

*„A tudományos felfedezés lényege nem az, hogy valamit első ízben pillantunk meg, hanem hogy szilárd kapcsolatot létesítünk az eddigi tudás és az eddig ismeretlen között.”  
(Selye János)*

**A nitrogén-monoxid (NO) szerepe, keletkezése és forrása  
auxin kezelés, valamint ozmotikus stressz alatt  
gyökerekben**

Doktori (Ph. D.) értekezés

KOLBERT ZSUZSANNA

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék

Témavezető: Prof. Dr. Erdei László

Szeged

2009

## Rövidítések jegyzéke

ABA	abszcizinsav
ABC	ATP-binding Casette
acetyl-CoA	acetyl-koenzim A
4AF-DA	4-aminofluoreszcein diacetát
AOX	alternatív oxidáz
AtCYT-INV1	CYTOPLASMIC INVERTASE
AtNOA1	<i>Arabidopsis thaliana</i> nitric oxide associated 1
AtNOS1	<i>Arabidopsis thaliana</i> nitric oxide synthase 1
ATP	adenozin-trifoszfát
ALF4	ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4
ARF	auxin response factor
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
Ca <sup>2+</sup>	kalcium
CAP2	<i>C. arietinum</i> AP2
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CooA	CO-sensing transcription activator
c-PTI	imidazolin-oxil
cPTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid
2,4-D	2,4-dikloro-fenoxiecetsav
DAF	diaminofluoreszcein
DAF-2DA	4,5-diaminofluoreszcein-diacetát
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorofluoreszcein
<i>dig</i>	drought inhibition of lateral root growth
DNIC	dinitrozil-vas komplex
DNS	deoxiribonukleinsav
e <sup>-</sup>	elektron
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
EPR	elektron paramágneses rezonancia
ER	endoplazmatikus retikulum
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-adenin-mononukleotid
FGY	főgyökér
GC	guanilát cikláz
GCS	globin-kapcsolt szenzor
GSH	glutation
GSNO	S-nitrozoglutation
GSNOR	S-nitrozoglutation reduktáz
GTP	guanozin-trifoszfát
HbO <sub>2</sub>	oxihemoglobin
HNOB	hem-NO-kötő
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
HR	hiperszenzitív reakció
IAA	indol-3-ecetsav
IBA	indol-3-vaajsav
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IP <sub>3</sub>	inozitol-trifoszfát
IRP-1	iron regulatory protein-1
JGY	járulékos gyökér
KCl	kálium-klorid
KClO <sub>3</sub>	kálium-klorát
LBD/ASL	LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES LIKE
LEA	late embryogenesis abundant
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginin-metilészter
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginin
L-NNA	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginin
LRD2	LATERAL ROOT DEVELOPMENT 2

MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MES	2-(N-morfolin)-etánszulfonsav
MetHb	methemoglobin
mm	milliméter
MoCo	molibdén kofaktor
mRNS	messenger ribonukleinsav
MS	Murashige-Skoog
MT	metallotionein
NAA	naftilecetsav
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
Ni:NOR	nitrit:NO reduktáz
NO	nitrogén-monoxid
NO <sup>·</sup>	nitrogén-monoxid gyök
NO <sup>+</sup>	nitrozónium kation
NO <sup>-</sup>	nitroxil anion
NO <sub>2</sub>	nitrogén-dioxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrát
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	dinitrogén-trioxid
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	dinitrogén-tetroxid
NOC-18	1-hidroxi-2-oxo-3,3-bis(2-aminoetil)-1-triazén
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NPA	naftilftálsav
NR	nitrát reduktáz
NtOSAK	<i>Nicotiana tabacum</i> osmotic stress-activated protein kinase
O <sub>2</sub>	oxigén
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	szuperoxid anion
O <sub>3</sub>	ózon
OGY	oldalgyökér
ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrit
PA	foszfátidsav
PAS	Per-Arnt-Sim
PEG	polietilén glikol
PG	poligalakturonáz
Pi	inorganikus foszfát
PK	protein kináz
PLA	pektin liáz
PLC	foszfolipáz C
PLD	foszfolipáz D
PM	plazmamembrán
PME	pektin metilészteráz
<i>pxal</i>	peroxisomal ATP-binding Casette 1
<i>rib 1</i>	resistant to IBA
RNS	reaktív nitrogénformák
ROS	reaktív oxigénformák
RSNO	S-nitrozotiol
sGC	szolubilis guanilát cikláz
SA	szalicilsav
SH	tiol
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicillamin
SNP	nátrium-nitroprusszid
TIBA	2,3,5-trijódbenzoészav
TF	transzkripció faktor
UV-B	ultraviola B
VBF	VIER F-BOX PROTEINE
XOR	xantin-oxidoreduktáz

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	2
Tartalomjegyzék .....	4
I. Bevezetés .....	6
II. Irodalmi áttekintés .....	8
II.1. A gyökérrendszer növekedése, fejlődése.....	8
II.1.1. Az oldalgökér fejlődés szakaszait szabályozó belső faktorok .....	9
II.1.1.1. Az indol-3-vaajsav, mint természetes auxin a növényekben.....	14
II.1.2. Az oldalgökér fejlődés szakaszait szabályozó külső/környezeti faktorok .....	19
II.2 A nitrogén-monoxid .....	23
II.2.1. A NO kutatásának története .....	23
II.2.2. A NO fizikai-kémiai tulajdonságai.....	24
II.2.3. A nitrogén-monoxid képződése az élőlényekben.....	26
II.2.3.1. A NO szintézise állati szövetekben .....	26
II.2.3.2. A NO keletkezésének lehetséges útjai növényekben.....	27
II.2.3.2.1. A NO keletkezésének nem enzimatis útjai növényekben.....	28
II.2.3.2.2. A NO enzimatis szintézise növényekben .....	28
II.2.4. A NO vizsgálatának lehetőségei növényekben .....	32
II.2.4.1. NO donorok és scavengerek.....	35
II.2.5. A NO szignalizációja állatokban és a növényi rendszerekre vonatkozó eddigi ismeretek.....	36
II.2.5.1. cGMP-függő NO jelátvitel .....	37
II.2.5.2. cGMP-független NO jelátvitel .....	38
II.2.6. A NO fiziológiai szerepei növényekben.....	42
II.2.6.1. A NO szerepe a növények növekedésében és fejlődésében.....	43
II.2.6.2. NO kölcsönhatása növényi hormonokkal .....	45
II.2.6.3. A NO szerepe biotikus stresszek során .....	46
II.2.6.4. A NO szerepe abiotikus stresszek során .....	47
III. Célkitűzés .....	50
IV. Anyagok, módszerek, a kísérletek kivitelezése.....	51
IV.1. Növényi anyag és nevelési körülmények .....	51
IV.2. Vegyszerek és kezelések .....	53
IV.3. A NO fluoreszcens mikroszkópos detektálása .....	54
IV.4. Statisztikai analízis .....	56
V. Kutatási eredmények.....	57
V.1. A DAF-2DA kísérleti rendszerünkben való alkalmazhatóságának igazolása ..	57
V.2. Az ozmotikus stressz és az IBA kezelés gyökérmorfológiára és NO keletkezésre gyakorolt hatása hasonló, de nem azonos .....	59
V.3. Auxin koncentráció-függő NO felszabadulás a gyökerekben .....	62
V.4. A poláris auxin transzport szerepe a gyökérfejlődésben.....	64
V.5. Az ozmotikus stressz- és IBA- indukált NO felszabadulás időgörbéje különböző: "a stressz-NO" .....	65
V.6. A „stressz-NO” szerepe a PEG által indukált oldalgökér fejlődésben.....	67
V.7. Polietilén glikol által indukált kétfázisú NO akkumuláció búza valamint <i>Arabidopsis thaliana</i> L. gyökerekben.....	68

---

V.8. Az IBA kezelés hatása <i>Arabidopsis thaliana</i> L. gyökerek szerkezetére és NO tartalmára .....	70
V.9. Az IBA kezelés és a NO képződés kapcsolatának vizsgálata <i>pxa1</i> mutáns <i>Arabidopsis</i> növények segítségével.....	72
V.10. Az IBA kezelés által indukált NO lehetséges enzimátikus forrásának biokémiai vizsgálata .....	74
V.11. Az IBA kezelés által indukált NO lehetséges enzimátikus forrásának vizsgálata mutáns <i>Arabidopsis</i> növények segítségével .....	76
V.12. Az ozmotikus stressz hatása <i>Arabidopsis thaliana</i> gyökerek szerkezetére és NO tartalmára .....	77
V.13. Az ozmotikus stressz által indukált korai („stressz-NO”) valamint késői NO forrásának biokémiai és genetikai vizsgálata.....	79
VI. Eredmények értékelése .....	82
VII. Összefoglalás .....	95
VIII. Köszönetnyilvánítás .....	97
IX. Függelék.....	98
IX.1. Irodalomjegyzék .....	98
IX.2. Ph. D. thesis.....	113
IX.3. Publikációs lista.....	120

## I. Bevezetés

A növényi szervezet bámulatos sajátossága a dinamikusan változó környezethez való gyors és hatékony alkalmazkodóképesség. A növény az egyes szerveinek (pl.: gyökérrendszerének) növekedését, fejlődését a környezet aktuális állapotához (pl.: vízellátottság) igazodva szabályozza. A környezeti tényezők mellett a gyökér endogén hormonális rendszere (auxin és egyéb hormonok) a fejlődési folyamatok fő szabályozója. A külső és belső regulációs elemek közötti gazdag jelátviteli hálózatban szignálmolekulák teremtenek kapcsolatot az egyes komponensek között, biztosítva a fejlődési és növekedési jelek összehangolását, azonban a részleteket ezen a területen több tekintetben nem ismerjük.

Laboratóriumunk ennek, a gyökérfejlődésben megnyilvánuló kettős szabályozási rendszernek a vizsgálatát tűzte ki célul. Összehasonlítottuk egy jelentős környezeti stresszfaktor, az ozmotikus stressz és egy endogén regulátor, az auxin gyökérnövekedésre és fejlődésre gyakorolt hatását. Különös figyelmet fordítottunk a nitrogén-monoxid (NO) vizsgálatára ebben a rendszerben, hiszen feltételeztük, hogy ez az újszerű, bioaktív jelmolekula a gyökérfejlődést szabályozó szignalizációs hálózat egyik kulcsfontosságú eleme lehet.

Elsődleges vizsgálati objektumként borsó (*Pisum sativum* L.) növényeket választottunk, melyekben az ozmotikus stresszt polietilén glikol (PEG 6000) tápoldatba való adásával idéztük elő. Exogén auxinként indol-3-vajsavat (indole-3-butyric acid, IBA) alkalmaztunk indol-3-ecetsavnál (indole-3-acetic acid, IAA) nagyobb stabilitása és magasabb fokú biológiai aktivitása miatt. A NO jelmolekulát egy érzékeny, *in vivo* és *in situ* eljárással mutattuk ki, mely során a mintáinkat 4,5-

diaminofluoreszcein diacetáttal (DAF-DA) festettük meg és a NO-kapcsolt fluoreszcenciát mikroszkóp alatt detektáltuk.

Vizsgálatainkat az auxin, valamint az ozmotikus stressz által indukált NO lehetséges enzimátikus forrásának kutatása irányába is kiterjesztettük. Az állati nitrogén-monoxid szintáz (NOS) és a nitrát reduktáz (NR) enzimek gátlószereit (N<sup>G</sup>-monometil-L-arginin, LNMMA illetve wolframát) alkalmaztuk vad típusú (Col-1) *Arabidopsis thaliana* L. növényekben, ezzel keresve biokémiai bizonyítékot a NO forrására. Emellett *Arabidopsis* mutáns növényeket (*Atnoal* és *nia1*, *nia2*) is használtunk a NO-ot szintetizáló enzim genetikai szinten való meghatározása céljából.

Tudomásunk szerint jelen értekezés az első, mely kísérletesen igazolja a NO részvételét valamint azonosítja annak forrását a külső stressz tényezők és belső hormonális faktorok által irányított gyökérfejlődési folyamatokban, ezért a dolgozat ezen a kutatási területen hiánypótlónak tekinthető.

## II. Irodalmi áttekintés

### II.1. A gyökérrendszer növekedése, fejlődése

A gyökér a növényi szervezet alapvető fontosságú része, hiszen biztosítja a tápanyag felvételét a talajból, rögzíti a növényt, valamint részt vesz biotikus és abiotikus stressz válaszok kialakításában. Egy növény gyökérrendszerét kezdetben a főgyökér (FGY) alkotja, ami az embriogenezis során képződik, és osztódó sejteket tartalmaz a csúcsi merisztémában. A csíranövény fejlődése során a FGY bizonyos sejtjei képessé válnak az osztódásra, és posztembrionálisan oldalgyökereket (OGY) hoznak létre. Az újonnan megjelenő oldalgyökerek növelik a gyökérzet felszívó felületét és mechanikailag szilárdítják a gyökeret. Posztembrionális eredetűek a járulékos gyökerek (JGY) is, melyek a hajtás-gyökér határvonalon képződnek. A gabonafélék (búza, rizs, kukorica) gyökérrendszerére jellemző további hajtás eredetű, posztembrionális gyökerek megjelenése (Hochholdinger és Zimmermann 2008). A növények gyökérzete fajoként változó szerkezetű, és a környezet, melyben a növény él, szintén hatással van a gyökér architektúrájára (Osmond és mts. 2007). A gyökérrendszer szerkezetét befolyásoló tényezők közül az OGY-ek képződése és fejlődése az egyik leglényegesebb faktor, hiszen az ezt meghatározó hormonális és környezeti jelek többsége hat a gyökérszőrök, FGY-ek növekedésére és a JGY-ek megjelenésére is.

Nyitva- és zárwatermő növényekben az OGY iniciálisok a FGY egy specializált sejtrétegéből, a periciklusból képződnek. A periciklus a központi henger legkülső sejtjeiből áll, mely két különböző sejtípusból áll (Dubrovsky és Rost 2005). *Arabidopsis*-ban és a legtöbb kétszikűben az OGY-ek kizárólag azokból a periciklus



sejtekből keletkeznek, melyek a fejlődő xilém szövetek szomszédságában helyezkednek el, míg más fajokban, különösen gabonafélékben az OGY-ek a floém melletti periciklus sejtekből alakulnak ki (De Smet és mts. 2006). Az oldalgöyker fejlődés négy kulcsfontosságú szakaszát különítjük el: (i) a periciklus sejtek indukciója és dedifferenciációja; (ii) az oldalgöyker primordium megjelenése a periciklus sejtek sejtciklusba való belépése és aszimmetrikus sejtosztódása révén; (iii) az OGY primordium megnyúlásos növekedése; (iv) az OGY merisztéma aktiválódása. (Malamy és Benfey 1997).

### **II.1.1. Az oldalgöyker fejlődés szakaszait szabályozó belső faktorok**

#### **Az oldalgöyker iniciáció**

Az oldalgöyker fejlődés szakaszait befolyásoló fő faktor az **auxin** (Casimiro és mts. 2003, Woodward és Bartel 2005). E hormon jelentőségét bizonyítja, hogy az auxin kezelés az *Arabidopsis* csíranövény gyökerében kifejeződő gének 10%-ának expresszióját befolyásolja (Himanen és mts. 2002). Az auxin transzporterek pozíciójának szabályozása ún. „auxin forró pontokat” eredményez a gyökérben. Ez a folyamat a gyökérhez hasonlóan a hajtásban is megjelenik az oldalszerv fejlődés során (Benkova és mts. 2003). Érdekes az, hogy az auxin jelátvitel önmaga szabályozza az auxin specifikus transzport molekulák helyét a sejten belül, így a hormon áramlás irányát (Sauer és mts. 2006). *Arabidopsis* növényben az OGY iniciálíst kialakító xilém pólus periciklus sejtek kisebb méretűek a periciklus más sejtjeinél. Ez arra utal, hogy eltérő sejtciklus szabályozási folyamatok működnek a különböző sejtípusokban. Általában nem minden xilém pólus periciklus sejt képez OGY kezdeményt, ami feltételezi, hogy többszintű szabályozás működik ezekben a sejtekben (Beeckman és mts. 2001).

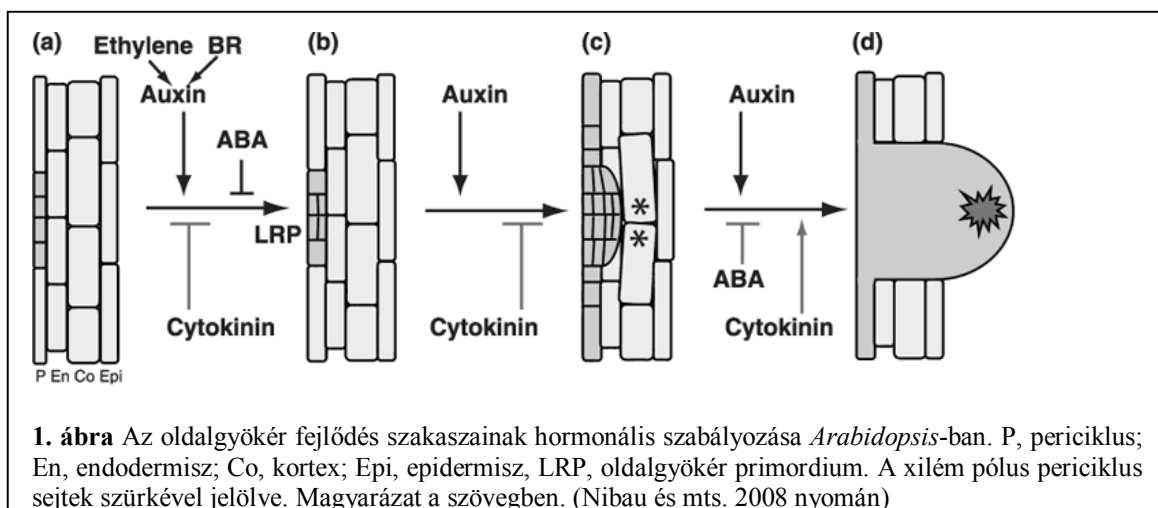
Az OGY iniciáció során lejátszódó **auxin jelátvitel** szorosan kapcsolódik bizonyos fehérjék szabályozott lebontásához. A folyamat során a célfehérjék ubiquitinálódnak, amit proteaszómális degradációjuk követ (Petroski és Deshaies 2005). Az auxin receptorok (TIR1 és AFB 1-3) az F-boxot tartalmazó fehérjecsalád tagjai (Kepinski és Leyser 2005). Auxin bekötődésének hatására a receptor kölcsönhat az AUX/IAA fehérjékkel, melyek lebomlása indukálódik. Az AUX/IAA fehérjék olyan represszorok, melyek az ARF (auxin response factor) transzkripciós faktorial (TF) dimerizálódva megakadályozzák annak kötődését az auxin válasz gének promóter eleméhez. Vagyis az AUX/IAA fehérjék auxin-indukálta lebomlása gátolja az auxin válasz gének átíródását (Gray és mts. 2001). Az egyik legfontosabb AUX/IAA fehérje az OGY indukció folyamatában a SLR/IAA14. Vad típusú növényekben az auxin az IAA14 degradációját okozza, ezáltal megakadályozza, hogy az ARF7 és ARF19 TF-ok aktiválják a *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES LIKE (LBD/ASL)* gének transzkripcióját. Ezen gének fehérjetermékei sejtosztódást szabályozó gének transzkripcióját indukálják (Okushima és mts. 2007). A funkcióvesztéses *slr1* mutáns nem fejleszt OGY-et, mivel benne az IAA14 fehérje stabil (Fukaki és mts. 2002). Vanneste és mts. (2005) összehasonlították az auxin-indukált transzkriptumokat vad típusú és *slr1* mutáns növények gyökerében, és 913 db OGY iniciáció-specifikus gént találtak, melyek az auxin/*slr1* jelátviteli út „downstream” elemei. Ezek legtöbbje sejtciklus-, vagy sejtosztódás-asszociált gén, illetve auxin szignalizációban, transzportban, metabolizmusban szereplő gén. Az IAA28 fehérje szintén fontos szerepet tölt be az OGY indukció folyamatában. Az *iaa28* funkcióvesztéses mutáns a vad típusnál kevesebb oldalgyökérrel rendelkezik: a fehérjét az auxin degradálja, és represszálja az auxin-indukált, OGY iniciációban szereplő géneket. A fent említett mutáns rezisztens

exogén citokinin és etilén kezelésekre is, ami más hormon jelátviteli utakkal való kapcsolódási pontra utal (Nibau és mts. 2008). Az OGY képzés jelátvitelének fontos komponensei *Arabidopsis*-ban a VBF (VIER F-BOX PROTEINE) fehérjék is, hiszen a VBF-deficiens növények csökkent OGY számmal rendelkeznek. Schwager és mts. (2007) microarray eljárást alkalmazva demonstrálták, hogy a VBF funkcióvesztés az auxin válaszgének és a sejtfa! újraszerveződésében szereplő gének megváltozott expresszióját eredményezi. Az auxin szignalizáció további komponense a NAC1 transzkripciós faktor, mely elősegíti az OGY iniciációt, és auxin válasz promóterekhez kötődve továbbíthatja az auxin jelet (Xie és mts. 2000). Nodzon és mts. (2004) azonosítottak egy OGY fejlődésben szereplő ubiquitin ligázt (XBAT32), amiről kiderült, hogy egy RING-finger típusú fehérje, és nagyfokú expressziót mutat a szállítószövet azon területein, melyek az OGY iniciációs pontokhoz közel lokalizálódnak.

Köztudott, hogy a periciklus sejtek a sejtciklus G1 fázisában vannak, míg az OGY-et képző periciklus sejtek a G2 szakaszban rekedtek meg. Az oldalgyökér fejlődést indukáló jelek stimulálják az utóbbi sejtek proliferatív osztódását (Beeckman és mts. 2001). Bár a sejtciklus lényeges az OGY iniciáció folyamatában, a mitótikus index megnövekedése vagy az intenzív sejtosztódás a periciklusban nem stimulálja az oldalgyökerek iniciációját vagy fejlődését (Vanneste és mts. 2005, Wang és mts. 2006). Ezért szükséges elválasztani egymástól a sejtosztódás és az OGY kezdemény fejlődésének folyamatát. Úgy tűnik, hogy az OGY iniciációhoz az SLR/IAA14 fehérje auxin-indukálta lebomlásának és a sejtciklusnak az egyidejű aktivációja szükséges (Vanneste és mts. 2005). Ötvös és mts. (2005) kísérletesen igazolták a nitrogén-monoxid jelmolekula szerepét az auxin-indukált sejtosztódás aktivációjában lucernában, Correa-Aragunde és mts. (2006) pedig felismerték, hogy a NO modulálja

bizonyos sejtciklus gének expresszióját az oldalgyökér fejlődés során paradicsomban. Ezen újszerű eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a NO jelmolekula lehet az egyik komponens, ami megteremti a kapcsolatot az auxin szignalizáció és a sejtciklus szabályozása között. A heterotrimer G-fehérjék szintén rendelkezhetnek ezzel a kapcsoló funkcióval, hiszen  $\beta$  vagy  $\gamma$  alegységük mutációja a sejtosztódás fokozódását és megnövekedett oldalgyökér képződést eredményezett (Ullah és mts. 2003).

Az auxin mellett más hormonok is befolyásolják a gyökérzet fejlődését (1. ábra). Ilyen hormon a **citokinin**, mely számos fejlődési folyamatban az auxinnal ellentétes hatású. *Arabidopsis*-ban, dohányban és rizsben a citokinin az OGY fejlődés negatív regulátora (Werner és mts. 2003, Laplaze és mts. 2007, Rani Debi és mts. 2005). Az **etilén és a brassinoszteroidok** auxin-függő úton keresztül hatnak az OGY fejlődésre (Bao és mts. 2004). Az **abszcizinsav** (abscisic acid, ABA) hatása a gyökérfejlődés folyamatában még kérdéses. E hormon szerepét bizonyítja az, hogy az abszcizinsav inszenzitív *abi3* mutáns csökkent érzékenységet mutat az auxin-indukálta OGY iniciációval szemben (Brady és mts. 2003), és bizonyították néhány auxin indukálta gén ABA-általi gátolhatóságát is (Vanneste és mts. 2005). Ugyanakkor ABA által stimulált oldalgyökér fejlődést találtak rizs növényben (Chen és mts. 2006).



Az oldalgökér indukció során **hormon független szignalizációs útvonalak** is szerepelnek. A leginkább tanulmányozott OGY indukcióban szereplő fehérje, mely hormon jelátviteltől függetlenül hat, az ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4 (ALF4). Az *Arabidopsis alf4* mutáns az oldalgökök teljes hiányát mutatja, még auxin jelenlétében is (Celenza és mts. 1995), emellett az auxin nincs hatással az ALF4 fehérje szintjére és sejten belüli lokalizációjára (DiDonato és mts. 2004) sem. Szintén hormon szignalizációtól függetlenül szabályozó faktorok az ARABIDILLO-1 és ARABIDILLO-2, melyek OGY iniciációt gátló hatással bírnak. Az auxin eloszlása az *arabidillo* mutáns gyökércsúcsában normálisnak tűnik, és az auxin nincs hatással az ARABIDILLO fehérjék sejtmagi lokalizációjára (Coates és mts. 2006).

#### **Az oldalgökér primordium további növekedése és fejlődése**

Az oldalgökér iniciációt követő folyamatokról kevés ismerettel rendelkezünk, de elmondható, hogy az auxin – függetlenül az előző folyamatban játszott szerepétől - szükséges a primordium további növekedéséhez (Bhalerao és mts. 2002). Több egymást követő sejtosztódás eredménye a primordium méretbeli növekedése, kúpformájú szerkezetének kialakulása, amik lehetővé teszik, hogy áthatoljon a FGY külső sejtrétegein (Nibau és mts. 2008 és 1. ábra cd). Ehhez szükség van az sejtek szétválására az endodermiszben, a kortexben és az epidermiszben. A sejt szeparáció olyan enzimek aktivitásának szabályozásán keresztül valósul meg, melyek a sejtfallújaszerveződésében szerepelnek. Ilyen enzimek például a pektin metilészterázok (PME), pektin liázok (PLA) (Laskowski és mts. 2006) és a poligalakturonáz (PG) (Gonzales-Carranza és mts. 2007) enzimcsalád.

A fejlődés későbbi szakaszában az oldalgökér merisztémája aktiválódik, amihez egy, a poláris auxin transzport által kialakított auxin maximumra van szükség a primordium csúcsában. Ez az auxin felhalmozódás számos transzkripciós faktor aktivitását szabályozza (Blilou és mts. 2005). Ebben a folyamatban az abszcizinsav szabályozó szerepét is felismerték, ugyanis e hormon reverzibilisen blokkolja a merisztéma aktivációt, ami az OGY növekedés gátlásához vezet (De Smet és mts. 2003). Az oldalgökér megnyúlás indukálásában a kulcsszerepű auxin mellett a citokininek is pozitív hatásúak a folyamatban. Feltehetően auxin-független úton stimulálják a sejtciklus gének expresszióját (Rani Debi és mts. 2005).

### **II.1.1.1. Az indol-3-vaicsav, mint természetes auxin a növényekben**

A legismertebb, természetes auxin forma a növényekben az indol-3-ecetsav. Hosszú évekig az a nézet uralkodott, hogy az IAA az egyetlen, mely a növényi szövetekben természetes körülmények között auxin hatással bír. Először Bayer mutatta ki kromatográfiás eljárással 1969-ben, hogy a dohány levelében az IBA egy természetes, endogén komponens. Később tömegspektrometriával kombinált gázkromatográfiával mutatták ki, hogy a borsó gyökerében és hajtásában más auxin formák mellett megtalálható az IBA is. Ez a típusú auxin biológiailag aktívnak bizonyult, hiszen képes volt indukálni az oldalgökér primordium fejlődését (Schneider és mts. 1985). Az is bizonyossá vált, hogy az IBA az IAA-nál kisebb koncentrációban található meg a szövetekben. Az IBA az *Arabidopsis* teljes szabad auxin raktárának 25-30%-át alkotja (Ludwig-Müller és mts. 1993). Azóta számos növényfajban, például *Arabidopsis thaliana*-ban (Ludwig-Müller és mts. 1993) és

kukoricában (Ludwig-Müller és Epstein 1991) azonosították az indol-3-vajsavat, mint természetes auxint.

### **Az IBA fiziológiai hatásai**

Az IBA legismertebb hatása a járulékos gyökerek indukciója szár szegmenseken (Epstein és Ludwig-Müller 1993). Emellett az IBA hatása az OGY képzésben szintén ismert. Annak ellenére, hogy az IAA-nál alacsonyabb koncentrációban van jelen a szövetekben, az OGY indukáló hatása mégis kifejezettebb, ami feltehetően nagyobb stabilitásából adódik (Chhun és mts. 2003). Számos tanulmány megállapította, hogy az IBA IAA-vá alakulva stimulálja az OGY-ek növekedését és fejlődését (Zolman és mts. 2000). Ezt Chhun és mts. (2004) megcáfolták, mivel azt tapasztalták, hogy az exogén IAA kezelést rizs növény tápoldatában alkalmazva az OGY képződés gátlódott, a hajtást kezelve azonban hatásosnak bizonyult az OGY sűrűség emelésében. Az IBA kezelés esetén ennek épp az ellenkezőjét tapasztalták, vagyis az IBA OGY indukáló hatással csak tápoldatban alkalmazva rendelkezett. Ebből arra következtettek, hogy az IBA hatása az OGY fejlődésre közvetlen, vagyis nincs szükség IAA-vá való átalakulására hatásának megjelenéséhez. További bizonyítékok is léteznek az IBA önálló, IAA-tól független auxin hatására vonatkozólag. Az IBA olyan koncentráció tartományban indukált JGY fejlődést, ahol az IAA hatástalannak bizonyult. Különböző stressz körülmények (szárazság-, só-, ozmotikus stressz) az IBA szintézisét indukálják, így növelik az endogén IBA szintet, ugyanakkor az IAA képződésére nincsenek hatással (Ludwig-Müller 2000). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy az indol-3-vajsav számos növényfajban természetesen megtalálható auxin, mely önálló hatással rendelkezik.

