet- és szervszinteken?
2. A korlátozott cinkelés befolyásolja-e a növényvonalak GSNOR enzim mennyiségét, expresszióját és aktivitását?
3. Hogyan módosul a reaktív nitrogén,- és oxigénformák szintje és a fehérjenitráció a Zn-megvonás hatására?
4. Okoz-e változást a gyökérrendszer morfológiájában az optimálisnál alacsonyabb Zn hozzáférés? Ha igen, mi állhat a háttérben?

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált növényvonalak és nevelési körülmények 1

Felhasznált növényvonalak				
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (Somssich, 2019)	<i>Columbia</i> , Col-0	vad típus
NO mutánsok	<i>gsnor1-3</i> (Chen és mtsai., 2009)		GSNOR hiányos	T-DNS inszerciós mutáns (KO)
	<i>35S::FLAG-GSNORI</i> (Frunghillo és mtsai., 2014)		GSNOR túltermelő	Gateway transzformálással előállított transzgenikus vonal (KD)
SL mutánsok	<i>max1-1</i> (Stimberg és mtsai., 2002)		bioszintézis hibás	pontmutáns (citozin cseréje timin aminosavra) (KD)
	<i>max2-1</i> (Stimberg és mtsai., 2002)		jelátvitel hibás	pontmutáns (aszpartát aminosav cseréje aszparaginra 581-es pozícióban) (KD)
	<i>d14</i> (Waters és mtsai., 2012b)		receptor hibás	T-DNS inszerciós mutáns (KD)
KAR mutánsok	<i>htl-3</i> (Sun és Ni., 2011)		receptor hibás	deléciós mutáns (15 bp kiesése a KAI2/HTL génben) (KD)
	<i>smax1/smx12</i> (Stanga és mtsai., 2016)		jelátvitel hibás	T-DNS inszerciós mutáns (KD)
KAR/SL mutáns	<i>htl-3/d14</i> (Toh és mtsai., 2014)		dupla receptor hibás	T-DNS inszerciós mutáns (KD)

1. táblázat: A kísérleteim első felében felhasznált növényvonalakat foglalja össze. A mutációk jelölése:

KO=knock out, KD=knock down.

A *gsnor1-3* és *35S::FLAG-GSNORI* magokat Christian Lindermayr (Helmholtz Centrum, München, Németország), a SL és KAR mutáns magokat Soós Vilmos

(Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásárhely, Magyarország) biztosította.

A magokat steril fülke alatt 1 percig 70% (v/v) etanollal öblítettem, majd 15 percig 30%-os nátrium-hipoklorit oldattal (tömény hipó + desztillált víz, 1:3) sterilizáltam. Ezután a magokat ötször átmostam desztillált vízzel és feles erősségű (fele mennyiségű Duchefa port tartalmazó) Murashige-Skoog (MS) (Duchefa Biochemie, katalógus szám: M0222, Haarlem, Hollandia) táptalajra (1% szacharóz és 0,8% agar) raktam ki (Murashige és Skoog, 1962). Petri-csészénként körülbelül 30 magot helyeztem a táptalajra. Ültetés után a magokat tartalmazó szögletes műanyag Petri-csészéket növénynevelőbe helyeztem, ahol 1 napig horizontális, 6 napig vertikális helyzetben ellenőrzött körülmények között ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson, 12-12 óras nappali és sötét periódussal, 55-60 % páratartalom mellett,  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten) tartottam őket. A mintavétel a hetedik napon történt.

#### 4.2. Alkalmazott kezelések

Kísérleteim során *rac*-GR24 (SL analóg), TIS108 (SL inhibitor), GSNO (NO donor) és 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid (cPTIO) (NO gyökfogó) kezeléseket alkalmaztam. A *rac*-GR24 törzsoldatot acetonban, a TIS108, GSNO és cPTIO oldatokat dimetil-szulfoxidban (DMSO-ban) oldottam fel. A  $2 \mu\text{M}$ -os *rac*-GR24-et és az  $5 \mu\text{M}$ -os TIS108-at (Chiralix B.V., Nijmegen, Hollandia) steril szűrő és fecskendő használatával adtam hozzá a még meg nem szilárdult táptalajhoz. A GSNO és cPTIO (Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, USA) törzsoldatokat desztillált vízzel hígítottam ki az általam használt  $250 \mu\text{M}$ -os GSNO és  $800 \mu\text{M}$ -os cPTIO koncentrációkra. A magkirakást követő 4. napon, steril fülke alatt, 2 ml-es steril fecskendővel és szűrővel 1 ml NO donor vagy gyökfogó oldatot csöpögtettem egyenletesen az agar felszínére a gyökérrendszer elhelyezkedésénél.

#### Felhasznált növényvonalak és nevelési körülmények 2

Kísérletem második feléhez *Arabidopsis thaliana* vad típusa és *35S::FLAG-GSNORI* vonala mellett, a hormonszintek kimutatásához  $\beta$ -glükuronidáz (GUS)

promóterrel ellátott *ACS8::GUS/GFP* (Tsuchisaka és Theologis., 2004), *ARR5::GUS* (D'Agostino és mtsai., 2000) és *DR5::GUS* (Ulmasov és mtsai., 1997) transzgenikus vonalakat használtam fel (Col-0 háttérben). *Cycb1::GFP* (Potuschak és Doerner, 2001) növényt a sejtosztódás nyomonkövetésére alkalmaztam.

Az *ACS8::GUS/GFP*, *ARR5::GUS*, *DR5::GUS* magokat a Nottingham Arabidopsis Stock Centre-től (NASC) rendeltük.

A magok sterilizálását a már említett módon végeztem el. A táptalaj elkészítéséhez külön mikroelem, makroelem, vas-EDTA, kalcium-klorid, kálium-jodid és vitamin törzsoldatokat állítottam össze Murashige és Skoog receptje alapján feles erősségben. Háromféle mikroelem törzsoldatot készítettem el. A kontroll táptalaj elkészítéséhez használt mikroelemtörzs 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ -ot tartalmazott, az enyhe cinkhiányos táptalajhoz (Zn/10) használt mikroelemtörzs 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ -ot, a cinkmentes táptalaj (Zn/0) összeállításához használt mikroelemtörzshöz nem adtam  $\text{ZnSO}_4$ -ot (0  $\mu\text{M}$ ). A táptalajhoz tartozó törzsoldatok protokollját a 2. melléklet foglalja össze. A táptalaj 1% szacharózt és 0,8% agart tartalmazott a törzsoldatok mellett.

A táptalajhoz használt bakterológiai agart 10 mM-os (pH 7,5) etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) oldattal való mosásnak vettem alá annak érdekében, hogy az agarban előforduló cinket eltávolítsam. Három napon keresztül, napi egyszer cseréltem ki az oldatot. A harmadik mosást követően az EDTA-s oldatot ioncserélt vízre váltottam és 1 napig állni hagytam benne az agart. A rákövetkező napon 20 percnként háromszor mostam ioncserélt vízzel. A harmadik mosás után szőlőprés zacskó segítségével a lehető legtöbb vizet kiperéselve az agarból elszívófülke alatt tálcára helyeztem és hagytam teljesen kiszáradni, ami körülbelül 3 napot vett igénybe (Bernal és mtsai., 2012; Sinclair és Kramel, 2020).

A növények a már említett módon és körülmények között nevelkedtek 7 napon keresztül.

### 4.3. Morfológiai mérések

Lúdfű csíranövények főgyökérhosszát (FGY) manuálisan, vonalzóval mértem meg, és az értékeket milliméterben (mm) adtam meg. Az oldalgyökér (OGY) primordiumokat



(kiseb, mint 7. stádium) és a már szabad szemmel is látható kifejlett oldalgyökereket (nagyobb, mint 7. stádium, Malamy és Benfey, 1997; Feigl és mtsai., 2019) fénymikroszkóp alatt számoltam meg. Az oldalgyökér denzitás (oldalgyökérszám  $\text{mm}^{-1}$ ) számításához az oldalgyökerek teljes számát elosztottam a főgyökér hosszával. Három biológiai ismétlést végeztem, kísérletenként 20 növényel ( $n=60$ ).

#### **4.4. Fluoreszcens mikroszkópia**

##### **4.4.1. A gyökér életképességének, sejtsztódásának és cinkszintjének detektálása**

A gyökérmerisztéma sejtek életképességét fluoreszcein-diacetát (FDA) (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: F1303, Waltham, Massachusetts, USA) 10  $\mu\text{M}$ -os festékoldatával vizsgáltam. Az FDA festéktörzset MES/KCL (2-N-morfolin-etánszulfonsav/kálium-klorid) pufferben hígítottam ki. A gyökerek szobahőmérsékleten, sötétben 30 percen keresztül inkubálódtak a festékoldatban. Tárgylemezre helyezésük előtt kétszer mostam a csíranövényeket MES/KCL pufferrel (10/50 mM, pH 6,15) (Lehotai, 2011).

A sejtsztódás kimutatásához használt GFP jelölt növényeket (*Cycb1::GFP*) 1 percig desztillált vízben elkészített 10  $\mu\text{M}$ -os propídium-jodid (PJ) (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: BmS500PI, Waltham, Massachusetts, USA) oldatba merítettem, majd a tárgylemezre helyezésük előtt egyszer mostam desztillált vízzel.

A cinkszint időfüggő kimutatására során a növényi mintákat 25  $\mu\text{M}$ -os Zinquin (2-metil-8((4-metil-fenil)sulfonil)-6-etil-oxi-karbonil-metil-oxi)kinolin) (Sigma-Aldrich, katalógus szám: Z2251, St. Louis, Missouri, USA) festékoldatban 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltam. A festékoldatot PBS (phosphate buffer saline) pufferben (10 mM, pH7,4) készítettem el. Az inkubáció elteltével egyszer mostam PBS-sel (Helmersson és mtsai., 2008).

Arabidopsis csíranövények gyökereiben a cinkszint kimutatására a Zinquin festék mellett Zinpyr-1-et (4',5'-Bis[bis(2-piridilmetil)aminometil]-2',7'-diklorofluoreszcein) (Sigma-Aldrich, katalógus szám: 40667, St. Louis, Missouri, USA) is alkalmaztam 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban PBS pufferben (10 mM, pH 7,4) elkészítve. A festést megelőzően háromszor mostam a gyökereket 10 mM-os EDTA-s oldattal (ioncserélt vízben elkészítve) annak érdekében, hogy a gyökerek felszínén lévő cinket eltávolítsam.

A gyökér mintákat szobahőmérsékleten 3 órán keresztül inkubáltam (Sinclair és mtsai., 2007). Az inkubációs idő elteltével a mintákat először ioncserélt vízbe, majd 10  $\mu\text{M}$ -os PJ oldatba mártottam, amivel a sejtfalat jelöltem meg (Tsukagoshi és mtsai., 2010). A csíranövények tárgylemezre való kirakásához PBS puffert használtam.

#### **4.4.2. Reaktív nitrogén - és oxigénformák kimutatása**

A nitrogén-monoxid szintjének detektálásához 10  $\mu\text{M}$ -os 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: D23844, Waltham, Massachusetts, USA) festékoldatot készítettem TRIS-HCl (10 mM, pH 7,4) pufferben. A mintákat szobahőmérsékleten, sötétben, 30 percen keresztül állni hagytam a festékoldatban, majd az inkubáció letelte után kétszer mostam a pufferrel, és tárgylemezre helyeztem (Kolbert, 2012).

Dihidrorodamin 123 (DHR) fluoreszcens festéktörzs (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: D632, Waltham, Massachusetts, USA) hígítottam ki 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációra TRIS-HCl (10 mM, pH 7,4) pufferben a gyökércsúcsok peroxinitrit szintjeinek vizsgálatához. A 30 perces inkubáció (sötétben, szobahőmérsékleten) lejárta után kétszer mostam a mintákat a pufferrel (Sarkar és mtsai., 2014).

A szuperoxid gyökönion detektálásához 10  $\mu\text{M}$ -os Dihidroetidium (DHE) (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: D7008, Waltham, Massachusetts, USA) festékoldatot készítettem TRIS-HCl (10 mM, pH 7,4) pufferben. A mintákat sötétben, 30 percen keresztül 37 °C-on tartottam, majd kétszeri puffer csere után mikroszkóp alatt vizsgáltam (Kolbert, 2012).

A hidrogén-peroxid kimutatására 50  $\mu\text{M}$ -os AmplexRed (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) festékoldatot (Thermo Fisher Scientific, katalógus szám: A12222, Waltham, Massachusetts, USA) készítettem el Na-foszfát (50 mM, pH 7,5) pufferben. A gyökereket szobahőmérsékleten, sötétben 30 percen keresztül inkubáltam, majd a festéket egyszer cseréltem le a pufferre a tárgylemezre helyezése előtt (Lehotai és mtsai., 2012).

Az FDA, DAF-FM DA, Zinquin, Zinpyr-1, DHR és DHE festéktörzsek 5 mM-os, az AmplexRed festéktörzs 10 mM-os koncentrációban lettek elkészítve DMSO-ban.

#### 4.4.3. Mikroszkópra vonatkozó adatok

A fluoreszcens festési vizsgálatokhoz Zeiss Axiovert 200 inverz (Carl Zeiss, Jena, Németország) fluoreszcens mikroszkópot használtam, amely nagy felbontású digitális kamerával (AxioCam HR, HQ CCD, Carl Zeiss, Jena, Németország) felszerelt. A zölden fluoreszkáló FDA, DAF-FM DA, DHR 123 festések során 10-es szűrőszettet (excitáció: 450–490 nm, emisszió: 515–565 nm), Zinquin alkalmazásánál a 49-es (DAPI) filter kombinációt (excitáció: 365 nm, emisszió: 445/50 nm), és a DHE festések alkalmával a 9-es szűrőkészletet (excitációs: 450-490 nm, emisszió: 515-∞ nm) állítottam be. 20 HE filter (excitációs: 546/12 nm, emisszió: 607/80 nm) alkalmazására az AmplexRed fluoreszcens jelének a kimutatásakor került sor. A festett gyökerekről készített digitális képeket az Axiovision Rel. 4.8 software segítségével elemeztem ki. A fluoreszcencia intenzitásának leéréséhez 38 vagy 45 µm átmérőjű kört rögzítettem.

Zinpyr-1-gyel és/vagy propidium-jodiddal festett lúdfű növényvonalak mikroszkópos vizsgálata a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumához tartozó Leica TCS SP5 (Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal történt. A cink sejtszintű lokalizációjának kimutatásához 488 nm gerjesztési hullámhossz tartományban, 100 mW-os argon lézer, fluoreszcein-izotiocianát (FITC) és PJ filter használatával 10-es és 20-szoros nagyítás mellett készítettem felvételeket a gyökérrendszeréről. Az elkészült digitális képek kiértékelését Fiji szoftver (<http://fiji.sc/Fiji>; Schindelin és mtsai., 2012) használatával végeztem el.

A festéseket minimum 10 növényen végeztem el, legalább két biológiai ismétléssel (n=20).

#### 4.5. Immunhisztokémiai β-glükuronidáz (GUS) festés

A hormonok (auxin, citokinin, etilén) *in situ* detektálását X-Gluc festéssel végeztem el Zhong és mtsai., (2014) módszere alapján. A növényeket 1 ml 90%-os acetont tartalmazó 1,5 ml-es Eppendorf csőbe tettem (5 db növény / cső) 30 percre -20 °C-ra. A fél óra letelte után az acetont leszívtam a növényekről és háromszor mostam PBS pufferrel (pH 7,4). A harmadik mosást követően 50 mM kálium-hexacianoferrátot ( $K_3Fe_{(III)}CN_6$ ), 50 mM kálium-ferrocianidot ( $K_4Fe_{(II)}CN_6$ ), 50 mM EDTA oldatot (vízben feloldva), 100 mM X-Gluc-ot (DMSO-ban feloldva) és 1% Triton X-100-at

tartalmazó festékoldatban 1-2 órán keresztül (a kék szín megjelenéséig) 37°C-on tartottam a növényi mintákat. Az inkubáció befejezésével kis kerek Petri-csészékbe öntöttem át a festékoldattal együtt a növényeket, majd 30, 70 és 95%-os etanol sorozattal mostam. 95%-os etanolt használtam a tárgylemezre helyezésük során, majd Zeiss Axiovert 200 inverz mikroszkóp (Carl Zeiss, Jena, Németország) 10-szeres objektívét használva képeket készítettem a gyökérrendszeréről.

Minden esetben minimum 10 növényt használtam fel három biológiai ismétléssel (n=30).

#### **4.6. SNO tartalom meghatározása**

A csíranövények SNO tartalmának a kimutatását témavezetőm, Kolbert Zsuzsanna végezte el Christian Lindermayr (Helmholtz Centrum, München, Németország) müncheni laboratóriumában Sievers 280i NO analizátorral (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA) Kolbert és mtsai., (2019b) módszere alapján. 250 mg Arabidopsis csíranövényhez az 1×PBS puffer (10 mM N-etil-maleimid és 2,5 mM EDTA-t tartalmazva, pH 7,4) dupla térfogatát adta, majd a mintákat a Fast Prep® eszközzel (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA) homogenizálta. A minták kétszeri centrifugálását (15 perc, 20000 g, 4°C) követően a felületi folyadékot 20 mM szulfanilamiddal inkubálta. A mintákból 250 µl-t fecskendezett be a kálium-jodiddal töltött reakciótérbe. A SNO koncentrációját a NO elemző szoftver (v3.2) (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA) segítségével határozta meg.

A kísérlethez három különböző növénynevelésből 5 technikai ismétlést végzett (n=5).

#### **4.7. Zn-tartalom elemzése induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS)**

Lúdfű csíranövények gyökerének és hajtásának cinktartalom meghatározásához 30-100 mg közötti szárazanyagot gyűjtöttem össze. A roncsolást megelőző napon a növényi szárazanyagot 60 °C-on tovább szárítottam. A porított mintákat elszívófülke alatt 2 órán keresztül 65 %-os (w/v) salétromsavban (HNO<sub>3</sub>) (Reanal, Magyarország) inkubáltam, majd 30%-os (w/v) hidrogén-peroxidot (VWR Chemicals, Magyarország)

adtam hozzá. A minták roncsolása 200 °C-on 16000 W-on 2 órán keresztül történt Mars Xpress CEM (Matthews, USA) zárt mikrohullámú roncsoló készülékben. A roncsolást követően a mintákat desztillált vízzel hígítottam ki a megfelelő végtérfogatra. Az elemtartalom meghatározása a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék közreműködésével történt induktív csatolt plazma tömegspektrometriával (Agilent 7700 Series, Santa Clara, Egyesült Államok). A cink koncentrációját  $\mu\text{g/g}$  száraz tömegben fejeztem ki.

#### **4.8. GSNOR aktivitás meghatározása spektrofotometriás eljárással**

A GSNOR aktivitás meghatározásához 250 mg friss növényi mintát dörzsöltem el 10 % glicerolt, 0,2 % Triton X-100-at, 2 mM ditioneitol (DTT), 0,1 mM EDTA-t tartalmazó TRIS-HCl (100 mM, pH 7,5) pufferrel 1:4 arányban. A dörzsölést centrifugálási lépés követte 4°C-on, 9300×g-n, 20 percen át. A felülúszót leszívtam (850  $\mu\text{l}$ ), jégre helyeztem és megkezdtem a reakcióelegy összeállítását UV küvettába. Elsőként 650  $\mu\text{l}$  0,5 mM EDTA-t tartalmazó 20 mM-os TRIS-HCl kivonó puffert (pH 8), 150  $\mu\text{l}$  növényi kivonatot, majd 100  $\mu\text{l}$  0,2 mM-os NADH oldatot mértem össze. A NADH hozzáadása után fél percen belül elindítottam a mérést 100  $\mu\text{l}$  0,4 mM-os GSNO oldat (desztillált vízben feloldva) jelenlétében. A referencia minta 2×650  $\mu\text{l}$  kivonó puffert tartalmazott. Az enzimaktivitást félsötétben, 340 nm-es hullámhosszon, 2,6 percig mértem (Sakamoto és mtsai., 2002).

A fehérjetartalom meghatározásához műanyag küvettában 1  $\mu\text{l}$  növényi minta, 200  $\mu\text{l}$  Bradford reagens és 799  $\mu\text{l}$  desztillált víz elegyét mértem le 595 nm hullámhosszon (Bradford, 1976).

Az adatokat NADH fogyás/perc/mg proteinben fejeztem ki. Egyféle mintából három biológiai ismétlést végeztem, legalább két növénygeneráció felhasználásával (n=3). A fehérjetartalom és a GSNOR enzim aktivitás mérését KONTRON UNIKOV UV/Vis (KONTRON, Milánó, Olaszország) típusú fotométeren végeztem el.

#### 4.9. GSNOR fehérjemennyiség és a fehérjetirozin-nitráció elemzése Western blot módszerrel

Egész Arabidopsis csíranövényeket 50 mM TRIS-HCl-t (pH 7,6-7,8) 0,1 mM EDTA-t, 0,1 (v/v) % Triton X-100-at, 10 (v/v) % glicerol-t tartalmazó extrakciós pufferrel dörzsöltem, majd 4°C-on, 9300×g-n, 20 percig centrifugáltam. A kapott fehérje kivonatot 1%-os protáz inhibitorral (Sigma-Aldrich, katalógus szám: P9599, St. Louis, Missouri, USA) kezeltem, és -20°C-on tároltam. A fehérjetartalmat Bradford (1976) módszere alapján határoztam meg.

A nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézishez (SDS-PAGE) a denaturált fehérje kivonatból 15 µl-t vittem fel a 12%-os akrilamid gélre. Western blot analízishez a szétválasztott fehérjéket tank eljárással transzferáltam (25 mA áramerősség mellett, 16 órán keresztül) polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra. Ezután a membránokat 1:2000 hígítású nyúlban termelt GSNOR elleni elsődleges poliklonális antitesttel (Agrisera, katalógus szám: AS09 647, Svédország) inkubáltam. Pozitív kontrollként anti-aktin antitestet (Agrisera, katalógusszám: AS13 2640, Svédország) használtam, amihez fehérje standarként aktint használtuk (marha izom, Sigma-Aldrich, katalógusszám: A3653, St. Louis, Missouri, USA).

Fehérje tirozin nitrálás esetén a nem specifikus antitestkötés elkerülése végett a membránokat 5 (w/v) %-os tejfehérjeoldatban blokkoltam, amit TBST pufferben készítettem el (20 mM Tris, 178 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, pH 7,8), majd 3-nitrotirozin elleni poliklonális nyúl antitestet (Sigma-Aldrich, katalógusszám: N0409, St. Louis, Missouri, USA) használtam a nitrált fehérjék jelölésére 1:2000 arányban hígítva. Három mosási lépést követően az immundetektálás 1:10000 arányban hígított, egy megfelelő, kecskében termelt alkalikus foszfatázzal kapcsolt másodlagos nyúl ellenanyag IgG (Sigma-Aldrich, Cat. No. A3687, St. Louis, Missouri, USA) alkalmazásával történt. A sávok előhívása 6-diklórfenol-indofenol/NBT reakcióval történt, amely során fekete színű formazán keletkezik az antitesttel jelölt fehérjéknél. Pozitív kontrollként nitrált szarvasmarha szérum albumint (NO<sub>2</sub>-BSA) (Sigma-Aldrich, katalógusszám: N8159, St. Louis, Missouri, USA) használtam.

A fehérjesávok denzitását GelQuant szoftverrel határoztam meg (<http://biochemlabsolutions.com>) pixelsűrűségben kifejezve. A kísérletet minimum két növénynevelésből származó, egymástól független három növényi kivonat ismétlésével végeztem el (n=3) (Kolbert és mtsai., 2018).

#### 4.10. NO, SL-, Zn-asszociált génexpresszió elemzése kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval

Valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) vizsgáltam az alábbi lúdfű gének expresszióját: NON-SYMBIOTIC HAEMOGLOBIN 1 (*GLB1*, At2g16060), NON-SYMBIOTIC HAEMOGLOBIN 2 (*GLB2*, At3g10520), S-NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE 1 (*GSNOR1*, At5g43940), NITRATE REDUCTASE 1 (*NIA1*, At1g77760), NITRATE REDUCTASE 2 (*NIA2*, At1g37130), CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7 (*CCD7*, At2g44990), CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 (*CCD8*, At4g32810), ALPHA/BETA HYDROXYLASE D14 (*D14*, At3g03990), MORE AXILLARY GROWTH 1 (*MAX1*, At2g26170), MORE AXILLARY GROWTH 2 (*MAX2*, At2g42620), IRON REGULATED TRANSPORTER 3 (*IRT3*, At1g60960), ZRT-/IRT-LIKE PROTEIN 3 (*ZIP3*, At2g32270), BASIC LEUCINE ZIPPER 19 (*bZIP19*, At4g35040), COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2 (*CSD2*, At2g28190), CARBONIC ANHYDRASE 2 (*CA2*, At5g14740).

Az RNS tisztítása 90 mg (folyékony nitrogénben lefagyasztott, -80 °C-on tárolt) növényi mintából a Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) alkalmazásával történt a gyártó utasításai alapján. NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Washington, DC, USA) mértem meg a mintákból izolált RNS-ek koncentrációját.

A cDNS szintetizálására a tisztított RNS 1 µg-jából reverz transzkriptáz (RT) enzimrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) 20 µl végtérfogatban random hexamer primerek jelenlétében került sor. A kiválasztott gének primereinek a tervezéséhez és szekvenciájuknak a beazonosításra az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisát használtam. A kapott szekvenciák alapján a primereket Primer 3 szoftver (<https://primer3.ut.ee/>) segítségével terveztem meg (1. melléklet). NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programmal ellenőriztem le a gének specifitását (Ye és mtsai., 2012).

A génexpressziós mintázat vizsgálatához összeállított reakcióelegy 2 µl 10-szeresre hígított cDNS-t, 0,42 µl primer párt, 4,16 µl nukleázmentes vizet és 7 µl 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmazott. A méréshez a qTOWER Real-Time qPCR System (Analytik Jena,

Németország) berendezés paramétereit a következőképpen állítottam be: a 10 percig tartó 95 °C-on történő denaturációs lépést 41 ciklusból álló ismétlődő reakciósor követte 60 (15 másodperc, 95 °C, 1 perc 60 °C). A termékek specifikusságát a program lefutása után az olvadási görbék nyomkövetésével ellenőriztem.