### Az IBA bioszintézise

Az IBA *in vivo* szintézisének több útja lehetséges a növényekben: (1) az IAA bioszintéziséhez hasonló út, melynek prekursora a triptofán, (2) a zsírsav bioszintéziséhez hasonló lánchosszabbodási reakciók, (3) IAA szubsztrátból kiinduló útvonal, (4) nem triptofán-kapcsolt útvonal (Ludwig-Müller 2000). Az IAA IBA-vá való átalakulását sötétben nőtt kukorica csíranövényekben mutatták ki (Ludwig-Müller és Epstein 1993). A reakció a levelekben a koleoptil és gyökérszegmensekhez képest nagyobb mértékben történt meg. Ennek a szintézisútnak a megtörténtét leírták *Arabidopsis thaliana* csíra- és kifejtett növényekben is (Ludwig-Müller és Epstein 1993). Az IBA keletkezése során az IAA karboxil-csoportja acetyl-coenzim A-val (acetyl-CoA) acetilálódik (Ludwig-Müller és Epstein 1991).

Ludwig-Müller és mts. (1995) az IBA *in vitro* keletkezését vizsgálva kukorica csíranövényben kimutatták, hogy az IBA bioszintézise mikroszómális membránhoz kapcsolt folyamat, amihez acetyl-CoA és adenzin-trifoszfát (ATP) jelenléte szükséges. Ez egy kétlépéses reakció, amiben egy köztitermék is felszabadul. A reakció második lépése során az intermedier IBA-vá alakul sötétben nevelt kukorica növényben. A reakciót katalizáló enzimet azonosították és részlegesen tisztították, és IBA szintetáznak nevezték el. Kisméretű, kb. 30 kDa-os fehérje, mely savas izoelektromos ponttal rendelkezik és az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában lokalizálódik.

Az IBA szintetáz enzim aktivitása szárazság-, só- és ozmotikus stressz hatására nagymértékben nőtt, míg nagy mennyiségű víz gátolta az enzimet. Mivel ABA exogén alkalmazása szintén stimulálta az IBA szintetázt, nagy a valószínűsége, hogy a szárazságstressz az ABA felhalmozódáson keresztül aktiválja az enzimet. Ezzel párhuzamosan az IBA endogén koncentrációja szintén megemelkedett mind a



szárazságstressz, mind az ABA kezelés hatására. A vízstressz a jól öntözött növényekhez képest megváltozott gyökérszerkezetet alakított ki kukorica esetén: a gyökerek és a gyökérszőrök száma megnövekedett. A szerzők mindebből arra következtetnek, hogy az IBA lehet a felelős a megváltozott gyökérstruktúra kialakulásáért szárazságstressz alatt (Ludwig-Müller és mts. 1995).

### **Az IBA metabolizmusa**

Az indol-3-ecetsavhoz hasonlóan az IBA is képez konjugátumokat a szövetekben. A leggyakoribb forma az IBA-glükóz, amely jelenlétét számos kétszikű növényben kimutatták *Arabidopsisban* emellett nagy mennyiségű IBA-észter konjugátumot is azonosítottak (Ludwig-Müller és mts. 1993).

### **Az IBA transzportja**

Az indol-3-ecetsav transzportjának a gyökérben az IAA-hoz hasonlóan két útja lehetséges: a gyökér alapjától a gyökércsúcs felé irányuló akropetális és a gyökércsúctól a gyökéralap felé irányuló bazipetális transzport. Különbség azonban a két auxin forma között, hogy az IBA transzportja nagyobb mértékű és nagyobb sebességű. Az IAA transzport gátló naftilftálsav (naphtylphtalamic acid, NPA) és 2,3,5-trijódbenzoésav (triiodobenzoic acid, TIBA) nincs hatással az IBA transzportjára, így feltehetően ez az auxin forma más szállító fehérje komplexeket használ a transzportja során. Az IAA és az IBA szállítását összehasonlították vad típusú, *aux1-7* és *eir1-1 Arabidopsis* mutánsokban. E két utóbbi növénycsoport olyan génekben deficiens, melyek IAA influx és efflux hordozókat kódolnak (Parry és mts. 2001, Friml és Palme 2002). Ezekben a növényekben a vad típushoz teljesen hasonló

IBA transzportot találtak, ami arra utal, hogy az IBA szállítása nem igényli az AUX1 és az EIR1 fehérjék aktivitását (Rashotte és mts. 2003).

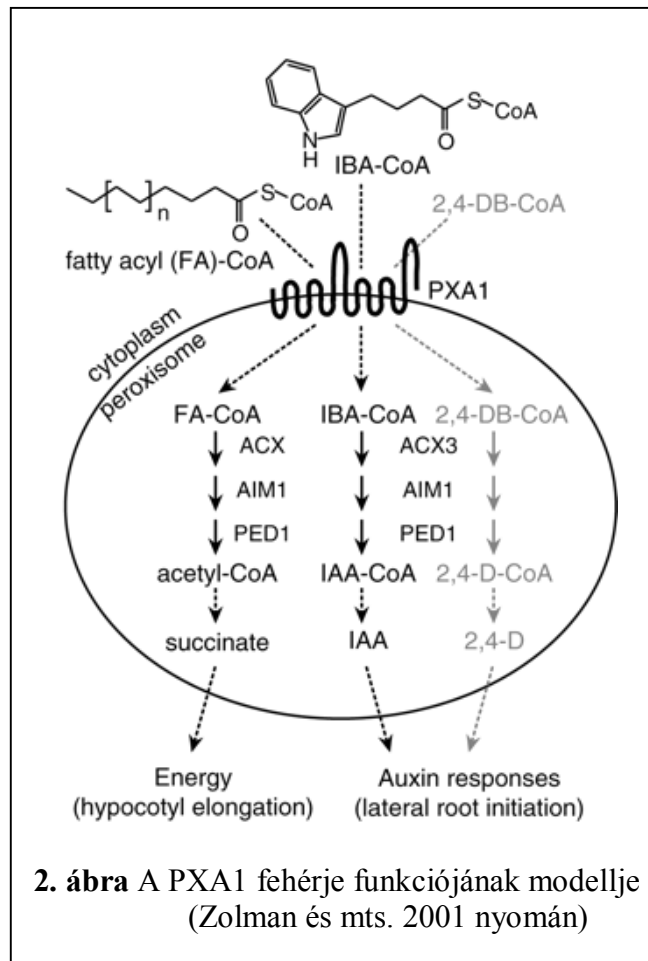
### **IBA mutáns *Arabidopsis* növények**

Az indol-3-vaajsav fiziológiai szerepének tisztázása céljából az elmúlt években különböző mutánsokat azonosítottak.

A *rib 1* (resistant to IBA) *Arabidopsis* mutáns rezisztens IBA és 2,4-diklorofenoxiecetsav (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) kezelésekre, de a vad típushoz hasonló választ ad IAA-ra, naftilecetsavra (naphtylacetic acid, NAA), citokininre, ABA-ra valamint etilénre. A mutáns rövid főgyökérrel és megnövekedett számú oldalgyökérrel rendelkezik, de a kifejlett növény fenotípusosan nem különíthető el a vad típustól. A *rib 1* környezeti stimulusokra adott válaszai variábilisak; ezek alapján a mutáns elkülöníthető az IAA-válasz fenotípustól, ami arra enged következtetni, hogy az IBA a valódi endogén auxin *Arabidopsis*-ban (Poupart és Waddell 2000, Poupart és mts. 2005).

Újabban azonosítottak néhány peroxiszómális zsírsav  $\beta$ -oxidációban deficiens mutáns vonalat is, melyek nagy része hibás különböző IBA válaszokban (Zolman és mts. 2000). Ezek közé tartozik a *pxa1* (Peroxisomal ATP-binding Cassette 1) *Arabidopsis* mutáns, ami a vad típussal (Col-0) ellentétben IBA kezelésre nem mutat OGY indukciót. A mutáns csírázása hozzáadott cukor nélkül nem történik meg, ami a zsírsav  $\beta$ -oxidációban való defektusra utal. Az indol-3-vaajsav indol-3-ecetsavvá alakulása a zsírsav  $\beta$ -oxidációhoz hasonló folyamat, így a *pxa1* mutáns nem képes az említett reakcióra. A mutáns fenotípusa a vad típushoz hasonló, bár kisebb rozettával, valamint kevesebb levéllel és oldalgyökérrel rendelkezik. A PXA1 egy, a peroxiszóma membránjában lokalizálódó ABC (ATP-binding Cassette)-transzporter

fehérje, mely a zsírsav-CoA észterek mellett az IBA-CoA peroxiszómába irányuló szállítását végzi. A peroxiszóma alapállományában történik meg az IBA többlépéses átalakulása IAA-vá (Zolman és mts. 2001, 2. ábra).



### II.1.2. Az oldalgökér fejlődés szakaszait szabályozó külső/környezeti faktorok

A növények helyhez kötött életmódú élőlények, ezért dinamikusan kell alkalmazkodniuk a változó környezethez. Az abiotikus és biotikus tényezőkre reagálva a növények fenntartják a gyökérzetük nagyfokú változékonyságát, így a

környezeti körülményektől függően különböző gyökér architektúrával rendelkezhetnek.

A gyökérzet adaptációja a talaj **nitrogén** ellátottságához ennek a fejlődési plaszticitásának kitűnő példája. Nagy nitrogén koncentráció ugyanis gátolja az oldalgyökér fejlődését az iniciáció után, de még a merisztéma aktiváció előtt. Ez a hatás megfordítható, hiszen a növényeket csökkentett nitrogén tartalmú közegbe helyezve az OGY fejlődés gátlása 24 órán belül megszűnik. A jelenség reverzibilis jellege azt mutatja, hogy a növények gyorsan képesek válaszolni a talaj változó nitrát tartalmára (Zhang és Forde 1998). A **foszfor** szintén fontos tápanyag, melyet a növények elsődlegesen inorganikus foszfát (Pi) formájában a gyökereken keresztül vesznek fel. Foszfor-hiányos *Arabidopsis*-ban a főgyökér növekedése leáll, az oldalgyökerek száma és megnyúlása azonban fokozódik, így egy erősen elágazó gyökérrendszer alakul ki (Williamson és mts. 2001, Lopez-Bucio és mts. 2002). A **szulfát**-deficiens gyökerek más képet mutatnak: gyorsan növekednek, az oldalgyökereik nagyobb számban, korábban, a gyökércsúcshoz közelebb jelennek meg (Kutz és mts. 2002).

A **vízellátottság** különösen nagy hatással van a gyökérrendszer fejlődésére. Takahashi és mts. (2003) megállapítása szerint a növények a nedvesebb talajrétegek felé növekednek, és elkerülik a magas ozmolaritású területeket. Egyes eredmények szerint, a vízhiány az OGY-ek fejlődését gátolja, bár az iniciációjukra nincs hatással (van der Weele és mts. 2000). A vízstressz során bekövetkező gyökérnövekedési válaszok molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert, bár az abszcizinsav nagy valószínűséggel szerepet játszik ezekben a folyamatokban. Az ABA-deficiens *aba2-1* és *aba3-2* mutánsok a vad típushoz képest kiterjedtebb gyökérzettel bírnak ozmotikus stressz alatt (Deak és Malamy 2005). A LATERAL ROOT DEVELOPMENT 2

(*LRD2*) és a CYTOPLASMIC INVERTASE (*AtCYT-INVI*) génben mutáns *Arabidopsis* növények az ABA-deficiens mutánsokhoz hasonló fenotípussal rendelkeznek (Deak és Malamy 2005, Qi és mts. 2007). Ez arra utal, hogy az ABA hormon és az *LRD2* gén terméke szerepel abban a folyamatban, mely során eldől, hogy az OGY primordiumok hány százaléka fejlődik oldalgyökérré normál és stressz körülmények között (Deak és Malamy 2005). Az ABA-nak és a szárazság stressznek hasonló, talán szinergikus hatása van az OGY fejlődésben. Néhány *drought inhibition of lateral root growth (dig)* mutáns megnövekedett szenzitivitást mutat ABA-ra, emellett pedig ezek a növények szárazság toleránsnak bizonyultak, míg mások ABA-ra csökkent OGY-gátló választ adtak, és szárazság szenzitívnek mutatkoztak (Xiong és mts. 2006). A *dig3* mutáns normális OGY növekedést mutat stressz alatt, ugyanakkor érzékeny a szárazságra. Érdekes az, hogy a *dig3* mutáns növények a vad típusnál kisebb méretűek jól öntözött körülmények között, ami arra utal, hogy az ABA és a szárazság stressz jelátvitel komponensei között általános növekedési regulátorok is szerepelnek (Xiong és mts. 2006). Csicsriborsóban (*Cicer arietinum*) a szárazság által aktivált CAP2 (*C. arietinum* AP2) TF stressz-indukálta gének dehidráció-válasz eleméhez kötődik (Boominathan és mts. 2004, Shukla és mts. 2006). A CAP2-t kifejező transzgenikus dohány só- és ozmotikus stressz toleráns, feltehetően OGY számának nagymértékű növekedése végett. Ezekben a növényekben számos auxin válasz gén indukálódott, ami a szárazság- és sóstressz válaszok, valamint az endogén auxin-kapcsolt fejlődési folyamatok közötti összeköttetésre utal (Shukla és mts. 2006).

A **sóstressz**, mely szorosan kapcsolódik a szárazságstresszhez, szintén átprogramozza a gyökérrendszer fejlődését. *Arabidopsis thaliana* L. növényben a sóstressz csökkent gyökérhosszt, erősen redukálódott merisztematikus zónát és az OGY iniciálisok számának csökkenését eredményezi, ami együtt jár számos sejtciklus

gén expressziójának gátlásával (Bursens és mts. 2000). Azonban a sóstressz indukálhatja is az OGY szám növekedését. He XJ. és mts. (2005) sóstressznek kitett *Arabidopsis* növényekben az OGY szám növekedését és a FGY hossz csökkenését tapasztalták. A sóstressz által szabályozott NAC2 transzkripciós faktor nagymértékű expressziója az OGY képződés megnövekedését okozza a gyökérhossz megváltozása nélkül (He XJ. és mts. 2005).

## II.2 A nitrogén-monoxid

### II.2.1. A NO kutatásának története

Az utóbbi időben mind több kutatás alanya a nitrogén-monoxid, mint a növényi, állati és emberi szövetekben előforduló szignalizációs kulcsmolekula. Gyarapszik azon biológiai folyamatok száma, melyek indukcióját vagy szabályozását a NO-nak tulajdonítják. Ezt a molekulát már régóta ismerték a légszennyező NO<sub>x</sub> komplex (NO és nitrogén-dioxid [NO<sub>2</sub>]) komponenseként, ami a Chapman reakcióban képes a sztratosz- és troposzférában található ózont (O<sub>3</sub>) oxigénné (O<sub>2</sub>) alakítani (Howard 1980, Sandermann 2001). 1987-ben Salvador Moncada és munkatársai az EDRF-ként (endothelium-derived relaxing factor) korábban már ismert vegyületről kimutatták, hogy valójában a NO-dal azonos. Ekkortól került számos kutatás középpontjába ez a valóban érdekes, sokrétű funkcióval bíró molekula. 1992-ben a *Science* tudományos folyóirat az „Év Molekulájá”-nak nevezte a NO-ot, ami tovább népszerűsítette azt. Az 1998. évi orvosi és élettani Nobel-díjat Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad kapták, mert felismerték, hogy a NO az élő szervezet alapvető szignálmolekulája.

A növények NO termelésének kutatása viszonylag újkeletű, hiszen először 1975-ben írták le a növények NO kibocsátását (Klepper 1975). Az azóta eltelt három évtizedben az aktív növénybiológiai kutatásoknak köszönhetően a NO szerepét számos élettani folyamatban felismerték, mint például biotikus és abiotikus stresszekre adott válaszreakciókban (Delledonne és mts. 1998, Xing és mts. 2004), növekedési- és fejlődési folyamatokban (Correa-Aragunde és mts. 2004), sejthalál

során (Durner és mts. 1998) valamint öregedési folyamatokban (Leshem és mts. 1998).

Látjuk tehát, hogy az először EDRF-ként azonosított NO valójában egy állatokban és növényekben egyaránt megtalálható multifunkcionális szignálmolekula, mely sokrétű hatását fizikai és kémiai sajátosságainak köszönheti.

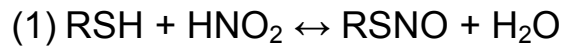
### II.2.2. A NO fizikai-kémiai tulajdonságai

A NO (N=O) egy sok szempontból jellegzetes szabadgyök molekula.  $\pi$  pályáján egy párosítatlan elektront ( $e^-$ ) tartalmaz, vagyis nyílt elektron szerkezettel rendelkezik. Egy  $e^-$  felvételével illetve leadásával egy energetikailag kedvezőbb szerkezetet tud kialakítani, így három formája létezik a biológiai rendszerekben: nitrogén-monoxid gyök ( $\text{NO}^\cdot$ ), nitrozónium kation ( $\text{NO}^+$ ), nitroxil anion ( $\text{NO}^-$ ). Ezek a NO formák gyors redox reakciókban egymásba alakulnak ( $\text{NO}^\cdot + e^- \rightarrow \text{NO}^-$  vagy  $\text{NO}^\cdot \rightarrow \text{NO}^+ + e^-$ ). Szobahőmérsékleten és atmoszférikus nyomáson színtelen, szagtalan gáz, mely vízben kevésbé oldódik. Hidrofób tulajdonsága révén diffúzióval képes áthatolni a biológiai membránokon. Egyéb reaktív szabadgyökökhöz képest hosszú a féléletideje (szövetekben 3-6 másodperc), mely függ saját koncentrációjától: ha koncentrációja kisebb, mint  $1 \mu\text{mol/l}$ , akkor féléletidejének hossza perces, óras nagyságrendű, ha azonban a NO  $1 \mu\text{mol/l}$ -nél nagyobb koncentrációban van jelen a féléletidő másodpercekre rövidül. A féléletidő a célmolekuláinak (hemoproteinek, hidrogén-peroxid, oxigén stb.) koncentrációjától is függ (Stöhr és Ullrich 2002).

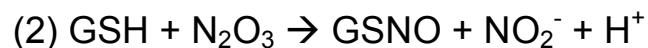
A NO gyorsan reagál molekuláris oxigénnel, aminek az eredménye  $\text{NO}_2$ , s ez vizes közegben gyorsan nitráttá ( $\text{NO}_3^-$ ) és nitritté ( $\text{NO}_2^-$ ) alakul. A NO szuperoxid anionnal ( $\text{O}_2^-$ ) vagy hidrogén-peroxiddal ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) történő reakciója peroxinitrit



(ONOO<sup>-</sup>) keletkezéséhez vezet, ami egy erős, oxidáló molekula. Érdekes módon a növényi sejtek ellenállónak mutatkoznak ezzel az oxidáló hatással szemben (Delledonne és mts. 2001), sőt a peroxinitritnek, mint a NO származékának saját szignalizációs útja is ismeretes, miszerint nitrálni képes fehérjék tirozin aminosavát, így nitrotirozint képez. Kísérletes bizonyíték a reakció *in vivo* megtörténte, hogy a fehérje tirozin nitráció megnövekedését mutatták ki só stressz alatt olíva növény levelében (Valderrama és mts. 2007). Ezenkívül a NO a reverzibilis, S-nitrozilációs reakció során kölcsönhat fehérjék cisztein aminosavának tiol (SH) csoportjával, és S-nitrozotiol (RSNO) csoport keletkezik (1).



Emellett a NO alacsony molekulásúlyú tiolokkal (pl.: glutation, GSH) való reakciója is ismert, melynek eredménye S-nitrozilált glutation (GSNO) keletkezése. Alacsony pH-n (pH<3.5) a nitroziláló molekula a NO<sup>+</sup>, míg magasabb pH tartományban a dinitrogén-trioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), mivel ebben az esetben a nitrozónium kation felszabadulása gátolt (2).



Az S-nitrozotiol vegyületek magánál a NO-nál stabilabbak, féléletidejük vizes oldatban több nap is lehet. Képesek NO-ot felszabadítani magukból, az S – N kötés termo-, vagy fotolízisével, illetve átmeneti fém ionok (Fe<sup>2+</sup> vagy Cu<sup>+</sup>) redukciójával, ezért az S-nitrozotiolok a NO mobil raktárainak tekinthetők, valamint NO- donorként alkalmazhatók. Az S-nitrozotiolok mellett a NO fontos raktárai a sejtekben, szövetekben jelenlévő ún. dinitrozil-vas komplexek (dinitrosyl-iron complex, DNIC). Az S-nitrozotiolokhoz hasonlóan stabilak, így NO transzportot is megvalósíthatnak a növényekben (Graziano és Lamattina 2007).

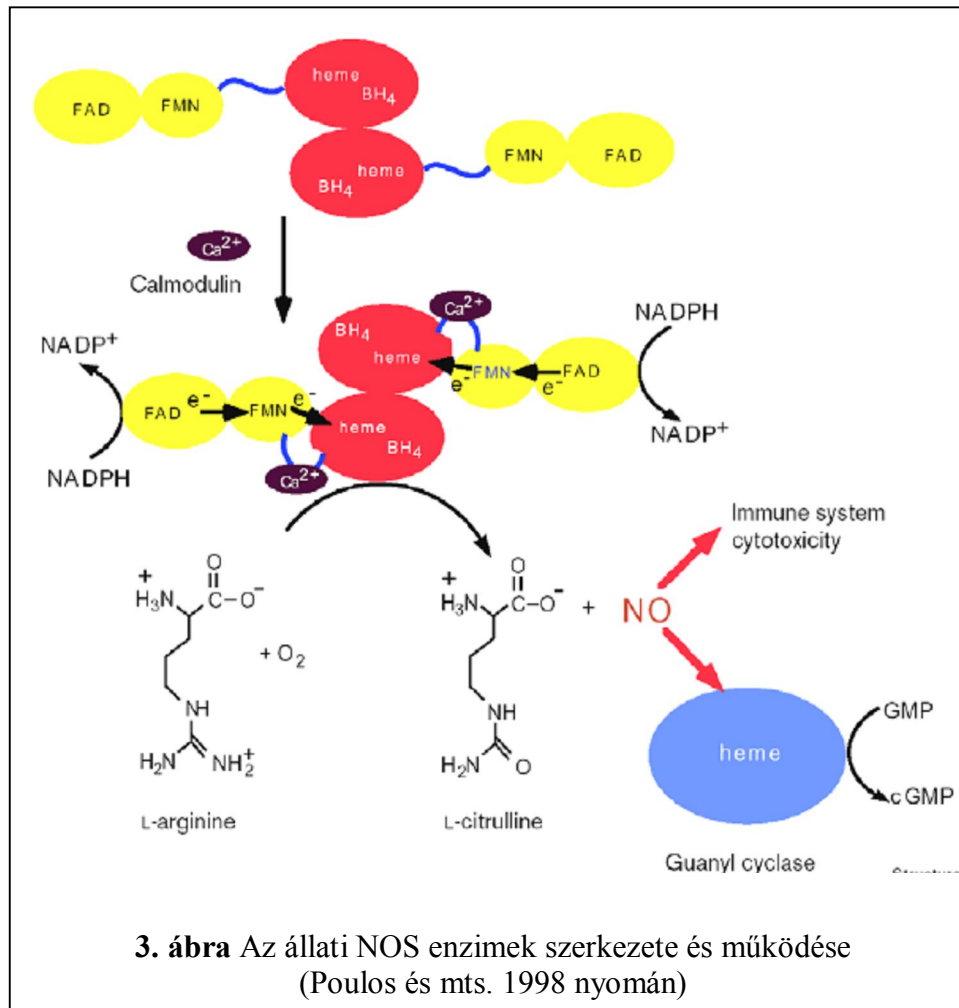
### II.2.3. A nitrogén-monoxid képződése az élőlényekben

#### II.2.3.1. A NO szintézise állati szövetekben

A NO állatokban elsősorban enzimatis úton keletkezik a nitrogén-monoxid szintáz (EC 1.14.13.39) működése révén. Ezek az enzimek evolúciósan konzervált citoszolikus vagy membránkötött izoenzimek, melyek az L-arginin 5 elektronos oxidációját katalizálják N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginin köztiterméken keresztül L-citrullinná és NO-dá oxigén és nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) jelenlétében (Nappi és mts. 2000) Az enzim 3 izoformáját írták le, melyek különböző szövetekben fejeződnek ki. Az endoteliális (eNOS), neuronális (nNOS) NOS enzimek konstitutívak, míg az iNOS (indukálható NOS) gén expressziója gyulladásos faktorok és citokinek jelenlétében a makrofágokban fokozódik (Nathan és Xie 1994). A NOS enzimek szerkezetére jellemző, hogy homodimerek, és mindkét alegységüknek két doménje van: az N-terminális oxigenáz és a C-terminális reduktáz. Az előbbi domén egy P450 típusú hem centrumot és egy tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)-kötő elemet, az utóbbi pedig flavin-adenin-dinukleotid (FAD)-, flavin-adenin-mononukleotid (FMN)- és NADPH-kötő helyeket tartalmaz, míg a két domén között kalmodulin-kötő hely található. Ebből következik, hogy az enzim szabályozó faktora a kalcium (Ca<sup>2+</sup>)-kalmodulin. Az enzim kutatásban használt gátlószerei szubsztrátjának, az L-argininnek analógjai (pl.: L-NMMA) Az enzim szerkezete és az általa katalizált reakció az 3. ábrán látható.

Olyan betegségekben, melyek során acidózis és hipoxia történik (pl.: ischémia vagy shock) a NO NOS-független szintézisúton is képződhet. Ez esetben nitrit

redukciója történik meg mioglobin, anoxiás mitokondrium, hemoglobin vagy xantin-oxidoreduktáz (XOR) által.



### II.2.3.2. A NO keletkezésének lehetséges útvjai növényekben

A növényi NO keletkezése az állatokénál lényegesen komplexebb folyamatok összessége. Míg az állati szövetekben a NO szintézise főként enzimátikus úton történik, addig növényekben - amellet, hogy több enzim részvételével is számolnunk kell- számos nem enzimaktivitáshoz kötött forrás is lehetséges.

### II.2.3.2.1. A NO keletkezésének nem enzimatis útjai növényekben

Elsőként a nem enzimatis NO keletkezés két lehetőségét írták le, vagyis a nitrogén dioxid fény irányította átalakulását NO-dá, mely folyamatot a karotinoidek katalizálnak. A reakció a NO<sub>2</sub> káros hatásai (membránlipidek oxidációja, DNS direkt mutációja, egyes szálú DNS törések stb.) elleni védelem egyik eleme (Cooney és mts. 1994). A NO keletkezés másik, enzimaktivitás nélküli útja a nitrit spontán kémiai redukciója NO-dá savas pH-n (Klepper 1991). Ezt a reakciót árpa aleuron sejtek apoplastjában figyelték meg (Bethke és mts. 2004). Ezen kívül a NO származhat szimbiota mikroorganizmusok tevékenysége révén, nitrifikációs és denitrifikációs folyamatokból.

### II.2.3.2.2. A NO enzimatis szintézise növényekben

Az irodalomban jelenleg nincs egységes álláspont az állatihoz hasonló NOS enzim(ek) létezésével kapcsolatban. A vita kiindulópontja Guo és mts. (2003) felfedezése volt, akik *Helix pomatia* szekvencia homológot használva azonosították a NOS-t kódoló génszekvenciát *Arabidopsis*-ban, amit AtNOS1-nek (*Arabidopsis thaliana* nitric oxide synthase 1) nevezték el. A gén terméke képes volt az L-arginin→L-citrullin reakcióra. Létrehozták a T-DNS inszerció *Atnos1* mutánst, mely csökkent NO szintézist mutatott ABA-kezelt zárósejtekben és gyökerekben. Később más kutatócsoportok nem tudták reprodukálni az eredményeket, így kérdésessé vált, hogy a szekvencia valóban NOS-t kódol-e. A felmerülő kritikákra (Zemojtel és mts. 2006), Crawford és csoportja azzal válaszolt, hogy átnevezték a szekvenciát AtNOA1-re (*Arabidopsis thaliana* nitric oxide associated 1) és kijelentették, hogy bár az

---

AtNOS1 gén terméke nem NOS, mégis fontos szerepe van a NO szintézisben (Crawford és mts. 2006). Ezek után az állati NOS enzim különböző gátlószereit (pl. L-NMMA) használva több növényfajban a NO produkció és/vagy hatás elmaradását tapasztalták, és L-arginin-függő vagy L-NMMA-szenzitív NO szintézisről beszélnek (Zhao és mts. 2007). Lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódási ciklusba lépéséhez egy LNMMA-szenzitív enzim, feltehetően a lucerna nitrogén-monoxid szintáz aktivitására van szükség (Fehér 2006). Liu és mts. (2007) a közelmúltban egy NOS-szerű fehérjéhez hasonló proteint azonosítottak *Vicia faba* zárósejtjeiben. Legújabb eredmények azonban arra mutatnak rá, hogy az AtNOS1 nem képes az arginin kötésére és oxidálására, vagyis nincs közvetlen szerepe a NO szintézisben. Kimutatták, hogy az AtNOS1/AtNOA1 fehérje egy ciklikus GTPáz, ami képes a mitokondriális riboszóma kötésére és stabilitásának kialakítására. Az *Atnoa1* mutánsban a riboszóma/RNS összerendeződés hibás, ami a reaktív oxigénformák (ROS) megnövekedett produkcióját okozza. A  $O_2^-$  és különböző lipid gyökök gyorsan reagálnak a NO-dal, így lehetséges, hogy a mutánsban csökkent NO szint detektálható (Moreau és mts. 2008). A különböző módszerekkel meghatározott NOS aktivitásokat az 1. táblázat foglalja össze.

Faj/Szövet- vagy sejttípus	Módszer	Referencia
<i>Pisum sativum</i> /Levél	NOS inhibitorokra érzékeny NO gáz emisszió	Leshem és Harmathy (1996)
<i>Pisum sativum</i> /Levél peroxiszóma	Arginin-citrullin módszer elektron paramágneses rezonancia (EPR)	Barroso és mts. (1999) Corpas és mts. (2004)
<i>Lupinus albus</i> /Gyökér és nódusz	Arginin-citrullin módszer	Cueto és mts. (1996)
<i>Mucuna hassjoo</i>	Arginin-citrullin módszer	Ninnemann és Maier (1996)
<i>Glycine max</i> / <i>Ps. syringae</i> -fertőzött sejtszuspenzió	NOS inhibitorokra érzékeny NO produkció	Delledonne és mts. (1998)
<i>Nicotiana tabacum</i> /TMV-fertőzött levél	Arginin-citrullin módszer	Durner és mts. (1998)
<i>Glycine max</i> /embrionális axis	NADPH-diaforáz aktivitás	Caro és Puntarulo (1999)
<i>Zea mays</i> /gyökér csúcs és fiatal levél	Arginin-citrullin módszer	Ribeiro és mts. (1999)
<i>Taxus brevifolia</i> /kallusz	NOS inhibitorokra érzékeny NO produkció	Pedroso és mts. (2000)
<i>Nicotiana tabacum</i> /levél epidermisz sejtek	NOS inhibitorokra érzékeny NO produkció	Foissner és mts. (2000)
<i>Nicotiana tabacum</i> /sejtkultúra	NOS inhibitorokra érzékeny NO produkció	Tun és mts. (2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i> /sejtkultúra		
<i>Petrosilenum crispum</i> /sejtkultúra		
<i>Glycine max</i> /kotiledon	Arginin-citrullin módszer	Modolo és mts. (2002)
<i>Sorghum bicolor</i> /mag	NADPH-diaforáz aktivitás EPR	Simontacchi és mts. (2004)

**1.táblázat** Különböző növényfajokban detektált NOS aktivitások (del Rio és mts. 2004 nyomán).

A NO bioszintézisért felelős egy, a nitrát metabolizmusban szerepet játszó enzim is, a nitrát reduktáz (EC 1.6.6.1). A NR egy 200 kDa-os, NADPH-függő, cianid érzékeny enzim, ami 6,75-ös pH optimummal rendelkezik. Elsődleges feladata a nitrát nitritté redukálása egy NADPH-függő reakcióban, emellett azonban képes a nitritből NO-t és peroxinitritet fejleszteni szintén NADPH segítségével (Yamasaki és Sakihama 2000). NR-deficiens szója mutánst használva Dean és Harper (1986) azt találta, hogy ezen növények ellentétben a vad típusal nem fejlesztenek NO-t. *Arabidopsis*-ban 2 gén kódolja az enzimet: NIA1 és NIA2. Ezen gének termékeinek hasonló az aminosav sorrendje, de különböző mértékű a N metabolizmusban betöltött szerepük. Míg a NIA1 a nitrogén asszimiláció 20 %-áért, a NIA2 annak 80%-áért felelős. A *nia1*, *nia2* mutáns *Arabidopsis* mindkét génben deficiens, így a vad típusú növények NR aktivitásának csupán 1%-át mutatja (Wilkinson és Crawford 1993).

Ezen növények zárósejtjeiben a vad típushoz képest csökkent NO produkciót detektáltak ABA kezelés hatására, ami a NR enzim NO szintézisben betöltött szerepét bizonyítja (Desikan és mts. 2002). Modolo és mts. (2006) azonban a *nial*, *nial2* dupla mutánsban megfigyelt csökkent NO szintet azzal magyarázták, hogy a gátolt N metabolizmusból eredő redukált arginin tartalom miatt a NOS-kapcsolt szintézisút nem megy végbe. Ezt a kérdést szimpla mutánsok felhasználásával tisztázták. A *nial* mutáns segítségével- melyben a N metabolizmus 80%-os hatékonysággal végbemegy - bizonyították, hogy az ABA-indukált NO forrása a NIA1 gén terméke (Bright és mts. 2006).

Magasabbrendű növényekben a NR homodimerként fordul elő, alegységei 100-115 kDa-osak. Egyes növényekben tetramer enzimszerkezet is előfordul. A spinót nitrát reduktáza 926 aminosavból áll, a többi növényé valamivel kisebb, pl.: a babé 881 AS (Hoff és mts. 1994). Az enzim N-terminálisa egy molibdén kofaktort (MoCo) kötő domént tartalmaz, ami az emlősök szulfit oxidázával homológ szerkezetű. A középső régió a haem-kötő domén, ami a citokróm *b<sub>5</sub>*-tel mutat hasonlóságot. A C-terminálison található a NADPH/FAD-kötő régió, ami a citokróm *b<sub>5</sub>* reduktázzal homológ. A nitrát reduktáz gének expressziója fényfüggő. A fény nemcsak a gének transzkripcióját indukálja, hanem hatással van magának a fehérjének a képződésére is a transláció szabályozásán keresztül (Desikan és mts. 2002). A NR enzim kísérleti körülmények között wolframáttal vagy okadainsavval gátolható. A wolframát beköt az enzim MoCo-kötő helyére, így egy inaktív „wolframát-protein komplex” keletkezik (Notton és Hewitt 1971). Habár az enzim aktivitása csökken, az mRNA szintek és a fehérje mennyisége nő wolframát kezelés hatására (Deng és mts. 1989). Desikan és mts. (2002) azt találták, hogy az ABA-indukált NO szintézis és az ezzel együttjáró sztómazáródás is wolframáttal gátolható folyamatok.

A NO bioszintézisben szereplő enzimek közül a harmadik az ún. nitrit:NO reduktáz (Ni:NOR), mely a gyökérben működik, a sejtek plazmamembránjához (PM) kötve, és a PM-kötött NR által felszabadított nitritet redukálja NO-dá *in vivo* (Stöhr és mts. 2001). Az enzim NAD helyett *citokróm c-t* használ elektron donorként *in vitro*. Az *in vivo* elektron donor mibenléte jelenleg még kérdéses. A reduktáz aktivitását az oxigén jelenléte reverzibilisen gátolja (Stöhr és Stremlau 2006).

A xantin-oxidoreduktáz (EC 1.1.3.22) egy komplex flavoprotein, mely a nitrát reduktázhoz hasonlóan molibdén kofaktort igényel a működéséhez. NADPH vagy xantin jelenlétében a peroxiszómában képes a nitrit redukciójára, ami NO keletkezéséhez vezet. A reakció az enzim molibdén-kötő helyén megy végbe. Az oxigén tenziójának növekedésével a NO produkció csökken, ami a NO XOR által generált szuperoxiddal történő reakciójának következménye (Godber és mts. 2000). Planchet és Kaiser (2006) rekombináns XOR-ral végzett kísérlete arra enged következtetni, hogy ennek az enzimnek elenyésző a szerepe a növényi NO szintézisében.

#### **II.2.4. A NO vizsgálatának lehetőségei növényekben**

A NO detektálására számos direkt és indirekt módszert fejlesztettek ki az utóbbi években.

A közvetlen meghatározási módszerek közül az egyik legérzékenyebb és legmegbízhatóbb a NO-szenzitív elektród alkalmazása. A NO-ról egy elektron átadása történik meg az anódra, így  $\text{NO}^+$  keletkezik, mely végül nitritté alakul. A NO oxidációs rátája arányos annak koncentrációjával. Bár a szenzor jó detektálási határral rendelkezik (10 nM), a módszer csupán szűk határok között használható, nem reprodukálható és hőmérsékletfüggő. További lehetőség a NO detektálására a gáz



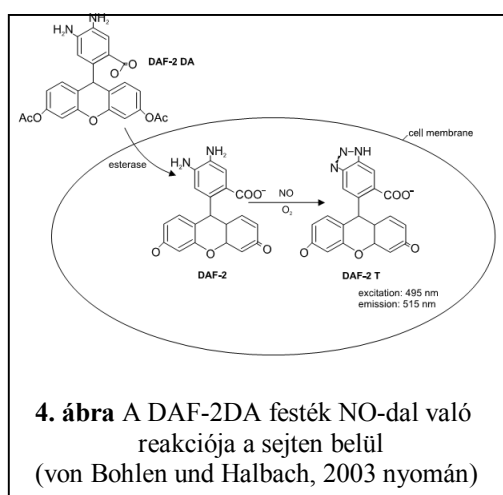
fázisú kemilumineszcencia, mely a legnagyobb érzékenységgel és szelektivitással mutatja ki a NO-ot. Hátránya a módszernek, hogy rendkívül műszerigényes és költséges. Ezeken kívül a növényi szövetek NO emissziója meghatározható gáz kromatográfiával és tömegspektrometriával (Dean és Harper 1986; Magalhaes és mts. 2000) valamint lézer foto-akusztikus spektroszkópiával (Leshem és Pinchasov 2000).

Az indirekt eljárások között tartjuk számon az ún. „hemoglobin-módszert”, melynek lényege, hogy az oxihemoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) a NO-dal való reakciója során methemoglobinná (MetHb) oxidálódik, és eme oxidált forma spektruma felvehető (Murphy és Noack 1994). Ezt a meghatározási módot azonban fenntartásokkal kell kezelni, mert az oxihemoglobin reaktív oxigénformákkal és nitrittel is képes reakcióba lépni. Gyakran alkalmazott eljárás még a nitritnek, mint a NO reakciótermékének kimutatása az ún. Griess-reakcióban (Devignat 1952). A növényi sejtek magas nitrit tartalma miatt a módszer megbízhatósága azonban kérdéses.

A NO meghatározásával kapcsolatos problémákra megoldást jelentett egy NO szenzitív fluoreszcens festék család, a diaminofluoreszcein fluorofórok (DAF) felfedezése (Kojima és mts. 1998). A festéket növényi szövetekben először Pedroso és mts. (2000) alkalmazták. A festék diacetát formában (DAF-2DA) átjut a membránon, majd intracelluláris észterázok lehasítják az acetil csoportokat. Az így keletkezett DAF-2 molekula oxigén jelenlétében reagál a  $\text{N}_2\text{O}_3$ -dal, ami egy fluoreszcens triazol termék, a DAF-2T keletkezéséhez vezet (4. ábra). Vagyis a fluorofór elsősorban a NO spontán oxidációs termékének ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) a szintjét méri, azaz bár a DAF-2T fluoreszcencia nagymértékben függ a NO koncentrációjától, az oxigén jelenléte is alapvető fontosságú a reakció kialakulásához, így ez a NO detektálási mód nem alkalmazható anoxiás körülmények között (Planchet és Kaiser 2006). Néhány egyéb kritika is felmerült a festék érzékenységgel kapcsolatban. Egyes kutatások szerint a

festék NO-hoz való affinitása kalciumion jelenlétében nő (Broillet és mts. 2001). Suzuki és mts. (2002) azonban kísérleteikkel megcáfolták a kérdést. Azt találták, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  nem befolyásolja a DAF-2T fluoreszcenciáját, viszont a NO felszabadulását a donorokból igen. A másik kérdést Stöhr és Stremlau (2006) vetették fel, miszerint a szövetekben jelenlévő aszkorbinsav és dehidroaszkorbinsav megnövekedett DAF fluoreszcenciát eredményezhet. Saját kísérletünkben - amely során 1 mM aszkorbinsavval kezeltünk borsó gyökereket - nem tapasztaltuk a DAF fluoreszcencia növekedését a kontrollhoz képest (adatok nincsenek feltüntetve). A festék érzékenységét alátámaszthatjuk a negatív kontrollként használható 4-aminofluorescein diacetát (4AF-DA) alkalmazásával. Ez a festékmolekula csupán egy aminocsoportot tartalmaz, így képtelen a NO kötésére. A fent említett DAF-2DA-n kívül rendelkezésre áll a 4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorofluorescein (DAF-FM) elnevezésű NO-szenzitív festék, mely pH 5,5 és 12 között stabil. Emellett a festék fotostabil és detektálási határa 3 nM.

A felmerülő kritikák ellenére a NO fluoreszcens kimutatása a különböző festékek segítségével széles körben alkalmazott eljárás növényi szövetekben, hiszen lehetővé teszi a NO felszabadulás *in situ* és *in vivo* tanulmányozását.



### II.2.4.1. NO donorok és scavengerek

A biológiai minták NO gázzal való kezelése technikailag nehézkes. Ehelyett rendelkezésre állnak olyan vegyületek (ún. NO donorok), melyek képesek NO-ot felszabadítani enzimatis vagy nem enzimatis úton. A donorokkal való kezelés egyszerű és különböző koncentrációkban alkalmazható. A NO felszabadulás mértéke a különböző donorokból eltérő lehet a különböző kísérleti körülmények között. A sokféle kifejlesztett NO donor közül a nátrium-nitroprussid (sodium nitroprusside, SNP) a legszélesebb körben alkalmazott vegyület, mely egy  $\text{NO}^+$ -ot generáló vas-nitrozil komplex (Stamler és mts. 1992). Az SNP fény hatására bomlásra megy keresztül, és ez a folyamat alapvető fontosságú a NO képződésében. A reakcióban 1:1 moláris arányban keletkezik NO és egy melléktermék, a pentaciano-ferrát. Ebből adódik, hogy nagy koncentrációban ( $> 1 \text{ mM}$ ) alkalmazva az SNP-t számolnunk kell a toxikus cianid felszabadulásával. Emellett problémát jelent az is, hogy az SNP-ből felszabaduló nitrozónium kation igen reaktív szabadgyök, így gyorsan reagál puffer komponensekkel, vagy akár vízzel is (Koppenol 1996). Ezért nehéz megbecsülni oldatokban az SNP-ből felszabaduló NO valós koncentrációját. Más NO donorok is rendelkezésre állnak, mint például a GSNO, az S-nitroso-N-acetilpenicillamin (SNAP), vagy az l-hidroxi-2-oxo-3,3-bis(2-aminoetil)-1-triazén (NOC-18). A GSNO és a SNAP NO gyököt szabadít fel vizes oldatban, de különbség a két donor molekula között, hogy míg a GSNO stabilabb (órák alatt bomlik el), a SNAP tranziens módon szabadítja fel a NO-ot. A donorokkal való kezelés hátulütője, hogy nem lehet pontosan meghatározni, hogy az ezekből felszabaduló NO észlelt fiziológiai hatása hűen tükrözi-e az endogén NO hatását. Annak érdekében, hogy eldönthessük, vajon a donorok hatása megfelel-e a NO hatásának célszerű kimutatni, hogy a hatás NO

gyökfogó (ún. scavenger) alkalmazásával gátolható-e. Általánosan használt gyökfogó vegyület a 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid (cPTIO). A vízdékony cPTIO egy oxidatív transzformációs folyamat során gyorsan reagál a NO-dal, ami imidazolin-oxil (c-PTI) és szabad NO<sub>2</sub> gyök keletkezéséhez vezet (Pfeiffer és mts. 1997).

### **II.2.5. A NO szignalizációja állatokban és a növényi rendszerekre vonatkozó eddigi ismeretek**

A NO kutatása emlősökben jóval korábban kezdődött, mint a növényi rendszerekben. Ebből adódik, hogy az állati NO kutatása során kapott eredmények inspirálták a növényi kísérleteket. Példaként említhető, hogy az állati NOS enzimek gátlószereit széles körben alkalmazzák növényekben is. Éppen ezért lényeges, hogy betekintést nyerjünk a NO szignáltranszdukciós utáiba állati rendszerekben.

A nitrogén-monoxid jelátvitelének általános komponensei közé tartozik maga a jelmolekula vagy ligand (NO), a jelfelfogó receptor (pl.: guanilát cikláz, GC), másodlagos hírvivő (pl.: ciklikus guanozin-monofoszfát, cGMP) valamint a további „downstream” elemek (pl.: protein kinázok). A NO jelátviteli folyamatokat állatokban hagyományosan két útra oszthatjuk fel: cGMP-függő és cGMP-független szignalizáció.

Az állati NO receptorokról kiderült, hogy azok hem alapú szenzor fehérjék, melyek hem-kötő szabályozó és jeltovábbító domént tartalmaznak (Gilles-Gonzales és Gonzales 2005). Jelenleg ezen receptorok 50 tagja ismert, és hem-kötő doménjük alapján négy csoportba sorolhatóak: hem-kötő PAS („Per-Arnt-Sim”) doménnel,

globin-kapcsolt szenzorral („globin coupled sensor”, GCS), CooA-val („CO-sensing transcription activator”) és hem-NO-kötő („haem-NO-binding”, HNOB) alegységgel rendelkező receptorok. Az ezekhez kapcsolódó transzmitterek lehetnek hisztidin protein kinázok (PK), ciklikus nukleotid foszfodiészterázok, hélix-loop-hélix, vagy hélix-turn-hélix dezoxiribonukleinsav (DNS)-kötő motívummal rendelkező transzkripció faktorok.

### II.2.5.1. cGMP-függő NO jelátvitel

A ciklázokra vonatkozó ismereteink állati rendszerekre vonatkoznak, hiszen növényekben csak 2003-ban azonosítottak GC enzimet (Ludidi és Gehring 2003). Az állati guanilát cikláz enzimek (EC 4.6.1.2) közül a citoszólikus, „szolubilis” guanilát cikláz (sGC) találták NO által aktiválhatónak. A sGC heterodimer ( $\alpha$  és  $\beta$  alegységek) hem enzimekből áll. A NO az enzim hem részében lévő vasával reagálva, a vas-hisztidin kötés felbomlását okozza, ami az enzimfehérje konformációs változásához és aktivációjához vezet (Marti és mts. 2005). Az aktív enzim a guanozin-trifoszfát (GTP) átalakulását katalizálja cGMP-tá. Az enzim deaktiválódása jelenleg még kérdéses, a kutatók két lehetőséget tartanak szem előtt. Az első szerint a NO egyszerű disszociációja révén szűnik meg az enzim aktivált állapota. A másik magyarázat szerint, valamely külső faktor (pl.: glutation) képes megbontani a vas-NO kötetést az enzimben. A GC enzim  $\beta$ -alegysége két globuláris domént tartalmaz; ezek a HNOB és a HNOBA (HNOB-associated). Érdekes megállapítás, hogy a hemoglobin porfirin gyűrűs szerkezete azonos a GC enzim  $\beta$ -alegységével. A hemoglobinnal való szerkezeti azonosság nem eredményez működésbeli azonosságot, mivel a GC enzim csak NO kötésére képes, az oxigént nem köti. További érdekesség, hogy a HNOB és

HNOBA alegységek a GC enzimen funkcionálisan hasonlóak a citokinin receptorok CACHE és CHASE doménjeivel.

A cGMP-függő jelátvitel „downstream” elemei állati rendszerekben lehetnek cGMP-függő PK-ok, ciklikus nukleotid kapuzó ioncsatornák, foszfodiészterázok.

Növényekben is ismertek olyan jelátviteli folyamatok, melyekben bizonyított a ciklikus nukleotidok részvétele (pl.: fitokróm jelátvitel, sztómazáródás), valamint cGMP által aktivált kinázt is azonosítottak *Pharbitis nil* növényekben (Szmidt-Jaworska és mts. 2003). A cGMP növényi NO jelátvitelben betöltött szerepéről az irodalomban több eredmény is rendelkezésre áll. Többek között az ABA-indukált sztómazáródás, a járulékos gyökérfejlődés, valamint a védekezési reakciók során a NO indukálja a cGMP képződését (Neill és mts. 2008, Pagnussat és mts. 2003, Durner és mts. 1998).

#### II.2.5.2. cGMP-független NO jelátvitel

A sGC-n kívül még jónéhány enzim képes betölteni a NO receptorának szerepét az állatokban. Az egyik ismert NO receptor a mitokondriális légzési lánc terminális  $e^-$  akceptora, a *citokróm c oxidáz* (E.C. 1.9.3.1) (Lawson és mts. 2000). Az enzim 3 fémion komplexet tartalmaz; egy réz-réz dimert, egy hem A-t és egy binukleáris hem-réz központot (Yoshikawa és mts. 2000). Ha a NO a redukált állapotú citokróm c oxidáz binukleáris hem-réz központjához kapcsolódik, akkor az oxigén kötése kompetitíve gátlódik. A NO az oxidált állapotú citokróm c oxidázhoz is képes kapcsolódni, ekkor a kötött oxigénnel reagál és nitrát keletkezik, az enzim pedig inaktiválódik (Cooper 2002). Mindkét folyamat eredménye a sejtlégzés gátlása. A növényekben található egy másik terminális  $e^-$  akceptor is, ez az alternatív oxidáz (AOX). Kísérletesen igazolták, hogy ezt az enzimet nem gátolja a NO, sőt

*Arabidopsis*-ban a NO megnövelte az AOX transzkripcióját és az enzim aktivitását (Huang és mts. 2002).

A NO receptoraként funkcionálhat a *metallothionein* (MT) is. Ez egy ciszteinben gazdag fehérje, mely nagy affinitással köt kétértékű kationokat (főleg cinket) (Cobbett és Goldsbrough 2002). A NO a fehérjéhez kapcsolódva indukálja a cink felszabadulását, ami jelátviteli utak aktiválódásához vezet. Az állati szervezetben a MT citoprotektív és antioxidáns hatású, a növényekben pedig a fémion homeosztázis szabályozásában és a tolerancia folyamatok kialakításában játszik szerepet. Ez a szignalizációs folyamat szép példája annak, hogy egy redox szenzitív molekula (NO) egy redox inszenzitív molekula (cink) homeosztázisát szabályozni képes.

A NO receptorai között kell megemlíteni az *akonitáz* enzimet (EC 4.2.1.3) is, mely a Krebs-ciklusban a citrát-izocitrát izomerációt katalizálja. Az enzim ( $\text{Fe}_4\text{-S}_4$ )<sup>2+</sup> csoportot tartalmaz, ez a NO kötésének a helye. Az enzim a NO-dal való reakciója után konformációváltozást szenved és ún. „iron regulatory protein 1”-gyé (IRP-1) alakul. Ez az enzimforma képes a ferritin és a transferrin messenger ribonukleinsavához (mRNS) kötődni és gátolni, illetve elősegíteni a fehérjék translációját, ezúton szabályozni a vas homeosztázist. Ezt a folyamatot növényekben is megtalálták. A dohány akonitáz enzime NO kezeléssel gátolható (Navarre és mts. 2000, Murgia és mts. 2002).

A cGMP-független NO jelátvitel fontos másodlagos hírvivője a  $\text{Ca}^{2+}$ . Bár viszonylag kevés ismeretünk van a NO szignalizációját illetően, mégis számos adat áll rendelkezésünkre a  $\text{Ca}^{2+}$  szerepéről ezen folyamatokban. Bebizonyosodott, hogy NO szerepel dohány sejtekben a hiperozmotikus közeg vagy a kriptogein elicitor által kiváltott intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedésében (Gould és mts. 2003;

Lamotte és mts. 2004). Emellett azt is felismerték, hogy a NO kezelés  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedést váltott ki lóbab és dohány zárósejtekben (Garcia-Mata és mts. 2003, Lamotte és mts. 2004). Feltehetően a NO cADPR-, cGMP- valamint foszforiláció-függő folyamatok révén indukálja a  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedését a sejtekben. Ezek alapján úgy vélhetjük, hogy a NO egy  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló intracelluláris vegyület a növényi sejtekben (Courtois és mts. 2008).

A NO jelátvitel jelentős hírvivő molekulái a *mitogén-aktivált protein kinázok* (MAPK) is, melyek jelátviteli folyamatok fontos szabályozói. Szerepelnek többek között abiotikus és biotikus stresszekben, mediálják a sejtciklust és az egyedfejlődésben is meghatározó funkcióval bírnak. NO kezelést követően dohányban a MAPK kaskád aktivációját figyelték meg (Clarke és mts. 2000, Capone és mts. 2004, Kumar és Klessig 2000). Uborka járulékos gyökérfejlődése során szintén NO-által kiváltott MAPK kaskád aktivációt írtak le (Pagnussat és mts. 2004).

Az **S-nitroziláció** a NO reverzibilis reakciója fehérjék cisztein aminosavának tiol csoportjával, melynek eredményeként RSNO-csoport keletkezik, vagy átmeneti fémekkel, ami fém-nitrozilok képződéséhez vezet. Annak ellenére, hogy az S-nitroziláció egy kémiai reakció, nagyfokú specifikusságot mutat, hiszen nem minden cisztein tartalmú fehérje nitrozilálódik. A szubcelluláris lokalizáció és a kémiai környezet (a jelenlévő NO koncentrációja) szabja meg, hogy mely fehérje lép nitrozilációs reakcióba. A reakció specifikusságát támasztja alá az is, hogy egy nitrozilálódó fehérje nem minden cisztein SH-csoportja nitrozilálódik (pl.: a rianodin receptor 84 szabad SH-csoportjából csak 12 nitrozilálódik) (Xu és mts. 1998). A reakció során bizonyos enzimek illetve transzkripciós faktorok poszttranszlációs módosuláson mennek keresztül. Állatokban 115 db SNO-kötés kialakítására alkalmas fehérjét azonosítottak (Stamler és mts. 2001). Növényekben is számos fehérjét



azonosítottak biotin jelzéses módszerrel, melyek az S-nitroziláció lehetséges célpontjai (Lindermayr és mts. 2005). Ezen fehérjék között megkülönböztettek stressz-kapcsolt fehérjéket (pl.: glutation-S-transzferáz, Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz), redox fehérjéket (pl.: glutation-peroxidáz), szignalizációs/szabályozó fehérjéket (pl.: elongációs faktor 2), citoszkeleton fehérjéket (pl.: tubulin, aktin, annexin), metabolikus fehérjéket (pl.: S-adenozil-metionin szintetáz, ATP szintáz) illetve fotoszintézisben szereplő fehérjéket (pl.: Rubisco, PSII D2 fehérje). Valderrama és mts. (2007) pedig az S-nitrozotiolok mennyiségének növekedését találták sóstressz során *Olea europea* levelében, ami rávilágít ezen NO-származékok szerepére stressz körülmények között. A NO az előbb tárgyalt reakció során kölcsönhathat kis molekulású tiollokkal, mint amilyen a glutation is. A reakció végterméke az S-nitrozilált glutation, ami a NO mobil raktárának tekinthető és NO donorként is alkalmazható (lásd 2.2 fejezet). Ezen NO-származék (valamint az S-nitrozilált fehérjék) mennyiségét a sejtekben a GSNO reduktáz (GSNOR) szabályozza, mely állati rendszerekben növeli a nitrozatív stresszel szembeni rezisztenciát, növényekben pedig a betegség-ellenállóságban szerepel (Feechan és mts. 2005, Rustérucci és mts. 2007). Az enzim aktivitása és az azt kódoló gén expressziója csökkent Cd-stressz során borsóban (Barroso és mts. 2006). Különböző folyamatok biztosítják a nitrozilációs reakció reverzibilis jellegét. Az SNO kötés felbomlása történhet inorganikus vagy organikus módon. Előbbi folyamatban a réz, higany vagy az aszkorbinsav okozhatja a kötés felbomlását. Utóbbi folyamatban a SNO kötés enzimkatalízis (pl.: tioredoxin rendszer, glutation-peroxidáz) révén bomlik fel.

A NO módosíthatja egyes fehérjék aktivitását az ún. **tirozin nitrációs** reakción keresztül is, melynek során a célfehérje tirozin aminosaván 3-nitrotirozin képződik. A reakció specifikus, hiszen nem minden fehérje és nem minden tirozin aminosav képes

nitrálódni (Souza és mts. 1999). A NO hatása ebben az esetben közvetett, hiszen a reakciót direkt úton a peroxinitrit mediálja *in vivo*. A reakció jelentőségére számos bizonyíték akad, mint például a növényi  $\alpha$ -tubulin nitrációja (Blume és mts. 2005) vagy sóstressz hatására megnövekvő tirozin nitráció olíva növényben (Valderrama és mts. 2007).