Az adatok analízise qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Németország) szoftverrel történt. A relatív mRNS szintek számolása  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  képlettel (Livak és Schmittgen, 2001), az *ACTIN2* (At3918780) és a *GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2 (GAPDH2)* (At1913440) génexpressziós szintjéhez normalizálva történt. Egyféle mintából három biológiai ismétlést végeztem, legalább két egymástól független növénynevelésből származó mitával (n=3).

#### 4.11. Jóslás

A peptidszekvenciákhoz az UNIPROT adatbázisából ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) jutottam hozzá és három ingyenesen elérhető *in silico* előrejelzési szoftvernek a segítségével határoztam meg, hogy melyek lehetnek azok a cisztein aminosavak, amelyek potenciális célpontjai a nitrozilációnak. A GPS-SNO 1.0 szoftver a <http://sno.biocuckoo.org/>, a iSNO-PseAAC szoftver a <http://app.aporc.org> és a DeepNitro szoftver a <http://deepnitro.renlab.org> címen érhető el. Mindhárom szoftver esetén a keresési paramétert mediumra állítottam.

#### 4.12. Statisztikai elemzés

Egyes adatok statisztikai elemzése Microsoft Excel 2016 program Student-féle T-próbájával történt. Ebben az esetben az eredmények szignifikanciáját az adatok ábrázolásánál következőképpen jelöltem: \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ; ns = nem szignifikáns. Más adatsorok esetén a szignifikancia SigmaPlot 12.0 Systat program egyutas variancia analízisével (ANOVA) is megállapításra került Duncan-féle teszttel kombinálva. A szignifikánsan eltérő adatokat ( $P \leq 0,05$ ) különböző betűkkel jelöltem. A standard hiba (SE) feltüntetésével ábrázoltam az átlageredményeket.



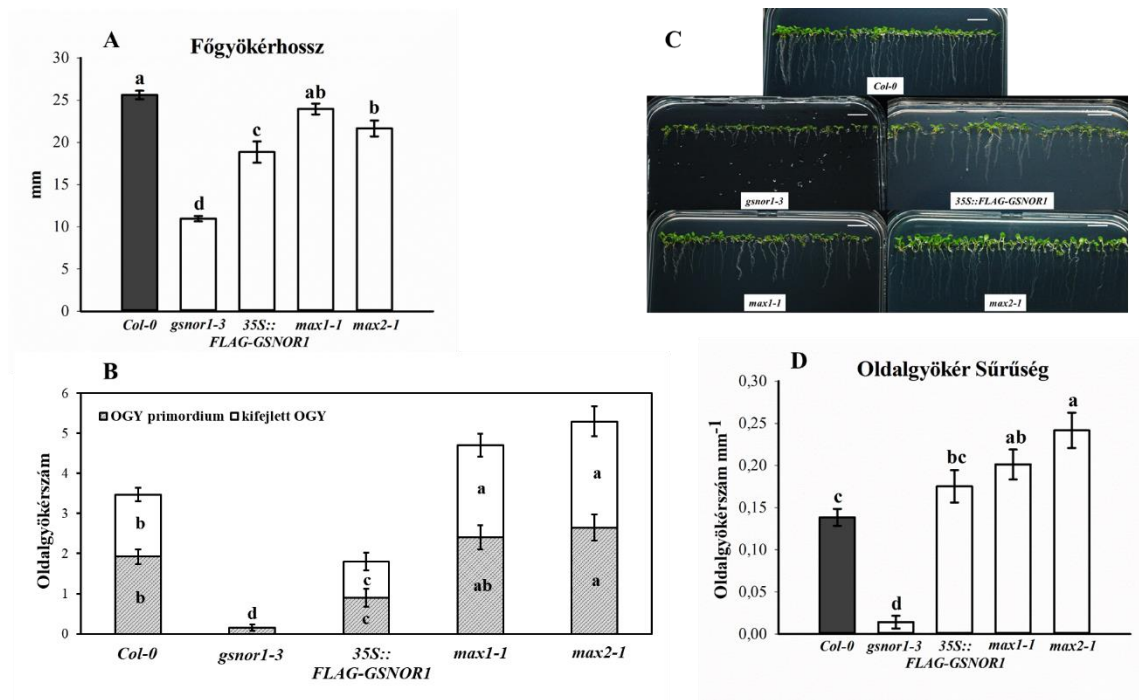
## 5. Eredmények

### 5.1. Eredmények 1

#### 5.1.1. Vad típusú, GSNOR és SL mutáns lúdfű vonalak vizsgálata stresszmentes állapotban

##### 5.1.1.1. Lúdfű csíranövények gyökérszerkezeti tulajdonságainak az ismertetése

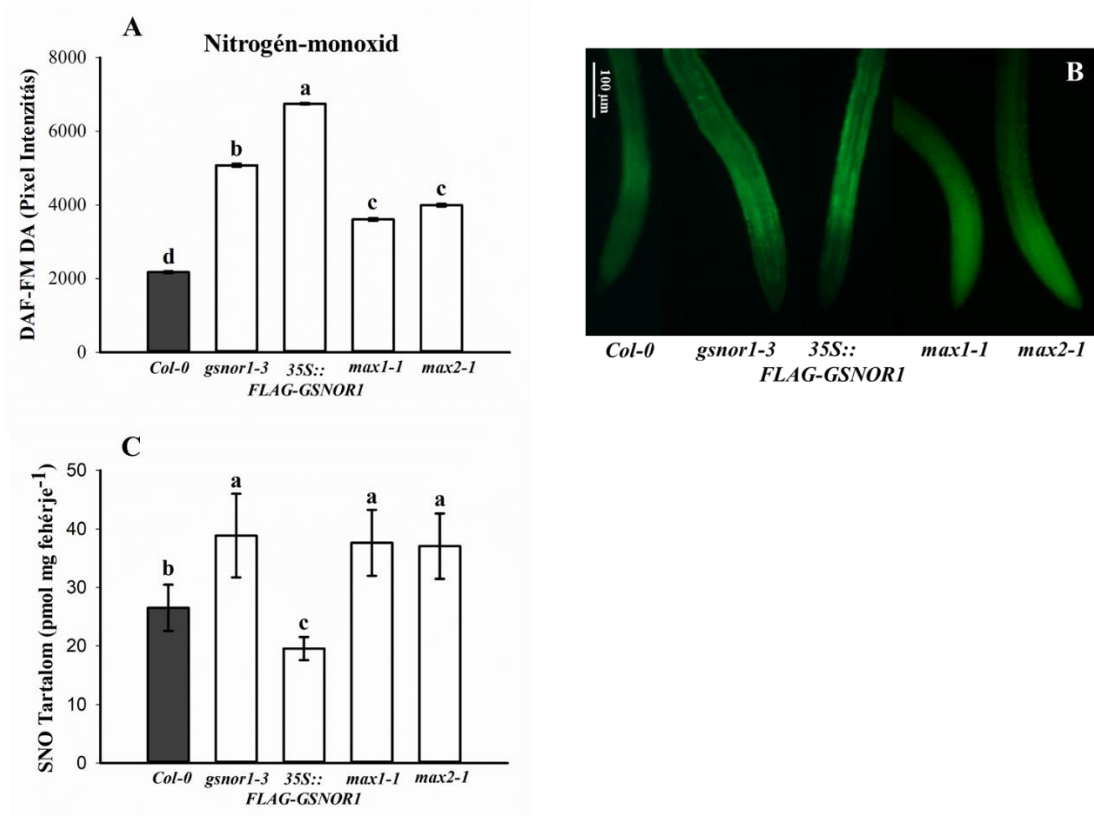
Megvizsgáltam és összehasonlítottam Col-0, *gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNOR1*, *max1-1*, *max2-1* vonalak főgyökérhosszát, oldalgyökereinek számát valamint ezekből az adatokból számított oldalgyökér denzitásokat. Mindegyik növényvonal a vad típushoz képest rövidebb főgyökérrzel rendelkezik (6. ábra, A, C), kiváltképp a *gsnor1-3*, ahol a rövidülés mértéke a Col-0-hoz képest elérte az 58%-ot. A *gsnor1-3* rövid főgyökéretében nem volt kimutatható kifejlett OGY (nagyobb, mint 7. stádium), továbbá szignifikánsan kevesebb primordiumot (kisebb, mint 7. stádium) figyeltem meg, mint vad típusban. A növényvonalak közül a legalacsonyabb OGY denzitással rendelkezik (6. ábra, D). GSNOR túltermelő, *35S::FLAG-GSNOR1*, ami a vad típushoz képest szignifikánsan kevesebb primordiummal és kifejlett OGY-rel rendelkezett, azonban OGY sűrűsége hasonló volt. Az OGY-ek tekintetében az SL mutánsok közül a *max2-1* a vad típushoz képest szignifikánsan több primordiummal és kifejlett OGY-rel rendelkezett (6. ábra, B). A *max* mutánsok magasabb OGY denzitást mutattak, mint a Col-0.



**6. ábra:** 7 napos stresszmentes körülmények között nevelt vad típusú (*Col-0*), GSNOR mutáns (*gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNORI*), SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*) hibás csíranövények főgyökérhossza (A), oldalgökér száma (B) és sűrűsége (D). A szignifikáns különbségeket eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=20$ ,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív felvételek a Petri-csészében nevelt *Col-0*, GSNOR és SL mutáns növényekről a mintavétel 7. napján (C). Mércse=1 cm.

### 5.1.1.2. Nitrogén-monoxid és S-nitrozotiol szintek meghatározása

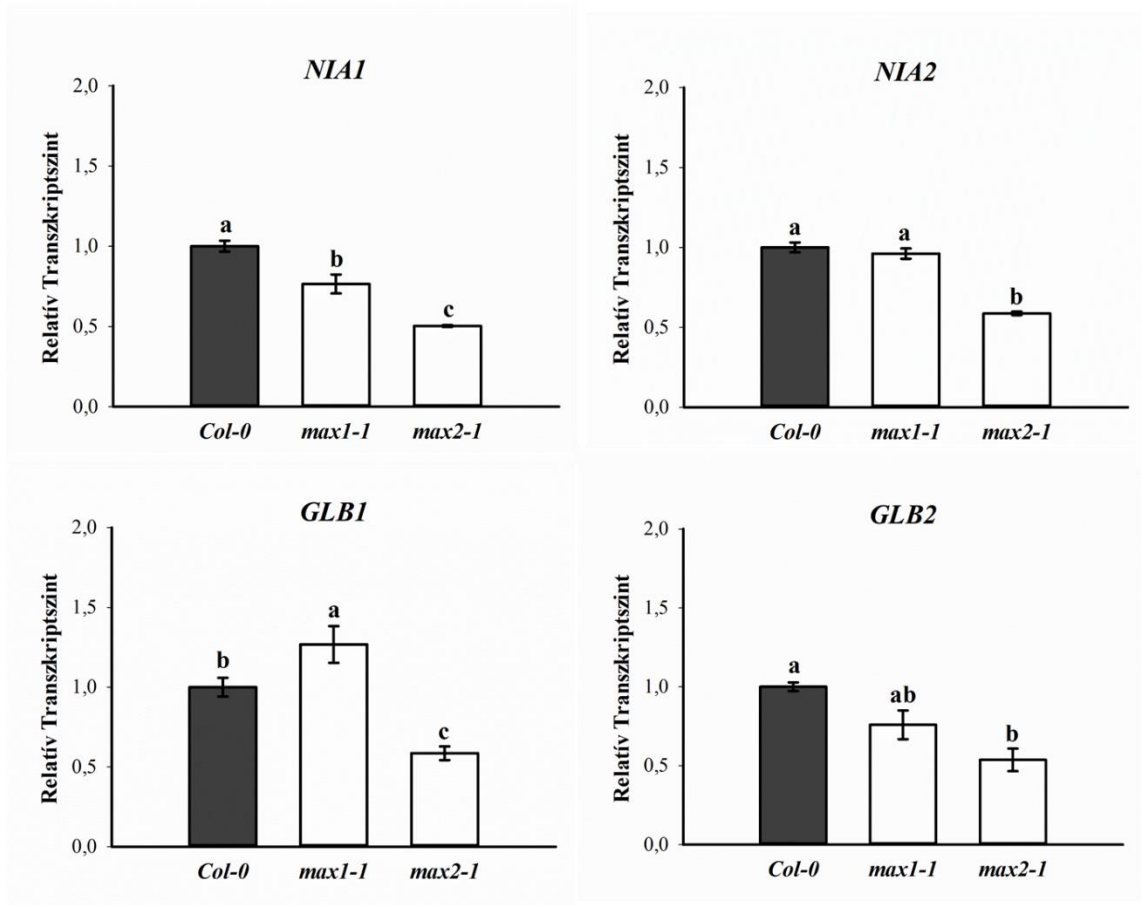
A jelmolekula szerepet is betöltő fő reaktív nitrogénforma, a NO szintjét fluoreszcens próbával mutattam ki a lúdfű vonalakban (7. ábra, B). A GSNOR enzimben hiányos, illetve ezt az enzimet túltermelő, valamint a *max1-1* és *max2-1* vonalak szignifikánsan magasabb NO szinttel rendelkeztek a vad típushoz képest (7. ábra, A). Az SNO tartalom a *gsnor1-3*, *max1-1* és a *max2-1* esetén magasabb, a *35S::FLAG-GSNORI* csíranövényekben alacsonyabb volt a vad típushoz képest (7. ábra, C).



**7. ábra:** A nitrogén-monoxid szint változása 7 napos kontroll körülmények között nevelt vad típusú (Col-0), GSNOR mutáns (*gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNOR1*), SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*) mutáns csíranövényekben (A). Col-0 és GSNOR mutáns vonalak esetében a NO szint mérését a merisztémától távolabbi gyökércsúcban, *max* mutánsok esetében a gyökércsúcsban végeztem el. (C) S-nitrozotiol szintek vad típusú (Col-0), GSNOR mutáns (*gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNOR1*) és SL mutáns (*max1-1*, *max2-1*) vonalakban. A szignifikáns különbségeket eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív felvételek a DAF-FM DA (NO-specifikus) próbával jelölt gyökércsúcsokról (B). Mércse=100  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.1.3. NO-asszociált gének expressziójának meghatározása *max1-1* és *max2-1* csíranövényekben

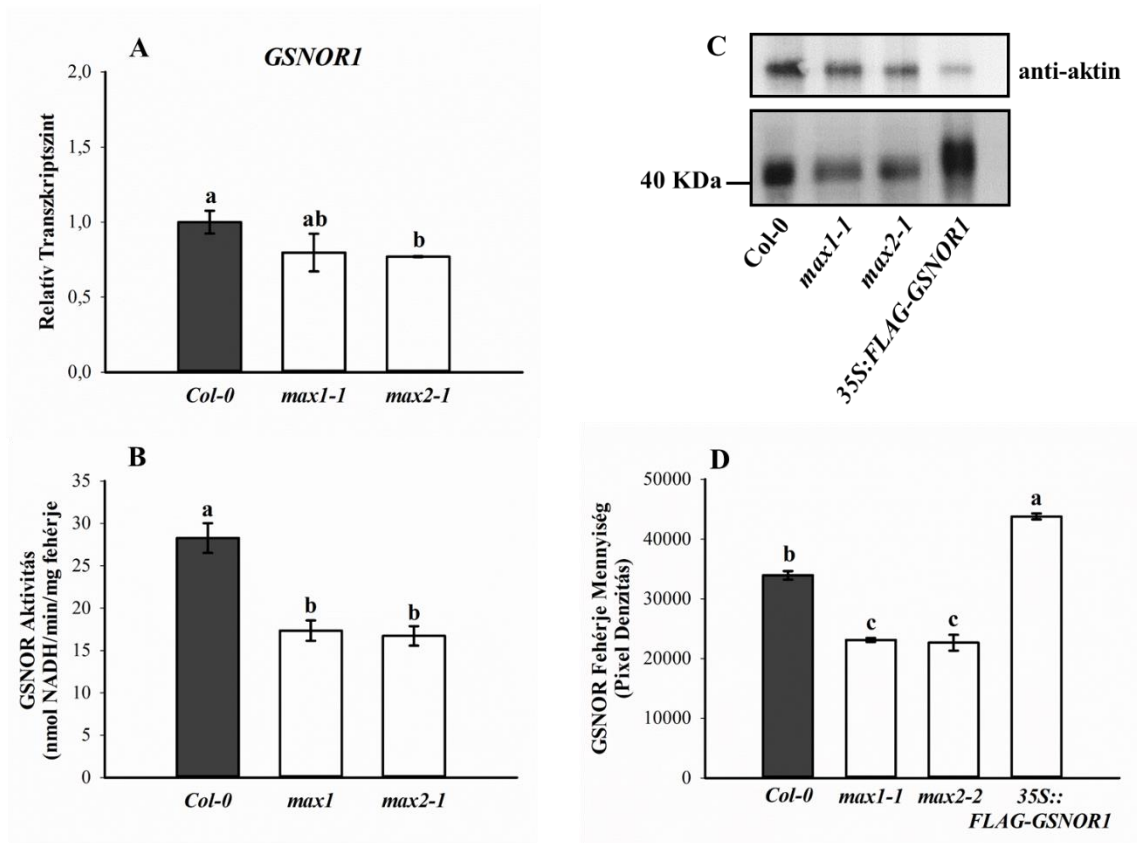
*NIA1*, *NIA2*, *GLB1* és a *GLB2*, NO metabolizmusában résztvevő gének esetében a *max2-1* mutánsban csökkent expressziós szinteket detektáltam a vad típusúhoz képest. A SL bioszintézisében hibás *max1-1* vad típuszerű génexpressziót mutatott a *NIA2* és *GLB2* géneknél, azonban a *NIA1* gén expressziójában csökkenést, míg *GLB1* gén expressziójában növekedést tapasztaltam a Col-0-hoz képest (8. ábra).



**8. ábra:** NO-függő gének (*NIA1*, *NIA2*, *GLB1*, *GLB2*) relatív transzkript szintjeit mutatja be Col-0, SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*) hibás 7 napos növényekben stresszmentes állapotban. Génextpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P\leq 0,05$ ).

#### 5.1.1.4. *Max* mutánsok GSNOR enzimének-gén, és fehérjeszintű vizsgálata

A *max2-1 AtGSNOR1* gén expressziója szignifikánsan csökkent, míg *max1-1*-ben nem mutatott jelentős eltérést vad típushoz képest (9. ábra, A). Mindkét *max* mutánsban a GSNOR enzim aktivitása (9. ábra, B) és mennyisége is (9. ábra, C, D) szignifikánsan csökkent a Col-0-hoz képest.

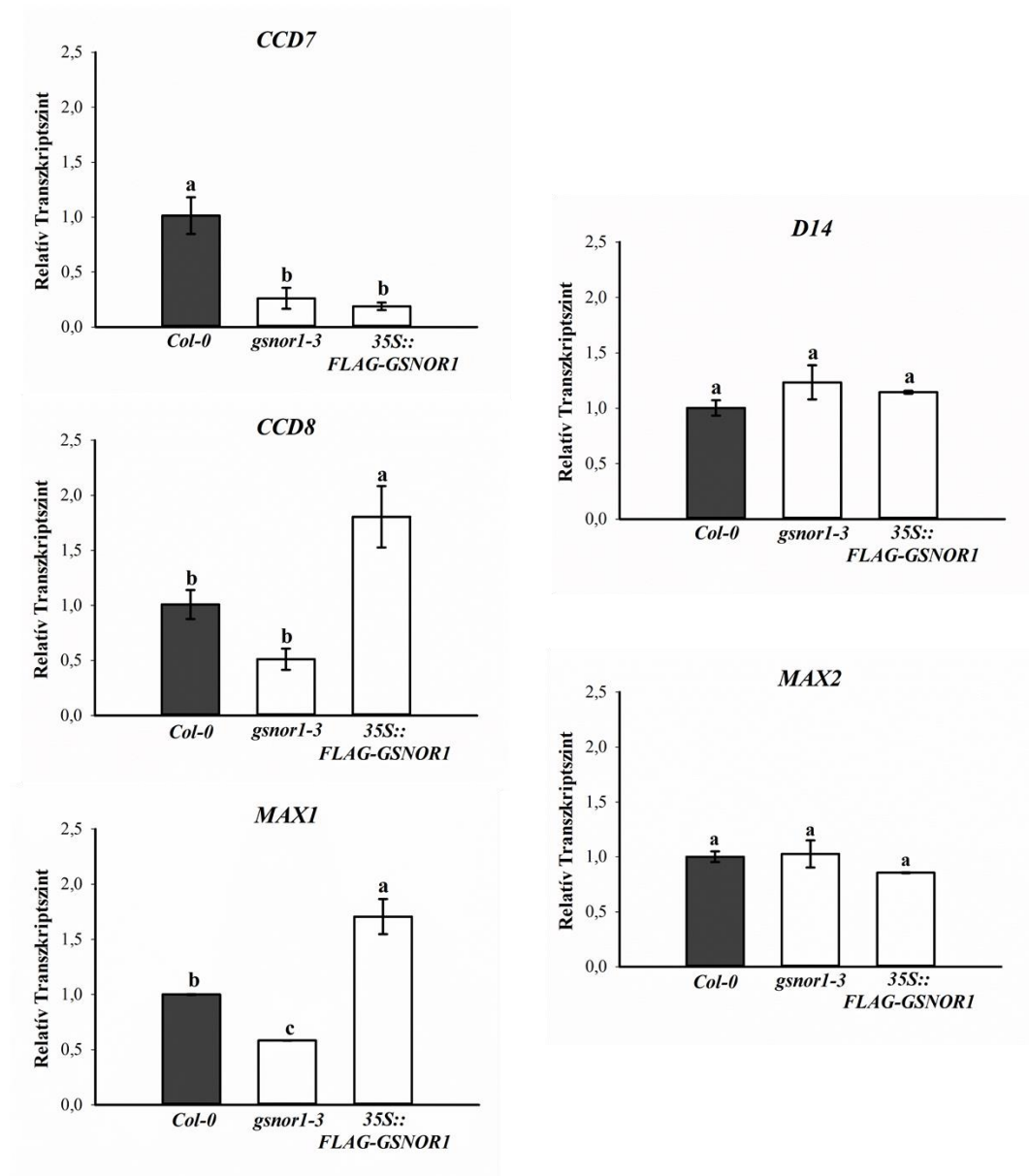


**9. ábra:** Vad típusú, SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*) hibás 7 napos kontroll körülmények között nevelt csíranövények *AtGSNOR1* gén expressziós változása (A) a GSNOR enzim aktivitása (B) és mennyisége (C). A génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Western blot membránra a 35S::FLAG-GSNOR1 pozitív kontrollként szerepel. GelQuant szoftverrel mért fehérjesávok számszerűsített pixel denzitás adatai (D). Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ).

#### 5.1.1.5. SL-függő markergének expressziós mintázata *gsnor1-3* és 35S::FLAG-GSNOR1 csíranövényekben

A SL mutánsok NO-asszociált génjeinek vizsgálatát követően elvégeztem az SL szintézisben és jelátvitelben szerepet játszó gének (*CCD7*, *CCD8*, *D14*, *MAX1*, *MAX2*) kimutatását GSNOR mutánsokban (10. ábra). A GSNOR enzim hiányában a *CCD7*, *CCD8* és a *MAX1* gén expressziója szignifikánsan csökkent a *Col-0*-hoz képest. A *CCD7* gén kifejeződésének a csökkenése szintén megfigyelhető volt a GSNOR túltermelése esetén, azonban a *CCD8* és *MAX1* expresszió növekedett GSNOR-t túltermelő lúdfűben a vad típusúhoz képest. Ezzel szemben a SL jelátvitelben szerepet

betöltő gének (*MAX2*, *D14*) expressziói sem GSNOR hiánya,-sem túltermelése esetén nem változtak.



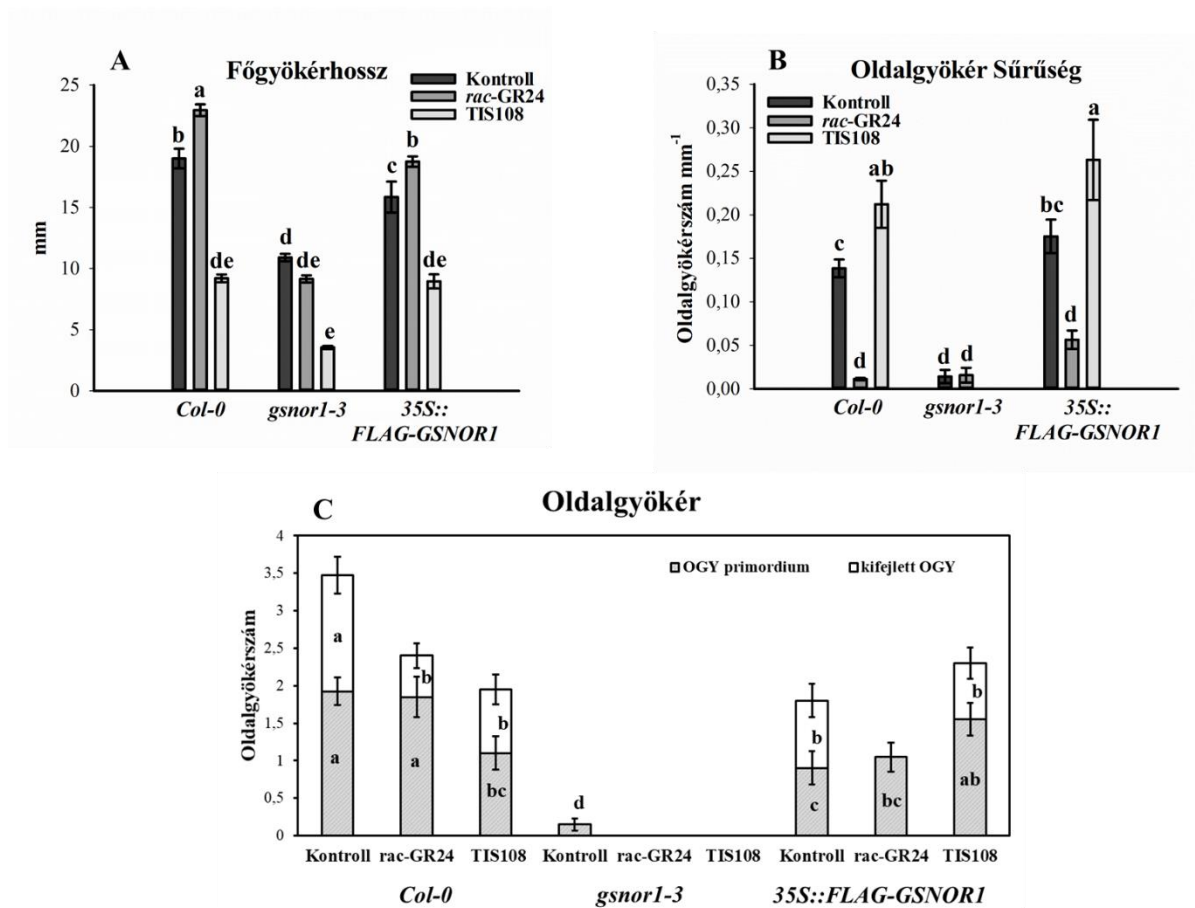
**10. ábra:** Az SL-függő gének (*CCD7*, *CCD8*, *MAX1*, *MAX2*, *D14*) relatív transzkripcióját mutatja be 7 napos *Col-0*, *gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNORI* növényekben stresszmentes állapotban. Génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ).