A legújabb eredmények szerint kapcsolat van a NO szignalizációja és a **foszfatidsavon** (phosphatidic acid, PA) keresztüli jelátviteli utak között. A xilanáz (gomba elicitor) NO-függő foszfatidsav felszabadulást okozott paradicsomban (Laxalt és mts. 2007). Azt is felismerték, hogy ebben a jelátviteli útban a NO a foszfolipáz C (PLC) enzim aktiválásán keresztül indukálja a PA felhalmozódását, míg a foszfolipáz D (PLD) enzim működése ebben a rendszerben NO-függetlennek bizonyult. Uborkában az IAA által indukált járulékos gyökérfejlődés során a NO szintén PA akkumuláción keresztül hat. Ez esetben a PA forrása a PLD enzim, mely a foszfatidilkolint hasítja inozitol trifoszfátra ( $IP_3$ ) és foszfatidsavra (Lanteri és mts. 2008). Az is kiderült, hogy a sztómazáródás folyamatában a NO szintén a foszfatidsav jelátvitelen keresztül hat. Ebben az esetben mind a PLC, mind a PLD enzim aktiválódása megtörténik (Distéfano és mts. 2008).

### **II.2.6. A NO fiziológiai szerepei növényekben**

Az elmúlt három évtizedben végzett aktív kutatásnak köszönhetően a NO szerepét számos fiziológiai folyamatban igazolták. Jelenleg úgy tűnik, hogy a NO sokkal inkább tekinthető általános szignálmolekulának, mintsem bizonyos folyamatok specifikus résztvevőjének. Szerepe rendkívül sokrétű, hiszen részt vesz növekedési- és

fejlődési folyamatokban, kölcsönhat klasszikus növényi hormonokkal, valamint szerepel különböző abiotikus és biotikus stresszek során.

### II.2.6.1. A NO szerepe a növények növekedésében és fejlődésében

Anderson és Mansfeld már 1979-ben leírták, hogy a NO növekedésére gyakorolt hatása koncentrációfüggő, ugyanis nagy koncentrációban (40-80 pphm) gátolta a paradicsom növekedését, míg alacsonyabb koncentrációban (0-20 pphm) elősegítette a növekedést salátában (Hufton és mts. 1996) és borsóban (Leshem és Harmaty 1996). A NO **hipokotil- és internódusz megnyúlásra** gyakorolt hatását szintén vizsgálták, és azt kapták, hogy NO donorok gátolták a hipokotil növekedését, stimulálták a de-etiolációt, valamint megnövelték a klorofill tartalmat burgonyában, salátában és *Arabidopsis*-ban (Beligni és Lamattina 2000). A NO által indukált **klorofill tartalom növekedést** borsó levelekben is leírták (Leshem és mts. 1998). A NO klorofill tartalomra gyakorolt pozitív hatása arra enged következtetni, hogy a NO-nak szerepe van a növények vas háztartásának szabályozásában (Graziano és mts. 2002). Néhány irodalmi adatból láthatjuk, hogy a NO **anti-szeneszencs**, azaz öregedésgátló hatással bír a növényekben. NO donor alkalmazása csökkentette az etilén szintézisét borsó levelekben (Leshem és Harmaty 1996). A gyümölcsök érése szintén egy etilén által szabályozott öregedési folyamat, mely NO kezeléssel késleltethető, így a gyümölcsök, zöldségek szüretelés utáni eltarthatósága megnövelhető (Leshem és Pinchasov 2000). A NO stimulálja bizonyos növényfajok **csírázását**. NO donorok alkalmazása megszakította a saláta magok nyugalmi állapotát, ugyanakkor a hatás a NO gyökfogó, PTIO alkalmazásával megfordítható volt (Beligni és Lamattina 2000). Néhány korai közlemény arról számolt be, hogy a nitrit alacsony pH-n (2.5 és 3) előmozdította a magok csírázását (Giba és mts. 1998).

Mai ismereteink fényében ezt azzal magyarázhatjuk, hogy savas pH tartományban a nitrit spontán NO-dá redukálódik, és valójában ez a molekula indukálja a csírázást. A NO szerepét a poliamin-indukálta **embriogenezis** folyamatában szintén felismerték, mivel *Ocotea catharinensis* növény embrionális sejtjei megnövekedett NO szintézissel válaszoltak a poliamin kezelésre (Scherer 2007).

A NO, mint szignálmolekula jelentős szerepet tölt be a **gyökér fejlődési folyamataiban** is. Gouvêa és mts. (1997) különböző NO donorok jelenlétében a kukorica gyökér szegmensek megnyúlásos növekedését tapasztalták, és a hatás megfordíthatónak bizonyult NO gyökfogó (metilénkék) alkalmazásával. Ezzel ellentétesnek tűnő eredményekkel szolgált később Pagnussat és mts. (2002) munkája, ahol NO donor SNP indukálta az OGY szám növekedését, a NO gyökfogó (cPTIO) pedig az oldalgöyökér fejlődést teljesen gátolta, a főgyökér megnyúlásában viszont 40%-os növekedést eredményezett paradicsomban. Ez a munka bizonyította a NO részvételét az auxin által indukált oldalgöyökér fejlődésben. Később Correa-Aragunde és mts. (2006) felismerték a NO hatásmódját az OGY fejlődésben. Amikor a NO-t eltávolították a rendszerből, bizonyos sejtciklus szabályozó gének (CYCA2;1, CYCA3;1, CYCD3;1, CDKA1, KRP2) auxin által indukált expressziója gátolt volt. Ebből látható, hogy a NO modulálja az auxin indukálta sejtciklus gének expresszióját. A NO fontos jelmolekulának bizonyult az auxin-mediált sejtciklus aktivációban lucerna sejt kultúrában is (Ötvös és mts. 2005). Aktívan tanulmányozott esemény a **járolékos gyökérfejlődés** is, illetve a NO szerepe ebben a folyamatban. Az elsődleges gyökérrendszer eltávolítása után NO donorok indukálták, míg a NO gyökfogó cPTIO gátolta a járolékos gyökérzet fejlődését uborka növényben (Pagnussat és mts. 2002). Huang és mts. (2007) IBA által indukált NO képződést találtak bab JGY képződése során. Az IBA hatását a járolékos gyökerek megjelenésére a cPTIO valamint a NOS

inhibitor, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-metilészter (L-NAME) késleltette. Más kutatócsoportok kísérleteiből fény derült a NO szerepére az IAA által indukált járulékos gyökérbérbézésben is, vagyis, hogy a NO egyrészt cGMP-n keresztüli úton, másrészt attól függetlenül, a MAPK kaszkád aktivációjával szabályozza a folyamatot (Pagnussat és mts. 2003, 2004). A legújabb eredmények szerint a NO a PA jelátvitel aktiválásán keresztül is hathat ebben a fiziológiai folyamatban (Lanteri és mts. 2008).

#### II.2.6.2. NO kölcsönhatása növényi hormonokkal

Bizonyos körülmények között a NO szabályozhatja elsődleges szignálmolekulák, mint a növényi hormonok hatását.

A gyökérbérbézés fő szabályozó hormonja az **auxin**. Először Pagnussat és mts. (2002) mutatták be, hogy auxin kezelés NO felhalmozódást indukál uborka növények járulékos gyökérbérbézése során. Később kimutatták, hogy a gyökerek auxin kezelése lokalizált NO produkciót eredményezett az OGY-ek és a gyökérbérbézők fejlődése során (Correa-Aragunde és mts. 2004, Lombardo és mts. 2006). Az auxin-indukált NO asszimmetrikusan halmozódik fel a gyökérbérbécsban gravitropikus válasz során (Hu és mts. 2005). Mindhárom auxin által szabályozott folyamat gátolható volt a NO gyökérbérbéző, cPTIO alkalmazásával, ami egyértelműen rámutat az endogén NO kulcsszerepére ezekben a folyamatokban. Ötvös és mts. (2005) munkájából az is kiderült, hogy nemcsak az auxin növeli az endogén NO szintet, hanem a NO szint változása is befolyásolja a sejtek auxin érzékenységét.

**Citokinin** (zeatin) kezelés NO akkumulációt idézett elő dohányban, petrezselyemben és *Arabidopsis* sejt kultúrában (Tun és mts. 2001). A citokininnek által indukált betalain felhalmozódás NOS inhibitorokkal gátolható bizonyult

*Amaranthus retroflexus* levélben, ami feltételezi a NO részvételét ebben a folyamatban (Scherer és Holk 2000). Újabb citokinin mutáns *Arabidopsis* növények (*cre1/ahk4*, *ahk2,3*, *ahk2,4*, *ahk3,4*, *ahp1,2,3*) vizsgálatával világossá vált, hogy a NO szignálkomponens e hormon által szabályozott folyamatokban (Tun és mts. 2008). Romanov és mts. (2008) azonban az előbbi kutatócsoporttal ellentétes eredményeket publikáltak, és megkérdőjelezték a NO részvételét a citokinin szignalizációban.

A **poliaminokról** is kiderült, hogy nagyon gyors NO akkumulációt indukálnak *Arabidopsis* csíranövényekben, bár ez esetben a NO forrása- csakúgy, mint a citokininnek esetében- még nem tisztázott (Tun és mts. 2006).

Az a felfedezés, hogy a NO mediátor molekula az **abszcizinsav** által indukált sztómazáródásban, nagymértékben előmozdította a NO „természetének” jobb megismerését. Az egyik első felfedezés az volt ezzel kapcsolatban, hogy a NO indukálta a sztómazáródást, csökkentette a transzspirációs rátát és növelte a növény adaptív válaszát szárazságstresszel szemben (Garcia-Mata és Lamattina 2001). Emellett kimutatták borsóban, babban és *Arabidopsis*-ban azt is, hogy az ABA indukálja a NO szintézisét a zárósejtekben (Neill és mts. 2002, Desikan és mts. 2002). Ez az indukció elmaradt *Arabidopsis* szuszpenzióban, ami bizonyos mértékű szövetspecifitásra utal (Tun és mts. 2001). Borsóban a NO eltávolítása megakadályozta a sztómák ABA-indukált záródását, ami arra mutat rá, hogy a NO elengedhetetlenül szükséges a folyamatban.

### II.2.6.3. A NO szerepe biotikus stresszek során

A NO biológiájának intenzíven kutatott területe a patogén fertőzés jelátvitelére. Számos modell rendszerben leírták a NO produkció hiperszenzitív reakcióval (HR)

párhuzamosan történő tranziens fokozódását avirulens baktérium vagy gomba fertőzés hatására (Delledonne és mts. 1998, Mur és mts. 2003, Zhang és mts. 2003). A növények NO szintézisével válaszolnak általános elicitor molekulák megjelenésére is, mint például a kriptogein (Foissner és mts. 2000) vagy a Gram-negatív baktériumok sejtfelszíni lipopoliszaharid komponensei (Zeidler és mts. 2004). A sok esetben tapasztalt NO akkumuláció a hiperszenzitív reakció része, hiszen a felszabaduló nagy koncentrációjú NO a reaktív oxigén formákkal együtt programozott sejthalált vált ki, megakadályozva ezzel a patogén növényi szöveteken belüli tovaterjedését (Delledonne és mts. 1998, 2005).

#### II.2.6.4. A NO szerepe abiotikus stresszek során

A NO ellentmondásos jellegű molekula, hiszen alacsony koncentrációban fontos fiziológiai folyamatok jelátvitelét segíti elő, ugyanakkor nagymértékű, sejtben belüli produkciója a sejt károsodását okozhatja (del Río és mts. 2004). Ez utóbbi állapotot kiváltó NO-származékokat reaktív nitrogénformáknak (reactive nitrogen species, RNS) nevezzük. Ezek közé a molekulák közé tartozik többek között a  $N_2O_3$ , dinitrogén-tetroxid ( $N_2O_4$ ),  $ONOO^-$ ,  $NO^+$ ,  $NO^-$ . Abiotikus stressz faktorok hatására reaktív oxigén- és nitrogénformák képződnek, amik oxidatív, illetve nitrozatív stresszt váltanak ki a növényben. Az oxidatív stressz során lipidperoxidáció és protein oxidáció, a nitrozatív stressz során pedig fehérje nitráció történik. Ezek együttesen vezetnek a növény károsodásához (Barroso és mts. 2006).

A NO abiotikus stresszek során betöltött szerepét aktívan kutatják, így számos adat áll rendelkezésre ebben a témakörben. A **nehézfémstressz** során játszott szerepére utal, hogy NO donorokkal való kezelés védő hatásúnak bizonyult kadmium és alumínium terhelés esetén (Wang és Yang 2005, Laspina és mts. 2005). A **só** egy

produktivitást befolyásoló fő stresszfaktor, mely negatívan hat a növények növekedésére, ion egyensúlyára és vízháztartására (Hasegawa és mts. 2000). NO donor kezelés alkalmazása több növényfajban is növelte a sóval szembeni rezisztenciát (Zhao és mts. 2004, Zhang és mts. 2006). Oliva növény levelében a sóstressz gátolta a levél növekedését, oxidatív stresszt indukált, és érdekes módon megváltoztatta a reaktív nitrogénformák metabolizmusát (Valderrama és mts. 2007). Az **ultraviola-B** (UV-B) sugárzás a növények növekedését gátolja és általában oxidatív stresszt idéz elő. *Vicia faba* epidermisz sejtekben UV-B indukálta NO képződést találtak (He J-M. és mts. 2005), más növényfajokban a NO védő hatását mutatták ki az UV-B sugárzással szemben (Shi és mts. 2005, Zhang és mts. 2006). Velikova és mts. (2005) az **ózon** és a NO produkció kapcsolatát vizsgálva kimutatták, hogy az ózon hatására képződő NO a megnövekedett NOS aktivitásból származik. A NO szintézis fokozódását találták **mechanikai stressznek** kitett *Arabidopsis* levél sejtekben (Garcês és mts. 2001) és *Taxus* szuszpenziós sejtekben is. Ez utóbbi esetben a NO felszabadulás NOS inhibitorral gátolható volt, ami feltételezi az enzim részvételét a mechanikai stressz által indukált NO szintézisében (Gong és Yuan 2006). Exogén NO alkalmazása búza növényben sztómazáródást indukált, valamint megnövekedett toleranciát alakított ki a **szárazságstresszel** szemben, ami LEA (late embryogenesis abundant) fehérjék felhalmozódásával járt együtt (Garcia-Mata és Lamattina 2001). Manitollal előidézett **ozmotikus stressznek** kitett búza csíranövényekben a levél vízvesztésének csökkenése és az ABA hormon akkumulációja volt megfigyelhető. Ezen hatások részben visszafordíthatók voltak NO gyökfogók és NOS enzim gátlók alkalmazásával (Xing és mts. 2004). Dohány növény NO donorral való kezelése egy 42 kDa molekulatömegű kináz aktiválódását eredményezte. Az enzim azonosításakor kiderült, hogy az a NtOSAK (*Nicotiana*



*tabacum* osmotic stress-activated protein kinase), mely enzimet korábban már ismerték, mint az ozmotikus stressz szignalizáció komponensét (Lamotte és mts. 2006). NO donorok paradicsom levelében gátolták a **sebzés** hatására megjelenő proteináz inhibitor 1 és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintézisét (Orozco-Cárdenas és Ryan 2002). Dordas és mts. (2003, 2004) **hipoxia** által indukált NO képződést találtak lucerna gyökerekben és kukorica sejt-szuszpenziós kultúrában; ezt a folyamatot az 1. típusú hemoglobinok katalizálják. Több mint 25 évvel ezelőtt írták le először, hogy szója növényekben alkalmazott **herbicidek** NO felszabadulást idéznek elő (Klepper 1979). Újabban számos tanulmányban megállapították, hogy NO donorokkal való kezelés megvédte a burgonya és rizs leveleit a metil-viologén és diquat herbicidek károsító hatásaitól (Beligni és Lamattina 1999, 2002; Hung és mts. 2002).

Annak ellenére, hogy látszólag sok ismeretünk van a NO és különböző abiotikus stresszforrások kapcsolatát illetően, számos további tisztázandó kérdés merül fel, mint például a NO és más reaktív nitrogén fajták sejten belüli metabolizmusa, ezek szerepe a biokémiai, fiziológiai stressz folyamatokban, a NO enzimatis vagy nem enzimatis forrása stressz körülmények között. Jelen értekezés az ozmotikus stressz által indukált NO enzimatis forrásának vizsgálatával járul hozzá az ismeretek bővítéséhez, tehát ebből a szempontból a dolgozat hiánypótlónak tekinthető.

### III. Célkitűzés

A növényi NO kutatása hazánkban rövid múltra tekint vissza. Tanszékünkön az elsők között kezdtünk el foglalkozni ezzel a valóban érdekes, bioaktív szigálmolekulával, és célul tűztük ki természetének jobb megismerését. Munkánk során a NO szerepét, keletkezésének tulajdonságait és enzimátikus forrását vizsgáltuk a gyökérrendszer fejlődése során. Alapvetően a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Mi a hasonlóság illetve különbség az ozmotikus stressz, mint a gyökérfejlődést befolyásoló környezeti faktor és az auxin, mint belső regulátor gyökérmorfológiára és NO képződésre gyakorolt hatása között?
- Van-e különbség a két faktor által indukált NO keletkezésének sajátosságaiban?
- Mely enzim lehet a felelős a NO szintéziséért auxin kezelés, illetve ozmotikus stressz hatására bekövetkező gyökérfejlődés során?

Vizsgálatainkhoz borsó és búza növényeket használtunk. A NO forrásának genetikai hátterét vad típusú és mutáns (*Atnoa1*, *nia1*, *nia2*) *Arabidopsis thaliana* L. növények felhasználásával tanulmányoztuk, melyekben az OGY primordium iniciációja és növekedése mikroszkóp alatt jól vizsgálható.

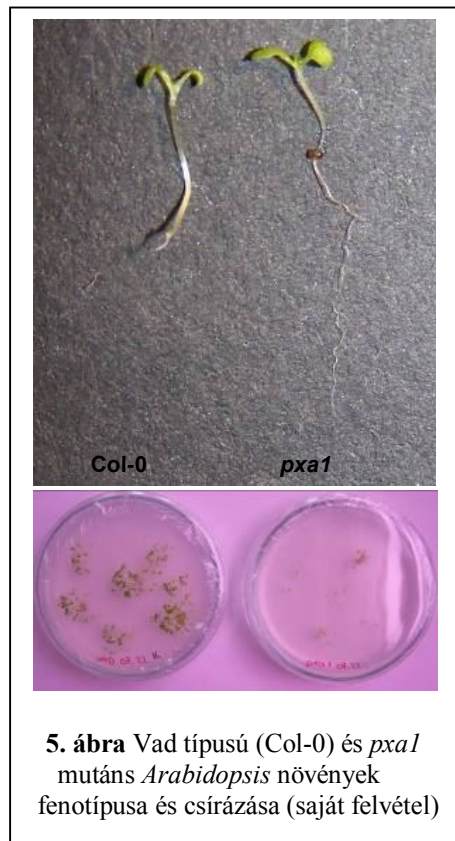
## IV. Anyagok, módszerek, a kísérletek kivitelezése

### IV.1. Növényi anyag és nevelési körülmények

A borsó (*Pisum sativum* L. cv. Rajnai törpe) magvakat és búza (*Triticum aestivum* cv. GK Öthalom) szemterméseket 5%-os nátrium hipoklorit oldat felhasználásával 10 percig sterilizáltuk és 2 órán keresztül folyóvíz alatt öblítettük. A csíráztatás 26°C-on, 2 napig, Petri-csészékben, nedves szűrőpapírok között történt. A 2 cm-es radikulával rendelkező csíranövényeket módosított Hoagland tápoldatba helyeztük (9 csíranövény/400 mL-es edény) és üvegházi körülmények között (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  –es fényintenzitás, 12/12 órás fény/sötét periódus, 55-60%-os relatív páratartalom,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  hőmérséklet) 5 napig neveltük. A módosított Hoagland tápoldat a következő vegyületeket tartalmazta: 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM  $\text{KCl}$ , 0.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . A tápoldat készítésénél használt mikroelem koncentrációk a következők voltak: 1  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , és 20  $\mu\text{M}$   $\text{Fe-EDTA}$ . Az 5 napos csíranövényeket borsó esetén további 5 napig, búza esetében pedig 1 napig kezeltük. A mintákat naponta vettük, illetve, ahogy feltűntetjük. A főgyökér (FGY) hosszakat mércével mértük meg, és milliméterben (mm) adtuk meg. Az oldalgyökereket megszámláltuk, és oldalgyökér (OGY) szám/gyökér egységben fejeztük ki.

A további kísérleteinket 3 hetes vad típusú (Col-1), *nial*, *nial2* és *Atnoal* mutáns *Arabidopsis* növényekkel valamint 8 napos Col-0 és *pxal* mutáns *Arabidopsis* növényekkel (5. ábra) végeztük. A magok felületi sterilizálását 5%-os nátrium hipoklorit oldattal (v/v) végeztük 20 percig, majd mielőtt Murashige-Skoog (MS)

táptalajra (7 g/L agar) (Murashige és Skoog 1962) tettük a magokat, 5-ször átmostuk steril desztillált vízzel. A *nia1*, *nia2* mutáns magok tisztaságát 5 mM kálium-klorát (KClO<sub>3</sub>) táptalajhoz való hozzáadásával ellenőriztük. A 3 hetes Col-1, *Atnoa1* és *nia1*, *nia2* növényeket módosított Hoagland tápoldatot tartalmazó Petri-csészékbe helyeztük, és további 5 napon keresztül kezeltük. Ezen periódus alatt N-hiánytüneteket nem észleltünk a növényeken. A Col-0 és *pxa1* mutáns növények 5 napig tartó kezelése 3 napos korukban, steril körülmények között MS táptalajon történt.



**5. ábra** Vad típusú (Col-0) és *pxa1* mutáns *Arabidopsis* növények fenotípusa és csirázása (saját felvétel)

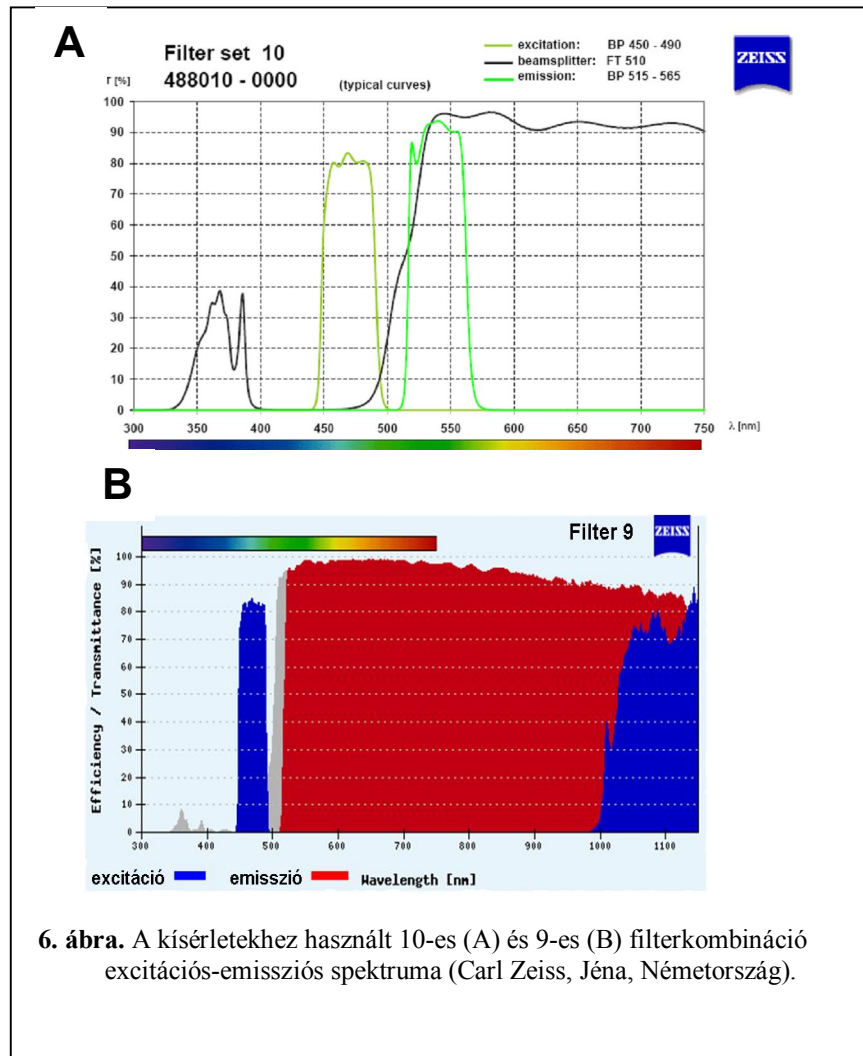
## IV.2. Vegyszerek és kezelések

Nitrogén-monoxid donorként 1 mM SNP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) valamint 1 mM SNAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kezeléseket alkalmaztunk. A NO eltávolítására a széles körben használt cPTIO vegyületet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmaztuk 1 mM koncentrációban. A gyökérszégmenseket 4 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékben donor és/vagy scavenger oldatokban (4ml) inkubáltuk 2 órán keresztül. A donorkezelések  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson történtek. A NO detektálására egy fluoreszcens festéket, a DAF-2DA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használtuk  $10 \mu\text{M}$ -os koncentrációban, melyet 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav (MES, Reanal, Budapest, Magyarország) pufferben oldottunk fel (MES és kálium-klorid [KCl], pH 6.15). A festék alkalmazhatóságának igazolása céljából annak negatív kontrollját, a 4AF-DA-t (Calbiochem, San Diego, CA) használtuk  $10 \mu\text{M}$  koncentrációban. Az ozmotikus stresszt PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tápoldatba való adásával idéztük elő. 50, 100, 200, 400 mOsm ozmotikus koncentrációjú (6.98, 9.97, 14.3 és 19% [w/v]) oldatokat állítottunk be digitális ozmométer segítségével (Micro GMS, Magyarország). Ezen oldatok ozmotikus potenciálját a Wyn Jones és Gorham (1983) -féle kalkuláció alapján a következőkben határoztuk meg: -0.122, -0.244, -0.488 és -0.976 MPa  $\psi_s$ . A poláris auxin transzport gátlására  $10 \mu\text{M}$  NPA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használtunk, exogén auxinként pedig  $10^{-3}$  M-  $10^{-9}$  M IBA-t (Fluka, Sneeze, Németország) alkalmaztuk. A NOS enzim gátlószerét, az L-NMMA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) valamint a nitrát reduktáz enzim gátló wolframátot (Reanal, Budapest, Magyarország) 1 mM koncentrációban alkalmaztuk.

### IV. 3. A NO fluoreszcens mikroszkópos detektálása

A gyökerek NO tartalmának vizualizációjára egy rendkívül érzékeny *in situ* és *in vivo* módszert használtunk (Kojima és mts.1998, Pedroso és mts. 2000). 1.5-2 cm hosszú borsó gyökér szegmenseket és keresztmetszeteket valamint búza és *Arabidopsis thaliana* gyökér szegmenseket vizsgáltunk. A borsó gyökér keresztmetszeteket egy speciális növényi mikrotómmal (NIHONIKA MTH-1, Tokió, Japán) készítettük. Borsó és búza esetében a gyökerek nagysága, vastagsága miatt nehézkes az OGY primordiumok mikroszkópos tanulmányozása, ezért itt a főgyökerek csúcsi régiójában vizsgáltuk a fluoreszcencia változásokat. Az *Arabidopsis* gyökerek a mikroszkóp alatt jobban átvilágíthatóak, az OGY iniciálisok jól vizsgálhatók, ez esetben tehát lehetőségünk nyílt a NO-kapcsolt fluoreszcencia térbeli lokalizálására az OGY kezdemények területén. Mintáinkat MES/KCl pufferben oldott DAF-2DA fluoreszcens festékkel festettük 20 percig  $25 \pm 2$  °C-on, sötétben. A festés után a mintákat 20 percen belül 4-szer mostuk MES pufferrel, majd mikroszkóp tárgylemezre helyeztük őket. A fluoreszcens intenzitás detektálására 10-es illetve 9-es filter kombinációval felszerelt Zeiss Axiowert 200 M-típusú fluoreszcens mikroszkópot (6. ábra, Carl Zeiss, Jéna, Németország) használtunk. Az excitációs hullámhossz beállítása 450-490 nm-en, az emissziós hullámhosszá a 10-es sávszűrő esetén 515-565 nm-en, a 9-es végtelenített szűrő esetében 515 nm ( $-\infty$ ) en történt. Kísérleteink kezdetén csupán a 9-es szűrőkombináció állt rendelkezésünkre, mely az esetleges klorofill autofluoreszcenciát is átengedi. A 10-es filter ez előbbi vörös színű emittált fényt kiszűri, így alkalmasabb a mintáink vizsgálatára, ezért a továbbiakban ezt alkalmaztuk. FLUAR 5x/0.25 NA és LD ACROPLAN 40x/0,60 Korr Ph2 objektív lencsét használtunk a minták vizsgálatához. A fényképeket nagy felbontású digitális

kamerával (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300×1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) készítettük. A detektált fluoreszcencia intenzitást az AxioVision Rel. 4.6 nevű szoftver segítségével mértük meg. Ez a program lehetőséget ad arra, hogy a pixel intenzitást adott átmérőjű körök területén határozzuk meg. A borsó és búza gyökérszegmensek esetén a csúcstól számítva 0,5 milliméterenként három körben történt a fluoreszcencia intenzitás meghatározása. A három adat átlagát vettük minden fotó esetében. Az *Arabidopsis* gyökerekben minden felvétel esetében a primordium területén egy meghatározott átmérőjű körben, valamint a főgyökér területén két körben mértük a pixel intenzitást. A fotók készítésekor az expozíciós idők megválasztása során figyelembe kellett vennünk, hogy minden minta esetében értékelhető képeket kapjunk, ezért az expozíciós idők beállítását növényfajonként és az egyes kísérletek között esetenként változtattuk. Egy kísérleten belül azonban azonos expozíciós idővel dolgoztunk, így a kontroll és a kezelt minták pixel intenzitás értékei összevethetőek. A NO detektálását a kezelések 0., 24., 48., 72., 96. és 120. órájában végeztük el, valamint néhány esetben a 12. és 36. órában is történt mintavétel (ezeket jeleztük a megfelelő helyeken). Minden kezelés esetén legalább 3-szori mérés történt (n=9). Biológiai ismétlésként a növények három független generációját neveltük fel.



#### IV. 4. Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok minden esetben három független biológiai ismétlés átlag- és szórásértékei. A szignifikáns különbségeket Student t-tesztel állapítottuk meg SigmaStat 3.11 nevű szoftver felhasználásával. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

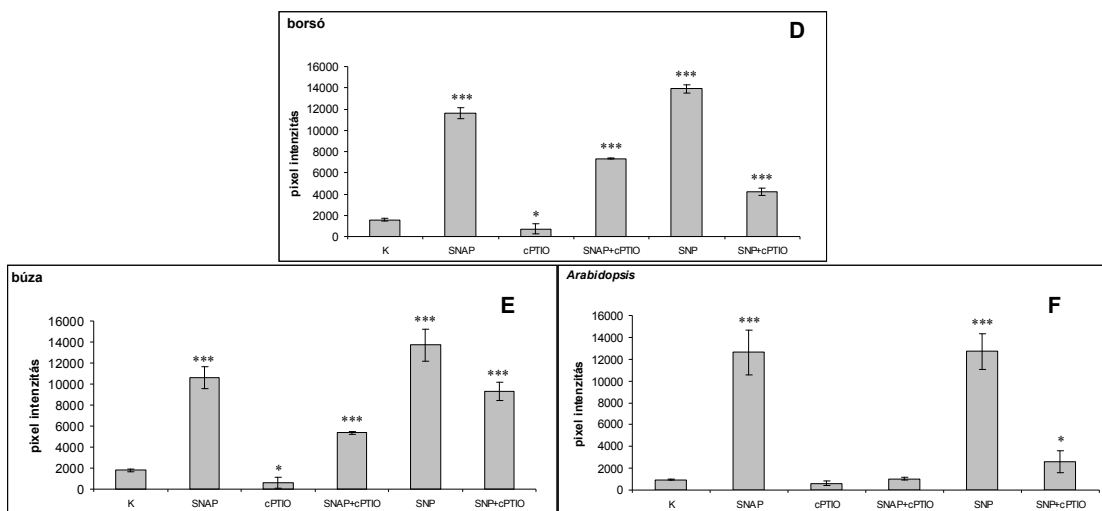
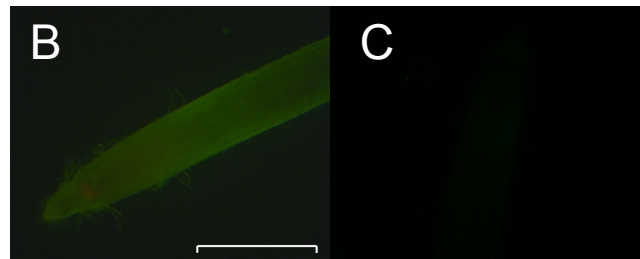
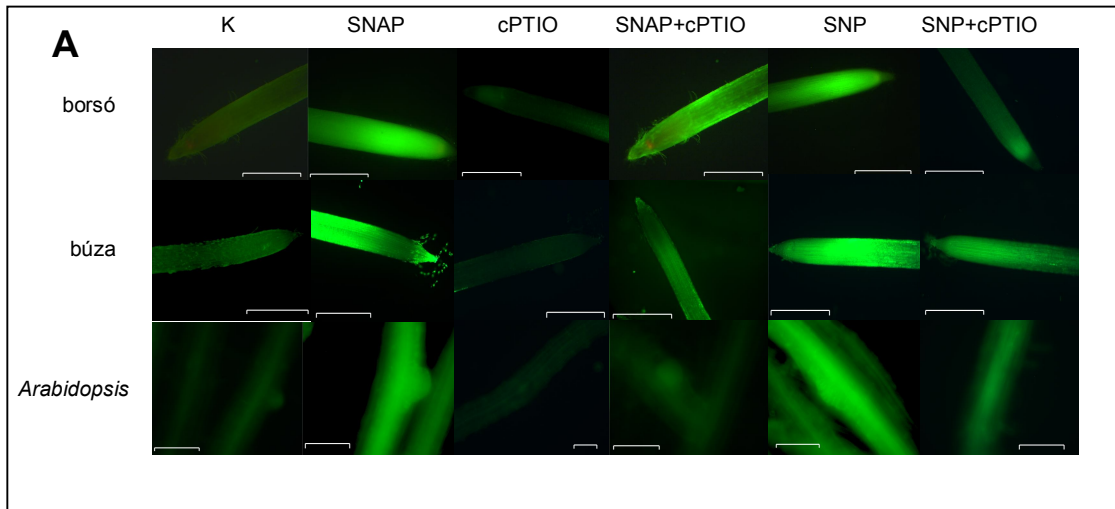


## V. Kutatási eredmények

### V.1. A DAF-2DA kísérleti rendszerünkben való alkalmazhatóságának igazolása

A DAF-DA fluorofórral történő NO meghatározás széles körben alkalmazott eljárás, hiszen gyors és egyszerű módon biztosítja a NO *in vivo* és *in situ* vizualizációját az állati és a növényi szövetekben. Mégis számos kritika érte a festékcsalád érzékenységét, használhatóságát az elmúlt években (lásd II.2.4. fejezet). Éppen ezért munkánk kezdetén szükség volt a festék rendszerünkben való alkalmazhatóságának bizonyítására. Első lépésként a gyökereket festés nélkül helyeztük a mikroszkóp alá, és megállapítottuk, hogy nem mutatnak detektálható autofluoreszcenciát. DAF-festés után azonban látható volt, hogy a gyökerek kontroll állapotban egy alap NO-szinttel rendelkeznek. Ezek után NO-donor és/vagy gyökfogó (SNP, SNAP és/vagy cPTIO) vegyületekkel módosítottuk ezt az alap NO tartalmat a gyökerekben, majd DAF-2DA-val festettük és mikroszkóp alatt vizsgáltuk azokat. Mint ahogy a 7. A és DEF ábrákon látható, mindkét donorkezelés a DAF-2T fluoreszcencia jelentős mértékű növekedését eredményezte mindhárom növényfaj gyökerében. A NO-ot eltávolító cPTIO csökkentette a DAF-2T fluoreszcenciát mind a kontroll, mind pedig a donor-kezelt gyökerekben. Mintáinkat megfestettük a DAF-2DA negatív kontrolljaként számon tartott 4-AFDA nevű fluorofórral, mely egyetlen aminocsoporttal rendelkezik, így nem képes a NO (vagy oxigenált származékainak) kötésére. Ezt a kontroll kísérletet is elvégeztük mindhárom növényfaj esetében, és a DAF-2DA-val festett kontroll mintákhoz képest erősen redukált fluoreszcenciát kaptunk. Jelen dolgozatban csupán egy, borsó gyökérről készült, reprezentatív felvételt mutatunk be (7. ábra B és C). A továbbiakban „NO fluoreszcencia”, „NO

keletkezés”, „NO felhamozódás” kifejezések alatt a DAF-2T fluoreszcencia intenzitásának változásait értjük.



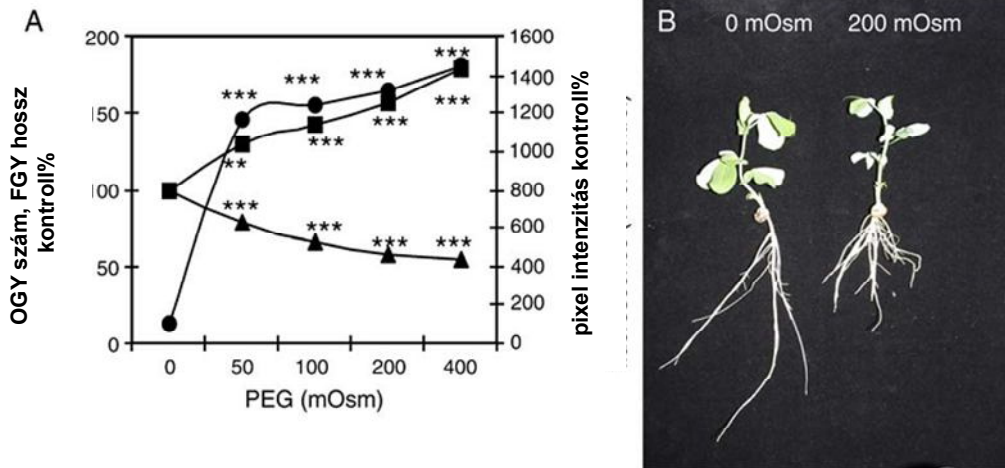
**7. ábra** „A” 10 μM DAF-2DA-val festett kontroll valamint NO-donor és/vagy scavenger-kezelt borsó, búza és *Arabidopsis* gyökérszegmensekről készült fluoreszcens mikroszkópos felvételek. „B” Kontroll borsó gyökér 10 μM DAF-2DA-val festve. „C” Kontroll borsó gyökér 10 μM 4-AFDA-val festve. Mércse=1 mm ill. 100 μm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es illetve 9-es filter kombináció felhasználásával készítettük (10-es filter exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm; 9-es filter exc.: 450-490 nm, em.: 515 nm). A DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei borsó (D), búza (E) és *Arabidopsis* (F) gyökerekben. Az y tengelyen feltüntetett pixel intenzitás értékek a NO szintet jelzik. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001).

## V. 2. Az ozmotikus stressz és az IBA kezelés gyökérmorfológiára és NO keletkezésre gyakorolt hatása hasonló, de nem azonos

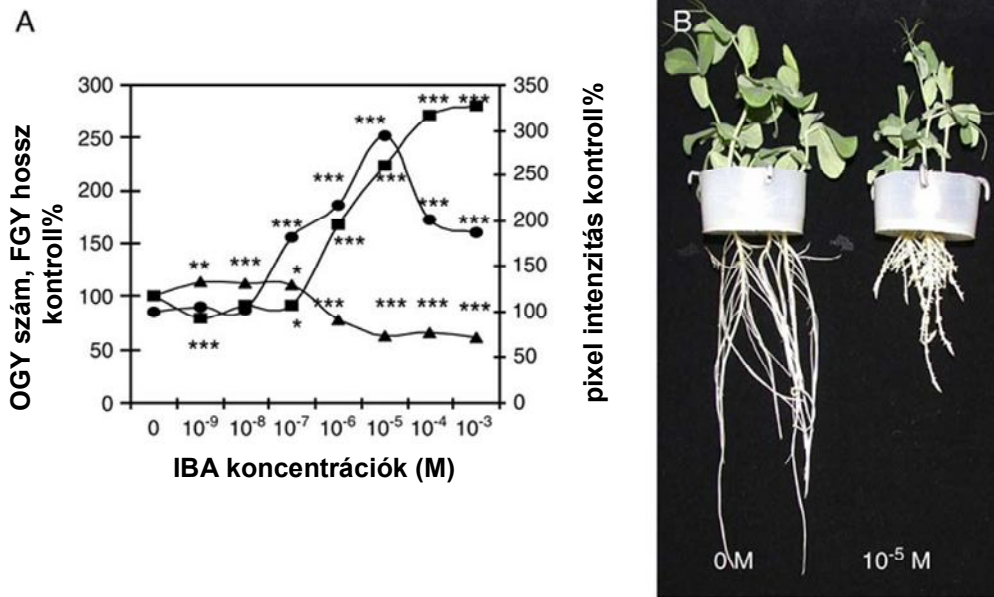
Az ozmotikus stressz, illetve az exogén auxin gyökérszerkezetre és NO tartalomra gyakorolt hatásának vizsgálatához polietilén glikol és indol-3-vaajsav kezeléseket alkalmaztunk széles koncentráció tartományban.

A PEG növekvő ozmolaritásai megnövelték az oldalgyökerek számát, és csökkentették a főgyökerek hosszát a borsó növényekben (8.A ábra). Az ezzel együtt járó NO felszabadulás (8.A ábra) egy intenzív kezdeti csúcsot mutatott a legalacsonyabb, alkalmazott ozmotikus értéknél, majd a növekvő OGY számot parallel módon követte a NO keletkezése. A fenotipikus akklimatizáció a növény jelentősen módosult morfológiáját eredményezte, különösen igaz ez a gyökérszerkezetére (8.B ábra). Ez a jelleg összehasonlítható az auxin kezelés által eredményezett morfológiával (9. ábra). Korábbi felfedezésekkel egyetértésben azt találtuk, hogy az alacsony IBA koncentrációk ( $10^{-9}$  M- $10^{-8}$  M) a kontrollhoz viszonyítva hosszabb főgyökeret és kevesebb oldalgyökeret eredményeztek, míg a magasabb IBA koncentrációk ( $10^{-7}$  M- $10^{-3}$  M) a főgyökerek rövidülését és az OGY szám növekedését idézték elő. Kontroll szintű NO tartalmat detektáltunk az alacsony koncentrációjú auxin kezelések esetében, viszont a  $10^{-6}$  M és  $10^{-5}$  M IBA-kezelt gyökerekben a NO fluoreszcencia intenzitása 2-3-szor magasabb volt, mint a kontroll esetében. A legmagasabb alkalmazott IBA koncentrációk ( $10^{-4}$  és  $10^{-3}$  M) esetén azonban az OGY szám és a NO fluoreszcencia közötti korreláció megszűnését tapasztaltuk. A magasabb IBA koncentrációtartományban a főgyökér megnyúlása gátolt volt. A kezelések hatására bekövetkezett morfológiai változásokat a 9.B ábra szemlélteti. Az alacsony és magas koncentrációtartományban mért NO fluoreszcenciát

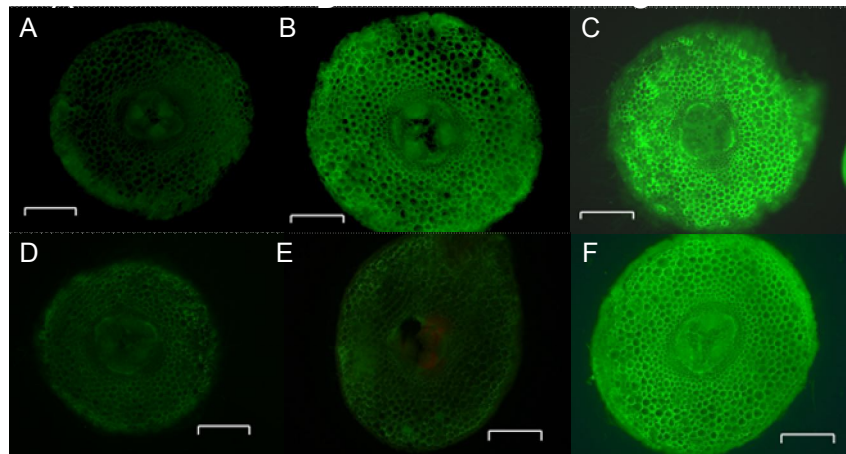
a 0, 50, 400 mOsm PEG-kezelt és 0,  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  M IBA-kezelt gyökérkeresztmetszetekről készült digitális fotókon mutatjuk be (10. ábra ABC és DEF).



**8. ábra** A) PEG 6000 által indukált ozmotikus stressz hatása a főgyökér növekedésére (FGY, ▲), az oldalgyökerek fejlődésére (OGY, ■) és a NO képződésére (●) *Pisum sativum* L. gyökérben. Az adatok a kontroll %-ában vannak kifejezve a következők szerint: a főgyökérre 100%=154±15 mm növény<sup>-1</sup>, az oldalgyökérre 100=14±2,08 darab növény<sup>-1</sup>, a NO-ra 100%=906±249,82 pixel intenzitás. Kezelésként 9 ismétlés átlagát ábrázoltuk (n=9). B) PEG kezelés okozta morfológiai változások a kontrollhoz képest. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.



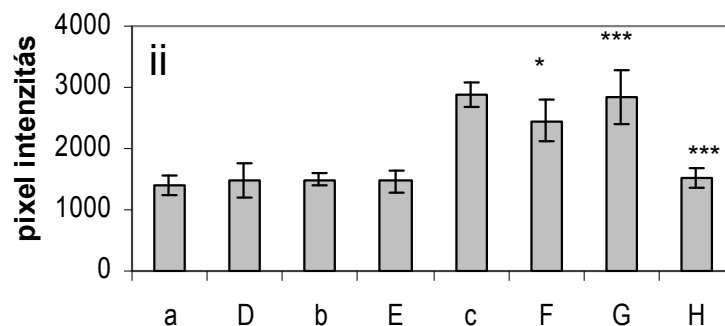
**9. ábra** A) IBA koncentrációk hatása a főgyökér növekedésére (FGY, ▲), az oldalgyökér számra (OGY, ■) és a NO keletkezésre (●) *Pisum sativum* L. gyökérben. Az adatok a kontroll %-ában vannak kifejezve a következők szerint: a főgyökérre 100%=144±24 mm növény<sup>-1</sup>, oldalgyökérre 100%=25±2.8 darab növény<sup>-1</sup> és a NO-ra 100%=1120±126 pixel intenzitás. Kezelésenként 9 ismétlés átlagát ábrázoltuk (n=9). B) A 10<sup>-5</sup> M IBA kezelés által indukált morfológiai változások a kontrollhoz képest. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.



**10. ábra** NO fluoreszcencia borsó főgyökér keresztmetszetekben a kontroll (0 mOsm PEG, A; 0 M IBA, D), 50 mOsm PEG (B), 400 mOsm PEG (C), 10<sup>-8</sup>M IBA (E) és 10<sup>-5</sup>M IBA (F) kezelt mintákban. Mércse=500 μm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es illetve 9-es filter kombináció felhasználásával készítettük (10-es filter: exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm; 9-es filter: exc.: 450-490 nm, em.: 515 nm).

### V. 3. Auxin koncentráció-függő NO felszabadulás a gyökerekben

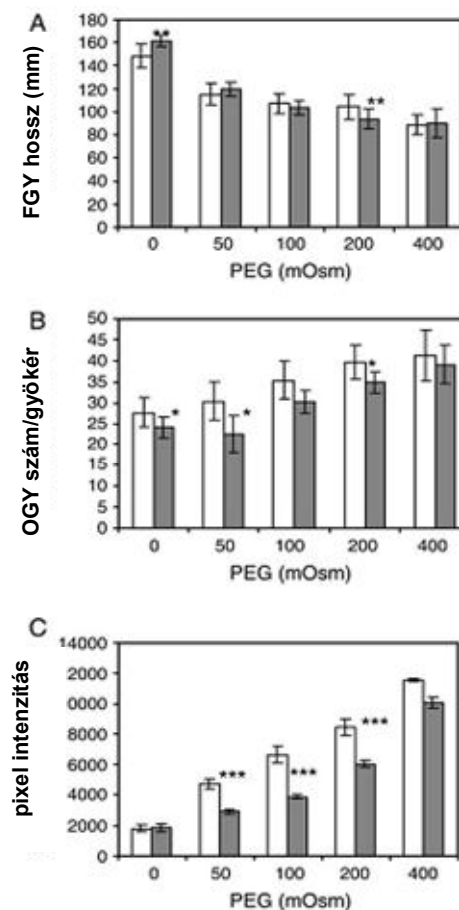
A továbbiakban egy egyszerű, de informatív kísérletet végeztünk az auxin kezelés és a NO keletkezés közötti kapcsolat felderítése céljából. Borsó növényeinket 5 napig kezeltük egy alacsony ( $10^{-8}$  M) vagy egy magas ( $10^{-5}$  M) IBA koncentrációval, és az eddigiekhez hasonlóan az előbbi esetben a FGY megnyúlását, az utóbbi esetben pedig az OGY szám szignifikáns megnövekedését tapasztaltuk (11. ábra abc, ABC). A növényeket további 5 napig kezelve a rövid OGY primordiumok kismértékű megnyúlását és a NO fluoreszcencia enyhe csökkenését detektáltuk (11. ábra def, DEF). A növények egy csoportját az 5. napon alacsony koncentrációjú auxint tartalmazó tápoldatból nagy auxin koncentrációjú oldatba helyeztük át. Ezen növények gyökerein számos apró OGY iniciális jelent meg, a gyökerek NO szintje pedig megnövekedett (11. ábra g, G). A növények egy másik csoportját fordítottan kezeltük, vagyis  $10^{-5}$  M IBA tartalmú tápoldatból  $10^{-8}$  M IBA-t tartalmazó tápoldatba helyeztük őket. Az ilyen módon kezelt növények OGY kezdeményei nagymértékben megnyúltak, és bennük a NO tartalom szignifikáns módon lecsökkent (11. ábra h, H).



**11. ábra** “i” Gyökér morfológia (a-h) és NO fluoreszcencia (A-H) 5 napos kezelések után (kontroll:a,A;  $10^{-8}$  M IBA: b,B;  $10^{-5}$  M IBA: c,C) valamint 10 napos kezelések után (kontroll:d,D;  $10^{-8}$  M IBA: e,E;  $10^{-5}$  M IBA: f,F). “g” és “G” fotó a  $10^{-8}$  M IBA-t tartalmazó tápoldatból a  $10^{-5}$  M IBA tartalmú oldatba helyezett növényeket mutatja, míg a “h” és “H” felvételeken a  $10^{-5}$  M IBA koncentrációból a  $10^{-8}$  M IBA tartalmú tápoldatba áthelyezett növények láthatók. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). “ii” Az A-H fotókhoz tartozó relatív fluoreszcencia értékek. Mércse=1mm. Kezelésenként 9 ismétlés átlagát ábrázoltuk (n=9). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

#### V. 4. A poláris auxin transzport szerepe a gyökérfejlődésben

Az ozmotikus kezelések hatására kialakult gyökérmorfológia hasonló volt ahhoz, melyet külső IBA jelenlétében kaptunk, ahogy az a 8. és 9. ábrán látható. Felmerül a kérdés, hogy vajon az ozmotikus stressz során akropetálisan transzportált auxin felelős-e a megnövekedett oldalgöyker képződésért és NO szintéziséért vagy sem. Ennek kiderítése érdekében a poláris auxin transzport egyik gátlószerét (NPA) alkalmaztuk és az oldalgöyker szám, valamint a NO szint csökkenését kaptuk, míg a főgyöyker növekedésére ez a kezelés gyakorlatilag nem hatott (12. ábra ABC).



**12. ábra** A PEG koncentrációk hatása a főgyöyker hossza (A), az oldalgöyker számra (B) és a NO fluoreszcenciára (C). A fehér oszlopok a NPA nélküli kezeléseket, a szürke oszlopok pedig a PEG+10 μM NPA kezeléseket jelzik. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.



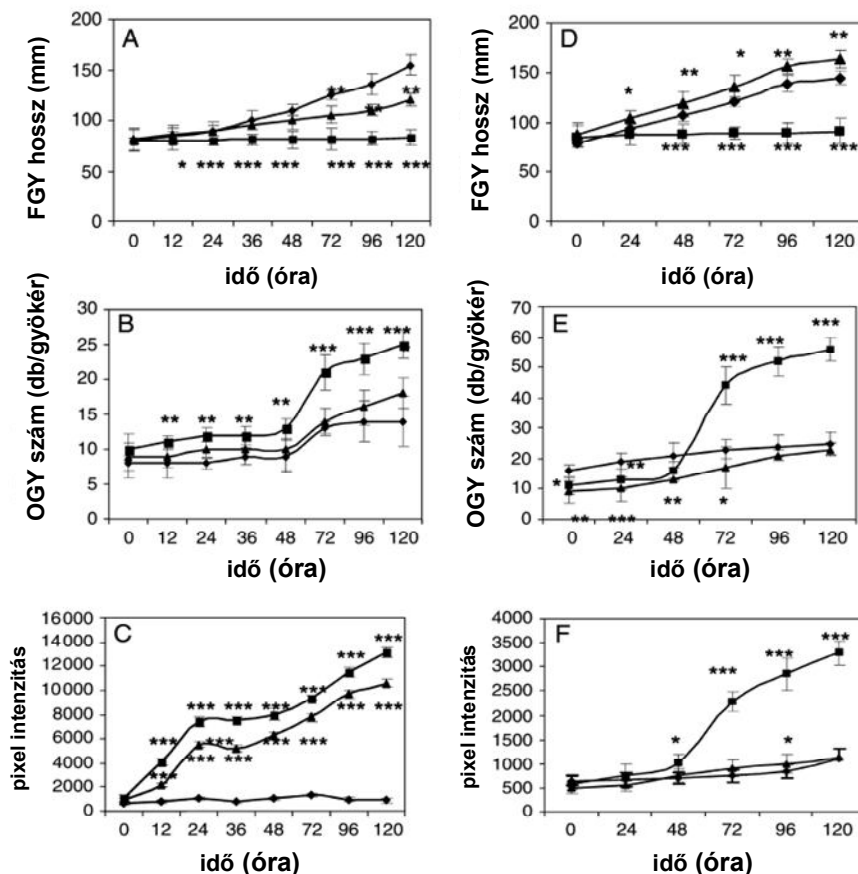
## V.5. Az ozmotikus stressz- és IBA- indukált NO felszabadulás időgörbéje különböző: “a stressz-NO”

A főgyökerek hosszát, az oldalgyökerek számát és a NO-kapcsolt fluoreszcenciát a kezelések 0., 24., 48., 72., 96. és 120. órájában mértük. Ezen kísérleteket minden PEG és IBA koncentráció esetén elvégeztük, de az átláthatóság érdekében mindkét kezelés esetében két reprezentatív koncentrációt választottunk ki, nevezetesen az 50 és 400 mOsm PEG kezeléseket valamint a  $10^{-8}$  M és  $10^{-5}$  M IBA koncentrációkat. Az ozmotikus stressz hatására képződő NO-ot a kezelés 12. és 36. órájában is detektáltuk.

A FGY növekedése az idő függvényében egyenletesnek mutatkozott a kontroll esetében (13. ábra AD), és ezt az időben állandó jelleget az 50 mOsm PEG kezelés nem befolyásolta, de a legnagyobb alkalmazott ozmotikus koncentráció gátolta a megnyúlást (13. ábra A). Habár a  $10^{-8}$  M IBA szignifikánsan növelte a főgyökerek hosszát, a megnyúlás időben egyenletes jellege megmaradt, míg a  $10^{-5}$  M IBA a főgyökér növekedésének azonnali leállítását eredményezte (13. ábra D).

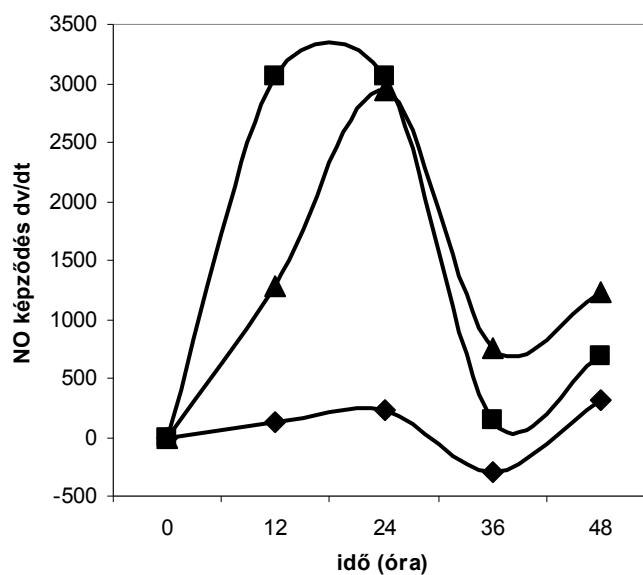
Az oldalgyökerek iniciációja az ozmotikus kezelés utáni 48. órában történik, ezután pedig az emelkedő PEG koncentrációkkal fokozódik (13. ábra B). A kontroll és a  $10^{-8}$  M IBA kezelt gyökerek OGY száma időben egyenletesen emelkedett, bár ez utóbbi növénycsoport jelentősen csökkent OGY számmal rendelkezett, mint a kontroll. A kezelés 48. órájáig a  $10^{-5}$  M IBA koncentráció nem fejtett ki látható hatást az OGY számra, de ezután a “lappangó” fázis után az oldalgyökerek száma szignifikáns módon megemelkedett, és a legjelentősebb növekedés a kezelés 48. és 72. órája között volt megfigyelhető (13. Ábra E). Ebből a szempontból az ozmotikus stressz és a nagy koncentrációjú exogén auxin hatása kétségtelenül azonos (13. ábra B és E). Azonban jelentős különbség fedezhető fel a NO produkcióban a két stressz

faktor között. Ozmotikus stressz alatt elkülöníthető egy, az első 24 órában megjelenő tranzien NO felhalmozódás, melyet egy „lag fázis” követ a 24. és 36. óra között. Ezután egy lassabb, nagymértékű NO akkumuláció volt detektálható a borsó gyökerekben (13. ábra C). Vagyis ozmotikus stressz során a NO kétfázisú felhalmozódást mutatott. A kontroll és a  $10^{-8}$  M IBA kezelt gyökerek hasonlóan alacsony NO tartalommal rendelkeztek, mely időben kissé növekedett. A  $10^{-5}$  M IBA koncentráció esetében látható fluoreszcencia növekedés csak a kezelés 48. órája után volt mérhető (13. ábra F). A NO produkció időgörbéit összehasonlítva (13. ábra C és F) látható egy PEG-indukált tranzien NO felszabadulás, mely megelőzi a lassú, egyenletes, auxin-kapcsolt NO szintézist.