### **5.1.2. *rac*-GR24 és TIS108 kezelések Col-0-ban és GSNOR mutáns csíranövényekben**

A stresszmentes körülmények vizsgálatát követően *rac*-GR24 SL analóg és TIS108 SL inhibitor kezelést alkalmaztam külsőleg a 4. napon Col-0, *gsnor1-3* és *35S::FLAG-GSNOR1* növények 7 napos növekedési periódusa során.

#### **5.1.2.1. Morfológiai változások kimutatása SL analóg és inhibitor kezelés hatására**

Vad típusú lúdfűben a *rac*-GR24 kezelés 20%-os főgyökérhossz megnyúlást, a TIS108 hozzáadása pedig 51%-os rövidülését okozott. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a GSNOR túltermelő mutánsban (11. ábra, A). A GSNOR hiányos lúdfű SL analóg és inhibitor hatására is főgyökér rövidülést szenvedett, ami nagyobb mértékű (61%) volt TIS108 kezelésre. Vad típusban mind *rac*-GR24 mind TIS108 szignifikánsan csökkentette a kifejlett OGY-ek számát a kontrollhoz képest. Az OGY primordiumok esetében csak a TIS108 kezelés okozott csökkenést. Kontroll állapotban is csak primordiummal rendelkező *gsnor1-3*-ban *rac*-GR24 és TIS108 hozzáadása mellett nem volt megfigyelhető OGY. GSNOR túltermelő vonalban SL analóg kezelés hatására a kifejlett OGY-ek száma 0-ra csökkent, és kevesebb primordiummal rendelkezett, mint a kontroll vad típus. A TIS108 alkalmazása a kifejlett OGY-ek számában okozott szignifikáns csökkenést a kontroll Col-0-hoz képest (11. ábra, C). Az oldalgyökér sűrűség tekintetében a vad típus és a *35S::FLAG-GSNOR1* vonalak hasonló tendenciát mutattak *rac*-GR24 és TIS108 kezelés hatására (11. ábra, B).

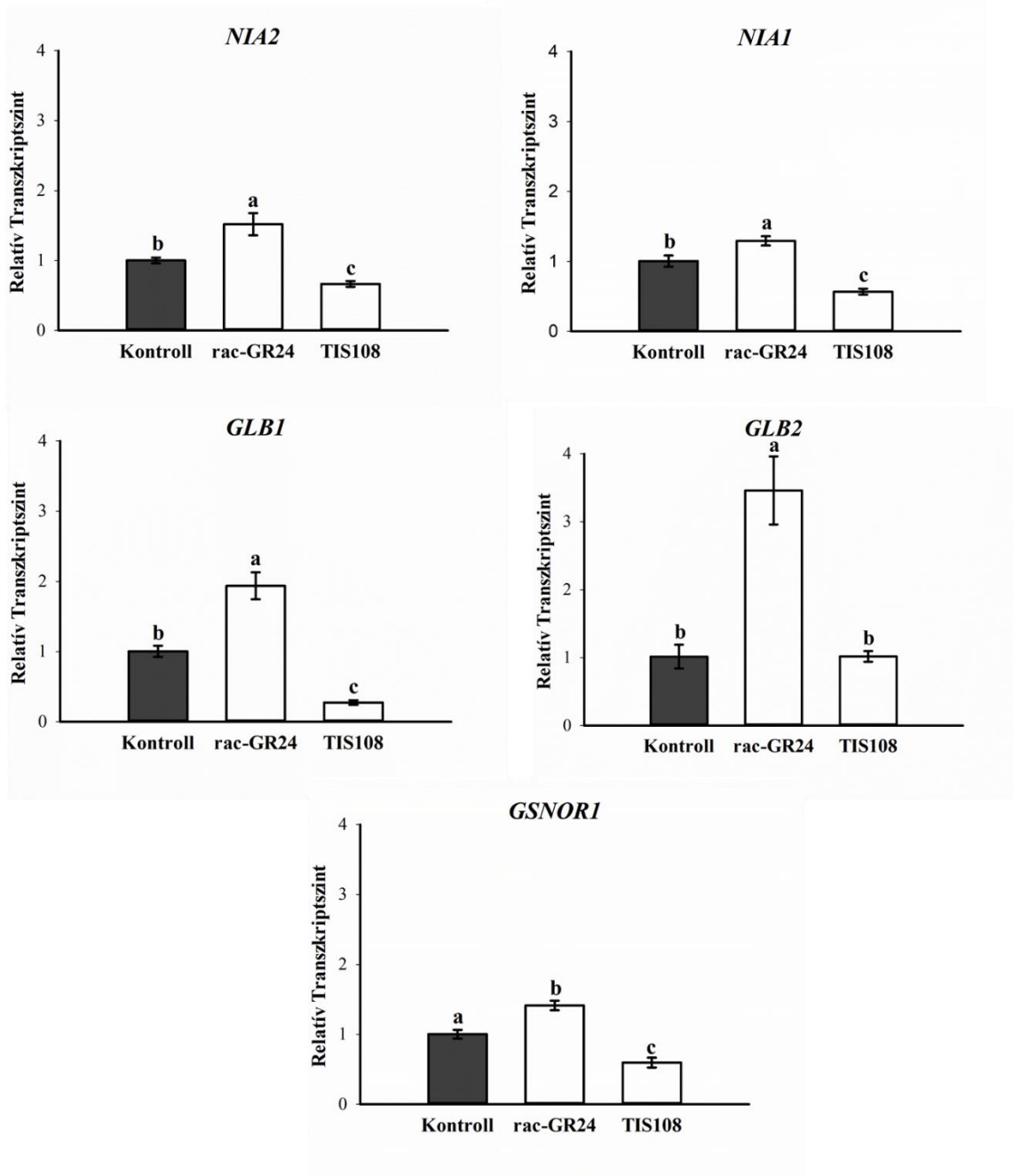


**11. ábra:** Kontroll, 2  $\mu\text{M}$ -os *rac*-GR24 és 5  $\mu\text{M}$ -os TIS108 kezelt *Col-0*, *gsnor1-3*, *35S::FLAG-GSNOR* csíranövények főgyökérhossza (A), oldalgökérszáma (C) és oldalgökér sűrűsége (B). A statisztikailag különböző adatokat eltérő betűk jelölik a Duncan-féle teszt ( $n=60$ ,  $P \leq 0,05$ ) alapján.

### 5.1.2.2. NO-asszociált gének meghatározása SL analóg és inhibitor kezelés hatására *Col-0*-ban

A NO bioszintézisében résztvevő nitrát-reduktázt kódoló *NIA1* és *NIA2*, valamint a NO szint szabályozásában szerepet játszó fitohemoglobinokat kódoló *GLB1* és *GLB2*, továbbá a *GSNOR1* gén vizsgálatát végrehajtottam vad típusban *rac*-GR24 és TIS108 külső alkalmazása mellett. A *rac*-GR24 szignifikánsan növelte, még a TIS108 kezelés szignifikánsan csökkentette (a *GLB2* gén kivételével) ezen NO-asszociált gének expresszióját a kontrollhoz képest (12. ábra).

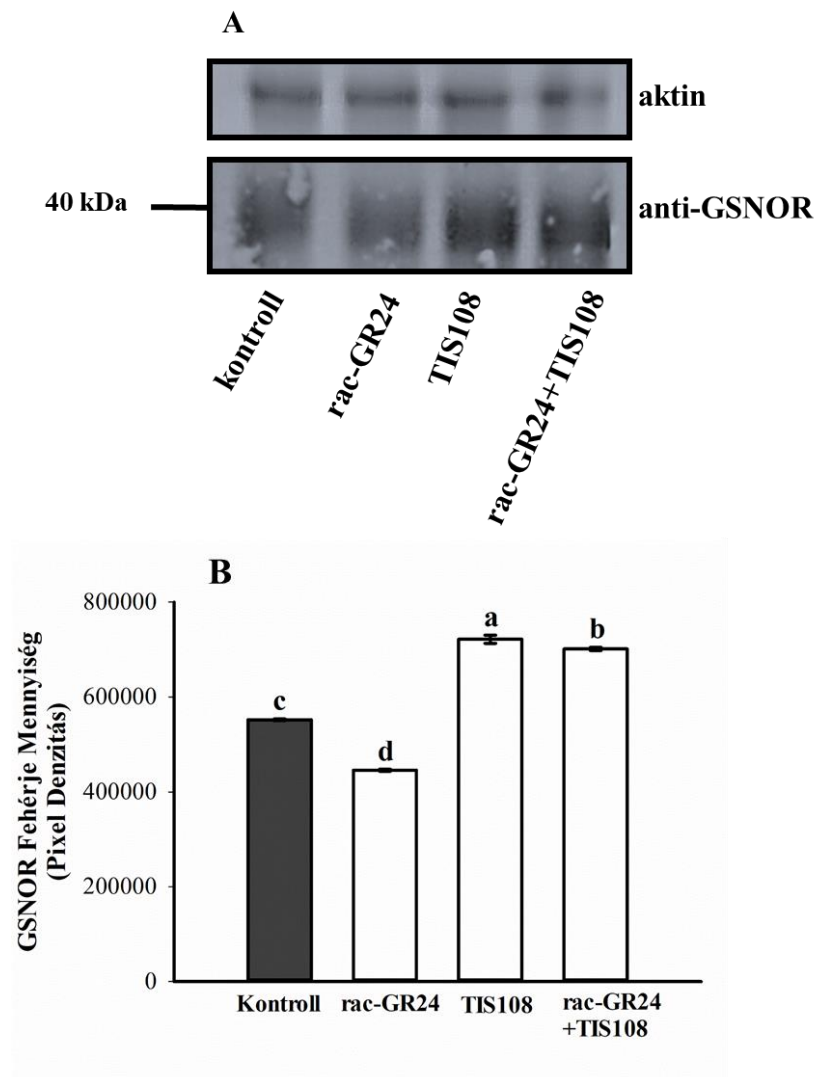




**12. ábra:** A NO-asszociált gének (*NIA1*, *NIA2*, *GSNOR1*, *GLB1*, *GLB2*) relatív transzkriptszintje Col-0 növényben kontroll, 2  $\mu$ M-os *rac*-GR24 és 5  $\mu$ M-os TIS108 kezelés hatására. A génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ).

### 5.1.2.3. GSNOR enzim mennyiségének kimutatása Col-0-ban SL analóg és inhibitor kezelés hatására

A vad típusban a GSNOR enzim mennyiségét Western blot analízissel mutattam ki *rac*-GR24, TIS108 és a kettő együttes alkalmazása során (13. ábra, A). A 2  $\mu$ M-os *rac*-GR24 csökkentette az enzim mennyiségét, míg az 5  $\mu$ M-os TIS108, illetve a *rac*-GR24+TIS108 együttes alkalmazása növelte az enzimfehérje abundanciáját (13. ábra, B).



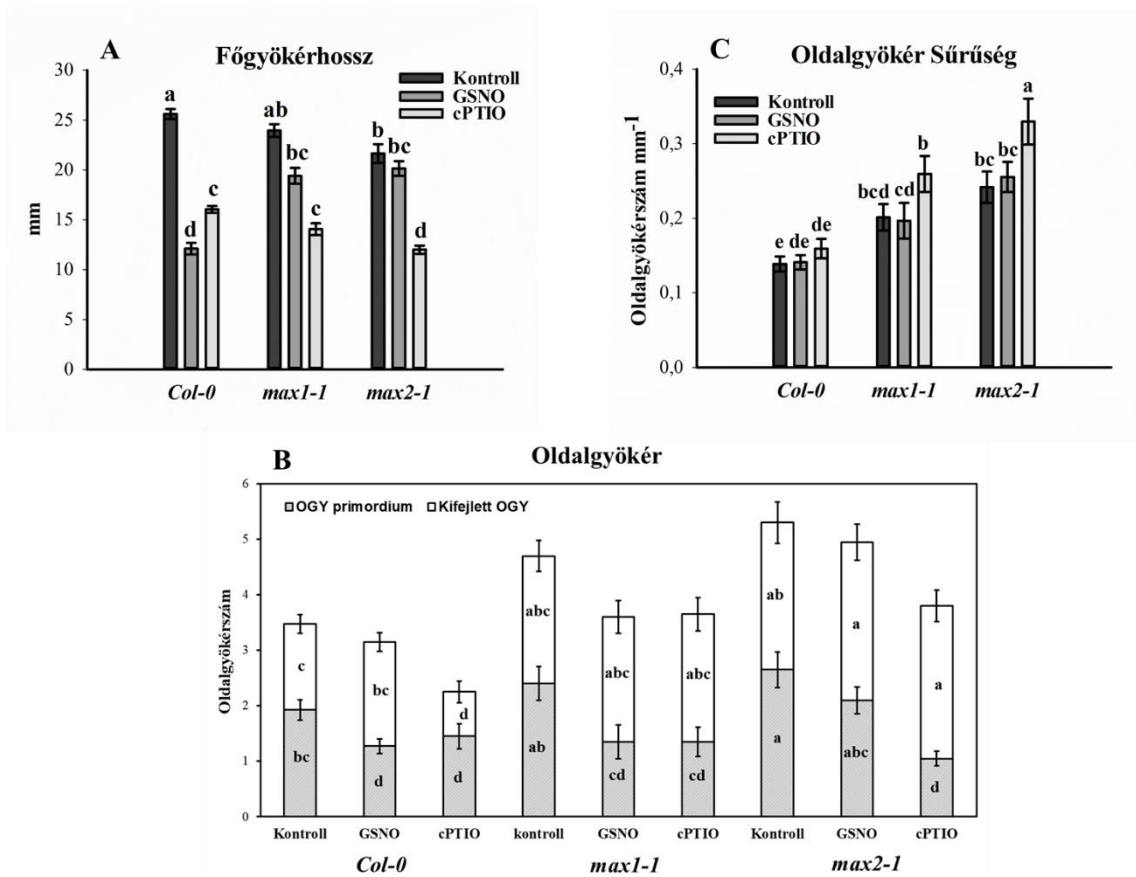
**13. ábra:** A GSNOR enzimfehérje mennyisége Col-0-ban 2  $\mu$ M-os *rac*-GR24, 5  $\mu$ M-os TIS108 és 2  $\mu$ M-os *rac*-GR24+5  $\mu$ M-os TIS108 hatására (A). GelQuant szoftver segítségével mért fehérjesávok pixel densitás adatai (B). Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P\leq 0,05$ ).

### **5.1.3. GSNO és cPTIO külső alkalmazásának hatása vad típusban és *max* mutánsokban**

Ezt követően kísérleteimet 250  $\mu$ M-os GSNO (NO donor) és 800  $\mu$ M-os cPTIO (NO gyökfogó) kezelésekkel folytattam Col-0, *max1-1* és *max2-1* vonalakon. Ahogyan az SL analóg és inhibitor kezeléseknél, ebben az esetben is külsőleg történtek a 4. napon a növények 7 napos nevelési periódusa során.

#### **5.1.3.1. Gyökérmorfológiai változások detektálása NO donor és gyökfogó kezelésre vad típusban és *max* mutánsokban**

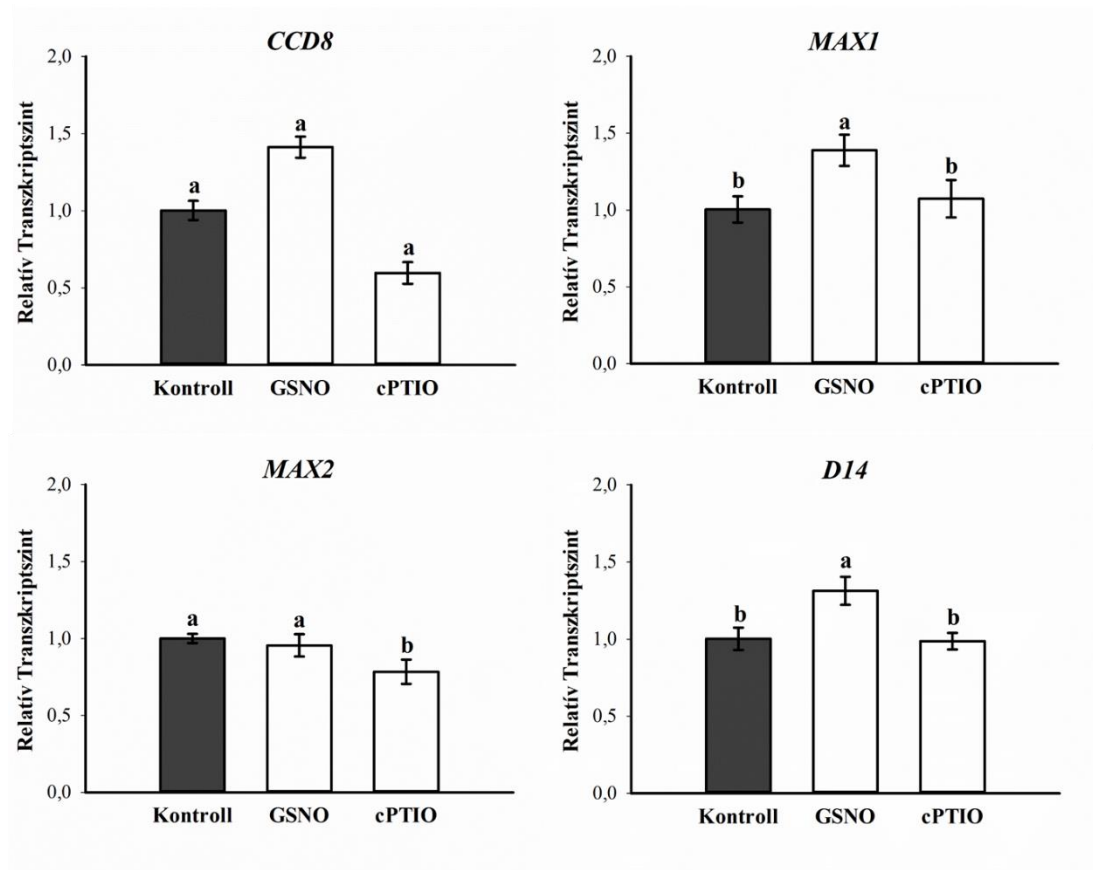
Vad típusban a GSNO 54%-kal rövidítette meg a FGY hosszát, míg *max* mutánsokban nem vagy enyhébb mértékű rövidülést okozott (14. ábra, A). A cPTIO kezelés mindegyik növényvonal esetén FGY rövidüléséhez vezetett. A Col-0-ban és SL mutánsokban a NO donor nem okozott észlelhető jelentős változást a kifejlett OGY-k tekintetben. A *max* mutánsok kisebb-nagyobb mértékű primordiumszám csökkenést szenvedtek el a NO donor és gyökfogó kezeléseknél (14. ábra, B). A GSNO alkalmazása nem váltott ki változást a *max* mutánsok OGY sűrűségében, azonban a gyökfogó hozzáadása mindkét vonalban szignifikánsan megemelte azt (14. ábra, C).



**14. ábra:** Kontroll, 250  $\mu$ M GSNO- vagy 800  $\mu$ M cPTIO kezelt *Col-0*, *max1-1*, *max2-1* csíranövények főgyökérhossza (A), oldalgökérszáma (B) és oldalgökér denzitása (C). A statisztikailag különböző adatokat eltérő betűk jelölik a Duncan-féle teszt ( $n=60$ ,  $P \leq 0,05$ ).

### 5.1.3.2. GSNO vagy cPTIO kezelt vad típusú lúdfű SL-asszociált génjeinek relatív transzkriptszintjei

SL bioszintézis (*CCD8*, *MAX1*) és jelátviteli (*MAX2*, *D14*) gének kifejeződését NO donorral és gyökfogóval kezelt *Col-0* növényekben mutattam ki. SL-függő markergének sem GSNO sem cPTIO kezelésre nem mutattak lényeges eltéréseket a kontrollhoz képest (15. ábra).

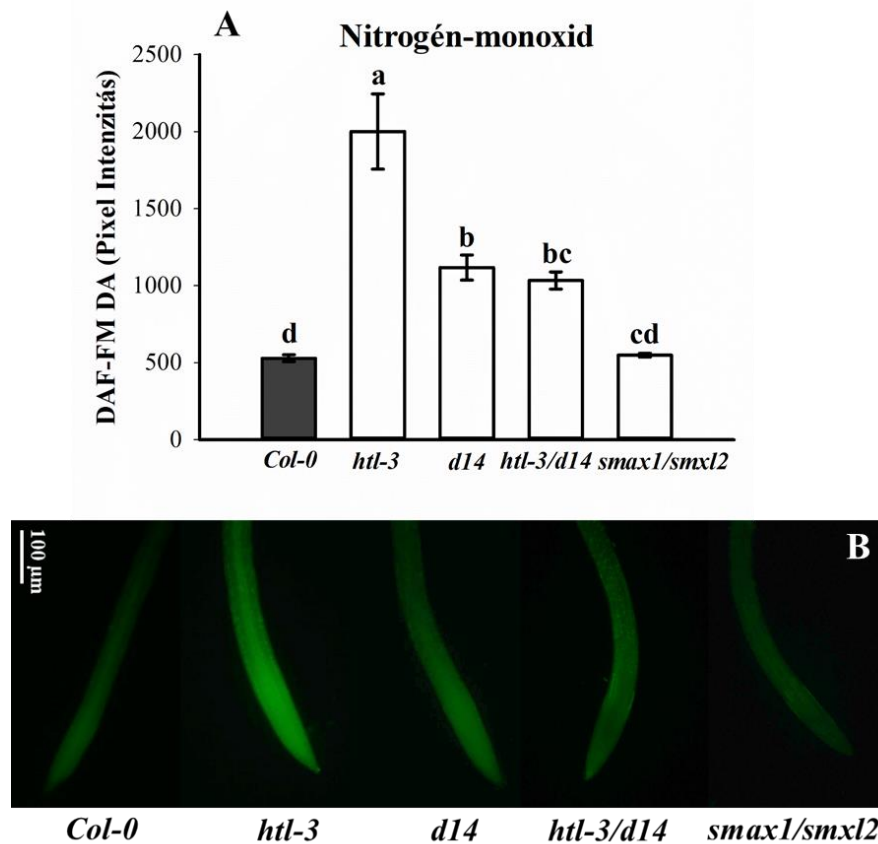


**15. ábra:** A SL-függő gének (*CCD8*, *MAX1*, *MAX2*, *D14*) relatív transzkriptszintjei Col-0 7 napos növényekben 250  $\mu$ M-os GSNO és 800  $\mu$ M-os cPTIO kezelésre. Génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P\leq 0,05$ ).

### 5.1.3.3. *d14*, *htl-3*, *htl-3/d14* és *smax1/smxl2* lúdfű csíranövények NO szintjeinek a meghatározása kontroll állapotban

A KAR-ek és a NO közötti kapcsolatról kevés információ áll a rendelkezésünkre, azonban azt tudjuk, hogy a *rac-GR24* indukálja a KAR jelátvitelt, valamint a *max* mutánsok szintén interferálnak a KAR-nel, hiszen közös jelátviteli elemeken osztoznak. Ezért nem kizárható, hogy a KAR és a NO között is megfigyelhető kapcsolat. Ennek bizonyítására *d14* (SL receptor), *htl-3* (KAR receptor), ezekben kettős mutáns *htl-3/d14* és KAR jelátvitelben dupla mutáns *smax1/smxl2* vonalakban vizsgáltam meg a NO tartalmat stresszmentes állapotban. Col-0-hoz képest *htl-3*-ban négyszeresére emelkedett az endogén NO szint. SL receptor mutáns vonal is magasabb NO szintet mutatott a vad típushoz képest, azonban a *htl-3*-hoz képest enyhébb mértékben. A *htl-*

*3/d14* dupla receptor mutánsban a hatás nem adódott össze, *d14*-szerű NO szinttel rendelkezett. A *smax1/smxl2* mutáns vad típushoz hasonló NO szintet mutatott (16. ábra, A, B).



**16. ábra:** Stresszmentes körülmények között nevelt vad típusú *Col-0*, SL (*d14*) és KAR (*htl-3*) receptor hibás, KAR/SL receptor dupla mutáns (*htl-3/d14*), valamint KAR jelátviteli dupla mutáns (*smax1/smxl2*) vonalak NO szintjei (A). Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív mikroszkópos felvételek a DAF-FM DA (NO) fluoreszcens próbával jelölt gyökércsúcsokról (B). Mércse=100  $\mu$ m.

Annak a hipotézisnek az alátámasztására, hogy a KAR és a NO jelátviteli utak egymással kölcsönhatásban állnak, *in silico* megvizsgáltam KAR-specifikus jelfehérjék, a KAI2, és a SUPPRESSOR OF MAX1 (SMAX1) lehetséges *S*-nitrozilációját. Érdekes módon a KAI2 *S*-nitrozilációját csak az iSNO-PseAAC szoftver jelezte előre, míg a SMAX1 esetében mindhárom program több cisztein származék *S*-nitrozilációját is jelezte. (2. táblázat).