**13. ábra** A főgyökér növekedés (A), oldalgöyökér fejlődés (B) és a NO képződés (C) időfüggése kontroll (◆), 50 mOsm PEG-kezelt (▲), 400 mOsm PEG-kezelt növényekben (■). A főgyökér növekedés (D), az oldalgöyökér fejlődés (E) és a NO keletkezés (F) időfüggése kontroll (◆),  $10^{-8}$  M IBA-kezelt (▲),  $10^{-5}$  M IBA-kezelt növényekben (■). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

A két típusú NO elkülönítése érdekében a NO produkció szintjét a kezelések időfüggvényében ábrázoltuk (14. ábra). A differenciál görbe segítségével világosan elkülöníthető az ozmotikus stressz-indukált robbanásszerű, valamint a 48. óra utáni NO felszabadulás. Mivel kísérleti rendszerünkben a tranziens NO képződés auxin kezelés hatására nem, csak ozmotikus stressz kezelt gyökerekben jelent meg, a NO képződés ezen gyors szakaszát elneveztük „stressz-NO-nak”.

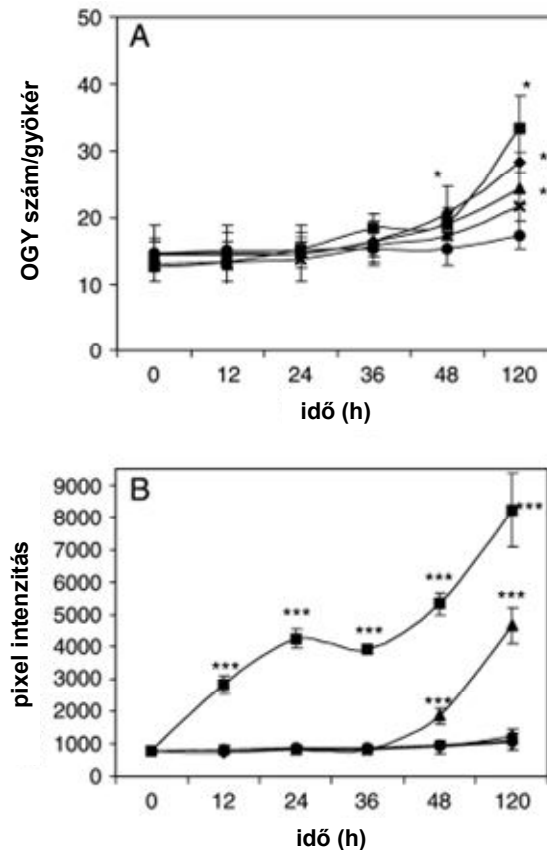


**14. ábra** A tranziens NO keletkezés differenciál időgörbéje a kontroll (◆), 50 mOsm PEG-kezelt (▲) és 400 mOsm PEG-kezelt (■) borsó gyökerekben.

## V.6. A „stressz-NO” szerepe a PEG által indukált oldalgökér fejlődésben

Azon kérdés megválaszolására, vajon a korai NO képződés szerepet játszik-e a PEG-indukált oldalgökér keletkezésben, az ozmotikus stressz indukált tranziens cPTIO segítségével gátoltuk az első 36 órában és vizsgáltuk az OGY szám alakulását

a kísérlet 120. órájában. Ezen növények- melyekben a „stressz-NO” nem volt jelen- a kontrollhoz és a 400 mOsm PEG-kezelt növényekhez képest csökkent oldalgyökér számot mutattak a kezelés 120. órájában (15. ábra). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a korai NO felszabadulás szükséges a PEG-indukált oldalgyökér fejlődéshez.



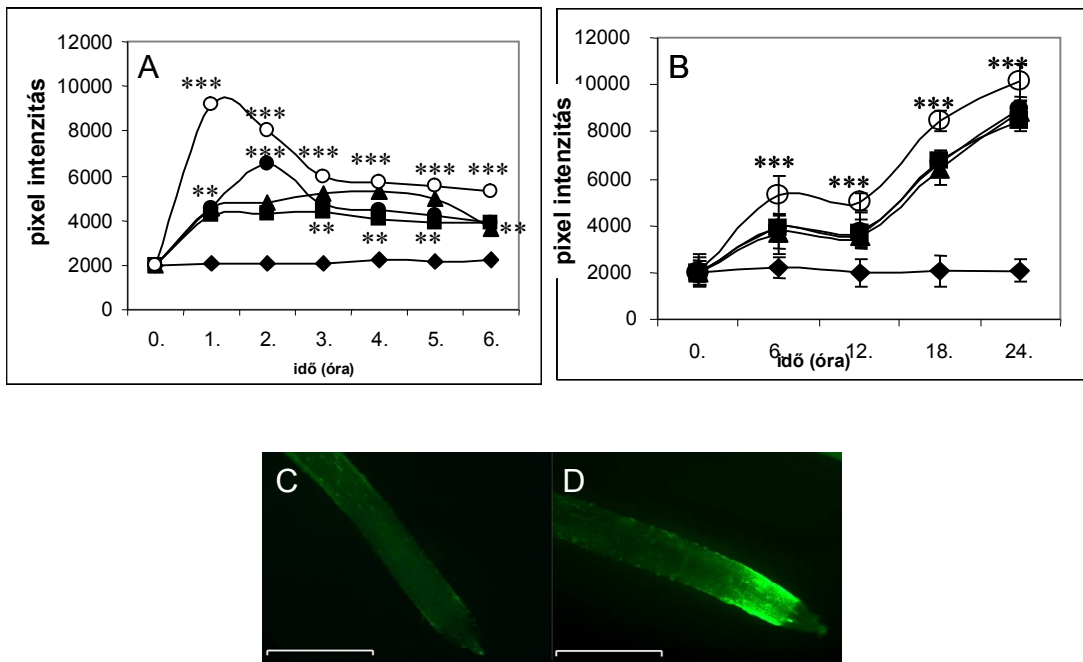
**15. ábra** A kontroll (◆), a 400 mOsm PEG (■), a cPTIO + PEG (×) és a cPTIO (●)- kezelt gyökerek oldalgyökér (OGY) fejlődése (A) és NO képződése (B) időgörbéje. A háromszög (▲) azon növények OGY számát és NO tartalmát szimbolizálja, melyeket a 36. óra után cPTIO + PEG –et tartalmazó oldatból 400 mOsm PEG-et tartalmazó tápoldatba helyeztük át. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

## V.7. Polietilén glikol által indukált kétfázisú NO akkumuláció búza valamint *Arabidopsis thaliana* L. gyökerekben

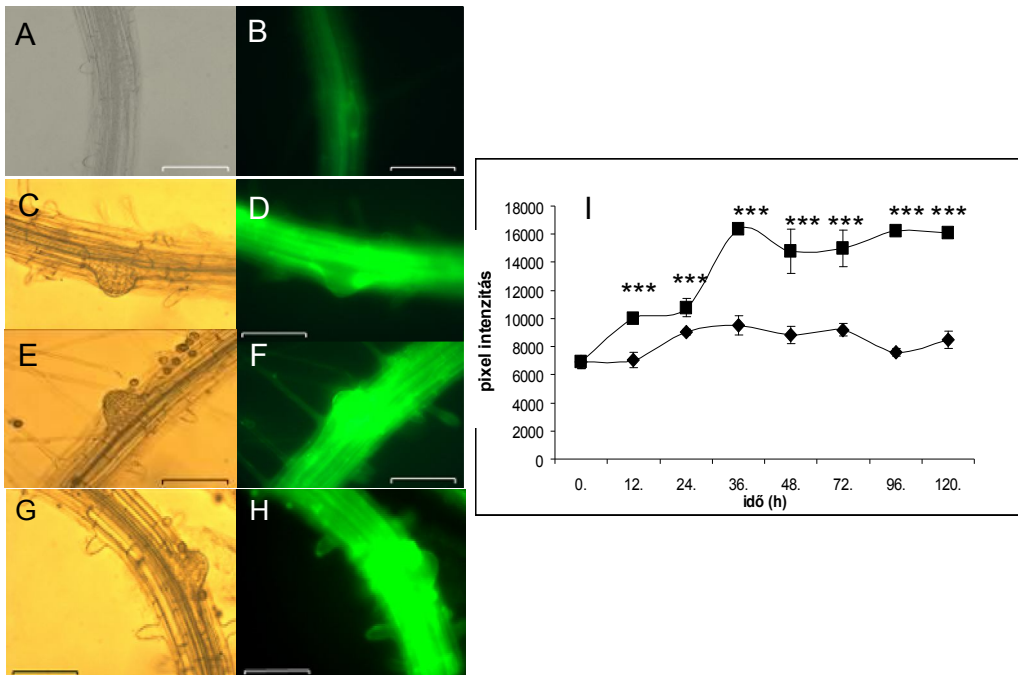
Polietilén glikol különböző koncentrációival kezeltünk búza növényeket (GK Öthalom fajta) és csakúgy, mint borsóban, ez esetben is kétfázisú NO felhalmozódást

tapasztaltunk. A kinetika viszont eltérő volt az előzőekben tapasztalttól, hiszen itt már a kezelést követő 1-2 órában jelentős mértékű NO képződést detektáltunk, ami a 6.-12. óra között kissé mérséklődött, majd a 12.óra után a NO produkció lassú szakasza kezdődött meg (16. ábra AB). A NO szövetspecifikusan keletkezett a gyökerekben, hiszen a 400 mOsm PEG kezelés a gyökércsúcsban nem, viszont az azt követő 0.5 mm-es szakaszon (merisztematikus zóna) okozott NO akkumulációt (16. ábra CD).

*Arabidopsis* növényekben vizsgálódva is megállapítható volt, hogy a PEG kezelés hatására történő NO képződésben 2 szakasz különíthető el: az első 12 órában jelentkező gyors NO akkumuláció, amit egy lag fázis követ a 12. és 24. óra között, majd a NO fluoreszcencia a 36. órára éri el a maximumát, ezután pedig a kísérlet végéig magas szinten marad (17. ábra).



**16. ábra** NO fluoreszcencia kontroll (◆), 50 mOsm PEG (■), 100 mOsm PEG (▲), 200 mOsm PEG (●) és 400 mOsm PEG (○)-kezelt búza gyökerekben (A, B). A NO szövetspecifikus felhalmozódása kontroll (C) búza gyökérben és 400 mOsm PEG kezelést követően (D). Mércse=1mm. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

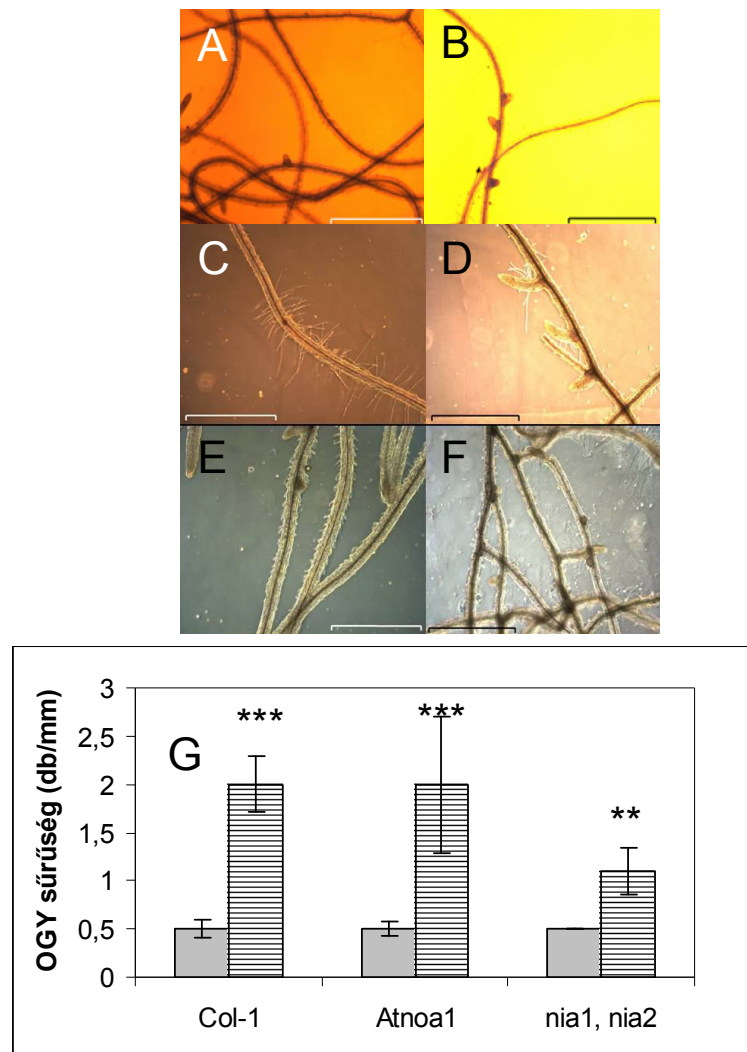


**17. ábra** A NO fluoreszcencia 0 óras (A,B), 24 óras (C,D), 72 óras (E,F) és 120 óras (G,H) 400 mOsm PEG kezelés után. „I” Fluoreszcencia intenzitás kontroll (♦) és 400 mOsm PEG-kezelt (■) *Arabidopsis* gyökerekben. Mércse=500  $\mu$ m. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

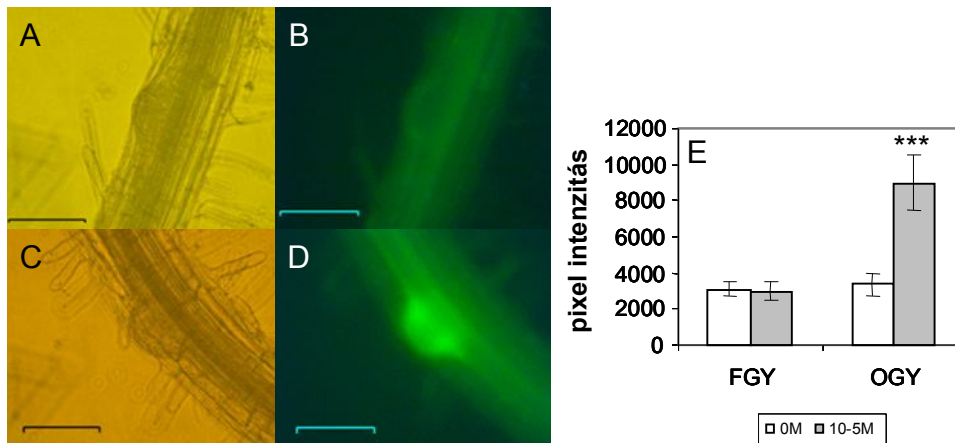
## V.8. Az IBA kezelés hatása *Arabidopsis thaliana* L. gyökerek szerkezetére és NO tartalmára

Ezen kísérleteinkhez a vad típus mellett (Col-1) használtuk az *Atnoa1* mutáns növényeket, valamint a NR-deficiens, dupla mutáns *nia1*, *nia2* növényeket. Kontroll körülmények között nem tapasztaltunk különbséget a vad típusú és mutáns *Arabidopsis thaliana* L. növények oldalgyökér sűrűsége között (18. ábra ACE). Tekintettel borsóval végzett kísérleteinkre az OGY képzés indukálására  $10^{-5}$  M IBA kezelést alkalmaztunk mindhárom növénycsoportban. Az auxin ezen koncentrációja 5

napos kezelés után a rövid iniciálisok sűrűségét ~ 4-szeresére növelte a vad típusban és az *Atnoa1* mutánsban a nem kezelt növényekhez képest (18. ábra ABCD). Az indol-3-vaajsav hatása csekélyebbnek mutatkozott a NR-deficiens mutánsban, itt ugyanis az OGY sűrűség növekedése a kontrollhoz viszonyítva csupán 2-szeres volt (18. ábra EF). A NO fluoreszcenciára vonatkozólag azt találtuk, hogy nincs különbség a vad típusú kontroll növények főgyökere és oldalgyökér iniciálisai között, míg az IBA-kezelt gyökerek szignifikánsan (~3-szor) nagyobb NO fluoreszcenciát mutattak a primordiumok területén (19. ábra).



**18. ábra** Kontroll (vad típus: A, *Atnoa1*: C, *nia1, nia2*: E) valamint  $10^{-5}$  M IBA-val kezelt (vad típus: B, *Atnoa1*: D, *nia1, nia2*: F) gyökerekről készült fénymikroszkópos felvételek. Mércse=1mm. Oldalgyökér sűrűség kontroll (szürke oszlopok) és  $10^{-5}$  M IBA kezelt (csíkos oszlopok) növényekben. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ).



**19. ábra** A Col-1 típusú *Arabidopsis* gyökér fénymikroszkópos (kontroll A,  $10^{-5}$  M IBA C) és fluoreszcens mikroszkópos (kontroll B,  $10^{-5}$  M IBA D) felvételei. Mércse=100  $\mu$ m. A NO felszabadulás relatív fluoreszcencia értékei a főgyökérben és az OGY primordiumokban a kontroll (fehér oszlopok) és a  $10^{-5}$  M IBA kezelés esetében (szürke oszlopok) (E). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

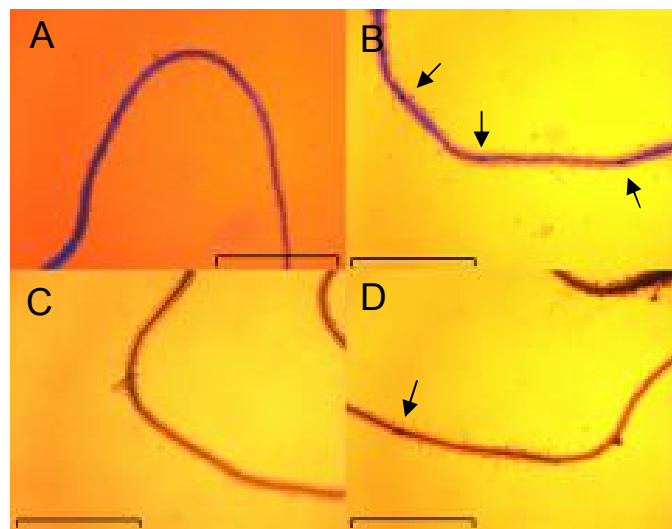
### V.9. Az IBA kezelés és a NO képződés kapcsolatának vizsgálata *pxal* mutáns *Arabidopsis* növények segítségével

Mivel irodalmi adatokból jelenleg nem világos, hogy az indol-3-ecetsav önmaga kifejti-e auxin hatást, vagy csupán az IAA mobil raktárának tekinthető, mely hormonhatással nem rendelkezik. Ezért felmerül a kérdés, hogy az oldalgökökerekben okozott NO produkció az IBA közvetlen hatása-e, vagy indol-3-ecetsavvá alakulása szükséges előfeltétele a NO képződésének.

A kérdés megválaszolására vad típusú (Col-0) és *pxal* mutáns *Arabidopsis thaliana* L. növényeket használtunk. Az utóbbi növénycsoport a peroxiszómális zsírsav  $\beta$ -oxidációban deficiens, vagyis nem történik meg bennük az IBA indol-3-ecetsavvá alakulása. Míg nagy koncentrációjú IBA ( $10^{-5}$  M) 7-szeres OGY sűrűséget

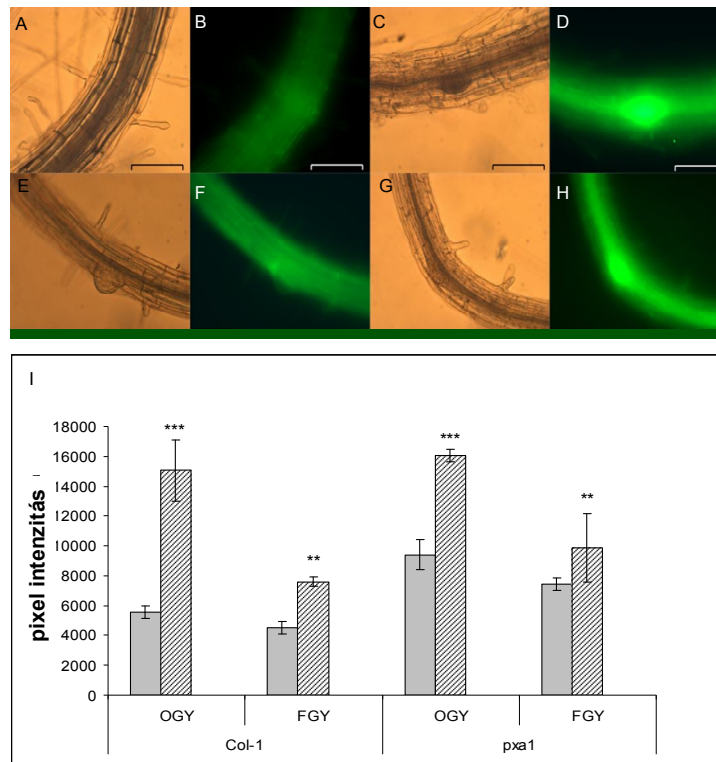


alakított ki a Col-0 növényekben, addig a *pxa1* növények oldalgyökér sűrűsége csupán ~ 4-szeresére nőtt a kezelés hatására (20. ábra). Kontroll állapotban a *pxa1* mutánsok nagyobb NO fluoreszcenciát mutattak fő- és oldalgyökereik területén a vad típusú növényekhez képest (21. ábra AB és EF).  $10^{-5}$  M IBA kezelés a vad-típushoz hasonló mértékben indukálta a NO képződését a *pxa1* növények oldalgyökér iniciálisaiban (21. ábra CD és GH).



E	OGY sűrűség (db/mm)	
	Col-0	<i>pxa1</i>
Kontroll	0,35 ± 0,15	0,33 ± 0,26
$10^{-5}$ M IBA	2,5 ± 0,707	1,37 ± 0,25

**20. ábra** Vad típusú (kontroll A,  $10^{-5}$  M IBA B) és *pxa1* (kontroll C,  $10^{-5}$  M IBA D) gyökerekről készült fénymikroszkópos felvételek. Mércse=1mm. A nyilak az OGY primordiumokat jelzik. OGY sűrűség kontroll, valamint IBA-kezelt vad típusú és *pxa1* mutáns növényekben (E).

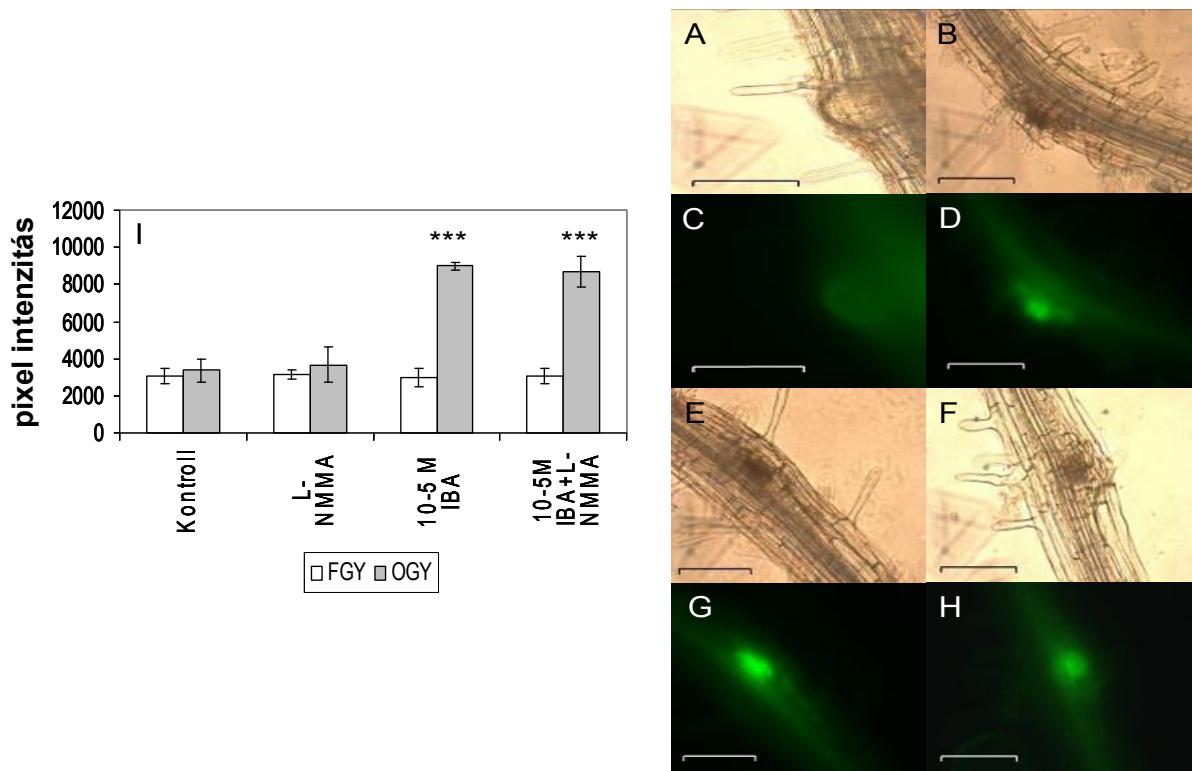


**21. ábra** Vad típusú (kontroll A,B;  $10^{-5}$  M IBA C,D) és *pxa1* (kontroll E,F;  $10^{-5}$  M IBA G,H) gyökerekről készült fény- és fluoreszcens mikroszkópos képek és a NO fluoreszcencia relatív értékei (szürke oszlopok: kontroll, csíkos oszlopok:  $10^{-5}$  M IBA) (I). Mércse=100  $\mu$ m. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

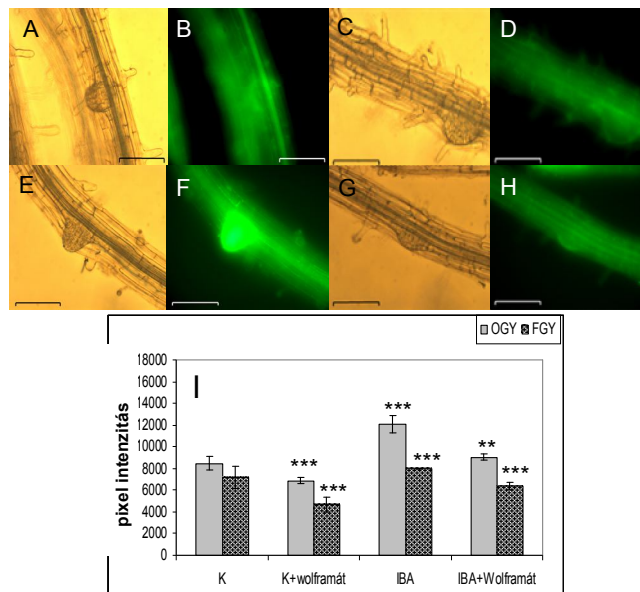
## V.10. Az IBA kezelés által indukált NO lehetséges enzimátikus forrásának biokémiai vizsgálata

A NO enzimátikus forrásának vizsgálatához vad típusú *Arabidopsis* növényeinket az IBA kezelés mellett az állati NOS enzim gátlószerével, az L-arginin analóg L-NMMA-val (1 mM), valamint a NR enzim gátló molibdén-analóg wolframáttal (1 mM) kezeltük, majd a NO fluoreszcenciát a kísérlet 120. órájában

detektáltuk. Mint a 22. ábrán látható, az L-NMMA nem volt hatással a NO fluoreszcenciára sem a kontroll sem pedig az auxin-kezelt gyökér iniciálisokban. Ezzel ellentétben a wolframát csökkentette a fő- és oldalgyökerek NO tartalmát a kontroll növények esetében. A helyzet hasonló volt az IBA-kezelt növényekben, ahol az exogén auxin által indukált NO fluoreszcenciát a wolframát kontroll szintre csökkentette. (23. ábra).