GPS-SNO 1.0			iSNO-PseAAC		Deep-Nitro	
Fehérje-Neve	Pozíció	Peptid	Pozíció	Peptid	Pozíció	Peptid
<u>KAR érzékelés</u>			154	EAIRSNYKAWCLGFAPLAVGG		
KAI2 ( <i>A. thaliana</i> )			209	RQILPFVTVPCHILQSVKDLA		
<u>KAR jelátvitel</u>	637	VAATVSQCKLGNGKR	115	KRAQAHQRRGCPQQQPLLA	115	KRAQAHQRRGCPQQQPLLA
SMAX1 ( <i>A. thaliana</i> )	962	SSGT YGDCTVARLEL	417	SFVPANRTLKCCPCLQSYER	479	QKKWNDACVRLHPSF
			580	GDVQVRDFLGCISSESVQNNN	809	KFGKRRASWLCSDDEERLTKPK
			637	AAAVAAATVSQCKLGNGKRRGV		
			809	KFGKRRASWLCSDDEERLTKPK		
			865	QGFSGKLSLQCVPF AFHDMVS		
			962	RVSSSGTYGDCTVARLELDE D		

**2. táblázat:** GPS-SNO, iSNO-PseAAC és Deep-Nitro szoftverek által megjósolt lehetséges S-nitrozilációra alkalmas peptidszekvenciák *Arabidopsis thaliana* KAI2, SMAX1 fehérjék esetén.

## 5.2. Eredmények 2

### 5.2.1. A Zn-hiány igazolása szerv és szövet szinten vad típusú és GSNOR túltermelő vonalban

Kísérleteimet a cinkhiányos állapot kialakításával és annak igazolásával kezdtem meg. A normál cinkellátottságú, az enyhe Zn-limitáció (Zn/10) és súlyos Zn-limitáció (Zn/0) mellett nőtt vad típusú (Col-0) és GSNOR enzimet túltermelő (*35S::FLAG-GSNORI*) lúdfű vonalak gyökérzetében és hajtásában megmértem a cinkkoncentrációt.

Mindkét lúdfűvonal gyökér- és hajtás rendszerének a Zn-tartalma koncentrációfüggő módon csökkent, attól függően, hogy mekkora mértékű volt a cinkmegvonása a táptalajban. A Col-0 *Arabidopsis* gyökerében a Zn-ion tartalom 68%-kal, illetve 83%-kal csökkent a kontrollhoz képest a Zn/10 és a Zn0 kezelések esetén. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a GSNOR mutáns vonal gyökerében, a kontrollhoz képest a korlátozott cink (Zn/10) hozzáférése 63%-kal, teljes elvonása 83%-kal csökkentette a cinktartalmat. A hajtás tekintetében Col-0-ban 67%, illetve 76%-kal csökkent a Zn-tartalom a kontrollhoz képest enyhe (Zn/10) és cinkmentes (Zn/0) kezelés hatására. A GSNOR mutáns hajtásában is hasonló tendencia volt kimutatható, vagyis a Zn/10 kezelés 71%-os, a Zn0 kezelés 82%-os csökkenést okozott a Zn-tartalomban (3. táblázat).

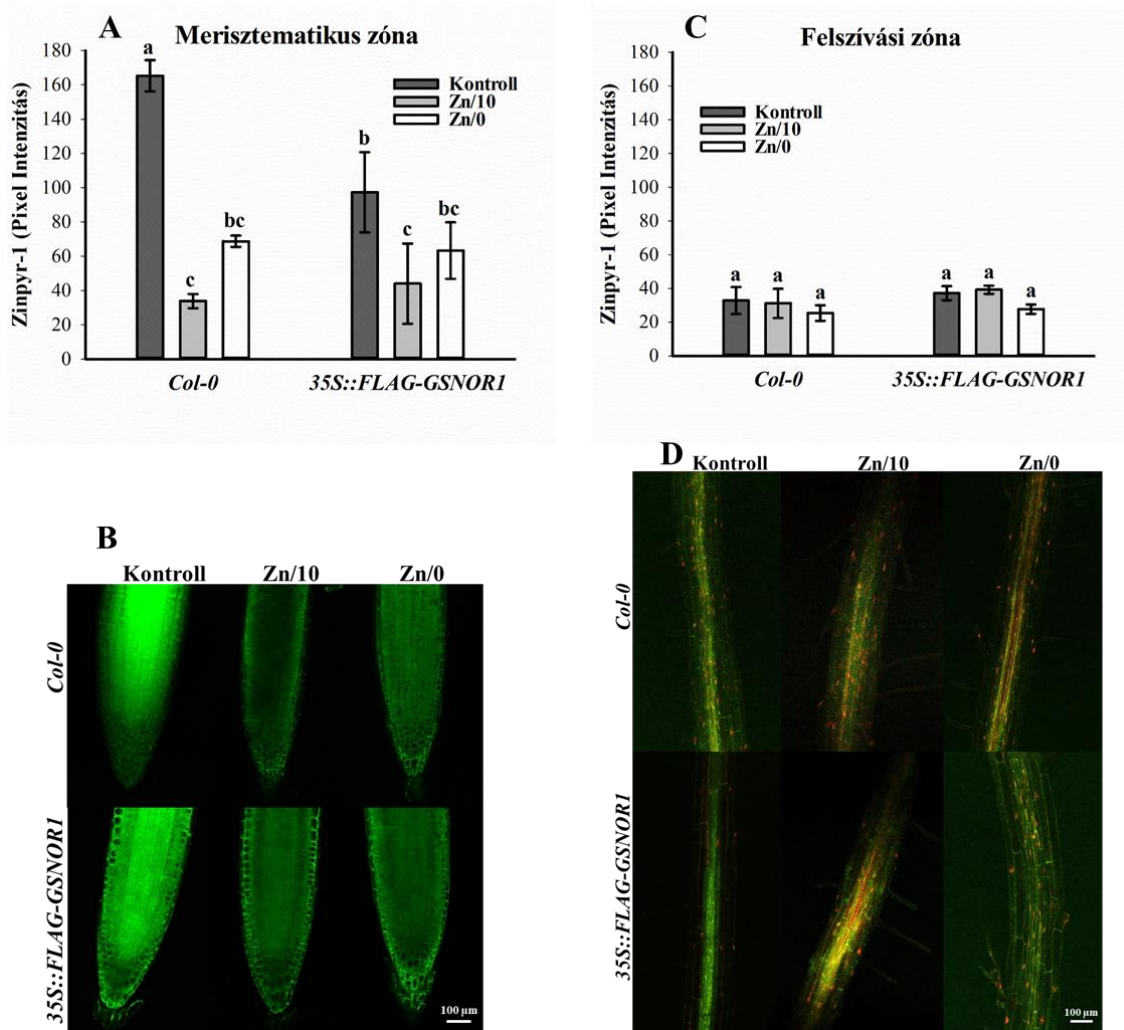
	Gyökér (Zn <sup>2+</sup> ) µg/g száraz tömeg	Hajtás (Zn <sup>2+</sup> ) µg/g száraz tömeg
Col-0 Kontroll	258,22 ± 3,82	184,74 ± 0,51
Col-0 Zn/10	84,33 ± 0,69	62,96 ± 0,76
Col-0 Zn/0	43,23 ± 0,19	44,37 ± 0,37
35S:: <i>FLAG-GSNOR1</i> Kontroll	220,66 ± 1,76	249,65 ± 4,47
35S:: <i>FLAG-GSNOR1</i> Zn/10	81,97 ± 1,05	73,76 ± 1,16
35S:: <i>FLAG-GSNOR1</i> Zn/0	39,37 ± 0,63	43,94 ± 0,51

**3. táblázat:** Col-0 és 35S::*FLAG-GSNOR1* cinktartalma µg/g száraz tömegben. A növények kontroll (15 µM ZnSO<sub>4</sub>) Zn/10 (1,5 µM ZnSO<sub>4</sub>) vagy Zn0 (0 µM ZnSO<sub>4</sub>) táptalajon növekedtek 7 napig.

Szövetszinten a növényvonalak szabad cinkionszintjének detektálásához Zn specifikus fluoreszcens festéket alkalmaztam, a Zinpyr-1-et.

Enyhe Zn-hiányos táptalajon növekedett növények merisztematikus zónájában szignifikánsan csökkent a Zinpyr-1 fluoreszcens jele mindkét vonal esetén a kontrollhoz képest (17. ábra, A, B). Col-0-ban a cink teljes megvonása is szignifikánsan csökkentette a cinkszintet, míg ez a hatás elmaradt az eredetileg is alacsonyabb cinkszinttel rendelkező GSNOR mutánsban. Az optimálisnál alacsonyabb cinkellátottság nem okozott cinkszintbeli változást a növényvonalak csúcstól távolabbi gyökérszónájában (17. ábra, C, D).

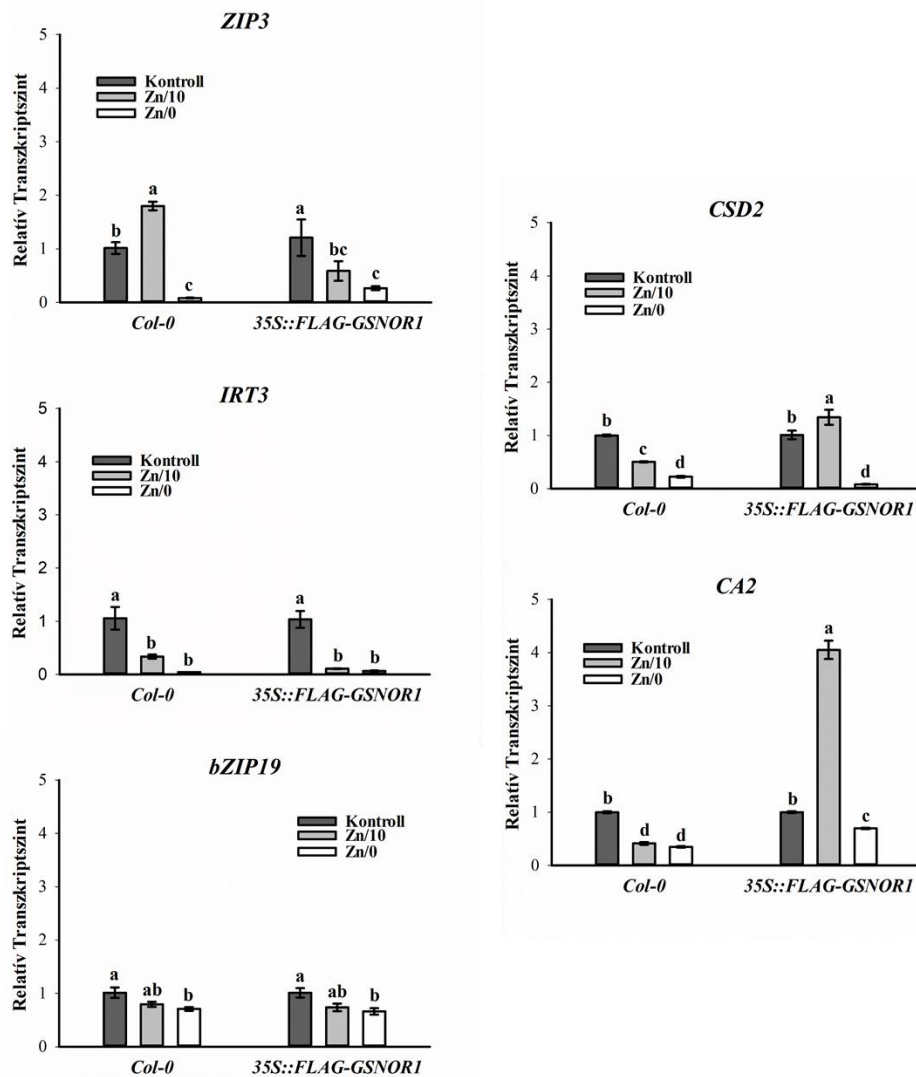




**17. ábra:** Kontroll ( $15 \mu\text{M ZnSO}_4$ ) Zn/10 ( $1,5 \mu\text{M ZnSO}_4$ ) és Zn0 ( $0 \mu\text{M ZnSO}_4$ ) táptalajon nevelt *Col-0* és *35S::FLAG-GSNOR1* vonalak szabad cinkionszintjei a főgyökérzet merisztematikus (A) és felszívási zónájában (C). A statisztikailag különböző adatokat eltérő betűk jelölik a Duncan-féle teszt ( $n=10$ ,  $P \leq 0,05$ ) alapján. Reprezentatív felvételek a 7 napos, Znp1-1 próbával jelölt növények gyökércsúcsairól (B) és a csúcstól távolabbi gyökérszónáiról (D). Mércse= $100 \mu\text{m}$ .

A lúdfű csíranövények Zn-hiány marker géneinek expressziós mintázatát qRT-PCR-rel vizsgáltam. A cink szállításában résztvevő gének közül a *ZIP3* transzkripció szintje szignifikánsan megemelkedett enyhe Zn-hiány hatásra, míg a teljes Zn-megvonása 0 körüli értékre csökkentette azt vad típusban a kontrollhoz képest. *35S::FLAG-GSNOR1*-ben a *ZIP3* expressziója szignifikánsan csökkent a Zn0 kezelés hatására. Szintén a cink szállításában szerepet betöltő *IRT3* gén expressziója szignifikánsan csökkent mindkét növényfajban mindkét Zn korlátozásra. Az alacsony Zn-hozzáférése estén az adaptációs folyamatokat elindító *bZIP19* transzkripció faktor expressziója enyhe csökkenést mutatott Zn0 kezelés esetén mindkét vonalban. A cink

kofaktort igénylő enzimek közül a szuperoxid-dizmutáz és a szénsav-anhidráz génjei, a *CSD2* és a *CA2* hasonló változásokat mutattak szuboptimális cinkellátottság esetén. Mindkét mértékű Zn-megvonás csökkentette a *CSD2* és *CA2* gének expresszióját Col-0-ban, míg az enyhe Zn-korlátozás a *CSD2* és *CA2* expresszió növekedését okozta a GSNOR túltermelő vonalban. Kiemelendő, hogy az enyhe Zn-megvonás négyszeres növekedést okozott a transzgénikus vonal *CA2* expressziójában (18. ábra).

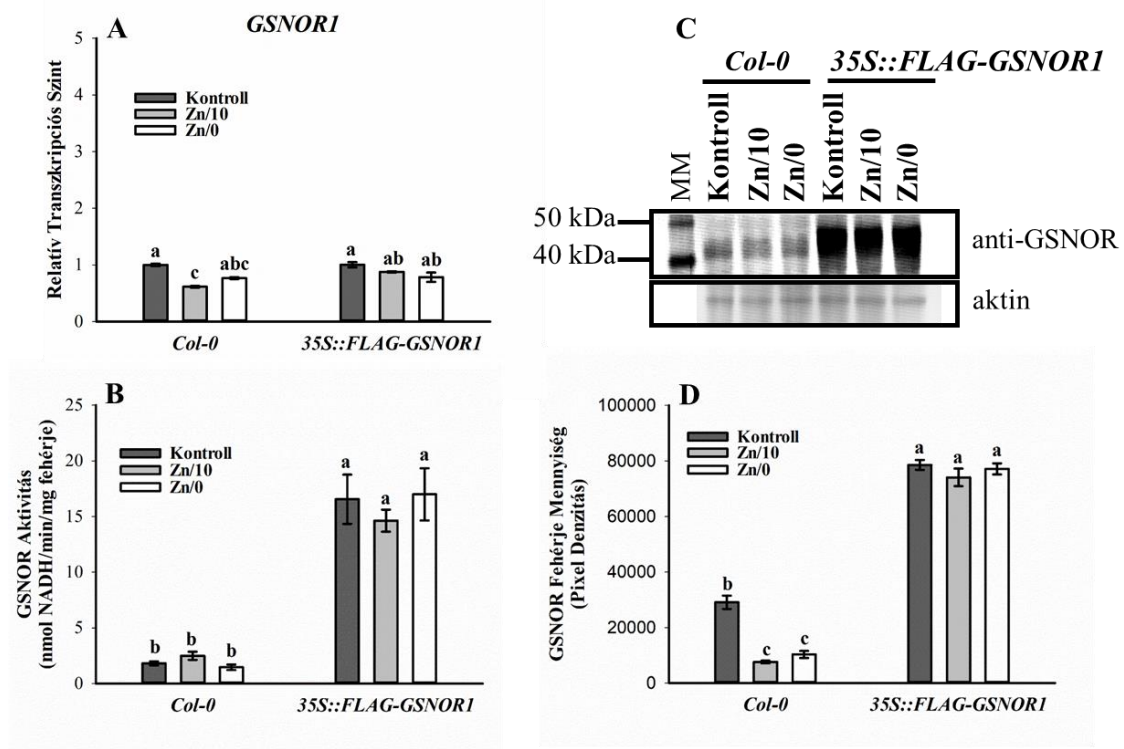


**18. ábra:** Zn-hiány markergének (*ZIP3*, *IRT3*, *bZIP19*, *CSD2*, *CA2*) relatív transzkriptszintjei kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ), Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) kezelés alatt vad típusú és GSNOR mutáns csíranövényekben. Génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. A szignifikáns különbséget az adatsorban eltérő betűk jelzik a Duncan-féle teszt alapján ( $n=3$ ,  $P \leq 0,05$ ).

## 5.2.2. A Zn hiány hatása a GSNOR enzimre gén-, fehérje- és aktivitás szinten

Alegységenként két központi cinkiont tartalmazó GSNOR enzim génkifejeződési, fehérjeszintű és biokémiai analizisét is elvégeztem annak érdekében, hogy minél pontosabb képet kapjak a cinkhiány enzimre gyakorolt hatásáról.

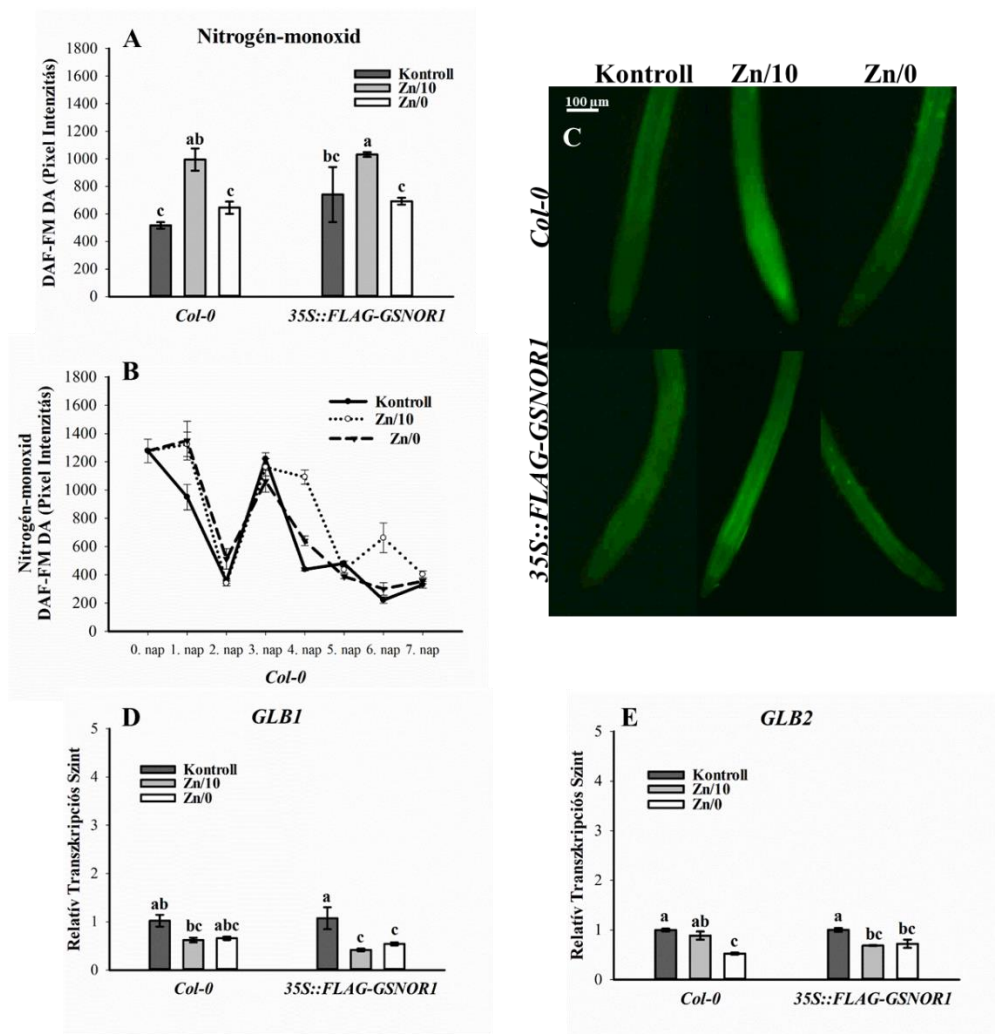
Col-0-ban a cink korlátozott elérhetősége (Zn/10) a *GSNOR1* gén transzkript szintjében enyhe szignifikáns csökkenést okozott a kontrollhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns a cink teljes elvonása (Zn0) esetén (19. ábra, A). Ami a GSNOR fehérje mennyiségét illeti, a Zn-korlátozás (enyhe és teljes megvonása) jelentősen csökkentette azt Col-0-ban (19. ábra, C, D), ami összefüggésbe hozható a *GSNOR1* génexpresszió csökkenésével. A *35S::FLAG-GSNOR1* vonal esetében a csökkent Zn-ellátás nem okozott változást a *GSNOR1* expressziójában és a fehérje mennyiségében. Érdekes módon, a GSNOR aktivitás egyik növényvonalban sem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest Zn-korlátozás esetén. (19. ábra, B).



**19. ábra:** A *AtGSNOR1* gén relatív transzkriptszintje (A), a GSNOR enzim mennyisége (C, D) és aktivitása (B) kontroll (15  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) Zn/10 (1,5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) és Zn0 (0  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) kezelés hatására 7 napos *Arabidopsis thaliana* vonalakban. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján (n=3,  $P \leq 0,05$ ). MM=molekula marker (fehérje létra, a membránképen az egyes sávokhoz tartozó fehérjék súlyát mutatja be kDa-ban megadva).

### **5.2.3. A reaktív nitrogén- és oxigénformák cinkhiány által indukált változásainak hatása a fehérjenitrációra**

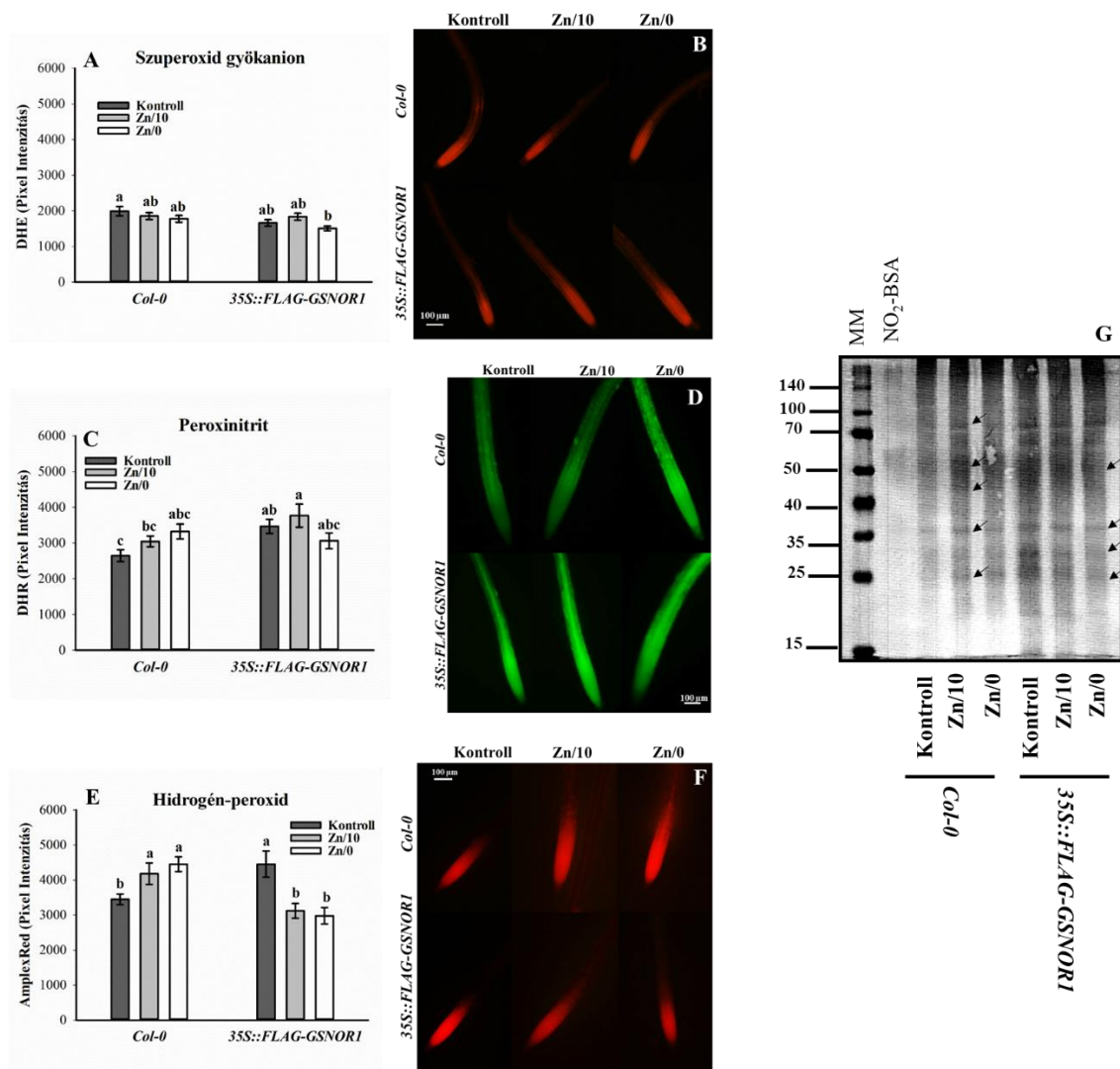
A nitrogén-monoxid szintjét DAF-FM DA fluoreszcens festékekkel mutattam ki a gyökérzetben (20. ábra, C). Mindkét növényvonalban az enyhe Zn-korlátozás NO szint növekedést váltott ki, míg Zn<sup>0</sup> kezelés esetén a gyökerek NO szintje hasonló volt a kontroll állapothoz (20. ábra, A). Vad típusú lúdfűben a NO-szintek a kezelés időtartama alatt erőteljes fluktációt mutattak mind a kontroll, mind a cinkhiányos növényekben (20. ábra, B). A kezelés 4. és 7. napján között volt a legnagyobb különbség a NO szintek között kontroll és a cinklimitáció mellett nőtt növények között. A NO eltávolításában résztvevő *GLB1* és *GLB2* gének expressziójában a cink enyhe és teljes elvonása egyaránt szignifikáns csökkenést váltott ki Col-0 és GSNOR mutáns vonalakban (20. ábra, D, E).



**20. ábra:** A nitrogén-monoxid szintek a nevelési periódus 7. napján (A) és az időfüggvényében (B) kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) táptalajon nevelt Col-0 és GSNOR mutáns vonalaknál. *GLB1* (D) és *GLB2* (E) gének relatív transzkriptszintjei. Génexpressziós vizsgálat során az adatokat *ACTIN2* és *GAPDH2* génekhez normalizáltam. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=10$ ,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív mikroszkópos felvételek a DAF-FM DA-jelölt gyökércsúcsokról (C). Mércse=100  $\mu\text{m}$ .

Optimálisnál alacsonyabb cinkellátottság mellett a  $\text{ONOO}^-$  képződésében résztvevő  $\text{O}_2^{\cdot -}$  szintje nem mutatott szignifikáns változást a kontrollhoz képest egyik növényvonalban sem (21. ábra, A, B). Col-0-ban a  $\text{ONOO}^-$  szintek koncentrációfüggő, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést mutattak, míg a GSNOR túltermelő vonalban a Zn/10 és Zn0 kezelések nem befolyásolták a  $\text{ONOO}^-$  szinteket (21. ábra, C, D). A  $\text{H}_2\text{O}_2$  szint Col-0-ban nőtt a Zn-korlátozás mértékétől függően, míg *35S::FLAG-*

*GSNOR1*-ben szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest a Zn-megvonás hatására (21. ábra, E, F). A fehérjenitráció mértéke magasabb volt a *GSNOR* túltermelő vonalban a Col-0-hoz képest optimális cinkszint mellett.  $\text{ONOO}^-$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  szintek szignifikánsan magasabbak voltak az optimálisan Zn-ellátású *35S::FLAG-GSNOR1*-ben, mint a Col-0-ban. Vad típusban a cinkhiány növelte a 3-nitrotirozin mennyiségét legalább öt fehérjesáv esetén (21. ábra, G, nyilakkal jelölve). Érdekes módon a *35S::FLAG-GSNOR1*-ben a cinkmegvonás legalább négy fehérjesávban csökkentette a tirozinnitrációját jelző 3-nitrotirozin-asszociált immunpozitív jelet (21. ábra, G, nyilakkal jelölve).



**21. ábra:** A szuperoxid gyökkanion (A), a peroxinitrit (C) és a hidrogén-peroxid (E) szintek változása 7 napos kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) táptalajon nevelt Arabidopsis csíranövényekben. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján ( $n=10$ ,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív mikroszkópos felvételek (B) DHE ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ )- (D) DHR123 ( $\text{ONOO}^-$ )- és (F) AmplexRed ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-jelölt gyökércsúcsokról. Mércse=100  $\mu\text{m}$ . (G) Reprezentatív 3-nitrotirozin-jelölt Western-blot-membrán. MM=molekula marker (fehérje létra, a membránképen az egyes sávokhoz tartozó fehérjék súlyát mutatja be kDa-ban megadva). NO<sub>2</sub>-BSA=nitrált borjú szérum albumin. Fekete nyilak jelzik a változásokat a fehérje sávok nitrációs szintjében.

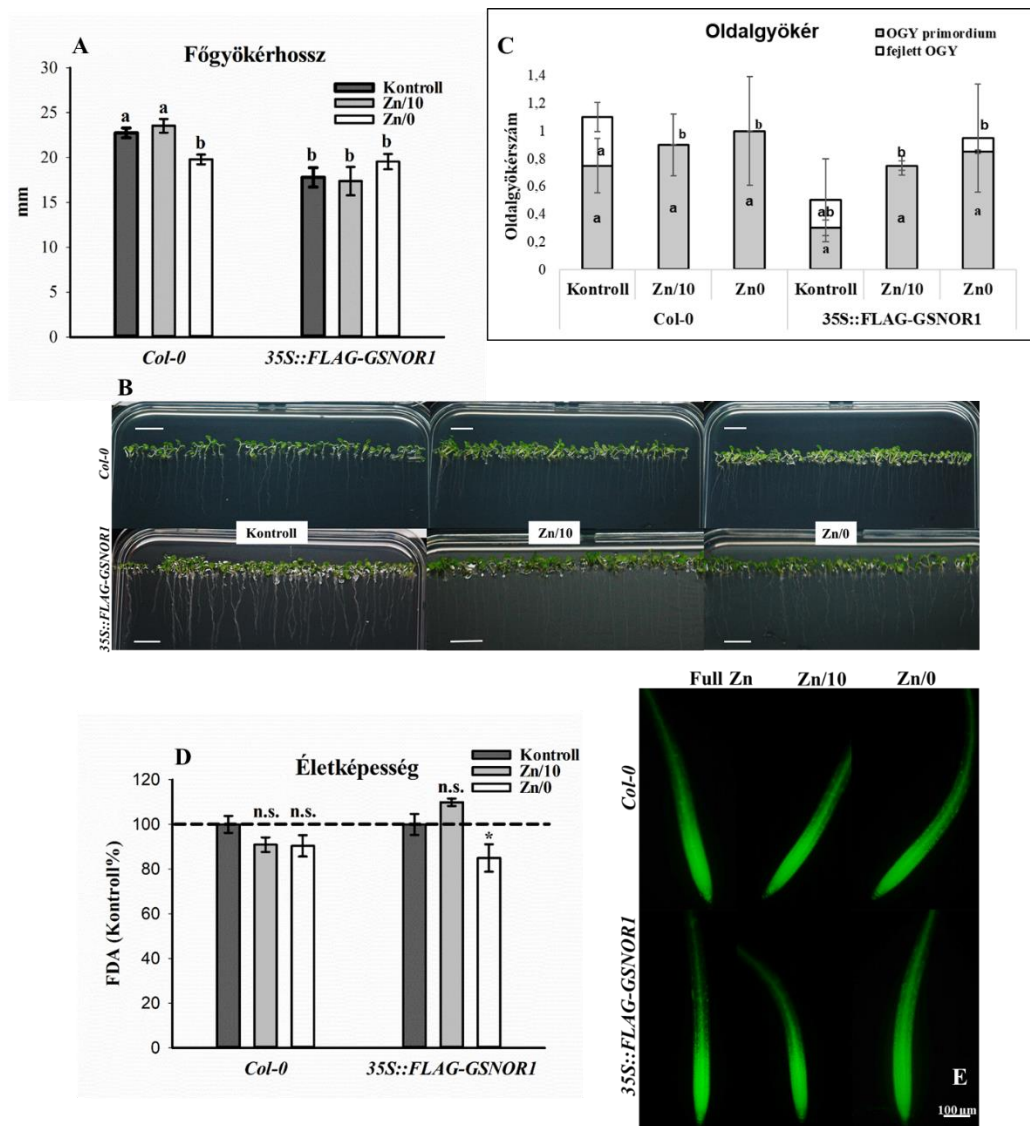
#### **5.2.4. Cinkhiány által kiváltott morfológiai változások és a háttérben húzóó folyamatok**

A cinkmegvonása kismértékű változásokat idézett elő a lúdfű vonalak gyökérzetének architektúrájában. Vad típusban a Zn0 kezelés 13%-os főgyökérhossz rövidülést okozott, míg ez a hatás elmaradt Zn/10 esetén. A transzgenikus vonal rövidebb főgyökérrel rendelkezett a vad típushoz képest (lásd még 5. ábra), amit a cinkmegvonása nem csökkentett tovább (22. ábra, A, B). Az OGY primordiumok (kisebb, mint 7. stádiumú oldalgökerek) számában nem következett be szignifikáns változás cinkkorlátozás hatására egyik növényvonalban sem, annak ellenére, hogy a GSNOR mutánsban emelkedő tendencia volt megfigyelhető az optimális Zn-ellátottságú növényhez képest (22. ábra, C). A kifejlett OGY-ek (nagyobb, mint 7. stádiumú oldalgökerek) száma enyhe és teljes cinkhiányos kezelés hatására szinte nullára csökkent Col-0-ban. Ugyanez a hatás megfigyelhető volt GSNOR mutánsban Zn/10 kezelésre, viszont Zn0 kezelésre nem következett be ekkora mértékű csökkenés (22. ábra, C). Kontroll körülmények között az össz oldalgökérszám GSNOR mutánsnál szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típushoz képest (22. ábra, C).

A gyökérmorfológiai változások háttérben számos folyamat állhat, melyek közé tartozik a sejtek életképességében, osztódásában, valamint a hormonháztartásban bekövetkező esetleges eltérések.

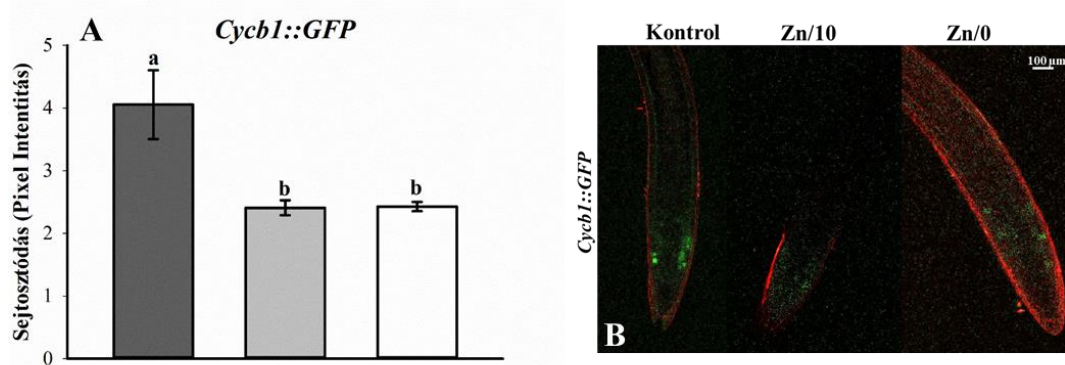
A korlátozott Zn-ellátottság nem okozott romlást a merisztémasejtek életképességében Col-0-ban, míg a GSNOR túltermelő vonalban enyhe csökkenés volt megfigyelhető a Zn teljes megvonásának eredményeként (22. ábra, D, E).





**22. ábra:** Col-0 és 35S::FLAG-GSNORI főgyökérhossz- (A), oldalgökérszám- (C) és életképességbeli változása (D) 7 napos kontroll (15  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) Zn/10 (1,5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) és Zn0 (0  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) táptalajon nevelt csíranövényeknél. Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján (n=3,  $P \leq 0,05$ ). A statisztikailag szignifikáns adatokat a Student-féle teszt alapján csillag jelöli (\* $P \leq 0,05$ , n.s.= nem szignifikáns). Reprezentatív fotók a Petri-csészében nevelt Arabidopsis növényekről (B). Mércé=1 cm. (E) Reprezentatív mikroszkópos felvételek FDA-jelölt gyökércsúcsokról. Mércé=100  $\mu$ m.

Az életképességbeli vizsgálatok után további vizsgálatot végeztem a merisztematikus zóna sejtjeinek osztódásában bekövetkező lehetséges változásokkal kapcsolatban. A sejtosztódás detektálásához egy GFP promóterrel jelölt *Cycb1::GFP* transzgenikus vonalat használtam (23. ábra, B). A CycB1::GFP kifejeződése mindkét cinkkorlátozás (Zn/10, Zn0) esetén szignifikáns módon csökkent a kontrollhoz képest (23. ábra, A).



**23. ábra:** A *CycB1::GFP* kifejeződése (pixel intenzitás) kontroll (15 µM ZnSO<sub>4</sub>) Zn/10 (1,5 µM ZnSO<sub>4</sub>) és Zn0 (0 µM ZnSO<sub>4</sub>) táptalajon nevelt, 7 napos *Cycb1::GFP* Arabidopsis gyökércsúcsában (A). Az adatokban bekövetkezett szignifikáns változásokat eltérő betűk jelölik a Duncan teszt alapján (n=3,  $P \leq 0,05$ ). Reprezentatív mikroszkópos felvételek a *Cycb1::GFP* növények gyökércsúcsairól. Zöld szín=GFP jel, vörös szín=a sejtfalat megfestő propidium-jodid. Mércse=100 µm.

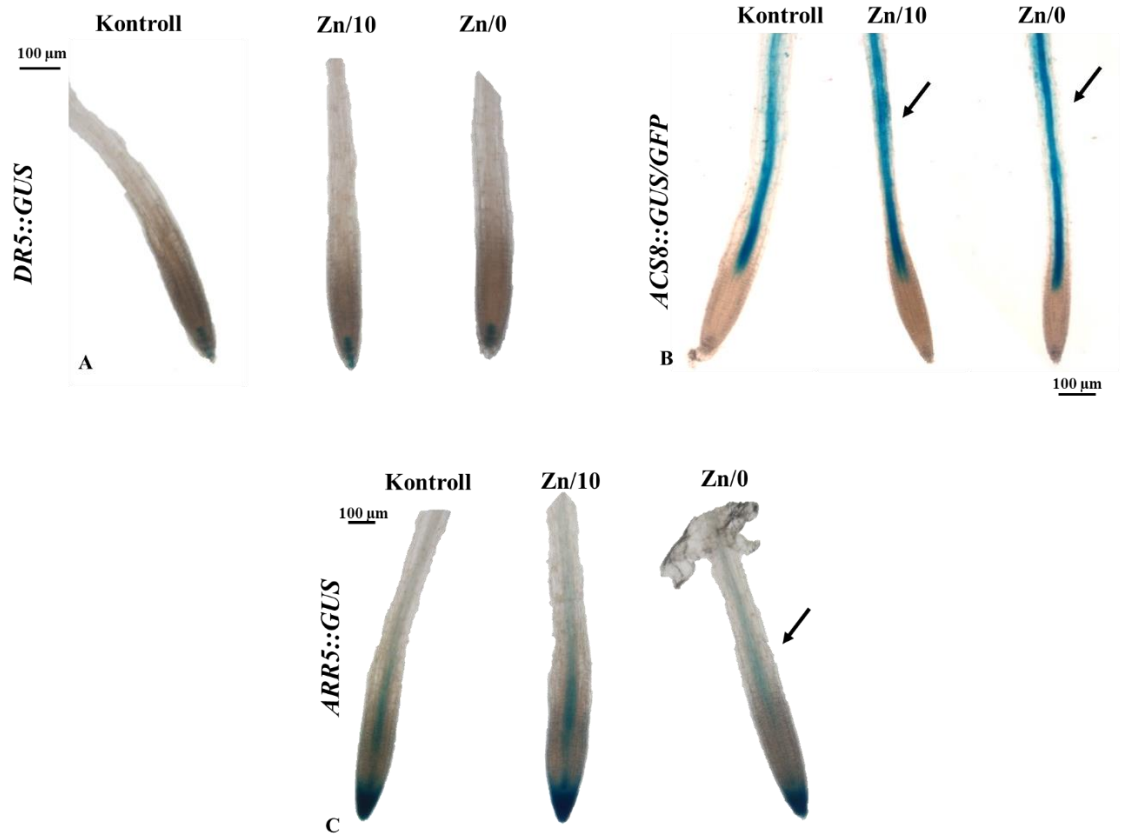
Az egészséges növények megfelelő gyökérstruktúrájának kialakításához elengedhetetlen a hormonok, legfőképp az auxin egyensúlyának a fenntartása. Emellett egyéb faktorok is befolyásoló tényezők lehetnek, mint például növényi növekedés szabályzó NO.

A hormonszintek (auxin, etilén, citokinin) *in situ* detektálásához a cinklimitált csíranövények gyökérzetében GUS riportervonalakat használtam fel.

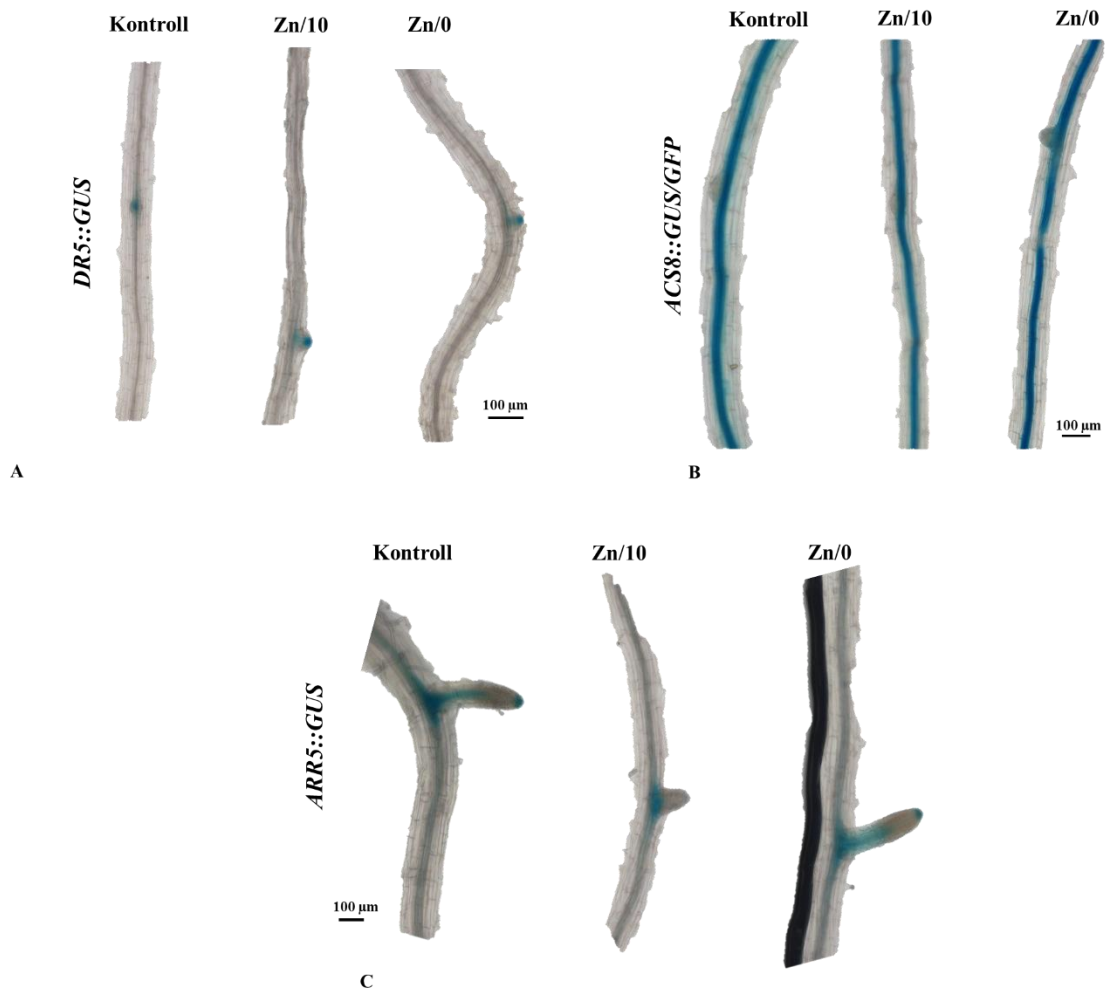
Az auxin jele a *DR5::GUS* transzgénikus növény főgyökerének nyugalmi centrumának és gyökérsüvegének területére korlátozódott. A kontrollhoz képes a cink enyhe és teljes megvonása sem okozott az auxin szintjében eltérést sem a gyökércsúcsban (24. ábra, A) sem az oldalgyökerekben (25. ábra, A).

Az etilén szintézisét jelző az *ACS8::GUS/GFP* transzgénikus növény esetében a X-Gluc a gyökér szállítószöveiteiben mutatott jelölődést. Enyhe és teljes cinkhiányos állapotban az etilén jele kiterjedt a szállítószövetek melletti szövetekre is (24. ábra, B), ami arra utal, hogy kismértékben fokozódott a kontrollhoz képest. Az oldalgyökerek tekintetében nem tapasztaltam változást Zn/10 és Zn0 kezelés hatására (25. ábra, B).

A citokinin jele, amely főként a gyökérsüvegben, kisebb mértékben pedig a merisztémában fejeződik ki *ARR5::GUS* transzgénikus vonalban, cinkmegvonásra mérséklődött. Ez a cinklimitáció-indukált csökkenés mind a főgyökérben (24. ábra, C), mind az oldalgyökérben (25. ábra, C) megfigyelhető volt.



**24. ábra:** *In situ* hormonszintek detektálása kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) táptalajon nevelt transzgénikus vonalak főgyökérsúcsában a nevelési periódus 7. napján. DR5::GUS=auxin-asszociált jel (A), ACS8::GUS/GFP=etilén-asszociált jel (B), ARR5::GUS=citokinin-asszociált jel (C). Mércse=100  $\mu\text{m}$ . Fekete nyilak a változásokat jelzik.



**25. ábra:** (A) Auxin (*DR5::GUS*) (B) etilén (*ACS8::GUS/GFP*) és (C) citokinin (*ARR5::GUS*) szintek változása oldalgyökerekben kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) Zn/10 (1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és Zn0 (0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) táptalajon 7 napig nevelt GUS transzgénikus növényekben. Mércse=100  $\mu\text{m}$ .

## 6. Eredmények értékelése

### 6.1. Eredmények értékelése 1

#### 6.1.1. A gyökérszerkezeti változások, valamint a NO-SL közötti kapcsolat stresszmentes állapotban.

A növényvonalak gyökérarchitektúráját vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a GSNOR enzim hiánya vezet a legkedvezőtlenebb gyökérszerkezet kialakításához. Ezt támasztja alá, hogy 7 napos *gsnor1-3* rendelkezik a legrövidebb FGY-rel és a legkevesebb OGY primordiummal (kifejlett OGY nincsen), ezáltal ez a vonal bír a legalacsonyabb OGY denzitással (6. ábra). Eredményeimmel összhangban mások is arra jutottak, hogy a GSNOR enzim elengedhetetlen a normális gyökérfejlődéshez (Lee és mtsai., 2008; Holzmeister és mtsai., 2011; Kwon és mtsai., 2012; Shi és mtsai., 2015). Az enzim túltermelése a *35S::FLAG-GSNORI*-ben nem vezetett drasztikus változásokhoz a gyökérzetben, annak ellenére, hogy főgyökere rövidebb, mint a vad típusé, azonban csökkent OGY primordiumszáma és kifejlett OGY száma vad típuszerű OGY denzitást eredményez (6. ábra). A SL bioszintézisben (*max1-1*) és jelátvitelben (*max2-1*) hibás lúdfüvek elágazó gyökérzete arra enged következtetni, hogy a MAX1-függő SL szintézis és a MAX2-függő SL jelátvitel gátolja az OGY fejlődést, ahogyan azt korábban megállapították (Kapulnik és mtsai., 2011, Ruyter-Spira és mtsai., 2011). A kifejlett OGY-k és a primordiumok aránya a Col-0-ban és a mutánsokban hasonló volt, ami arra utal, hogy a SL-ok befolyásolják az OGY iniciációját és a későbbi szakaszokat is. Ugyanakkor a *max2-1* mutánsról bebizonyosodott, hogy a SL és a KAR jelátvitelben is érintett, ezért a KAR részvétele a gyökérzet szabályozásában nem zárható ki ennek a mutánsnak a felhasználásával (Villaécija-Aguilar és mtsai., 2019).

A NO-nak a fehérjék cisztein aminosavával, szabad aminosavakkal vagy szabad tiolokkal való reakciójából keletkező SNO-k NO hordozóként egyrészt a NO hosszabbtávú szállítását teszik lehetővé, másrészt NO jelátviteli útvonalakban vesznek részt. A GSNOR az SNO/NO szintek szabályozásán keresztül hozzájárul a NO jelátviteli utak egyensúlyának a fenntartásához (Kolbert és mtsai., 2019a). A *gsnor1-3* és a *35S::FLAG-GSNORI* vad típusnál nagyobb NO szintjei eltérő forrásból eredhetnek. A GSNOR hiányos *gsnor1-3*-ban a SNO szintje magasabb, mint vad típusban, addig a

túltermelő vonal alacsonyabb SNO szinttel rendelkezik (7. ábra). GSNOR hiányában a magasabb SNO járul hozzá a magasabb NO szinthez, addig GSNOR túltermelőben a magasabb NO tartalmat a fokozott nitráttartalom és emelkedett nitrát-reduktáz aktivitás okozhatja (Frunghillo és mtsai., 2014). Ezért elmondható, hogy a *35S::FLAG-GSNOR1* vonal adataiból a nitrátból származó NO hatásaira tudunk következtetni, míg a *gsnor1-3* esetén a GSNOR-függő NO eltávolításáról kapunk információkat. Továbbá a GSNOR mutánsok hasonló gyökérszerkezetei magyarázhatóak a magas NO szintekkel, hiszen a NO-ról ismert, hogy az auxin maximumot csökkentve főgyökérrövidülést okoz (Fernández-Marcos és mtsai., 2011; Shi és mtsai., 2015). A *max* mutánsok szintén magasabb endogén NO-dal rendelkeznek a vad típushoz képest, ami magyarázható a *max1-1* és *max2-1* vonalak csökkent GSNOR fehérjemennyiségével (9. ábra, C, D). A NO-asszociált gének kifejeződése a *max1-1*-ben hasonló a vad típuséhoz, és minden vizsgált gén enyhén alulszabályozott a *max2-1* esetén (8. ábra). Mivel a változások kismértékűek voltak és nem voltak kimutathatóak mindkét *max* vonalban, ezért feltételezhető, hogy ezek a gének nem játszanak szerepet a NO szabályozásában SL hiányában. Fordított esetben, amikor GSNOR mutánsokban vizsgáltam meg az SL-függő géneket, azt az eredményt kaptam, hogy az SL bioszintézis gének (*CCD7*, *CCD8* és *MAX1*) *gsnor1-3*-ban alulszabályozottak, ami arra utal, hogy a GSNOR hiánya gátolja az SL bioszintézisét. A *CCD7* szintén alulszabályozott GSNOR túltermelőben, viszont a *D14* és a *MAX2* (SL jelátviteli gének) expressziói sem GSNOR hiányában, sem túltermelése esetén nem változtak (10. ábra). Ez arra utal, hogy a SL jelátvitel a GSNOR alul vagy túltermelése nem befolyásolja.