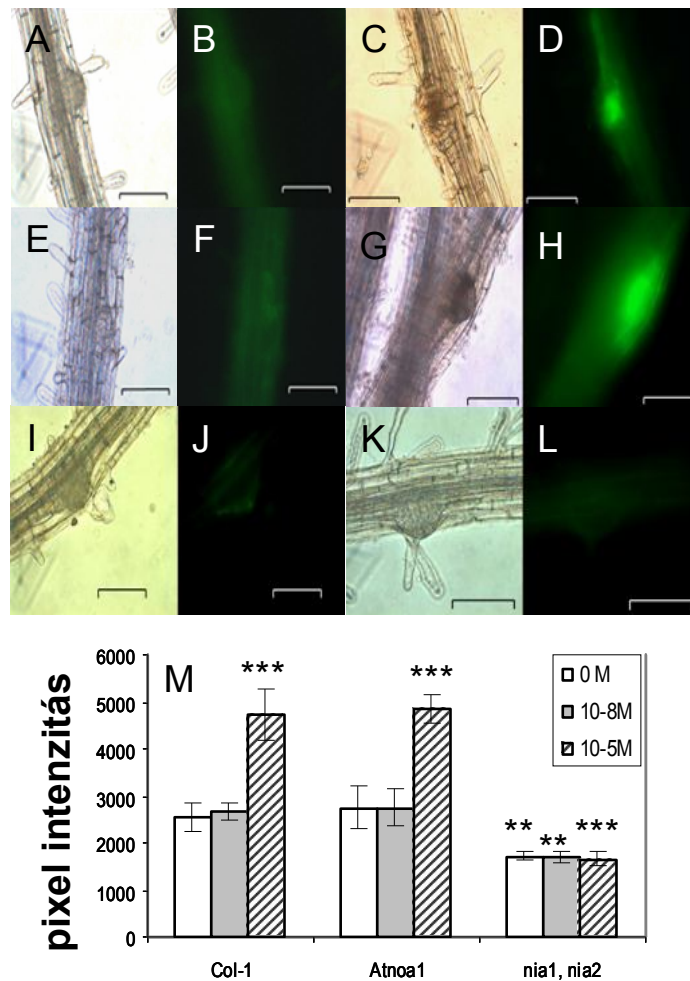
**22. ábra** Vad típusú *Arabidopsis* gyökerekről készült fénymikroszkópos (A,B,E,F) és fluoreszcens mikroszkópos (C,D,G,H) felvételek. Kontroll: A,C; L-NMMA: B,D; 10<sup>-5</sup> M IBA: E,G; 10<sup>-5</sup> M IBA+L-NMMA: F,H. Mércse=100 μm. Relatív NO fluoreszcencia értékek (I). A fehér oszlopok a főgyökerek, a szürke oszlopok az oldalgyökerek NO tartalmát mutatják. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.



**23. ábra** Kontroll (A,B), kontroll+wolframát (C,D),  $10^{-5}$  M IBA (E,F) és  $10^{-5}$  M IBA+wolframát (G,H) kezelt vad típusú *Arabidopsis* gyökerekről készült fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércé=100  $\mu\text{m}$ . „I” A NO fluoreszcencia relatív értékei a főgyökerekben (sötét szürke oszlopok) és az oldalgyökerekben (világos szürke oszlopok). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

### V.11. Az IBA kezelés által indukált NO lehetséges enzimátikus forrásának vizsgálata mutáns *Arabidopsis* növények segítségével

A biokémiai vizsgálatok után vad és mutáns *Arabidopsis* növények felhasználásával igyekeztünk alátámasztani a gátlószerekkel kapott eredményeket. A kontrollhoz képest a  $10^{-8}$  M IBA kezelés nem befolyásolta a NO fluoreszcenciát egyik *Arabidopsis* típusban sem, a  $10^{-5}$  M IBA viszont a NO produkció szignifikáns emelkedését okozta a vad típusú és az *Atnoal* mutáns növények oldalgyökér iniciálisaiban (24. ábra CD és GH). A  $10^{-5}$  M IBA-kezelt *nial1*, *nial2* mutáns gyökerek NO szintézise a kontroll növények szintje alatt maradt (24. ábra KL).

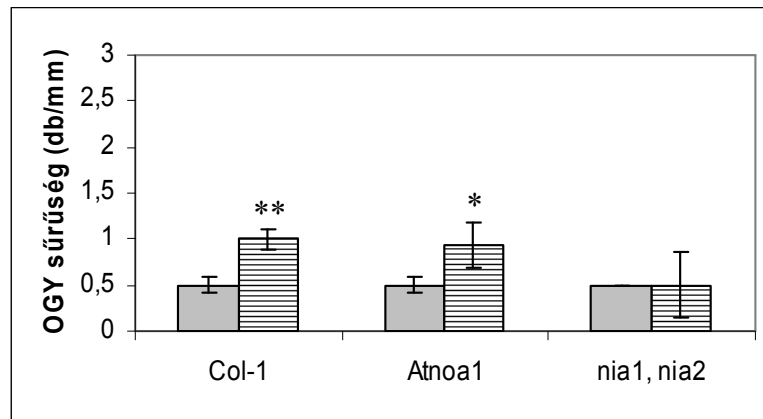


**24. ábra** Kontroll vad típusú (A,B), *Atnoa1* mutáns (E,F), *nia1*, *nia2* mutáns (I,J) valamint 10<sup>-5</sup> M IBA-kezelt vad típusú (C,D), *Atnoa1* mutáns (G,H) és *nia1*, *nia2* mutáns (K,L) *Arabidopsis thaliana* L. gyökerekről készült fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételek. Mércse=100 µm. Kontroll (0 M, fehér oszlopok), 10<sup>-8</sup> M (szürke oszlopok), 10<sup>-5</sup> M IBA (csíkos oszlopok) kezelt Col-1, *Atnoa1* mutáns és *nia1*, *nia2* dupla mutáns gyökerek NO fluoreszcencia értékei (M). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01, \*\*\*P ≤ 0.001). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

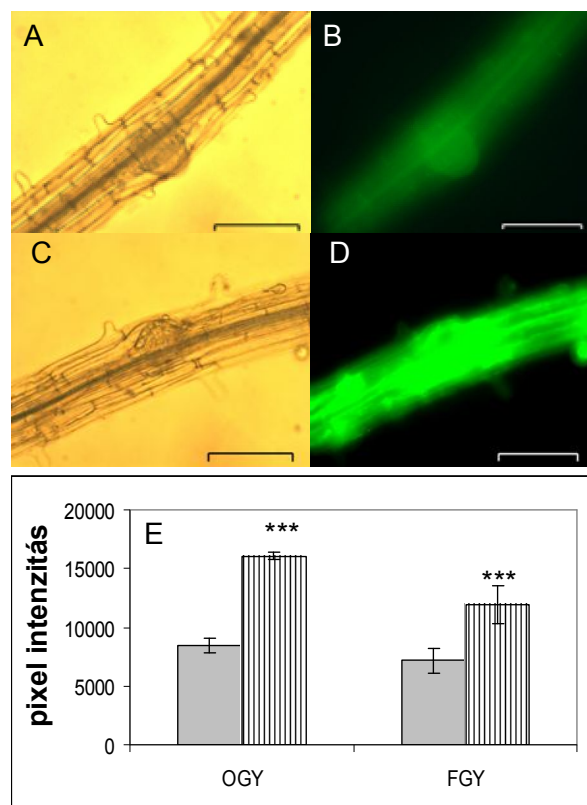
## V.12. Az ozmotikus stressz hatása *Arabidopsis thaliana* gyökerek szerkezetére és NO tartalmára

400 mOsm polietilén glikol kezelés kb. 2-szeres OGY sűrűséget eredményezett a kontrollhoz képest a vad típusú és az *Atnoa1* mutáns gyökerekben, ezzel ellentétben azonban a *nia1*, *nia2* mutáns nem mutatott PEG-indukálta OGY

fejlődést (25. ábra). Az 5 napos ozmotikus stressz kezelés jelentős NO felhalmozódást okozott a vad típusú növények fő- és oldalgyökereiben (26. ábra).



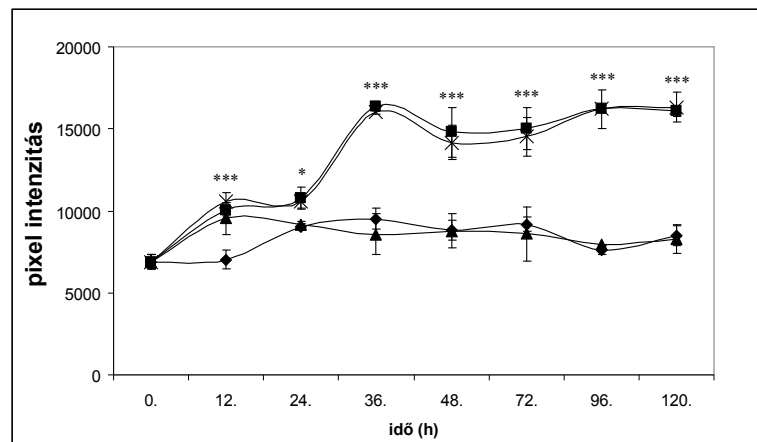
**25. ábra** Oldalgyökér sűrűség kontroll (szürke oszlopok) és 400 mOsm PEG-kezelt (csíkos oszlopok) vad típusú, *Atnoa1* valamint *nia1*, *nia2* mutáns növényekben. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ).



**26. ábra** Vad típusú *Arabidopsis* gyökerekről készült fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételek (kontroll: A,B; 400 mOsm PEG: C,D). Mércse=100  $\mu$ m. Relatív fluoreszcencia értékek kontroll (szürke oszlopok) és 400 mOsm PEG-kezelt (csíkos oszlopok) növények fő- és oldalgyökereiben (E). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

### V.13. Az ozmotikus stressz által indukált korai („stressz-NO”) valamint késői NO forrásának biokémiai és genetikai vizsgálata

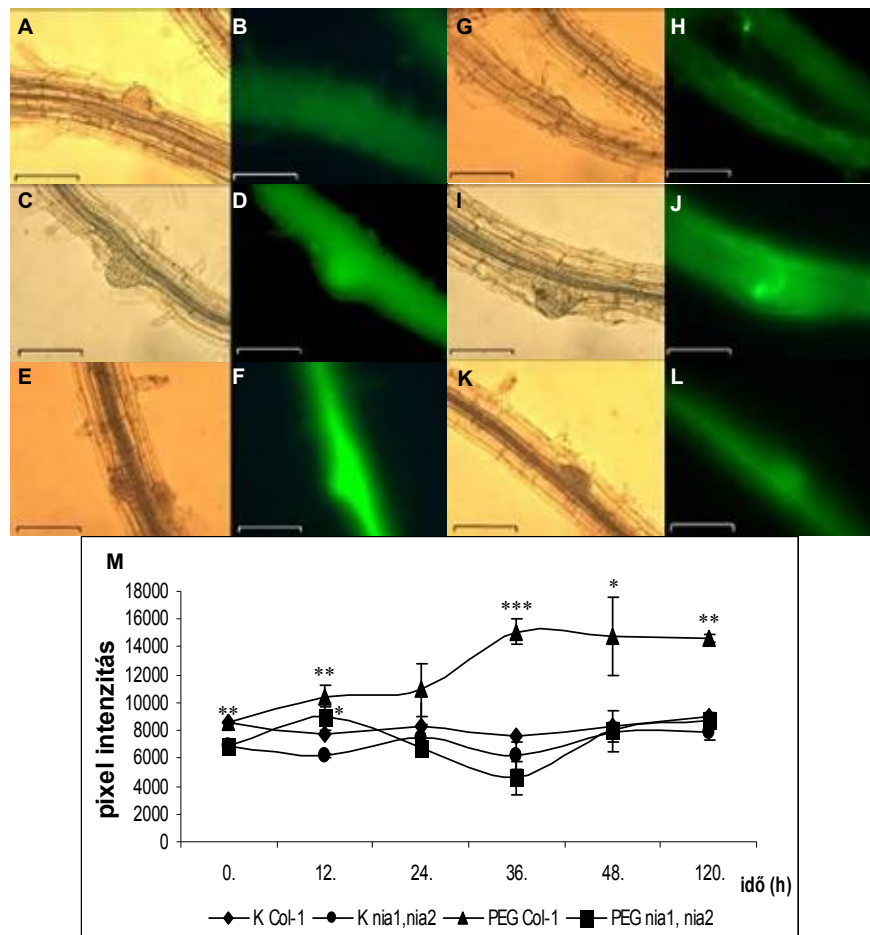
Mint azt az előzőekben láttuk (V.7. fejezet), a NO akkumuláció 2 fázisa jelen van PEG-kezelt *Arabidopsis thaliana* L. gyökerekben. Feltételezésünk szerint az első 12 órában megjelenő „stressz-NO” nem enzimatis úton keletkezik, míg a késői, lassabb, nagyobb mértékű NO képződés valamilyen enzim aktivitásához kötött folyamat lehet. Ezen hipotézisünk tesztelésére vad típusú növényeinket L-NMMA-val, valamint wolframáttal kezeltük az ozmotikum mellett. A NO felhalmozódást az L-NMMA kezelés nem befolyásolta egyik időpontban sem. A kísérlet további részében a PEG +wolframát-kezelt gyökerek kontroll szintű NO tartalmat mutattak (27. ábra).



**27. ábra.** A NO fluoreszcencia relatív értékei kontroll (◆), 400 mOsm PEG (■), 400 mOsm PEG+L-NMMA (×), 400 mOsm PEG+wolframát (▲) kezelt gyökér mintákban. A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

Ezek mellett az idő függvényében detektáltuk a NO tartalmakat vad típusú és *nia1*, *nia2* mutáns *Arabidopsis* gyökerekben. Előbbi növénycsoport esetén a gyökerekben kétfázisú NO akkumulációt tapasztaltunk az ozmotikus stressz hatására. A kezelés nélküli NR-deficiens gyökerekben a NO szintje a kísérlet során mindvégig

a vad típusú gyökerekhez képest alacsonyabb értékeket mutatott (28. ábra M). A PEG-kezelt mutáns gyökerekben megjelent a tranziens NO akkumuláció a kezelés első 12 órájában, ezután azonban a vad típusú gyökerekben tapasztalt nagymértékű, késői NO felszabadulás elmaradt (28. ábra).

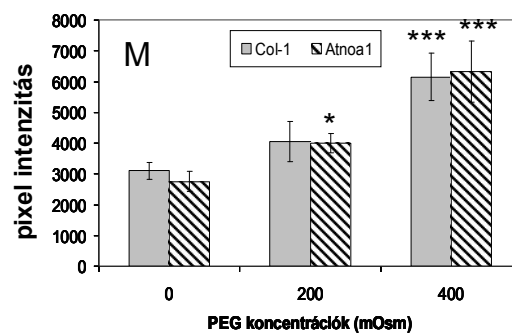
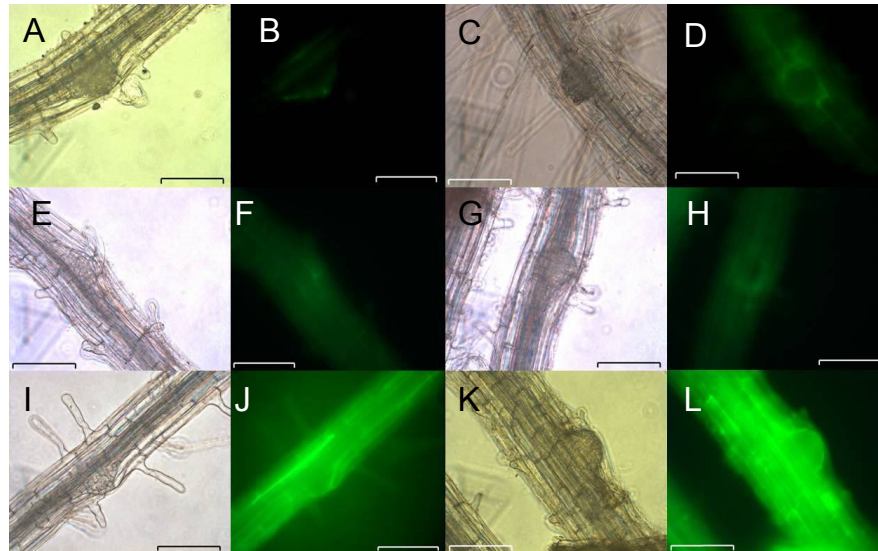


**28. ábra** Vad típusú (Col-1) és *nia1*, *nia2* mutáns *Arabidopsis* gyökerekről készült fény-és fluoreszcens mikroszkópos felvételek kezelés előtt (Col-1: AB; *nia1*, *nia2*: GH), 12 órás (Col-1: CD; *nia1*, *nia2*: IJ) és 120 órás (Col-1: EF; *nia1*, *nia2*: KL) 400 mOsm PEG kezelés után. A fluoreszcencia relatív értékei kontroll (Col-1 ◆; *nia1*, *nia2* ●), 400 mOsm PEG (Col-1 ▲; *nia1*, *nia2* ■) kezelt mintákban (M). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

A PEG-indukálta NO képződését megvizsgáltuk az *Atnoal* mutáns növények gyökerében is, és a NO akkumuláció megjelenését tapasztaluk ozmotikus stressz hatására (29. ábra CD GH KL), csakúgy, mint a vad típusú gyökerekben (29. ábra AB



EF IJ), vagyis a PEG ezen növénycsoport esetében is képes volt a NO szintézis indukálására.



**29. ábra** Kontroll (A,B), 200 mOsm (E,F) és 400 mOsm (I,J) PEG-kezelt vad típusú gyökek valamint kontroll (C,D), 200 mOsm (G,H) és 400 mOsm (K,L) PEG-kezelt *Atnoa1* mutáns gyökek fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételei. Mércse=100  $\mu$ m. Vad típusú (szürke oszlopok) és *Atnoa1* mutáns (csíkos oszlopok) gyökerekben detektált relatív NO fluoreszcencia értékek (M). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket 10-es filter kombináció felhasználásával készítettük (exc.: 450-490 nm; em.: 515-565 nm). A statisztikailag szignifikáns különbségeket egy, kettő illetve három csillaggal jelöltük (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). Az y tengelyen feltüntetett DAF-2T fluoreszcencia pixel intenzitás értékei a NO szintet jelzik.

## VI. Eredmények értékelése

### VI. 1. Az exogén auxin és az ozmotikus stressz hatása a gyökérzet fejlődésére és NO tartalmára

A gyökérrendszer fejlődését a belső, főként hormonális és sejtciklus szabályozó faktorok mellett a környezeti tényezők is befolyásolják, melyek közül a legmarkánsabb hatású a vízstressz és a tápanyag-ellátottság (Nibau és mts. 2008). A szerkezet felépítésében az oldalgökér iniciálisok száma és sűrűsége, valamint a főgyökér hossza a lényegi paraméterek, melyeket ún. “belső” és “válasz” útvonalak szabályoznak (Malamy 2005). Ebben a tanulmányban egy környezeti faktor (ozmotikus stressz) és egy specifikus belső regulátor (auxin) hatását vizsgáltuk a főgyökér megnyúlására és az oldalgökerek fejlődésére. Habár korábbi munkák bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozólag, hogy a NO az auxin által indukált oldalgökér fejlődésben szignálmolekulaként szerepel (Pagnussat és mts. 2002, Correa-Aragunde és mts. 2004, 2006), munkánk során további részleteket dolgoztunk ki, valamint különbségeket találtunk a NO keletkezésében az ozmotikus stressz és külső auxin által indukált gyökérnövekedés és fejlődés során.

Az irodalomban számos kritika merült fel a DAF festékcsalád használhatóságával, specificitásával kapcsolatban (Broillet és mts. 2001, Zhang és mts. 2002). Ezért elsőként a NO detektálására általunk használt fluoreszcenciás módszer alkalmazhatóságát igazoltuk. A gyökerek endogén alap NO szintjét donor és/vagy gyökfogó kezelésekkel befolyásoltuk, és azt találtuk, hogy a DAF-2T fluoreszcencia a gyökerek NO tartalmának függvényében változott. A DAF-2DA-val festett gyökerekhez képest a 4AF-DA festés igen jelentéktelen fluoreszcenciát eredményezett. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy kísérleti rendszerünkben a DAF-

2DA használható a NO detektálására, hiszen a DAF-2T fluoreszcencia a NO jelenlétéhez köthető.

Vízstressz során a gyökerek megnyúlása általában erősen gátolt, bár enyhe ozmotikus stressz képes stimulálni a növekedést (van der Weele és mts. 2000). Újabb vizsgálatok rámutattak arra, hogy a növények környezeti hatásokra adott növekedési válaszaiban kulcsfontosságú az oxidatív stressz és az auxin közötti kölcsönhatás, ami megváltozott auxin transzportot, így módosult növekedést és fejlődést eredményez (Pasternak és mts. 2005). A saját kísérleteinkben kapott eredményeink, nevezetesen a növekvő ozmotikus stresszre és külső auxinra adott gyökérfejlődési válaszok hasonlósága az előbbi elképzelést támasztják alá (8. és 9. ábra). Mindkét kezelés esetében, a főgyökér hosszának csökkenése elérte a kontroll gyökérhossz kb. 50%-át, az oldalgökér szám növekedése ozmotikus stressz hatására pedig 180%-os, míg a legmagasabb IBA koncentrációnál kb. 280%-os volt.

Az ozmotikus stressz és az auxin hatására kialakult gyökérfejlődési sajátosságok ellenére, jelentős különbség volt tapasztalható a NO produkció intenzitásában: míg a  $10^{-5}$  M IBA koncentrációval kezelt gyökerekben 3-szoros, az ozmotikus stressznek kitett gyökerekben 14-szeres NO szint növekedést mértünk a 400 mOsm-os PEG 6000 koncentrációnál (-0.98 MPa). Az oldalgökerek iniciációjával párhuzamosan mindkét esetben a NO produkció intenzív növekedése volt detektálható. Köztudott, hogy az auxin kis koncentrációban elősegíti a főgyökér megnyúlását, míg egy határkoncentráció elérése után az oldalgökerek keletkezését indukálja (Torrey 1950, Hinchee és Rost 1986, Casimiro és mts. 2001). A mi kísérleti rendszerünkben az exogén auxint (IBA) széles koncentráció tartományban ( $10^{-9}$  M- $10^{-3}$  M) alkalmaztuk. Habár az indol-3-vajsavat leggyakrabban járulékos gyökeresedés vizsgálatára használják, mi mégis ezt alkalmaztuk IAA-nál nagyobb stabilitása miatt,

valamint azért, mert a borsó gyökerekben természetesen is előforduló auxinforma (Schneider és mts. 1985). A széles koncentráció tartományban exogén módon alkalmazott IBA lehetővé tette gyökernövekedésre- és fejlődésre irányuló kettős hatásának vizsgálatát: az IBA alacsony koncentrációi ( $10^{-9}$  M- $10^{-8}$  M) a FGY megnyúlásnak kedveztek, melyet nem követett NO felszabadulás, míg a magasabb IBA koncentrációk ( $10^{-7}$  M- $10^{-3}$  M) az OGY fejlődésért és a NO keletkezés indukálásáért voltak felelősek. Az oldalgyökér szám emelkedése és az auxin koncentráció között egyenes arányosság volt megállapítható, ezzel ellentétben a NO fluoreszcencia a  $10^{-5}$  M-os IBA kezelésnél mutatott maximumot; az ennél nagyobb ( $10^{-4}$  M és  $10^{-3}$  M) IBA koncentrációval kezelt gyökerekben az OGY szám tovább nőtt, bár alacsonyabb NO fluoreszcenciát detektáltunk a gyökerekben. Ennek magyarázata az lehet, hogy az exogén auxin ilyen magas koncentrációi egy NO részvétele nélküli utat indukálnak. Például az irodalomban találunk eredményeket arra vonatkozólag, hogy magas auxin koncentrációk az etilén szintézisét okozzák, amely alacsony szintje kiváltja az OGY primordiumok képződését (Hansen és Grossmann 2000, Ivanchenko és mts. 2008). A 10. ábra illusztrálja a NO keletkezés lokalizációjának és intenzitásának különbségeit ozmotikus stressz és auxin kezelés alatt a főgyökér keresztmetszetekben. Az exogén auxin valamint a gyökerek NO produkciója és szerkezetbeli módosulása közötti kapcsolat vizsgálata céljából a borsó növényeket nagy IBA koncentrációjú ( $10^{-5}$  M) oldatból alacsony IBA koncentrációjú ( $10^{-8}$  M) közegbe helyeztük át és a NO fluoreszcencia csökkenését valamint a rövid iniciálisok megnyúlását tapasztaltuk. A NO tartalom növekedett, és a főgyökereken új primordiumok jelentek meg fordított kezelés esetén (11. ábra). Ez azt mutatja, hogy a gyökerekben a NO képződése, az auxin tartalom (ezt exogén IBA kezeléssel

módosítottuk), valamint a gyökérmorfológiai változások között szoros fiziológiai kapcsolat van.

Az ozmotikus stressz kezelés hatására kialakult gyökérszerkezet hasonló volt ahhoz, amit IBA kezelés esetén tapasztaltunk. Az irodalomból tudható, hogy stressz körülmények között az auxin akropetális transzportja az uralkodó (Potters és mts. 2007), ezért felmerül a kérdés, hogy az ozmotikus stressz során akropetálisan transzportálódó auxin felelős-e a megnövekedett OGY fejlődésért és NO képződésért. Kísérletünkben az auxin poláris transzportját gátló naftilftálsavat alkalmaztuk, és az OGY szám, valamint a NO szint csökkenését kaptuk, míg a FGY megnyúlására ez a kezelés gyakorlatilag nem hatott. Az NPA OGY fejlődésre gyakorolt relatív csekély hatását azzal a ténnyel magyarázhatjuk, hogy az NPA nem gátolja az IBA transzportját (Rashotte és mts. 2003). Az eredmények azt is mutatják, hogy kis mértékben bár, de az IAA is felelős lehet az OGY képzésért borsóban. A NO produkció NPA általi gátlása ozmotikus stressz körülmények között kifejezettebb volt, ami véleményünk szerint annak tudható be, hogy a PEG kezelés hatására a gyökér indol-3-ecetsav tartalma növekszik, mint ahogy azt Ribaut és Pilet (1994) kimutatták kukorica gyökerében. A megváltozott IAA szint érzékeny az NPA kezelésre, hatással van a NO képződésre és az OGY indukcióra.

Megvizsgálva az auxin szignalizáció és a NO jelmolekula kapcsolatát az OGY fejlődésben láthatjuk, hogy kísérletes bizonyítékok rendelkezésre állnak ebben a témakörben. Az oldalgökér iníciáció első lépése az auxin-mediált sejtciklus aktiváció (Himanen és mts. 2002), mely folyamatot a NO segíti lucerna sejtkultúrában (Ötvös és mts. 2005). Correa-Aragunde és mts. (2004, 2006) oldalgökérfejlődést kísérő NO képződést írtak le paradicsomban. Ezeket az eredményeket alapul véve vizsgáltuk a gyökeresedési folyamat és a NO felszabadulás időbeli alakulását, és azt találtuk, hogy

a  $10^{-5}$  M IBA OGY számra és NO fluoreszcenciára gyakorolt hatása a kezelés 48. órája után jelentkezett. Az auxin-indukált NO szintézis és oldalgökér indukció hasonló időbeli alakulása arra enged következtetni, hogy ezen folyamatok között funkcionális kapcsolat van (13. ábra). Ezt a feltételezést alátámasztja az az eredményünk is, hogy a NO produkció szorosan kapcsolódik az auxin koncentrációhoz (11. ábra).

Az ozmotikus stressznek kitett és az IBA-kezelt gyökerekben a NO keletkezés időfüggése jelentős különbséget mutatott, mert az előbbi növénycsoportban az iniciálisok megjelenését egy tranziens NO felszabadulás előzte meg (13. ábra). Az ozmotikus stressz által indukált NO felszabadulás e korai fázisa -mely a kezelés 24. órájában tetőzik- világosan elkülöníthető volt az OGY iniciációt kísérő NO produkciótól.

Feltehetően a korai NO tranziens és a későbbi, állandó NO forrása és szerepe különbözik. Ez utóbbi NO keletkezés a kezeléseket 48. órája után indukálódott, mikor a tranziens már lecsökkent. A korai NO képződés kinetikája vélhetően forrásának a függvénye lehet. A PEG által indukált kétfázisú NO felhalmozódás (korai, ún. „stressz-NO” és késői NO) borsó mellett búza és *Arabidopsis* növények gyökerében is detektálható volt, ami arra utal, hogy a jelenség nem fajspecifikus, hanem általános jellegű. Rendkívül korai, 30 másodperc alatt megjelenő NO robbanást detektáltak  $Fe^{2+}$ -kezelés hatására *Arabidopsis*-ban, melyet az *ATFer1D* gén expressziója előz meg (Arnaud és mts. 2006). Lassabb, korai NO tranzienszt írtak le gomba elicitor által indukált folyamatban, mely a kezelés után 5 órával mutatott maximális értéket, és ezt szalicilsav (salicylic acid, SA) akkumuláció előzte meg (Xu és mts. 2006). Hasonló, tranziens NO produkció volt tapasztalható 24 órával búza növények sárgarozsdával (*Puccinia striiformis*) való fertőzése után (Guo és mts. 2004). Nemcsak

stresszfaktorok, hanem más növényi hormonok is indukálhatnak gyors NO képződést, mint ahogy azt publikálták poliaminok, citokininek és SA esetében (Tun és mts. 2001, 2006; Zottini és mts. 2007). Amikor az ozmotikus stressz-indukált NO képződést cPTIO-val elimináltuk, a kontrollhoz és az ozmotikus stressznek kitett gyökerekhez képest csökkent oldalgökér számot kaptunk, ami arra utal, hogy a "stressz-NO" szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgökér fejlődéshez. Ezen eredmények a NO különböző forrásaira és a szignáltranszdukciós utakban elfoglalt különböző lokalizációjára utalnak, ugyanis a NO a stressz válaszok korai lépéseiben szerepel, melyet a különböző útvonalak specifikációja előz meg.