### **6.1.2. SL analóg és inhibitor hatása a NO jelátvitelre**

Más kutatócsoportokhoz hasonlóan én is megfigyeltem a *rac-GR24* kezelés serkentő hatását a FGY elongációjára vad típusban (Ruyter-Spira és mtsai., 2011; Sun és mtsai., 2014; Marzec 2016). Ezzel szemben a TIS108 50%-os FGY hossz csökkenést okozván gátolta az elongációt a FGY-ben. A Col-0-hoz képest *gsnor1-3*-ban a SL inhibitor nagyobb mértékű FGY rövidülést váltott ki. Érdeemes megemlíteni, hogy a *rac-GR24* is megrovidította a *gsnor1-3* FGY-t, azonban ez nem volt akkora mértékű, mint TIS108 kezelésre (11. ábra, A). A *gsnor1-3* gyökérrendszere sokkal érzékenyebbnek bizonyul az SL-szintek módosítására a vad típushoz képest, vagyis működőképes GSNOR enzim megléte szükséges ahhoz, hogy a *rac-GR24* ki tudja fejteni a pozitív

hatását a főgyökér megnyúlására. Feltehetően GSNOR hiányában NO/SNO szintek nincsenek megfelelően szabályozva, és a magas NO/SNO szintek megnyúlás helyett FGY rövidülést okozhatnak (Fernández-Marcos és mtsai., 2011). A *35S::FLAG-GSNORI* SL analóg kezelésre pozitív, SL inhibitor hozzáadására negatív hatást fejt ki a FGY elongációjára, akár csak Col-0 esetében. Ebből az következik, hogy a GSNOR enzim túltermelése nincs hatással a SL által kiváltott/indukált elongációra. A kifejlett OGY-k száma csökken, a primordiumoké változatlan marad 2  $\mu$ M-os *rac*-GR24 kezelés hatására (11. ábra, C), ami azt jelzi, hogy a SL nem az OGY iniciációra, hanem a kifejlett OGY-re hat vad típusban. A csak primordiummal rendelkező *gsnor1-3*-ban a SL analóg 0-ra csökkentette le a primordiumok számát. A GSNOR túltermelő vonalban a kifejlett OGY-k gátlása még kifejezettebb volt, mint Col-0-ban. Mindezek az eredmények alátámasztják azt a más kutatócsoportok általi megfigyelést, hogy a *rac*-GR24 gátló hatását fejt ki az oldalgyökérfejlődésre (Kapulnik és mtsai., 2011; Ruyter-Spira és mtsai., 2011; Arite és mtsai., 2012; De Cuyper és mtsai., 2015; Marzec és Melzer, 2018). Habár a GR24 különböző sztereoizomerjeinek használata nélkül nem zárhatjuk ki a lehetőségét annak, hogy a *rac*-GR24 interakcióba lép a KAI2-vel, így befolyásolja a KAR jelátvitelt (Scaffidi és mtsai., 2014) és a gyökérfejlődést (Villaécija-Aguilar és mtsai., 2019). A TIS108 kezelés vad típusban mind a primordiumok, mind a kifejlett OGY-k számát csökkenti, míg a *35S::FLAG-GSNORI*-ben a primordiumok számát növeli (11. ábra, C). Ebből arra következtethetünk, hogy normál GSNOR mennyiség mellett a csökkent SL szint gátolja az iniciációt, de megemelkedett GSNOR aktivitás vagy nitrátból származó NO-szint jelenlétében a SL gátlása az OGY iniciáció serkentéséhez vezet. Ezek a jelinterakciók meglehetősen összetettek lehetnek, és más közreműködő faktorok ismerete szükséges ahhoz, hogy a megfigyelt hatásokat meg tudjuk magyarázni.

A SL analógra csökkent a GSNOR fehérje abundancia, míg SL inhibitor, illetve az analóg és az inhibitor együttes használata növelte azt (13. ábra). Ez a mutánsokkal kapott eredményekkel ellentétes, ami betudható annak, hogy az exogén kezelések eltérő körülményeket jelentenek a kezeletlen mutánsokhoz képest. Egy másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy a MAX1 és MAX2 mutációk hatása a GSNOR-ra nem SL-specifikus, de lehet némi közvetett kapcsolat a génhiba és a GSNOR fehérje szintje között. Továbbá, a SL növényi szöveteken való gyenge kimutathatósága miatt a *rac*-GR24 és/vagy a TIS108 endogén SL szintekre gyakorolt hatása a csíranövényekben nem ismert.

Vad típusban a NO-függő gének közül a *NIA1*, a *NIA2* és a *GSNOR1* transzkripció szintjében nem okozott változást a *rac*-GR24 kezelés, míg a NO eltávolításában résztvevő, a nem szimbiotikus hemoglobinokat kódoló *GLB1* és *GLB2* gének expresszióját növelte kontrollhoz képest (12. ábra). Ez a megnövekedett expressziós szint feltételezhetően nem vezetett NO eltávolításhoz, mivel Kolbert és mtsai. (2019c) eredményei alapján a GR24 NO növekedést vált ki az *Arabidopsis* gyökerében. Ez egy érdekes ellentmondásnak tűnik, amit érdemes a továbbiakban kivizsgálni.

### 6.1.3. NO donor és gyökfogyó hatása a SL jelátvitelre

További vizsgálataim a SL hiányos lúdfüvek esetén NO donor (GSNO) és gyökfogyó (cPTIO) külsőleges alkalmazásával a gyökérmorfológiára és a SL-függő génekre fókuszáltak. A GSNO 250  $\mu$ M-os koncentrációban 50%-os főgyökér rövidülést okozott vad típusban, míg ez a hatás elmaradt a *max* mutánsokban (14. ábra, A). Ez arra utal, hogy a vizsgált SL (és KAR) mutánsok GSNOR-érzéketlenek és hogy a SL (és feltehetőleg a KAR) jelátvitel szükséges a GSNO-indukált gyökérrövidüléshez. Hasonló eredményre jutott Castillo és mtsai. (2018) *Arabidopsis* hipokotilban, a NO által okozott rövidülés a *max1*, *max2* és *max4* mutánsokban nem volt megfigyelhető. Fernandez-Marcos és mtsai. (2011) szerint a GSNO a gyökérmerisztéma aktivitását a PIN1-függő auxintranszport mérséklése révén csökkenti. Mivel a SL-ről ismert, hogy a PIN fehérjét negatívan szabályozza *Arabidopsis* gyökérben (Ruyter-Spira és mtsai., 2011), feltételezhetjük, hogy a GSNO PIN fehérjékre gyakorolt hatása a SL (és/vagy KAR) szintézis és/vagy jelátvitel serkentésén keresztül valósulhat meg. A NO, PIN és SL (KAR) közötti jelkapcsolatokat a jövőben kísérletiesen igazolni kell. Nem volt megfigyelhető változás NO donor és inhibitor hatására *CCD8*, *D14*, *MAX1*, *MAX2* génekre (15. ábra), azonban ezzel ellentétben Castillo és mtsai. (2018) NO kezelés hatására a *MAX2* és *MAX1* génekben is megemelkedett expressziót mutattak ki *Arabidopsis*ban.

Ahogy a SL analóg és inhibitor esetében, a NO donor és gyökfogyó se feltétlenül váltanak ki ellentétes hatást, viszont a NO optimális jelenléte elengedhetetlen.



#### 6.1.4. SL és KAR jelátviteli mutánsok NO szintjei

Annak érdekében, hogy a SL és a KAR hatásokat a NO-dal összefüggésben el tudjam választani egymástól, kísérleteimet kiegészítettem *htl-3* (KAR receptor), *d14* (SL receptor) *htl3/d14* és a KAR jelátviteli mutáns (*smax1/smxl2*) Arabidopsis NO tartalmának vizsgálatával. A *htl-3* extrém magas NO szintje (16. ábra) arra utal, hogy a KAR érzékelés hibája kedvez a NO felhalmozódásának. Ebből a KAR és NO közötti, a percepció szintjén megvalósuló jel kapcsolatra következtethetünk. A jelátviteli mutáns vad típuszerű NO szintje (16. ábra) arra utal, hogy a SMAX1/SMXL2-függő KAR jelátvitel nem kapcsolódik a NO jelátvitellel.

Annak alátámasztására, hogy a KAR és NO jelutak interferálnak, megvizsgáltam a KAR-specifikus KAI2 és a SUPPRESSOR OF MAX1 (SMAX1) szignálfehérjék lehetséges S-nitrozációját. Ehhez 3 különböző szoftvert használtam, és mindhárom program kimutatott olyan SMAX1 szekvenciákat, amelyek potenciális célpontjai lehetnek az S-nitrozilációnak. A KAI2 receptorfehérje esetén egy szoftver jelzett potenciális S-nitrozilációs módosulást (2. táblázat). Ezek arra utalnak, hogy ezek a KAR-specifikus szignálfehérjék NO-függő S-nitrozilációval módosíthatók/szabályozhatók, vagyis a NO és a KAR jelátvitel kapcsolódik. Ezt a hipotézist a jövőben kísérletileg igazolni kell.

## 6.2. Eredmények értékelése 2

### 6.2.1. A Zn-koncentráció alakulása szerv és szövet szinten vad típusú és GSNOR enzimet túltermelő vonalban

A cink enyhe (Zn/10) és teljes megvonása (Zn/0) a tápközegből vad típusú (Col-0) és GSNOR enzimet túltermelő (*35S::FLAG-GSNORI*) vonalak mindkét szervében a Zn-tartalom csökkenését okozta, melynek mértéke a tápközegben lévő cink mennyiségétől függött. Optimális Zn-ellátottság mellett, mindkét szerv hasonló Zn-tartalommal rendelkezik (~200-250 µg/g száraz tömeg), ami arra enged következtetni, hogy a föld feletti és alatti szervek között a cinkeloszlása homogén. Irodalmi adatok alapján a legtöbb növényfaj esetén cinkhiány akkor jelentkezik, ha a Zn-tartalom 15-20 µg/g száraz tömeg alá csökken (Marschner, 2012, Noulas és mtsai., 2018). Mindkét lúdfű vonal gyökerének és hajtásának Zn-koncentrációja Zn/0 kezelés hatására 40 µg/g

szárastömeg körüli, ezek alapján elmondható, hogy a táptalaj cinkmennyiségének csökkenése, akár teljes megvonása nem okozott Zn-hiányt, de jelentősen csökkentette a Zn-tartalmat a 7 napos kezelési időszak alatt. A GSNOR enzim túltermelése nem befolyásolta a csíranövény Zn-tartalmát, mivel a mutáns vonal a Col-0-hoz hasonló Zn-tartalommal rendelkezik Zn-megvonás hatására (3. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a hipotézisünk nem igazolódott, mivel a GSNOR túltermelése nincs hatással a Zn felvételére korlátozott Zn-ellátás mellett. A Zn-specifikus fluoreszcens próba alkalmazása során bizonyítást nyert, hogy a két vonal Zn-szintjei közötti kis különbség kimutatható szövetszinten, de nem jelenik meg teljes csíranövényben (17. ábra). Ez felhívja a figyelmet arra, hogy a Zn-megvonás hatásait több szinten érdemes vizsgálni.

A Zn-hiány markergének közül az enzimének (*CSD2*, *CA2*) és a transzkripciós faktor gén (*AtbZIP19*) az irodalmi adatoknak megfelelő változásokat mutat (Lilay és mtsai., 2021). A *ZIP3* és *IRT3* transzportergének irodalomtól (Campos és mtsai., 2017) eltérő változásainak oka az lehet, hogy a kísérleti növényeink bár csökkent Zn-tartalommal bírtak, valójában nem voltak Zn-hiányosak (18. ábra). Továbbá az *IRT3* nem Zn-specifikus szállító, ezért a kifejeződését más tényezők is befolyásolhatják (főként vasszintek).

### **6.2.2. A reaktív nitrogén- és oxigénformák cinkhiány által indukált változásainak hatása a fehérjenitrációra**

A GSNOR enzim a katalitikus aktivitásához cinkionokat igényel, ezért feltételezzük, hogy a korlátozott cinkellátás hatást gyakorol az enzim működésére. A GSNOR enzim többszinten történő vizsgálata során az elvártaknak megfelelően a GSNOR túltermelő mutáns szignifikánsan nagyobb GSNOR mennyiséget tartalmaz, mint a vad típusú lúdfű (19. ábra, C, D). Ez a megemelkedett enzim mennyiség a túltermelő vonalban feltehetőleg kompenzálja a Zn-hiány negatív hatásait, így változatlan marad az enzim mennyisége, expressziója és aktivitása. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a lehetséges változások nem detektálhatóak a western blot membrán túltelítettsége miatt. Col-0-ban a szuboptimális Zn-ellátottság a GSNOR enzim mennyiségének és expressziójának a csökkenését eredményezi, míg aktivitása fennmarad. Ez azt sugallja, hogy hipotézisünkkel ellentétben a limitált Zn-elérés a GSNOR működését nem befolyásolja az enzim Zn-igénye ellenére. Ezzel ellentétben a GSNOR aktivitása általában növekszik abiotikus stresszek esetén, mint pl. a vashiány

(Romera és mtsai., 2023). Feltételezhető, hogy a mi kísérleti rendszerünkben a növények csak enyhe stresszt szenvedtek el, aminek mértéke nem elegendő, hogy változásokat idézzon elő a GSNOR aktivitásában.

Az SNO jelátvitel központi molekulája a NO, melynek szintje enyhe cink (Zn/10) megvonás mellett emelkedett meg szignifikánsan a csíranövényekben (20. ábra, A, C). Ehhez nem járul hozzá a GSNOR inaktivációja, de okozhatja szintézisutak (pl. nitrát-reduktáz vagy poliaminok) aktiválódása. Ezek a lehetőségek további vizsgálatokat igényelnek. Továbbá a *GLB1* és a *GLB2* expressziójában az enyhe Zn-megvonás nem okozott szignifikáns változást, vagyis ezek szabályzó szerepe a NO-szintekkel kapcsolatban elhanyagolható lehet.

A *35S::FLAG-GSNOR1* vonalban a Zn-megvonás által okozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint növekedés elmaradása arra utal, hogy GSNOR magas expressziója/nagy fehérjemennyisége/emelkedett aktivitása megakadályozza a Zn-korlátozás által kiváltott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződést, így mérsékelheti az oxidatív stresszt. Ezt a hipotézist alátámasztja Li és mtsai. (2021) publikációja, melyben a GSNOR-t az oxidatív stressz fő szabályozójának tekintik. Mindkét Arabidopsis vonal egészséges egyedeiben kimutathatóak voltak a 3-nitrotirozin-tartalmú fehérjesávok, vagyis a fiziológias nitroproteom (Kolbert és mtsai., 2017; Corpas és mtsai., 2021). A *35S::FLAG-GSNOR1* vonalban tapasztalt nagyobb fokú tirozinnitráció összefüggésben lehet a vonal (nem szignifikánsan magasabb) alap H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és ONOO<sup>-</sup> tartalmával (21. ábra). Továbbá azt feltételezzük, hogy a GSNOR túltermelése alulszabályozza az SNO jelátvitelt, így eltolódik az egyensúly a fehérjenitráció és S-nitroziláció között a nitráció „irányába”. A Col-0-ban bekövetkező Zn-megvonás által indukált fehérjenitráció a képződő ONOO<sup>-</sup> és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> következménye lehet, hasonlóan az olajrepcében tapasztaltakhoz (Molnár és mtsai., 2022). Ezek alapján kijelenthető, hogy a szuboptimális Zn-ellátás pronitráns hatású a növényi proteomban, és feltehetőleg a fehérjék inaktivációjához és proteaszómális lebontásához vezet (Kolbert és Lindermayer, 2021). A *35S::FLAG-GSNOR1* vonalban a Zn-megvonás hatására csökkenő fehérjenitráció azt jelzi, hogy a GSNOR túltermelés befolyásolja a fehérjenitráció mértékét, ami a NO-függő PTM-ok közötti közvetett kapcsolatra utal.

### 6.2.3. A gyökérmorfológiai változások háttérében lévő hormonális változások

A cink korlátozott mennyisége Col-0-ban okozott jelentősebb gyökérszerkezeti változásokat a GSNOR mutánshoz képest a nevelési periódus 7 napja alatt. Vad típusban Zn0 kezelésre a főgyökérhossz rövidült, míg GSNOR mutánsban nem történt szignifikáns változás a főgyökérszerkezet hosszában, habár alapból rövidebb FGY-rel rendelkezik a Col-0-hoz képest. Mindkét növényvonal OGY primordium száma változatlan maradt, a kifejlett OGY-k vad típusban szinte teljesen eltűntek cinkhiányra, míg GSNOR túltermelő vonalban ezek számának csökkenése enyhébb mértékű volt Zn-megvonásra. Az optimálisnál alacsonyabb mennyiségű cink az OGY iniciációt nem befolyásolta egyik növényvonalban sem, a gyökérfejlődés későbbi szakaszát érinti hátrányosan legfőképp Col-0-ban.

A Zn-megvonás nem okozott életképességvesztést egyik vonalban sem, és nem figyeltem meg érzékenységbeli különbséget a vad típus és a GSNOR túltermelő vonalak között Zn-limitáció során (22. ábra). Ez ellentmond más tápanyag stresszekre pl. Zn-többletre, gátló nitrátdózisokra adott válaszoknak (Kolbert és mtsai., 2019b; Frungillo és mtsai., 2014). A gyökérmorfológiai változások háttérében tehát nem az életképesség csökkenése áll, ezért megvizsgáltam a sejtosztódás hatékonyságát és néhány gyökérfejlődést befolyásoló hormon *in situ* szintjét a gyökerekben.

A sejtosztódás több pontját szabályzó CYCB1;1 transzkripció faktor szintjének a csökkenése a *Cycb1::GFP* vonalak merisztémájában arra utal, hogy bár a sejtek életképesek, osztódási képességük jelentősen csökken Zn-limitált közegben (23. ábra). Meglepő módon *DR5::GUS* vonalban nem változott az auxin szintje Zn/10 és Zn0 kezelésre, azonban az etilénszint növekedése és a citokininszint csökkenése hozzájárulhatott a főgyökér rövidüléséhez Col-0-ban a nem megfelelő cinkellátottság hatására. Ezt támasztja alá a Qin és mtsai. által 2019-ben, valamint a Lewis és mtsai. által 2011-ben közölt publikáció, amelyben leírják a cinkhiány indukálta etilénszint növekedés szerepét a főgyökérrövidülés és az oldalgyökér megnyúlás gátlásában.

## 7. Összefoglalás

### 7.1. Összefoglalás 1

Az eddig ismereteink alapján azt már jól tudjuk, hogy külön-külön mindhárom molekula (NO, SL és a KAR) is szabályozza növényi növekedés, ezen belül a gyökérrendszer fejlődését. Azáltal, hogy a karrikinek és a strigolaktonok szerkezete hasonló, valamint közös jelátviteli elemen keresztül fejtik ki hatásukat a növényi növekedésre és fejlődésre, nagyszerű lehetőséget biztosít, hogy a NO-dal összefüggésben vizsgáljuk meg ezen molekulák közötti kapcsolatot *Arabidopsis thaliana* gyökerében.

Eredményeim alapján a feltett kérdésekre az alábbi válaszokat tudom megfogalmazni:

1. A csíranövények közül a *gsnor1-3* rendelkezik a legrövidebb FGY-rel és nincsen kifejlett OGY-re. Annak ellenére, hogy vad típushoz képest a *35S::FLAG-GSNOR1* rövidebb FGY-rel és kevesebb OGY-rel rendelkezik, OGY denzitása vad típuszerű. *A GSNOR* enzim szükséges a normális gyökérfejlődéshez, hiánya nagyobb problémát okoz, mint túltermelése. Ahogyan a *GSNOR*, úgy a *SL* megléte is szükséges az optimális gyökérszerkezet kialakításához, hiszen hiánya rövidebb FGY-t és több OGY kialakulását eredményezi. A *SL*-hiba/hiány emelkedett *NO/SNO* szinteket eredményez. A *SL* hiányában a *NO*-függő gének expressziója nem változik, így ezek a gének valószínűleg nincsenek hatással a *NO* jelátvitelre *SL* hiányában. Azonban a *GSNOR* hiánya a *SL* bioszintézisben résztvevő gének alulszabályozottságát okozza. A *SL* bioszintézisben hibás növényekben a *GSNOR* expressziója nem, de abundanciája és aktivitása alacsonyabb a vad típushoz képest, ami az *enzim poszttranszlációs gátlására utal (és ami által az NO/SNO szintek növekedtek)*.
2. A *gsnor1-3* bizonyult érzékenyebbnek *rac-GR24* kezelésre. A *SL* analóg amellet, hogy gátolta a FGY elongációját az oldalgökörek számát is 0-ra csökkentette. Col-0 és *GSNOR* túltermelő vonalakban a *rac-GR24* FGY növekedést váltott ki ezért gyanítotjuk, hogy *funkcionális GSNOR* szükséges a *NO/SNO* szint szabályozásához az *SL* (és/vagy *KAR*) által kiváltott FGY

*megnyúlás során. Vad típusban, gsnor1-3-ban és 35S::FLAG-GSNOR1-ben is gátló hatást fejtett ki a SL analóg kezelés, mindhárom növényvonalban lecsökkent a primordiumok vagy a kifejlett OGY-k száma. A TIS108 kezelés hatására vad típusban és gsnor1-3-ban kevesebb, 35S::FLAG-GSNOR1-ben több primordium jelent meg. A GSNOR enzim hiánya és optimális mennyisége az iniciáció gátolja, túltermelése pedig indukálja azt. Vad típusban a rac-GR24 a GLB1 és GLB2 gének transzkriptszintjét csökkentették.*

3. A NO donor több mint 50%-os gátlást okozott Col-0 főgyökerének növekedésében, addig *SL mutáns vonalak FGY elongációja kevésbé bizonyult érzékenynek GSNO kezelésre, sőt max1-1 egyáltalán nem váltott ki FGY rövidülést és nem befolyásolta a kifejlett OGY fejlődését. A NO gyökfogó max mutánsokban az iniciációt gátolta, addig vad típusban a kifejlett OGY-re gyakorolt negatív hatást. Sem a GSNO, sem a cPTIO nem okozott génexpressziós változást a SL bioszintézi és jelátviteli génekben.*
4. *A d14, htl-3, htl-3/d14 a vad típusnál magasabb NO szinttel rendelkeznek, míg a smax1/smx2 esetén a vad típusal megegyező NO tartalom mutatható ki. A KAR jelátviteli elemek közül a (KAI2, SMAX1) esetén volt kimutatható S-nitrozilációra fogékony cisztein aminosav.*

## 7.2. Összefoglalás 2

A cinkhiány és az exogén NO közötti kapcsolatra vonatkozóan széleskörű kutatások állnak rendelkezésünkre, azonban az endogén NO általi kölcsönhatása kevésbé kutatott terület. Munkám során elsőként vizsgáltam az alegységenként egy katalitikus és egy strukturális cinkiont tartalmazó GSNOR enzim funkciójának és a NO által közvetített jelátvitelben való lehetséges változtatásait kontroll (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) enyhe (Zn/10; 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) és teljes cinkmegvonás (Zn0; 0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) hatására vad típusú (Col-0) és GSNOR enzimet túltermelő 35S::FLAG-GSNOR1 lúdfűben.

Az elvégzett kísérletek alapján az alábbi eredményeket állapítottam meg:

1. A kísérleti periódus alatt a táptalajban lévő *Zn-korlátozott elérhetősége szignifikánsan csökkentette a lúdfű vonal gyökereinek és hajtásának cink-*

tartalmát és módosította a Zn-hiány markergének expresszióját. A Zn kimutatására szolgáló specifikus fluoreszcens próba alkalmazása lehetővé tette a Zn-tartalom szövetspecifikus vizsgálatát. A nem megfelelő cinkellátás a vad típusú és a GSNOR enzimet túltermelő mutáns lúdfü gyökérzetében csökkent szabad Zn-szintet alakított ki. *A gyökércsúcsok érzékenyebbnak bizonyultak a Zn-megvonására mindkét vonalban, mint a merisztémától távolabbi gyökérrégiók, ami a gyökérszövet specifikus Zn-tartalmára enged következtetni.*

2. A szuboptimális Zn-elérhetőség kisebb, de aktívabb GSNOR fehérjekészletet eredményezett *Col-0-ban*, így az elvártakkal ellentétben az *enzim képes kontrollálni a NO-függő jelátviteli folyamatokat. 35S::FLAG-GSNOR1-ben* az enzim túltermelése valószínűleg kompenzálja a csökkent Zn-ellátás negatív hatásait, ami *változatlan GSNOR expressziót, fehérje mennyiséget és aktivitást eredményez.*
3. Az optimálistól eltérő cinkmennyiség megváltoztatja a reaktív nitrogén- és oxigénformák (NO, ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) szintjeit és szembeötlő hatást fejtenek ki a növényi proteomban, ami a célfehérjék funkcionális elvesztését majd proteoszmális lebomlását okozhatja (Kolbert és Lindermayr, 2021). *Col-0-ban cinkhiány hatására a nitráció központi molekulájának, a ONOO<sup>-</sup> szintjének az emelkedése hozzájárulhatott a fokozott tirozinnitrációhoz.* Érdekes módon transzgenikus vonalban éppen ellenkezőleg, csökkent a fehérjenitráció cinkmegvonásra.
4. *A gyökérszerkezeti változások a főgyökér rövidülésében és a kifejlett oldalgyökerek számának a csökkenésében nyilvánult meg, ami a vad típust érintette erőteljesebben. Ennek hátterében a sejtosztódás zavara, valamint az etilénszint emelkedése és a citokininszint csökkenése állhat.*

Elsőként sikerült bizonyítani Arabidopsisban, hogy a korlátozott Zn-ellátás gén- és fehérjeszinten befolyásolja a GSNOR enzimet, de az aktivitását nem változtatja meg amellet, hogy a reaktív nitrogén- és oxigénformák szintjének módosításán keresztül befolyásolja a fiziológiás nitroproteomot.

## 8. Summary

### 8.1. Summary 1

Based on our current knowledge, we already know that each of the three molecules (NO, SL, and KAR) independently regulates plant growth, specifically the development of the root system. The structural similarity between karrikins and strigolactones, as well as their impact on plant growth and development through a common signaling element, provides an excellent opportunity to explore the relationship between these molecules in the roots of *Arabidopsis thaliana*, particularly in connection with NO.

Based on my results, I can formulate the following answers to the posed questions:

1. Among the seedlings, *gsnor1-3* has the shortest primary root (PR) and lacks developed lateral roots (LR). Despite having a shorter PR and fewer LR compared to the wild type, the LR density in *35S::FLAG-GSNOR1* is similar to that of the wild type. *The GSNOR enzyme is essential for normal root development, and its deficiency poses a greater challenge than its overproduction. Similar to GSNOR, the presence of SL is necessary for the optimal formation of the root structure, as its absence results in a shorter PR and more LR. The deficiency or mutation in SL leads to elevated levels of NO/SNO.* In the absence of SL, the expression of NO-dependent genes remains unchanged, indicating that these genes likely do not influence NO signaling in the absence of SL. However, *the lack of GSNOR causes the downregulation of genes involved in SL biosynthesis.* In plants with defective SL, GSNOR expression is unaffected, but its abundance and activity are lower than in the wild type, *suggesting post-translational inhibition of the enzyme, leading to increased levels of NO/SNO.*
2. The *gsnor1-3* proved to be more sensitive to *rac*-GR24 treatment, the SL analog that not only inhibited PR elongation but also reduced the number of lateral roots to zero. In Col-0 and GSNOR-overproducing lines, *rac*-GR24 triggered PR growth, indicating that *functional GSNOR is suspected to be necessary for regulating NO/SNO levels during PR elongation induced by SL (and/or KAR).* In



the wild type, *gsnor1-3*, and *35S::FLAG-GSNOR1*, the SL analog treatment had an inhibitory effect in all three plant lines, reducing the number of primordia or mature LR. TIS108 treatment resulted in fewer primordia in the wild type and *gsnor1-3*, while more were observed in *35S::FLAG-GSNOR1*. *The absence of the GSNOR enzyme and its optimal levels either inhibited or induced initiation.* In the wild type, *rac-GR24* reduced the transcript levels of the *GLB1* and *GLB2* genes.

3. The NO donor caused more than a 50% inhibition in Col-0 primary root growth, whereas *SL mutant lines were less sensitive to GSNO treatment, and in fact, max1-1* did not induce primary root shortening at all and did not affect the development of mature LR. *In the max mutants, NO scavenging inhibited initiation*, while in the wild type, it had a negative impact on mature LR. Neither GSNO nor cPTIO caused changes in gene expression in the SL biosynthesis and signaling genes.
4. The mutant lines *d14*, *htl-3*, and *htl-3/d14* exhibit higher levels of NO compared to the wild type, while in the case of *smax1/smxl2*, the NO content is comparable to the wild type. *Among the KAR signaling elements, cysteine amino acids susceptible to S-nitrosylation were detected in the case of KAI2=HTL3, SMAX1.*

## 8.2. Summary 2

Wide-ranging research exists on the relationship between zinc deficiency and exogenous NO, but the interaction mediated by endogenous NO is a less explored area. In my work, I first investigated the function of the GSNOR enzyme, which contains one catalytic and one structural zinc ion per subunit, and the potential alterations in NO-mediated signaling under control conditions (15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ), mild zinc deficiency ( $\text{Zn}/10$ ; 1.5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ), and complete zinc deprivation ( $\text{Zn}0$ ; 0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) in wild-type (Col-0) and GSNOR enzyme-overproducing *35S::FLAG-GSNOR1* in Arabidopsis.

Based on the experiments conducted, I have determined the following results:

1. During the experimental period, *the significantly reduced availability of Zn in the medium markedly decreased the zinc content in the roots and shoots of the Arabidopsis thaliana line*. It also altered the expression of Zn-deficiency marker genes. The application of specific fluorescent probe for Zn detection allowed for a tissue-specific examination of Zn content. Inadequate zinc supply induced a decrease in free Zn levels in the root systems of both the wild-type and GSNOR enzyme-overexpressing mutant Arabidopsis lines. *The root tips proved to be more sensitive to Zn deprivation in both lines than root regions farther from the meristem, indicating tissue-specific Zn content in the root tissue*
2. Suboptimal zinc availability resulted in a smaller but more active GSNOR protein pool in Col-0. Contrary to expectations, *this enzyme is capable of maintaining and controlling NO-dependent signaling processes*. In 35S::FLAG-GSNOR1, enzyme overproduction likely compensates for the negative effects of reduced zinc supply, *resulting in unchanged GSNOR expression, protein quantity, and activity*.
3. Deviations from optimal zinc levels alter the levels of reactive nitrogen and oxygen species (NO, ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and have a noticeable impact on the plant proteome, which can lead to functional loss of target proteins followed by proteasomal degradation (Kolbert and Lindermayr, 2021). *In Col-0, zinc deficiency may have contributed to the increased tyrosine nitration due to the elevated levels of ONOO<sup>-</sup>*. Interestingly, in the transgenic line, protein nitration decreased upon zinc deprivation.
4. *The changes in root structure* were manifested in the shortening of the primary root and a reduction in the number of mature lateral roots, which affected the wild type more significantly. *This may be attributed to a disturbance in cell division and the interaction between an increase in ethylene levels and a decrease in cytokinin levels*.

For the first time, it has been demonstrated in Arabidopsis that limited Zn supply influences the GSNOR enzyme at the gene and protein levels. However, it does not alter its activity. Additionally, it affects the physiological nitroproteome through modifications in the levels of reactive nitrogen and oxygen species.

## 9. Irodalomjegyzék

- Achkor, H., Díaz, M., Fernández, M. R., Biosca, J. A., Parés, X., & Martínez, M. C. (2003). Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132(4), 2248-2255.
- Ajeesh Krishna, T. P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., & Antony Ceasar, S. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 662.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824-827.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., ... & Al-Babili, S. (2012). The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335(6074), 1348-1351.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, 357(3), 593-615.
- Alloway, B. J. (2004). Zinc in soils and crop nutrition. International Zinc Association (IZA).
- Alloway, B. J. (2008a). Zinc in soils and crop nutrition. Fundamental aspects of zinc in soils and plants. IZA and IFA. 12-54.
- Alloway, B. J. (Ed.). (2008b). *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production. Micronutrients and Crop Production: An Introduction*. Springer Science & Business Media. 1-41.
- Appleby, C. A. (1992). The origin and functions of haemoglobin in plants. *Science Progress* (1933-), 365-398.
- Aranda-Caño, L., Sánchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., Valderrama, R., & Barroso, J. B. (2019). Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation. *Plants* (Basel, Switzerland), 8(4), 82.
- Arite, T., Kameoka, H., & Kyojuka, J. (2012). Strigolactone positively controls crown root elongation in rice. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 165-172.

- Arrivault, S., Senger, T., & Krämer, U. (2006). The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*, 46(5), 861-879.
- Assunção, A. G. (2022). The F-bZIP-regulated Zn deficiency response in land plants. *Planta*, 256(6), 108.
- Assunção, A. G., Herrero, E., Lin, Y. F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C., ... & Aarts, M. G. (2010). Arabidopsis thaliana transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10296-10301.
- Auld, D. S., & Bergman, T. (2008). Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 3961-3970.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., & Kizek, R. (2010). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants: Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants*, 275-317.
- Bai, X. G., Chen, J. H., Kong, X. X., Todd, C. D., Yang, Y. P., Hu, X. Y., & Li, D. Z. (2012). Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 710-720.
- Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., & Radi, R. (2007). Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino acids*, 32, 501-515.
- Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox biology*, 14, 618-625.
- Bashir, K., Takahashi, R., Nakanishi, H., & Nishizawa, N. K. (2013). The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects. *Frontiers in plant science*, 4, 15.
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Valderrama, R., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Padilla, M.N., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2018). Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *Journal of experimental botany*, 69 (2018) 3425–3438.
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M. N., ... & Barroso, J. B. (2015). Differential molecular response of

- monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of experimental botany*, 66(19), 5983-5996.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G. T., Grande, A., Yang, H., ... & 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(2), 738-761.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., & Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*, 148(1), 402-413.
- Bhowmik, D., Chiranjib, K., & Kumar, S. (2010). A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic. *Int J Pharm*, 1(1), 05-11.
- Bouwmeester, H. J., Matusova, R., Zhongkui, S., & Beale, M. H. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 358-364.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., & Hogg, N. (2013). S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3173-3181.
- Cai, W., Liu, W., Wang, W. S., Fu, Z. W., Han, T. T., & Lu, Y. T. (2015). Overexpression of rat neurons nitric oxide synthase in rice enhances drought and salt tolerance. *PloS one*, 10(6), e0131599.
- Cakmak, I. (2000). Tansley Review No. 111 Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *The New Phytologist*, 146(2), 185-205.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification?. *Plant and soil*, 302, 1-17.
- Campos, A. C. A., Kruijer, W., Alexander, R., Akkers, R. C., Danku, J., Salt, D. E., & Aarts, M. G. (2017). Natural variation in *Arabidopsis thaliana* reveals shoot ionome, biomass, and gene expression changes as biomarkers for zinc deficiency tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3643-3656.
- Cao, X., Ma, L. Q., Rhue, D. R., & Appel, C. S. (2004). Mechanisms of lead, copper, and zinc retention by phosphate rock. *Environmental pollution*, 131(3), 435-444.

- Carbonnel, S., Das, D., Varshney, K., Kolodziej, M. C., Villaécija-Aguilar, J. A., & Gutjahr, C. (2020). The karrikin signaling regulator SMAX1 controls *Lotus japonicus* root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(35), 21757-21765.
- Cardoso, C., Ruyter-Spira, C., & Bouwmeester, H. J. (2011). Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Plant science*, 180(3), 414-420.
- Castillo, M. C., Coego, A., Costa-Broseta, Á., & León, J. (2018). Nitric oxide responses in *Arabidopsis* hypocotyls are mediated by diverse phytohormone pathways. *Journal of Experimental Botany*, 69(21), 5265-5278.
- Castro, P. H., Lilay, G. H., Muñoz-Mérida, A., Schjoerring, J. K., Azevedo, H., & Assunção, A. G. (2017). Phylogenetic analysis of F-bZIP transcription factors indicates conservation of the zinc deficiency response across land plants. *Scientific reports*, 7(1), 3806.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2017). Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 163-174.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J., & Klessig, D. F. (2003). The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113(4), 469-482.
- Chen, R., Sun, S., Wang, C., Li, Y., Liang, Y., An, F., ... & Zuo, J. (2009). The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell research*, 19(12), 1377-1387.
- Cheng, X., Ruyter-Spira, C., & Bouwmeester, H. (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in plant science*, 4, 199.
- Chiwocha, S. D., Dixon, K. W., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Merritt, D. J., Nelson, D. C., ... & Stevens, J. C. (2009). Karrikins: a new family of plant growth regulators in smoke. *Plant science*, 177(4), 252-256.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B., Wall, M. E., & Egley, G. H. (1966). Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154(3753), 1189-1190.
- Corpas, F. J. (2017). Reactive nitrogen species (RNS) in plants under physiological and adverse environmental conditions: current view. *Progress in Botany Vol. 78*, 97-119.

- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist*, 199(3), 633-635.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Quirós, M., León, A. M., Romero-Puertas, M. C., ... & del Río, L. A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant physiology*, 136(1), 2722-2733.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2022). NO source in higher plants: present and future of an unresolved question. *Trends in Plant Science*, 27(2), 116-119.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2021). Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress*, 2, 100026.
- Corpas, F. J., Luis, A., & Barroso, J. B. (2007). Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 436-438.
- Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2018). Assessing nitric oxide (NO) in higher plants: an outline. *Nitrogen*, 1(1), 12-20.
- Corrêa, L. G. G., Riaño-Pachón, D. M., Schrago, C. G., Vicentini dos Santos, R., Mueller-Roeber, B., & Vincentz, M. (2008). The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PloS one*, 3(8), e2944.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., ... & Mari, S. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of botany*, 103(1), 1-11.
- D'Agostino, I. B., Deruere, J., & Kieber, J. J. (2000). Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant physiology*, 124(4), 1706-1717.
- Das, S., & Green, A. (2016). Zinc in crops and human health. *Biofortification of food crops*, 31-40.
- De Cuyper, C., Fromentin, J., Yocgo, R. E., De Keyser, A., Guillotin, B., Kunert, K., ... & Goormachtig, S. (2015). From lateral root density to nodule number, the strigolactone analogue GR24 shapes the root architecture of *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 137-146.
- De Cuyper, C., Struk, S., Braem, L., Gevaert, K., De Jaeger, G., & Goormachtig, S. (2017). Strigolactones, karrikins and beyond. *Plant, cell & environment*, 40(9), 1691-1703.

- Deinlein, U., Weber, M., Schmidt, H., Rensch, S., Trampczynska, A., Hansen, T. H., ... & Clemens, S. (2012). Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation. *The Plant Cell*, 24(2), 708-723.
- Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voigt, K., Schröder, A., Arrivault, S., Thomine, S., & Krämer, U. (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS letters*, 579(19), 4165-4174.
- Fageria, N. K. (2004). Dry matter yield and nutrient uptake by lowland rice at different growth stages. *Journal of plant nutrition*, 27(6), 947-958.
- Fedorova, M., Bollineni, R. C., & Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass spectrometry reviews*, 33(2), 79-97.
- Feigl, G., Horváth, E., Molnár, Á., Oláh, D., Poór, P., & Kolbert, Z. (2019). Ethylene-nitric oxide interplay during selenium-induced lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1481-1488.
- Fernández, V., & Brown, P. H. (2013). From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in plant science*, 4, 289.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., & Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18506-18511.
- Flematti, G. R., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2015). What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC biology*, 13(1), 1-7.
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2009). Identification of alkyl substituted 2 H-furo [2, 3-c] pyran-2-ones as germination stimulants present in smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9475-9480.
- Flematti, G. R., Scaffidi, A., Dixon, K. W., Smith, S. M., & Ghisalberti, E. L. (2011). Production of the seed germination stimulant karrikinolide from combustion of simple carbohydrates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(4), 1195-1198.
- Flematti, G. R., Scaffidi, A., Goddard-Borger, E. D., Heath, C. H., Nelson, D. C., Commander, L. E., ... & Ghisalberti, E. L. (2010). Structure– activity relationship of karrikin germination stimulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8612-8617.



- 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(11), 3816-3830.
- Freeman, B. A., Baker, P. R., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Napolitano, A., & d'Ischia, M. (2008). Nitro-fatty acid formation and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15515-15519.
- Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, 5(1), 5401.
- Fukui, K., Ito, S., Ueno, K., Yamaguchi, S., Kyozuka, J., & Asami, T. (2011). New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(16), 4905-4908
- Geisler, A. C., & Rudolph, T. K. (2012). Nitroalkylation--a redox sensitive signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(6), 777-784.
- Gorczyński, M. J., Huang, J., Lee, H., & King, S. B. (2007). Evaluation of nitroalkenes as nitric oxide donors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(7), 2013-2017.
- Guerra, D., Ballard, K., Truebridge, I., & Vierling, E. (2016). S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). *Biochemistry*, 55(17), 2452-2464.
- Guo, F. Q., Okamoto, M., & Crawford, N. M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302(5642), 100-103.
- Gupta, K. J., Hancock, J. T., Petrivalsky, M., Kolbert, Z., Lindermayr, C., Durner, J., ... & Loake, G. J. (2020). Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytologist*, 225(5), 1828-1834.
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A., & Igamberdiev, A. U. (2011). Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS letters*, 585(24), 3843-3849.
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 593-617.

- Hafeez, B. M. K. Y., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of zinc in plant nutrition-a review. *American journal of experimental Agriculture*, 3(2), 374.
- Hamon-Josse, M., Villaécija-Aguilar, J. A., Ljung, K., Leyser, O., Gutjahr, C., & Bennett, T. (2022). KAI2 regulates seedling development by mediating light-induced remodelling of auxin transport. *New Phytologist*, 235(1), 126-140.
- Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2019). Nitric oxide: its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants*, 8(2), 41.
- Hebelstrup, K. H., Igamberdiev, A. U., & Hill, R. D. (2007). Metabolic effects of hemoglobin gene expression in plants. *Gene*, 398(1-2), 86-93.
- Helmersson, A., von Arnold, S., & Bozhkov, P. V. (2008). The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology*, 147(3), 1158-1167.
- Hogg, N. (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), 585-600.
- Holzmeister, C., Fröhlich, A., Sarioglu, H., Bauer, N., Durner, J., & Lindermayr, C. (2011). Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO-homeostasis. *Proteomics*, 11(9), 1664-1683.
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., ... & Cobbett, C. S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 16(5), 1327-1339.
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., & Hill, R. D. (2006). Nitric oxide scavenging by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase-mediated ascorbate reduction of methemoglobin. *Planta*, 223, 1033-1040.
- Ito, S., Umehara, M., Hanada, A., Yamaguchi, S., & Asami, T. (2013). Effects of strigolactone-biosynthesis inhibitor TIS108 on *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 8(5), e24193.
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., ... & Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling*, 9(417), re2-re2.
- Jedelská, T., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2020). Thioredoxins: emerging players in the regulation of protein S-nitrosation in plants. *Plants*, 9(11), 1426.
- Jia, K. P., Baz, L., & Al-Babili, S. (2018). From carotenoids to strigolactones. *Journal of Experimental Botany*, 69(9), 2189-2204.

- Jobbagy, S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Turell, L., Pires, M. F., Kansanen, E., Batthyany, C., Lancaster, J. R., Jr, Freeman, B. A., & Schopfer, F. J. (2019). Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis. *Redox biology*, 21, 101050.
- Kabata-Pendias, A. (2000). Trace elements in soils and plants. CRC press.
- Kapulnik, Y., Delaux, P. M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Wininger, S., Bhattacharya, C., ... & Koltai, H. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta*, 233, 209-216.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Mori, H., Tomioka, R., Lee, Y., & Maeshima, M. (2009). A mutant strain *Arabidopsis thaliana* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc. *Plant and Cell Physiology*, 50(6), 1156-1170.
- Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1990). Zinc deficiency and immune function. *Annual review of nutrition*, 10(1), 415-431.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Liu, Q., Bours, R., Domagalska, M. A., Beguerie, S., ... & Ruyter-Spira, C. (2011). Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 155(2), 974-987
- Kolbert, Z. (2012). In vivo and in vitro studies on fluorophore-specificity. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(1), 37-41.
- Kolbert, Z. (2019c). Strigolactone-nitric oxide interplay in plants: The story has just begun. *Physiologia plantarum*, 165(3), 487-497.
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., ... & Hancock, J. T. (2019a). A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*, 93, 53-70.
- Kolbert, Z., Feigl, G., Bordé, Á., Molnár, Á., & Erdei, L. (2017). Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 56-63.
- Kolbert, Z., & Lindermayr, C. (2021). Computational prediction of NO-dependent posttranslational modifications in plants: current status and perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 851-861.
- Kolbert, Z., Molnár, Á., Oláh, D., Feigl, G., Horváth, E., Erdei, L., ... & Lindermayr, C. (2019b). S-Nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide

- metabolism of zinc-stressed *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 60(11), 2449-2463.
- Kolbert, Z., Molnár, Á., Szöllősi, R., Feigl, G., Erdei, L., & Ördög, A. (2018). Nitro-oxidative stress correlates with Se tolerance of *Astragalus* species. *Plant and Cell Physiology*, 59(9), 1827-1843.
- Kovacs, I., Holzmeister, C., Wirtz, M., Geerlof, A., Fröhlich, T., Römling, G., ... & Lindermayr, C. (2016). ROS-mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1669.
- Kumar, M., Kim, I., Kim, Y. K., Heo, J. B., Suh, M. C., & Kim, H. U. (2019). Strigolactone Signaling Genes Showing Differential Expression Patterns in *Arabidopsis* max Mutants. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 352.
- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B. W., Hwang, B. H., Pallas, J. A., Kang, J. G., & Loake, G. J. (2012). AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta*, 236, 887-900.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., 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(3), 786-802.
- Lehotai, N. (2011). The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 105-107.
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Pető, A., Feigl, G., Ördög, A., Kumar, D., ... & Erdei, L. (2012). Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5677-5687.
- León, J. (2022). Protein tyrosine nitration in plant nitric oxide signaling. *Frontiers in plant science*, 13, 859374.
- Leshem, Y. Y., & Haramaty, E. (1996). Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. *J Plant Physiol*, 148(3-4), 258-263.
- Leuci, R., Brunetti, L., Laghezza, A., Loiodice, F., Tortorella, P., & Piemontese, L. (2020). Importance of biometals as targets in medicinal chemistry: An overview about the role of Zinc (II) chelating agents. *Applied Sciences*, 10(12), 4118.
- Lewis, D. R., Negi, S., Sukumar, P., & Muday, G. K. (2011). Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development*, 138(16), 3485-3495.

- Li, B., Sun, C., Lin, X., & Busch, W. (2021). The emerging role of GSNOR in oxidative stress regulation. *Trends in plant science*, 26(2), 156-168.
- Lilay, G. H., Castro, P. H., Campilho, A., & Assunção, A. G. (2019). The Arabidopsis bZIP19 and bZIP23 activity requires zinc deficiency—insight on regulation from complementation lines. *Frontiers in plant science*, 9, 1955.
- Lilay, G. H., Persson, D. P., Castro, P. H., Liao, F., Alexander, R. D., Aarts, M. G., & Assunção, A. G. (2021). Arabidopsis bZIP19 and bZIP23 act as zinc sensors to control plant zinc status. *Nature Plants*, 7(2), 137-143.
- Lindermayr, C. (2018). Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 110-115.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., & Stamler, J. S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 410(6827), 490-494.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., & Leon, J. (2011). In vivo protein tyrosine nitration in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3501-3517.
- Machin, D. C., Hamon-Josse, M., & Bennett, T. (2020). Fellowship of the rings: a saga of strigolactones and other small signals. *New Phytologist*, 225(2), 621-636.
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development*, 124(1), 33-44.
- Mangnus, E. M., & Zwanenburg, B. (1992). Tentative molecular mechanism for germination stimulation of Striga and Orobanche seeds by strigol and its synthetic analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 1066-1070.
- Martinez, M. C., Achkor, H., Persson, B., Fernández, M. R., Shafqat, J., Farrés, J., ... & Parés, X. (1996). Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase: molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 241(3), 849-857.

- Martínez-Ruiz, A., & Lamas, S. (2007). Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular research*, 75(2), 220-228.
- Marschner, P., (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, Third Edition. Academic Press.
- Mashiguchi, K., Seto, Y., & Yamaguchi, S. (2021). Strigolactone biosynthesis, transport and perception. *The Plant Journal*, 105(2), 335-350.
- Marzec, M. (2016). Perception and signaling of strigolactones. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1260.
- Marzec, M., & Melzer, M. (2018). Regulation of root development and architecture by strigolactones under optimal and nutrient deficiency conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1887.
- Mata-Pérez, C., Sánchez-Calvo, B., Padilla, M. N., Begara-Morales, J. C., Luque, F., Melguizo, M., Jiménez-Ruiz, J., Fierro-Risco, J., Peñas-Sanjuán, A., Valderrama, R., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2016). Nitro-Fatty Acids in Plant Signaling: Nitro-Linolenic Acid Induces the Molecular Chaperone Network in Arabidopsis. *Plant physiology*, 170(2), 686–701.
- Men, L., & Wang, Y. (2007). The oxidation of yeast alcohol dehydrogenase-1 by hydrogen peroxide in vitro. *Journal of proteome research*, 6(1), 216-225.
- Milner, M. J., Seamon, J., Craft, E., & Kochian, L. V. (2013). Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of experimental botany*, 64(1), 369-381.
- Mohn, M. A., Thaqi, B., & Fischer-Schrader, K. (2019). Isoform-specific NO synthesis by Arabidopsis thaliana nitrate reductase. *Plants*, 8(3), 67.
- Molnár, A., Kondak, S., Benkő, P., Janovszky, P., Kovács, K., Szöllősi, R., ... & Kolbert, Z. (2022). Limited Zn supply affects nutrient distribution, carbon metabolism and causes nitro-oxidative stress in sensitive Brassica napus. *Environmental and Experimental Botany*, 202, 105032.
- Montalvo, D., Degryse, F., Da Silva, R. C., Baird, R., & McLaughlin, M. J. (2016). Agronomic effectiveness of zinc sources as micronutrient fertilizer. *Advances in agronomy*, 139, 215-267.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

- Neill, S. J., Desikan, R., & Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual review of plant biology*, 63, 107-130.
- Nishiyama, R., Kato, M., Nagata, S., Yanagisawa, S., & Yoneyama, T. (2012). Identification of Zn–nicotianamine and Fe–2'-deoxymugineic acid in the phloem sap from rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant and cell physiology*, 53(2), 381-390.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., & Karyotis, T. (2018). Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 252-260.
- Padilla, M. N., Mata-Pérez, C., Melguizo, M., & Barroso, J. B. (2017). In vitro nitro-fatty acid release from Cys-NO<sub>2</sub>-fatty acid adducts under nitro-oxidative conditions. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 68, 14–22.
- Palmgren, M. G., Clemens, S., Williams, L. E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J. K., & Sanders, D. (2008). Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in plant science*, 13(9), 464-473.
- Potuschak, T., & Doerner, P. (2001). Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology*, 4(6), 501-506.
- Qin, H., He, L., & Huang, R. (2019). The coordination of ethylene and other hormones in primary root development. *Frontiers in Plant*
- Ren, H., Han, J., Yang, P., Mao, W., Liu, X., Qiu, L., ... & Huang, X. (2019). Two E3 ligases antagonistically regulate the UV-B response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4722-4731.
- Rink, L. (2000). Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4), 541-552.
- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Angulo, M., & Pérez-Vicente, R. (2023). NO Is Not the Same as GSNO in the Regulation of Fe Deficiency Responses by Dicot Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12617.
- Ruyter-Spira, C., Kohlen, W., Charnikhova, T., van Zeijl, A., van Bezouwen, L., de Ruijter, N., ... & Bouwmeester, H. (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones?. *Plant physiology*, 155(2), 721-734.

- Sabadashka, M., Nagalievskaja, M., & Sybirna, N. (2021). Tyrosine nitration as a key event of signal transduction that regulates functional state of the cell. *Cell Biology International*, 45(3), 481-497.
- Saeed, M., & Fox, R. L. (1977). Relations between suspension pH and zinc solubility in acid and calcareous soils. *Soil Science*, 124(4), 199-204.
- Sakamoto, A., Ueda, M., & Morikawa, H. (2002). Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS letters*, 515(1-3), 20-24.
- Sarkar, T. S., Biswas, P., Ghosh, S. K., & Ghosh, S. (2014). Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions. *PLoS One*, 9(9), e107348.
- Sato, D., Awad, A. A., Takeuchi, Y., & Yoneyama, K. (2005). Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanche*, produced by cotton. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(1), 98-102.
- Scaffidi, A., Waters, M. T., Bond, C. S., Dixon, K. W., Smith, S. M., Ghisalberti, E. L., & Flematti, G. R. (2012). Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(11), 3743-3746.
- Scaffidi, A., Waters, M. T., Sun, Y. K., Skelton, B. W., Dixon, K. W., Ghisalberti, E. L., ... & Smith, S. M. (2014). Strigolactone hormones and their stereoisomers signal through two related receptor proteins to induce different physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 165(3), 1221-1232.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Schopfer, F. J., Baker, P. R., Giles, G., Chumley, P., Batthyany, C., Crawford, J., Patel, R. P., Hogg, N., Branchaud, B. P., Lancaster, J. R., Jr, & Freeman, B. A. (2005). Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), 19289–19297.
- Selwal, N., Wani, A. K., Akhtar, N., Kaur, M., & Jassal, P. S. (2023). Molecular insights of Strigolactone biosynthesis, signalling pathways, regulatory roles, and hormonal crosstalks in plant systems. *South African Journal of Botany*, 160, 9-22.



- Seto, Y., Kameoka, H., Yamaguchi, S., & Kyojuka, J. (2012). Recent advances in strigolactone research: chemical and biological aspects. *Plant and Cell Physiology*, 53(11), 1843-1853.
- Shabek, N., Ticchiarelli, F., Mao, H., Hinds, T. R., Leyser, O., & Zheng, N. (2018). Structural plasticity of D3–D14 ubiquitin ligase in strigolactone signalling. *Nature*, 563(7733), 652-656.
- Shi, Y. F., Wang, D. L., Wang, C., Culler, A. H., Kreiser, M. A., Suresh, J., ... & Liu, J. Z. (2015). Loss of GSNOR1 function leads to compromised auxin signaling and polar auxin transport. *Molecular plant*, 8(9), 1350-1365.
- Siegel, J. M., de Campos, R. P., Gunasekara, D. B., da Silva, J. A., Lunte, S. M., Peteu, S., ... & Bayachou, M. (2015). Electrophoretic methods for separation of peroxy nitrite and related compounds. *Peroxy nitrite Detection in Biological Media: Challenges and Advances*, (7), 121.
- Sinclair, S. A., & Krämer, U. (2012). The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(9), 1553-1567.
- Sinclair, S. A., & Krämer, U. (2020). Generation of effective zinc-deficient agar-solidified media allows identification of root morphology changes in response to zinc limitation. *Plant signaling & behavior*, 15(1), 1687175.
- Sinclair, S. A., Sherson, S. M., Jarvis, R., Camakaris, J., & Cobbett, C. S. (2007). The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 174(1), 39-45.
- Somssich, M. (2019). A short history of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Columbia-0* (No. e26931v5). *PeerJ Preprints*.
- Song, W. Y., Choi, K. S., Kim, D. Y., Geisler, M., Park, J., Vincenzetti, V., ... & Martinoia, E. (2010). *Arabidopsis* PCR2 is a zinc exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport. *The Plant Cell*, 22(7), 2237-2252.
- Souza, J. M., Peluffo, G., & Radi, R. (2008). Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker?. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4), 357-366.
- Staab, C. A., Hellgren, M., & Höög, J. O. (2008). Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3950-3960.

- Staden, J. V., Brown, N. A., Jäger, A. K., & Johnson, T. A. (2000). Smoke as a germination cue. *Plant Species Biology*, 15(2), 167-178.
- Stamler, J. S., Singel, D. J., & Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258(5090), 1898-1902.
- Stanga, J. P., Morffy, N., & Nelson, D. C. (2016). Functional redundancy in the control of seedling growth by the karrikin signaling pathway. *Planta*, 243, 1397-1406.
- Stirnberg, P., van De Sande, K., & Leyser, H. O. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 129(5), 1131–1141.
- Stoimenova, M., Igamberdiev, A. U., Gupta, K. J., & Hill, R. D. (2007). Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta*, 226, 465-474.
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., & Adam, V. (2018). Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of hazardous materials*, 349, 101-110.
- Sun, H., Li, W., Burritt, D. J., Tian, H., Zhang, H., Liang, X., ... & Tran, L. S. P. (2022). Strigolactones interact with other phytohormones to modulate plant root growth and development. *The Crop Journal*, 10, 1517-1527.
- Sun, X.-D., and Ni, M. (2011). HYPOSENSITIVE TO LIGHT, an alpha/beta fold protein, acts downstream of ELONGATED HYPOCOTYL 5 to regulate seedling de-etiolation. *Mol. Plant* 4, 116–126
- Sun, H., Tao, J., Liu, S., Huang, S., Chen, S., Xie, X., ... & Xu, G. (2014). Strigolactones are involved in phosphate-and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice. *Journal of experimental botany*, 65(22), 6735-6746.
- Tang, J., & Chu, C. (2020). Strigolactone signaling: repressor proteins are transcription factors. *Trends in Plant Science*, 25(10), 960-963.
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.
- Tiong, J., McDonald, G. K., Genc, Y., Pedas, P., Hayes, J. E., Toubia, J., ... & Huang, C. Y. (2014). Hv ZIP 7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. *New Phytologist*, 201(1), 131-143.
- Toh, S., Holbrook-Smith, D., Stokes, M. E., Tsuchiya, Y., & McCourt, P. (2014). Detection of parasitic plant suicide germination compounds using a high-throughput *Arabidopsis* HTL/KAI2 strigolactone perception system. *Chemistry & biology*, 21(8), 988-998.

- Treffon, P., Rossi, J., Gabellini, G., Trost, P., Zaffagnini, M., & Vierling, E. (2022). Proteome profiling of a S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) null mutant reveals that aldo-keto reductases form a new class of enzymes involved in nitric oxide homeostasis. *The FASEB Journal*, 36.
- Trevaskis, B., Watts, R. A., Andersson, C. R., Llewellyn, D. J., Hargrove, M. S., Olson, J. S., ... & Peacock, W. J. (1997). Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12230-12234.
- Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004). Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, 136(2), 2982-3000.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143(4), 606-616.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11), 1963-1971.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., ... & Barroso, J. B. (2007). Nitrosative stress in plants. *Febs Letters*, 581(3), 453-461.
- Villaécija-Aguilar, J. A., Hamon-Josse, M., Carbonnel, S., Kretschmar, A., Schmidt, C., Dawid, C., ... & Gutjahr, C. (2019). SMAX1/SMXL2 regulate root and root hair development downstream of KAI2-mediated signalling in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 15(8), e1008327.
- Villaécija-Aguilar, J. A., Körösy, C., Maisch, L., Hamon-Josse, M., Petrich, A., Magosch, S., ... & Gutjahr, C. (2022). KAI2 promotes *Arabidopsis* root hair elongation at low external phosphate by controlling local accumulation of AUX1 and PIN2. *Current Biology*, 32(1), 228-236.
- Wang, Q., Smith, S. M., & Huang, J. (2022). Origins of strigolactone and karrikin signaling in plants. *Trends in Plant Science*, 27(5), 450-459.
- Wani, K. I., Chaudhary, S., Zehra, A., Naeem, M., & Aftab, T. (2021). Precise Role of Strigolactones and Its Crosstalk Mechanisms in Root Development. *Rhizobiology: Molecular Physiology of Plant Roots*, 253-270.

- Waters, M. T., Brewer, P. B., Bussell, J. D., Smith, S. M., & Beveridge, C. A. (2012b). The Arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones. *Plant physiology*, 159(3), 1073-1085.
- Waters, M. T., Nelson, D. C., Scaffidi, A., Flematti, G. R., Sun, Y. K., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012a). Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis. *Development*, 139(7), 1285-1295.
- Waters, M. T., Scaffidi, A., Sun, Y. K., Flematti, G. R., & Smith, S. M. (2014). The karrikin response system of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 79(4), 623-631.
- Watts, R. A., Hunt, P. W., Hvitved, A. N., Hargrove, M. S., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2001). A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10119-10124.
- White, P. J., Whiting, S. N., Baker, A. J., & Broadley, M. R. (2002). Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*?. *New Phytologist*, 201-207.
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry*, 54(1), 1-4.
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., ... & Shi, Y. (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484(7393), 214-219.
- Xie, X., Yoneyama, K., Kisugi, T., Uchida, K., Ito, S., Akiyama, K., ... & Yoneyama, K. (2013). Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Molecular plant*, 6(1), 153-163.
- Xie, X., Yoneyama, K., & Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annual review of phytopathology*, 48, 93-117.
- Xu, S., Guerra, D., Lee, U., & Vierling, E. (2013). S-nitrosogluthione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 4, 430.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 1-11.

- Yeo, W. S., Kim, Y. J., Kabir, M. H., Kang, J. W., & Kim, K. P. (2015). Mass spectrometric analysis of protein tyrosine nitration in aging and neurodegenerative diseases. *Mass spectrometry reviews*, 34(2), 166-183.
- Zhong, S., Shi, H., Xue, C., Wei, N., Guo, H., & Deng, X. W. (2014). Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 3913-3920.

## 10. Melléklet

Gén név rövidítése	Lókuszt rövidítése	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<b>Referencia gének</b>			
ACTIN2	At3g18780	GGTAACATGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
GAPDH2	At1g13440	AATGGAAAATTGACCGGAATGT	CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA
<b>NO-függő gének</b>			
NIA1	At1g77760	ACAAAGGCCAAAGGCAACTTC	CCACATACATCTCGGTTTCGT
NIA2	At1g37130	GCGTGGTGTCCCTCTCTG	TGATGCTCGTTCCGTATTTG
GLB1	At2g16060	AGCCTCACGCAATGTCTGTT	TTCCCTGTTTTCTCAGTTG
GLB2	At3g10520	TGAAGTCCCTCACAACAATCC	TCAGCCACTACCACCTTTCC
GSNOR1	At5g43940	ACTGATGGCGGTGTTGACTA	TTGGAACGGACGAGTTGATA
<b>SL-függő gének</b>			
CCD7	At2g44990	CCTCTAAACGGGTGGAACAA	CGAATGGAAAATGGGGAAG
CCD8	At4g32810	TTGTCTTGTGCCCTCTTTCC	CTCATCATTTGTTGGTTGTG
D14	At3g03990	GGTTTCTCAACGACGAGGAT	AACAGCAAGCGGAGCAAAT
MAX1	At2g26170	CGGGAAGAAACCAATCAAAG	TCGGAATCAGTAAGCCTAAGATG
MAX2	At2g42620	TGTGGTGGTTTCTTGAGTCT	TTTGTATCCCTCGGTGAACG
<b>Zn-függő gének</b>			
IRT3	At1g60960	TACACGGGGGTTTGGATG	ATGGTCGCTGATTTGTTCT
ZIP3	At2g32270	CTTCACAGAGCCCAGATGCT	CTATTCCCATTCCCACAACG
bZIP19	At4g35040	GCTGCTTGTACCCACACTCA	GCAACCTCATCTCCAAAGA
CSD2	At2g28190	TAAATGCCAATGCCGATG	TCAAGCCAATCACACCACAT
CA2	At5g14740	GAAGGATGGGAAACGAATCA	CGAGCT ACCATACAAAGCA

**1. melléklet:** A qRT-PCR analízis során használt oligonukleotid primer párok. A gének tervezéséhez és szekvenciáik azonosításához az NCBI adatbázisát (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) használtam. Primer 3 szoftverrel (<https://primer3.ut.ee/>) terveztem meg a primereket a kapott szekvenciák alapján, majd a gének specifikálását az NCBI BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével ellenőriztem (Ye és mtsai., 2012).

<b>Mikroelem</b>								
Kontroll táptalajhoz			Enyhe cinkhiányos táptalajhoz			Cinkmentes táptalajhoz		
	mg/L	µM		mg/L	µM		mg/L	µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1	50	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1	50	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1	50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,45	50	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,45	50	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,45	50
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	4,3	<b>15</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,43	<b>1,5</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0	<b>0</b>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,125	0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,125	0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,125	0,5
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0125	0,05
Makroelem			Vitaminok			Vas-EDTA		
	mg/L	mM		mg/L	µM		mg/L	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	10,5	Mio-inozitol	50	277	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00278	9,996
KNO <sub>3</sub>	950	9,4	Tiamin HCl (B1 vitamin)	0,5	0,15	NaEDTA	0,00373	10,02
MgSO <sub>4</sub>	90,27	0,75	Nikotinsav	0,25	2,1			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	0,62	Piridoxin HCl (B6 vitamin)	0,25	1,2			
Kálium-jodid			Kalcium-klorid					
	mg/L	µM		mg/L	mM			
KJ	0,41	2,5	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	166,01	1,5			

**2. melléklet:** Kontroll, enyhe cinkhiányos és a cinkmentes táptalaj elkészítéséhez használt törzsoldatok koncentrációját mutatja be Murashige és Skoog módosított módszere alapján.

## 11. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10084434

\*jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a PH.D. értekezésemmel

†jelölt publikációban megosztott első szerzőként szerepelek

### Folyóiratban megjelent közlemények:

\***Oláh, D.**, Kondak, S., Molnár, Á., Adedokun, O. P., Czékus, Z., Gémes, K., ... & Kolbert, Z. (2023). Suboptimal zinc supply affects the S-nitrosoglutathione reductase enzyme and nitric oxide signaling in Arabidopsis. *Plant Stress*, 10, 100250. **IF: 5**

Kondak, S., Janovszky, P., Szöllősi, R., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Adedokun, O. P., ... & Kolbert, Z. (2023). Nickel oxide nanoparticles induce cell wall modifications, root anatomical changes, and nitrosative signaling in ecotypes of Ni hyperaccumulator *Odontarrhena lesbiaca*. *Environmental Pollution*, 122874. **IF: 8,9**

Kondak, S., Molnár, Á., **Oláh, D.**, & Kolbert, Z. (2022). The role of nitric oxide (NO) in plant responses to disturbed zinc homeostasis. *Plant Stress*, 4, 100068. **IF: 0**

Molnár, A., Kondak, S., Benkő, P., Janovszky, P., Kovács, K., Szöllősi, R., **Oláh, D.**,... & Kolbert, Z. (2022). Limited Zn supply affects nutrient distribution, carbon metabolism and causes nitro-oxidative stress in sensitive *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany*, 202, 105032. **IF: 5,7**

\***Oláh, D.**, Molnár, Á., Soós, V., & Kolbert, Z. (2021). Nitric oxide is associated with strigolactone and karrikin signal transduction in Arabidopsis roots. *Plant Signaling & Behavior*, 16(3), 1868148. **IF: 2,9**

Molnár, Á., Papp, M., Kovács, D. Z., Bélteky, P., **Oláh, D.**, Feigl, G., ... & Kolbert, Z. (2020). Nitro-oxidative signalling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in Brassica species. *Chemosphere*, 251, 126419. **IF: 7,086**

Vollár, M., Feigl, G., **Oláh, D.**, Horváth, A., Molnár, Á., Kúsz, N., ... & Kolbert, Z. (2020). Nitro-Oleic Acid in Seeds and Differently Developed Seedlings of *Brassica napus* L. *Plants*, 9(3), 406. **IF: 3,95**

\***Oláh, D.**, Feigl, G., Molnár, Á., Ördög, A., & Kolbert, Z. (2020). Strigolactones interact with nitric oxide in regulating root system architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1019. **IF: 5,753**

Molnár, Á., Rónavári, A., Bélteky, P., Szöllösi, R., Valyon, E., **Oláh, D.**, ... & Kolbert, Z. (2020). ZnO nanoparticles induce cell wall remodeling and modify ROS/RNS signalling in roots of Brassica seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111158. **IF: 6,20**

\*Kolbert, Z., **Oláh, D.**, Molnár, Á., Szöllösi, R., Erdei, L., & Ördög, A. (2020). Distinct redox signalling and nickel tolerance in *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109989. **IF: 6,20**

Feigl, G., Horváth, E., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Poór, P., & Kolbert, Z. (2019). Ethylene-nitric oxide interplay during selenium-induced lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1481-1488. **IF: 4,8**

Kolbert, Z., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Feigl, G., Horváth, E., Erdei, L., ... & Lindermayr, C. (2019). S-Nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 60(11), 2449-2463. **IF: 4,062**

**Összesített IF: 60,555**

**Könyvfejezetben megjelent közlemények:**



Szöllősi, R., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Kondak, S., & Kolbert, Z. (2022). Uptake and metabolism of selenium in plants: Recent progress and future perspectives. Selenium and nano-selenium in environmental stress management and crop quality improvement (pp. 79-90). Springer

Szöllősi, R., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Kondak, S., & Kolbert, Z. (2022). Selenium toxicity and tolerance in plants: recent progress and future perspectives. Selenium and nano-selenium in environmental stress management and crop quality improvement (pp. 311-324). Springer

Szöllősi, R., Molnár, Á., Feigl, G., **Oláh, D.**, Papp, M., & Kolbert, Z. (2021). Physiology of zinc oxide nanoparticles in plants. Plant responses to nanomaterials: recent interventions, and physiological and biochemical responses, 95-127.

**Oláh, D.**, Molnár, Á., Feigl, G., Szöllősi, R., Erdei, L., Kolbert Zs. (2020). A növényi nitrogén-monoxid kutatás múltja, jelene és jövője. Oxidatív Stressz és Antioxidáns Védekezés a Növényvilágtól a Klinikumig (pp. 41-51).

Feigl, G., Molnár, Á., **Oláh, D.**, & Kolbert, Z. (2020). Role of nitric oxide in plant abiotic stress tolerance. In Improving abiotic stress tolerance in plants (pp. 131-154). CRC Press.

### **Posztterek:**

Kondak, S., **Oláh, D.**, Molnár, Á., Janovszky, P., Dimitrakopoulos PG., Galbács, G., Kolbert Z. (2022) Uptake and effect of nickel oxide nanoparticles on biomass production and reactive molecule levels in nickel-hiperaccumulator *Odontarrhena lesbiaca* ecotypes. Fialat Biotechnológusok V. Országos Konferenciája, Gödöllő, Magyarország, 2022.04.11-12. (pp.87).

Molnár, Á., **Oláh, D.**, Szöllősi, R., Kovács, K., Topolesányi, P., Kolbert Z. (2021) The role of nitrosative stress response during Zn deficiency. 8th Nitric Oxide International Science, Zoom meeting, Magyarország, 2021.07.7-9. (pp.63).

Kondak, S., **Oláh, D.**, Molnár, Á., Kolbert Z. (2021) Zinc deficiency in *Pisum sativum*: focusing on reactive oxygen, nitrogen and sulphur species. 8th Nitric Oxide International Science, Zoom meeting, Magyarország, 2021.07.7-9. (pp.72).

\***Oláh, D.**, Kondak, S., Molnár, Á., Kolbert Z. (2021) Zinc deficiency effect of nitric oxide (NO) signaling in *Arabidopsis thaliana*. 8th Nitric Oxide International Science, Zoom meeting, Magyarország, 2021.07.7-9. (pp.76).

Kondak, S., **Oláh, D.**, Molnár, Á., Dimitrakopoulos PG., Kolbert Z. (2021) Nickel oxide (NiO) nanoparticles uptake and effect on biomass production and reactive nitrogen species levels in Ni-hyperaccumulator *Odontarrhena lesbiaca* ecotypes. XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2021.08.24-27. (pp.74).

Molnár, Á., **Oláh, D.**, Kovács, D., Szunyog, FM., Rázga, Z., Rónavári, A., Kolbert Z. (2021) A nitro-oxidatív jelátvitel változásai szén nanocső kezelés hatására repce és paradicsom csíranövényekben. XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2021.08.24-27. (pp.77).

\***Oláh, D.**, Molnár, Á., Kondak, S., Kolbert Z. (2021) A cinkhiány hatásainak vizsgálata S-nitrozoglutation reductáz mutáns *Arabidopsis thaliana* gyökérrendszerében. XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország, 2021.08.24-27. (pp.80).

\***Oláh, D.**, Feigl, G., Molnár, Á., Kolbert Z. (2020) Strigolactone- and nitric oxide-mediated changes in root architecture of *Arabidopsis thaliana*. Vienna International Science Conferences and Events Association, Plant Growth & Other Growth Regulators. Bécs, Ausztria, 2020.02.17-18. (pp.21).

Feigl, G., Molnár, Á., **Oláh, D.**, Czifra, Á., Kolbert Z. (2019) Combined heavy metal treatment affects nitro-oxidative status of Rapeseed and Sunflower roots differently. 14th International Conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants. München, Németország, 2019.07.10-12. (pp. 97).

Molnár, Á., Feigl, G., Papp, M., **Oláh, D.**, Kolbert Z. (2019) The effect of zinc oxide nanoparticles on ROS and RNS metabolism of Brassica roots. 14th International Conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants. München, Németország, 2019.07.10-12. (pp.124).

**Oláh, D.**, Molnár, Á., Szöllősi, R., Feigl, G., Kolbert Z. (2019) Nickel-induced ROS and RNS imbalance in Brassicaceae. 14th International Conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants. München, Németország, 2019.07.10-12. (pp. 125).

**Konferencia előadások:**

\***Oláh, D.**, Molnár, Á., Kondak, S., Kolbert Z. (2022) Nitric oxide signalling in responses of *Arabidopsis thaliana* to limited zinc supply. Fiatal Biotechnológusok V. Országos Konferenciája, Gödöllő, Magyarország, 2022.04.11-12. (pp.27).

\***Oláh, D.** (2020) A strigolakton és a nitrogén-monoxid közötti jelátvitel hatása *Arabidopsis thaliana* gyökérrendszerére. XXIII. Tavaszi Szél Konferencia, Zoom meeting, 2020.10.16. (pp.137)

## 12. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek **Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának** az odadó munkáját, türelmét és belém fektetett bizalmát, ami nélkül ez a disszertáció nem születhetett volna meg. Hálás vagyok, amiért az Ő szárnyai alatt fejlődhettem, szerezhettem szakmai tapasztalatokat már az MSc megkezdésétől egészen a Ph.D. befejezéséig. Nemcsak a kutatási pályán elért sikereimet köszönhetem Neki, hanem talán még a karriernél is fontosabb magánéleti sikert, hiszen általa ismertem meg a férjemet.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Fehér Attila** tanszékvezetőnek, aki lehetőséget biztosított a Növénybiológia Tanszéken a kísérleteim elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Erdei László** tanár úrnak a biztató szavait, segítőkészségét és tudásának átadását.

Köszönet illeti csoportunk korábbi tagjai közül **Dr. Feigl Gábort**, aki nagymértékben hozzájárult a BSc-s szakdolgozatom megírásához, ezáltal a kutatási pályám elindításához. **Dr. Molnár Árpádnak** is köszönöm, hogy számos olyan technikát elsajátítottam mellette, ami végigkísért ezen az utazáson. Jelenlegi tagok közül köszönöm **Véseiné Dr. Szöllösi Rékának** a támogatását, kedvességét.

Nem tudok elég köszönetet mondani **Kapásné Török Évának** a segítségnyújtásáért, a rengeteg mosogatásért, autoklávozásért, táptalajkészítésért, ültetésért és minden más elvégzett feladatért. Boldogsággal tölt el, hogy nemcsak kollegák, hanem egymás bizalmasai, barátai szinte családtagjai lettünk egymásnak. Nála jobb laborasszisztenst kívánni sem lehetne.

Szeretném megköszönni **Porkoláb Erzsébetnek**, **Bécs Attilánának** és **Dóri Erikának** a hasznos tanácsaikat, tapasztalataiknak a megosztását, amivel hozzájárultak a kísérleteim sikeres elvégzéséhez.

Köszönöm tanszékünk titkárnőjének, **Pál Erikának** az adminisztrációs ügyek és a rendelések lebonyolításában nyújtott segítségét.

Ez a négy év nem telhetett volna el jó hangulatban és légkörben, ha nincsen **Dr. Riyazzudin**, **Dr. Nadeem Iqbal** és **Dr. Czékus Zalán**.

Köszönöm minden tanszéki munkatársnak a fáradozást, akik valamilyen formában hozzájárultak a doktori disszertációm létrejöttéhez.

Elmondhatatlanul hálás vagyok a férjemnek **Selahattin Kondaknak** és a **Szüleimnek**, akik mindvégig támogattak, átsegítettek a mélypontokon és soha nem veszítették el a belém fektetett hitüket.

### 13. Nyilatkozat

A felsorolt közlemények felelős szerzőjeként igazolom, hogy Kondak (Oláh) Dóra Ph.D. jelölt nagymértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikációk elkészítéséhez és a tézisben közölt eredményeket más értekezésben nem használtuk fel.

Oláh, D., Kondak, S., Molnár, Á., Adedokun, O. P., Czékus, Z., Gémes, K., ... & Kolbert, Z. (2023). Suboptimal zinc supply affects the S-nitrosoglutathione reductase enzyme and nitric oxide signaling in *Arabidopsis*. *Plant Stress*, 10, 100250. IF: 5

Oláh, D., Molnár, Á., Soós, V., & Kolbert, Z. (2021). Nitric oxide is associated with strigolactone and karrikin signal transduction in *Arabidopsis* roots. *Plant Signaling & Behavior*, 16(3), 1868148. IF: 2,9

Oláh, D., Feigl, G., Molnár, Á., Ördög, A., & Kolbert, Z. (2020). Strigolactones interact with nitric oxide in regulating root system architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1019. IF: 5,753



Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna  
egyetemi docens  
SZTE TTIK Növénybiológia Tanszék

Szeged, 2024. február 27.