Abiotikus stresszorok, mint például az ozmotikus hatások, másodlagos, oxidatív stresszt okoznak a növényekben. A növények e körülmények között mutatott növekedési válaszaik a megváltozott auxin transzportnak köszönhetően módosulnak (Pasternak és mts. 2005). Innen adódhat a hasonlóság az ozmotikus stressz és az IBA kezelés által kialakított gyökérstruktúrák között (8B és 9B ábra). Valószínűsíthető, hogy a stressz indukálta morfogenetikai válaszokat a növényen belüli auxin eloszlás szabályozza és a stressz, valamint a morfogenetikai válaszok közötti szignalizációban a reaktív oxigénformák is részt vesznek (Potters és mts. 2007). A mi kísérleteinkben a tranziens módon akumulálódó NO egy stresszválaszként fogható fel, mely modulálhatja a gyökér auxin szintjét és/vagy a gyökérsejtek auxin érzékenységét, ami végső soron fokozott OGY képződéshez vezet. Eme általunk hipotetizált folyamatnak nagy jelentősége lehet a szárazságstressz alatti fenotipikus adaptációban.

Az indol-3-vaajsav számos növényfajban (borsó, kukorica, dohány, lúdfű) természetesen előforduló auxin. Ludwig-Müller és mts. (1995) eredményei szerint ozmotikus stressz alatt az IBA-szintetáz enzim aktivitásának fokozódása révén IAA→IBA reakció történik. Ezzel ellentétben Zolman és mts. (2001) azonosítva egy

IBA-inszenzitív *Arabidopsis* mutánst (*pxa1*), azt találták, hogy az IBA-ból származó IAA felelős az oldalgöckerfejlődésért. Az ellentmondónak tűnő eredmények tekintetében jelenleg nem tisztázott, hogy az IBA IAA-n keresztül hat-e, vagy önálló auxin hatással rendelkezik. Ez a kérdés a saját kísérleti rendszerünkben is jelentőséggel bír, vagyis, hogy az OGY primordiumokban tapasztalt NO felhalmozódás az IBA közvetlen hatása-e, vagy sem. A munkánk során alkalmazott *pxa1* mutáns gyökerek kontroll állapotban a vad típusnál magasabb NO tartalmat mutattak, ami abból adódhat, hogy több IBA-t tartalmaznak (erre vonatkozó adat jelenleg nem áll rendelkezésre), mivel ezekben a növényekben nem történik meg az IBA IAA-vá való átalakulása.  $10^{-5}$  M IBA-val történő kezelés a vad típusú és a mutáns gyökerekben is a NO fluoreszcencia fokozódását okozta, ami arra enged következtetni, hogy a NO szintézisének indukálásához nincs szükség az IBA átalakulására IAA-vá. Vagyis az IBA önállóan, IAA-tól függetlenül eredményezi a NO produkció fokozódását.

## **VI. 2. Az auxin-valamint az ozmotikus stressz indukálta NO lehetséges enzimatis forrása**

A nagy mennyiségű aktuális irodalomból körvonalazódik, hogy a NO növényélettani folyamatok tucatjaiban szerepel, az abiotikus és biotikus stressz válaszoktól a növekedés és fejlődés szabályozásáig. Kevés információnk van azonban a NO forrására vonatkozóan. A 2000-es évek elején enzimatis eredetének két útja volt elfogadott: a citoplazmikus nitrát reduktáz és a plazmamembrán kötött NR. Mindkét enzim nitrit képződését katalizálja, ami a Ni:NOR enzim reakciója által alakul NO-dá. A másik enzim, aminek NO-ot képző funkciót tulajdonítottak, a NOS



(Barroso és mts. 1999, Neill mts. 2003, Stöhr és Ullrich 1997, Stöhr és mts. 2001, Stöhr és Stremlau 2006). Habár a növényekben nincs bizonyíték az emlősökéhez hasonló NOS jelenlétére, különböző NOS-szerű enzimeket azonosítottak az elmúlt években. A kép még inkább zavarossá vált, mikor napvilágot látott Crawford és mts. (2006a) és Zemojtel és mts. (2006) vitája a növényi AtNOS1 létezését illetően. Azt a következtetést vonták le, hogy az AtNOS1 valószínűleg direkt vagy indirekt úton szerepel a NO szintézisében és felhalmozódásában, és a gént átnevezték “NO-associated1” (AtNOA1)-nek. Az új név gyors elfogadásra került: újabban kimutatták, hogy a NOS-szerű enzim (NOA1 fehérje) szerepel a só tolerancia módosításában *Arabidopsis*-ban (Zhao és mts. 2007). Annak ellenére, hogy Crawford és mts. (2006) megállapították, hogy eredményeik továbbá nem helytállóak, miszerint az AtNOS1 egy arginin-függő NOS enzim, kiderült, hogy a NOA1 fehérje N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin (L-NNA) érzékeny (Zhao és mts. 2007). Újabban az AtNOA1 gén termékéről kiderült, hogy egy cGTP-áz, ami közvetlen módon nem vesz részt a NO szintézisében.

Lamattina és csoportja több jelentős munkájában (Pagnussat és mts. 2002, 2003; Correa-Aragunde és mts. 2004; 2006) megjegyezte, hogy a NO-nak és az IAA hormonnak vannak közös lépéseik az auxin által indukált járulékos- és oldalgyökér fejlődés felé vezető szignáltranszdukciós kaszkádban. E publikációk megszületésekor még kevés információ volt elérhető a NO forrására vonatkozólag; ők azt feltételezték, hogy a Ni:NOR a NO-ot szintetizáló enzim, melyet az IAA transzkripcionális vagy poszttranszkripcionális úton szabályoz (Lamattina és mts. 2003).

Mivel a NR indukálható enzim, bizonyos körülmények közötti aktivitás növekedése eredményezheti a NO produkció megnövekedését, ami az új oldalgyökerek fejlődéséhez járul hozzá. Egyesek elfogadhatónak vélik, hogy a NR NO forrásként szolgál az oldalgyökér fejlődés folyamatában. Bár úgy tűnik, hogy

különböző NO források kapcsolhatóak különböző célpontokhoz. Az auxin-mediált sejtosztódás aktivációja és az embriogenetikus sejtek képződése során L-NMMA szenzitív NO képződést találtak (Ötvös és mts. 2005). *Nia1*, *nia2*, *Atnos1* mutánsokat valamint L-NMMA-t használva *Arabidopsis* gyökerekben, leírták, hogy a NO keletkezésében egy NOS-szerű enzim játszik szerepet (Zottini és mts. 2007). Flores és mts. (2008) arginin-amidohidroláz génben mutáns (*argah1-1* és *argah2-1*) *Arabidopsis* növények vizsgálata során arginin-függő NO szintézis meglétét valószínűsítették a gyökérben. Ez utóbbi megállapítás ellentétesnek tűnik saját kísérleteink eredményeivel. A Flores és mts. (2008) által használt *Arabidopsis* növények kora, valamint az általuk alkalmazott kezelések lényegesen eltérnek a mieinktől, ezért éles összehasonlítást nem célszerű tenni eredményeink között. Emellett azonban megjegyezzük, hogy nem zárkozunk el attól a hipotézistől sem, miszerint a NO-nak több különböző forrása is lehetséges ugyanazon sejten belül, illetve, hogy ez sejttípustól, növényfajtól, a szintézist indukáló tényezőtől, vagy akár a növény életkorától és a nevelési körülményektől függően változhat.

Egy korábbi tanulmányból (Correa-Aragunde és mts. 2004) tudható, hogy a NO alap szintje szükséges a normál OGY képzéshez paradicsomban. Kísérleteink során -melyek eredményei jelen értekezésben nem kerültek tárgyalásra- ez előbbi irodalmi adattal megegyező eredményre jutottunk borsó és *Arabidopsis* gyökerekben vizsgálódva, miszerint a NO eltávolítása (1 mM cPTIO) csökkentette, NO donor kezelés (1 mM SNAP) növelte az oldalgökerek számát.

Annak érdekében, hogy megtaláljuk a NO forrását, a legtöbb lehetőséget megvizsgáltuk genetikai és farmakológiai eszközök felhasználásával. Mivel a NR az egyik legáltalánosabban elfogadott enzim a NO forrásai között, a szerepének tisztázására a molibdén analóg wolframátot, mint gátlószert, valamint a NR-deficiens

*Arabidopsis* dupla mutánst, a *nia1*, *nia2*-t használtuk (Wilkinson és Crawford, 1993). Az előzőekben tárgyalt bizonytalanság ellenére munkánk során feltételeztük, hogy a különböző NOS-szerű enzimek képezhetnek NO-ot a növényi rendszerekben, ezért az állati, arginin-függő NOS enzimek gátlószerét (L-NMMA), valamint az *Atnoal* mutánst használtuk.

A NR szerepéről az IBA-indukált NO szintézisben az L-NMMA hatástalansága, valamint a wolframát kezelés NO szintet csökkentő hatása tanúskodott (22. és 23. ábra). Meg kell jegyezni, hogy az L-NMMA a gyökerek alap NO szintjét nem befolyásolta, a wolframát viszont azok NO tartalmát csökkentette. A mutások különböző NO szinteket mutattak a kontroll állapotukban (auxin kezelés nélkül). A *nia1*, *nia2* mutáns esetében a másik két növénycsoportnál alacsonyabb NO fluoreszcenciát detektáltunk, ami a gyökerekben NR-függő NO szintézis meglétére utal (24. ábra). Azt is meg kell jegyezni azonban, hogy a *nia1*, *nia2* mutáns a vad típushoz hasonló OGY számot mutatott kontroll állapotban, ami valószínűsíti, hogy a mutánsban a csökkent NO szint is elégséges a normál OGY iniciációhoz.

Világosan bemutattuk, hogy az exogén IBA képes volt a NO szintézis indukálására a vad típusú és az *Atnoal* növényekben, de teljesen hatástalan volt a NR-deficiens mutánsban (24. ábra). Ezen eredmények összessége alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a NR enzim kulcsszerepet tölt be a NO szintézisében az *Arabidopsis* gyökerekben kontroll körülmények között és exogén auxin kezelés hatására.

Az ozmotikus stressz oldalgyökér fejlődést indukáló hatását azonosítottuk borsó mellett *Arabidopsis*-ban is. Meg kell jegyezni, hogy sajátjainkkal ellentétes eredmények is vannak, miszerint az oldalgyökerek száma szignifikánsan és folyamatosan csökkent agar táptalajon nevelt *Arabidopsis* növények esetében PEG

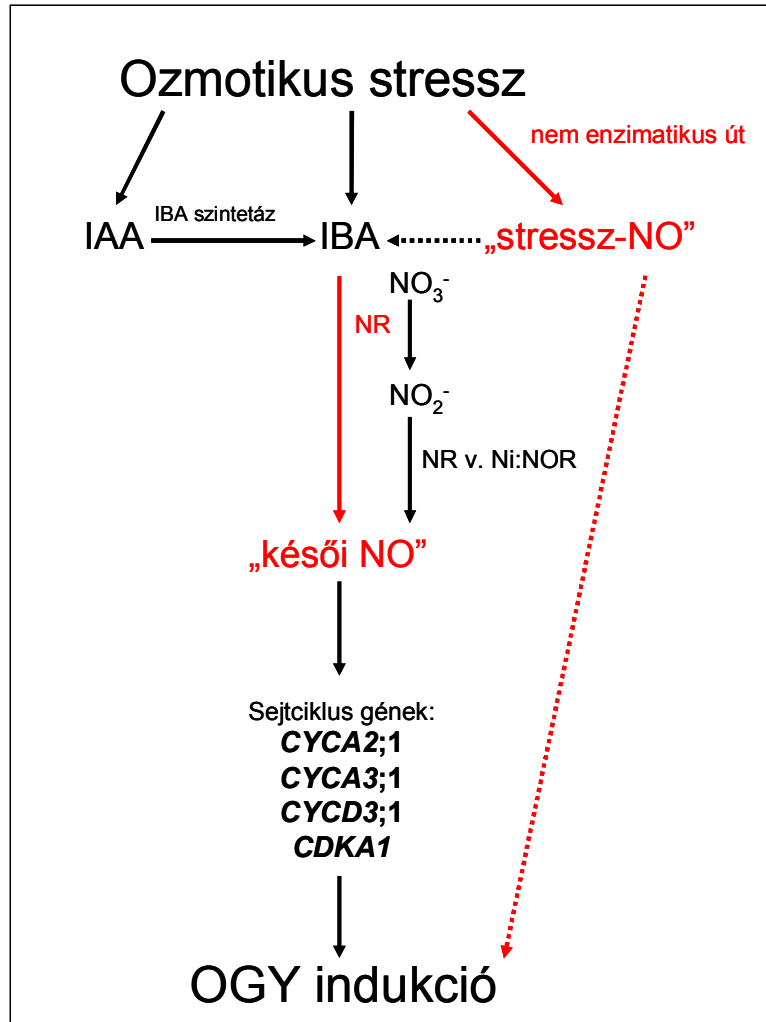
8000-rel kiváltott ozmotikus stressz hatására (van der Weele és mts. 2000). Fontos megjegyezni azt is, hogy az általunk tapasztalt hatás csak abban az esetben jelentkezett, amikor a növényeket tápoldatban nevelve kezeltük. Ha az ozmotikumot szilárd MS tápoldaton alkalmaztuk, nem tapasztaltuk az OGY fejlődés indukcióját.

Az ozmotikus stressz által kiváltott NO képződésnek két szakaszát találtuk *Arabidopsis* gyökérben is, ezért külön kellett tanulmányoznunk a korai („stressz-NO”) és a késői NO forrását. Az idő függvényében vizsgálódva azt láttuk, hogy az L-NMMA nem gátolta az ozmotikus stressz-indukált NO produkciót egyik időpontban sem. A PEG+wolframát-kezelt gyökerekben a NO felszabadulás korai fázisa megjelent, azonban a késői NO szintézis teljesen gátolt volt (27. ábra). Ezzel egybehangzó eredményt kaptunk *nia1*, *nia2* mutáns gyökerekben, ahol a stressz-NO detektálható volt a PEG-kezelés hatására, a későbbi NO keletkezés azonban elmaradt (28. ábra). Ezen vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy az ozmotikus stressz által indukált korai és késői NO forrása különböző: a gyorsan indukálódó „stressz-NO” képződésében sem a NOS-szerű enzim, sem a NR nem vesz részt. Tehát feltehetően a korai NO tranziens nem enzimatiszintézisúton képződik. A második fázisban felhalmozódó NO azonban enzimaktivitás útján képződik. Ebben a folyamatban a NOS-szerű enzim nem, a NR azonban közvetlenül vagy közvetve részt vesz.

Eredményeink összefoglalása céljából egy általunk készített modellben mutatjuk be a NO ozmotikus stressz-indukált oldalgökér fejlődésben betöltött szerepére vonatkozó hipotézisünket (30. ábra). Környezeti stresszhatások megváltozott auxin transzportot eredményeznek a növényben, ami gyökérmorfológiai változásokhoz, így fenotipikus akklimatizációhoz vezet (Potters és mts. 2007). Munkánk során a NO eme jelenség jelátvitelében betöltött szerepét kívántuk

---

felderíteni. Ismert, hogy ozmotikus stressz hatására a szövetek IAA tartalma növekszik (Wang és mts. 2008). Emellett az IBA szintetáz enzim aktivitás növekedése is megtörténik ozmotikus stressz hatására, ami az IAA indol-3-vajsavvá alakulását katalizálja (Ludwig-Müller 2000). A feltehetően megemelkedett auxin szint (IAA és IBA) indukálja a NR gén(ek) expresszióját, így az enzim aktivitását (Vuylsteker és mts. 1998). A NR önmaga közvetlenül képes NO képzésére (Rockel és mts. 2002), vagy a Ni:NOR enzim- amely nitritet használ szubsztrátként- aktiválásán keresztül idézi elő a NO produkció fokozódását (Stöhr és mts. 2001). A NO modulálja bizonyos sejtosztódásban szereplő gének (*CYCA 2;1*, *CYCA 3;1*, *CYCD 3;1*, *CDKAI*) expresszióját (Correa-Aragunde és mts. 2006), előidézve ez által a periciklus sejtek inekvális osztódását, így az OGY primordium iniciációját. Az ozmotikus stressz a tranziens NO nem enzimátikus úton történő képződését is indukálja, ami egy stresszválasznak tekinthető, szükséges az oldalgyökér indukcióhoz, és valószínűsíthető, hogy a gyökérsejtek auxin érzékenységeinek növelésén keresztül hat a folyamatban.



**30. ábra** Az osmotikus stressz által indukált oldalgyökér iniciáció jelátvitelének feltételezett modellje (saját ábra). A fekete színű nyilak és feliratok az irodalmi adatokat, a vörös színek saját eredményeinket jelzik. A szaggatott nyilak a „stressz-NO” feltételezett hatását mutatják. Magyarázat a szövegben.

## VII. Összefoglalás

A gyökérszövet létfontosságú szerepet tölt be a növények élettani folyamataiban, ezért alapvető fontosságú egyrészt a fejlődésének szabályozása normál körülmények között, másrészt a növekedésének fenntartása különböző stresszhatások során. A gyökérszövet kialakulását a környezeti és endogén faktorok közötti kölcsönhatások határozzák meg.

Kutatócsoportunk célja a jelen értekezésben közölt kísérletek elvégzésével az volt, hogy megvizsgáljuk a NO, mint bioaktív jelmolekula szerepét a belső és külső/környezeti tényezők által irányított gyökérszöveti folyamatokban.

Munkánk során kapott eredményeink alapján elmondható, hogy:

1. Az ozmotikus stressz és az exogén auxin kezelés hasonló gyökérszövet morfológiát alakít ki borsó növényben: a kezelések koncentrációjának növekedésével a főgyökerek megrövidülnek, az oldalgyökér szám gyarapodik.
2. Mindkét faktor NO felhalmozódást idéz elő a gyökerekben. A NO képződés időbeli tulajdonságai azonban különböznek. Az ozmotikus stressz hatására kétfázisú NO akkumuláció történik, melynek két szakasza különíthető el: egy tranzien NO felszabadulás („stressz-NO”), amit egy lassú, nagymértékű NO képződés követ. Ez a PEG-indukált, két szakaszban történő NO produkció búza és *Arabidopsis thaliana* L. gyökerekben is megjelenik. Exogén auxin kezelés hatására tranzien NO-csúcs sem borsó, sem *Arabidopsis* gyökerekben nem tapasztalható.
3. A korai, tranzien NO képződés („stressz-NO”) szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgyökér fejlődés indukálásához borsóban.
4. Az IBA közvetlen módon -tehát nem IAA-vá alakulását követően- indukálja a NO képződését *Arabidopsis thaliana* L. oldalgyökér iniciálisokban.

5. Az exogén auxin kezelés hatására történő NO képződés NR enzim működéséhez kapcsolt *Arabidopsis thaliana* L. gyökér primordiumokban.
6. Az ozmotikus stressz során gyorsan megjelenő „stressz-NO” képződésében sem a NR, sem pedig a NOS-enzim nem vesz részt. Eme folyamat hátterében nem enzimatisz szintézis utak állhatnak.
7. Az ozmotikus stressz által indukált késői NO megjelenése egyértelműen függ a nitrát reduktáz enzim működésétől *Arabidopsis thaliana* L. gyökér primordiumokban.

Mindezekből világosan látszik, hogy a NO szerepel a külső (ozmotikus stressz) és a belső (indol-3-vaajsav) faktorok által szabályozott gyökérfejlődési folyamatokban. Elsőként írtuk le az ozmotikus-stressz-indukált NO tranziens („stressz-NO”) megjelenését a gyökerekben, és bizonyítottuk az oldalgökér iniciációban betöltött szerepét. Az auxin hatására, valamint az ozmotikus stressz során a második szakaszban keletkező NO forrásaként a NR enzimet azonosítottuk *Arabidopsis* gyökerekben.

Úgy véljük, munkánkkal hozzájárultunk a növényi NO alaposabb megismeréséhez. Természetesen rengeteg még a nyitott kérdés, melyeket csak akkor leszünk képesek megválaszolni, ha a továbbiakban is lelkesen és kitartóan kutatjuk eme valóban érdekes, sokoldalú jelmolekula természetét.



## VIII. Köszönetnyilvánítás

Ezúton fejezem ki köszönetemet témavezetőmnek, a Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, **Prof. Dr. Erdei Lászlónak** a témaválasztásért, a külföldi és hazai konferenciákon, tanulmányutakon való részvétel, valamint -a számomra oly kedves- oktatási lehetőségek biztosításáért és legfőképp a munkám során nyújtott felbecsülhetetlen szakmai és emberi támogatásáért.

Köszönöm a Növénybiológiai Tanszék összes volt és jelenlegi munkatársának, hogy segítették a munkámat, bízottak, és együtt izgultak velem a sorsdöntő pillanatokban.

Külön köszönet illeti Bartha Bernadettet, aki a tanszéken folyó munkába való bekapcsolódásom során, valamint a módszer elsajátítása során volt segítségemre.

Köszönet illeti Prof. Bonnie Bartel-t (Rice Egyetem Huston, Texas, USA), Prof. Günther Scherer-t (Leibniz Egyetem, Hannover, Németország), valamint Dr. Mikael Brosché-t (Helsinki Egyetem, Finnország), a mutáns *Arabidopsis* magok biztosításáért és kooperatív támogatásukért.

Örök hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akik tanulmányaim és munkám során mindvégig kitartottak mellettem, gondoskodásukkal, szeretetükkel támogattak.

## IX. Fűggelék

### IX.1. Irodalomjegyzék

- Anderson LS, Mansfield TA** (1979) Effect of nitric- oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* 20:113-121
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F** (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 281:23579-23588
- Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami T, Yang Z** (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1624–1631
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* 274:36729-36733
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernandez-Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* 57:1785-1793
- Bayer MH** (1969) Gas chromatographic analysis of acidic indole auxin in *Nicotiana*. *Plant Physiology* 44:267-271
- Beeckman T, Burssens S, Inze D** (2001) The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 52:403-411
- Beligni MV, Lamattina L** (1999) Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide* 3:199-208
- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210:215-221
- Beligni MV, Lamattina L** (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment* 25:737-748
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL** (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16:332-341
- Bhalerao RP, Eklof J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal* 29:325-332

- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39-44
- Blume YB, Nyporko O, Demchuk O** (2005) Nitrotyrosination of plant  $\alpha$ -tubulin: potential mechanisms of influence on cellular processes. *BMC Plant Biology* 5:S26
- von Bohlen und Halbach O** (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide* 9:217-228
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Verma PK, Chattopadhyay D** (2004) Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology* 135:1608-1620
- Brady SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P** (2003) The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34:67-75
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *The Plant Journal* 45:113-122
- Broillet M-C, Randin O, Chatton J-Y** (2001) Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Letters* 491:227-232
- Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inze D, Verbruggen N** (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211:632-640
- Capone R, Tiwari BS, Levine A** (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:425-428
- Caro A, Puntarulo S** (1999) Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radicle Research* 31:205-212
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13: 843-852
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8:165-171
- Celenza JLJ, Grisafi PL, Fink GR** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 9:2131-2142
- Chen CW, Yang YW, Lur HS, Tsai YG, Chang MC** (2006) A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. *Plant & Cell Physiology* 47:1-13
- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M** (2003) The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 39:161-170

- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M** (2004) Different behaviour of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in stimulating lateral root development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 43:135-143
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ** (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal* 24:667-677
- Coates JC, Laplaze L, Haseloff J** (2006) Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103:1621-1626
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53:159-182
- Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA** (1994) Light mediated conversion of nitrogen dioxide to nitrite by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* 102:460-462
- Cooper CE** (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends in Biochemical Sciences* 27:33-39
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA** (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* 136:2722-2733
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L** (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218:900-905
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier Ch, Lamattina L** (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 57:581-588
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D** (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with  $Ca^{2+}$  and protein kinases. *Journal of Experimental Botany* 59:155-163
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A** (2006) Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* 11:526
- Cueto M, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S, Golvanova MP** (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters* 398:159-164
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH, Zhang H** (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33:543-555
- De Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T** (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* 60:871-887
- Deak KI, Malamy J** (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* 43:17-28
- Dean JV, Harper JE** (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiology* 82:718-723

- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13454-13459
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:390-396
- Deng M, Moureaux T, Caboche M** (1989) Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiology* 91:304-309
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S** (2002) A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid- induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:16314-16318
- Devignat R** (1952) The Griess reaction carried out on non-nitrated broth medium in the study of various pathogenic bacteria. *Annales de l'Institut Pasteur* 82:653-655
- DiDonato RJ, Arbuckle E, Buker S, Sheets J, Tobar J, Totong R, Grisafi P, Fink GR, Celenza JL** (2004) *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal* 37:340-353
- Distéfano AM, Garcia-Mata C, Lamattina L, Laxalt AM** (2008) Nitric oxide- induced phosphatidic acid accumulation: a role for phospholipases C and D in stomatal closure. *Plant, Cell & Environment* 31:187-194
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD** (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal* 35:763-770
- Dordas C, Hasinoff BB, Rivoal J, Hill RD** (2004) Class-1 hemoglobins, nitrate and nitric oxide levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* 219:66-72
- Dubrovsky JG, Rost TL** (2005) Pericycle. In: Roberts KR, ed. *Encyclopaedia of life sciences*. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd, doi: 10.1038/npg.els.0002085
- Durner J, Wendehenne D, Klessing DF** (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10328-10333
- Epstein E, Ludwig-Müller J** (1993) Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, biosynthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum* 88:382-389
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:8054-8059
- Fehér A** (2006) Növényi szaporodás biotechnológia: az embriogenezis első lépései *in vivo* és *in vitro*. Akadémiai Doktori Értekezés, Tézisek.

- Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa P, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC** (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiology* 147:1936-1946
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J** (2000) In vivo imaging for an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* 23:817-824
- Friml J, Palme K** (2002) Polar auxin transport: old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* 49:273-284
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M** (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 29:153-168
- Garcês H, Durzan D, Pedroso MC** (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 87:567-574
- García-Mata C, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126:1196-1204
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates  $K^+$  and  $Cl^-$  channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11116-11121
- Giba Z, Grubii D, Todorovi S, Sajc L, Stojakovi D, Konjevi R** (1998) Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome – controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regulation* 26:175-181
- Gilles-Gonzales MA, Gonzales G** (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99:1-22
- Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R** (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry* 275:7757-7763
- Gong YW, Yuan YJ** (2006) Nitric oxide mediates inactivation of glutathione-S-transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress. *Journal of Biotechnology* 123:158-92
- Gonzalez-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA** (2007) Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58:3719–3730
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell & Environment* 26:1851-1862
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhaes ACN, Martins IS** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21:183-187
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100-103

- Guo P, Cao Y, Li Z, Zhao B** (2004) Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant, Cell & Environment* 27:473-477
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M** (2001) Auxin regulates SCF (TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414:271-276
- Graziano M, Beligni MV, Lamattina L** (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiology* 130:1852-1859
- Graziano M, Lamattina L** (2007) Nitric oxide and dinitrosyl iron complexes: roles in plant iron sensing and metabolism. In: Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide (szerk.: van Faassen E, Vanin AF). Elsevier Oxford, UK pp:161-169
- Hansen H, Grossmann K** (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* 124:1437-1448
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:463-499
- He J-M, Xu H, She X-P, Song X-G, Zhao W-M** (2005) The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Functional Plant Biology* 32:237-247
- He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY** (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal* 44:903-916
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* 14:2339-2351
- Hinchee MAW, Rost TL** (1986) The control of lateral root development in cultured pea seedlings. I. The role of seedling organs and plant growth regulators. *Botanical Gazette* 147:137-147
- Hochholdinger F, Zimmermann R** (2008) Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology* 11:70-74
- Hoff T, Truong N-H, Caboche M** (1994) To use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell & Environment* 17:489-506
- Howard CJ** (1980) Stratospheric chemistry and the ozone problem. In: Rodgers, M. and Powers E. (szerk.), Oxygen and Oxy Radicals in Chemistry and Biology. Academic Press, New York, 535-589
- Hu XY, Neill SJ, Tang ZC, Cai WM** (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137:663-670
- Huang X, von Rad U, Durner J** (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 215:914-923
- Hufton CA, Besford RT, Wellburn AR** (1996) Effects of NO (+NO<sub>2</sub>) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO<sub>2</sub> enrichment. *New Phytologist* 133:495-501
- Hung KT, Chang CJ, Kao CH** (2002) Paraquat toxicity in reduced by nitric oxide in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 159:159-166

- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008)** Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55:335-347
- Kepinski S, Leyser O (2005)** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:446-451
- Klepper LA (1975)** Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* 184:70
- Klepper LA (1979)** Nitric oxide (NO) and nitrogen-dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* 13:537-542
- Klepper LA (1991)** Nox evolution by soybean leaves treated with salicylic- acid and selected derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 39:43-48
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998)** Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* 70:2446-2453
- Koppenol WH (1996)** Thermodynamics of reactions involving nitrogen-oxygen compounds. *Methods in Enzymology* 268:7-12
- Kumar D, Klessig DF (2000)** Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:347-351
- Kutz A, Muller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW (2002)** A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30:95-106
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003)** Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* 54: 109-136
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004)** Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* 135:516-529
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D (2006)** Mechanism of nitric- oxide-induced increase of free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radical Biology & Medicine* 40:1369-1376
- Lanteri ML, Laxalt AM, Lamattina L (2008)** Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiology* 147:188-198
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB (2007)** Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell* 19:3889-3900
- Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R (2006)** Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant & Cell Physiology* 47:788-792
- Laspina VN, Groppas MD, Tomaro ML, Benavides MP (2005)** Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169:323-330



- Lawson DM, Stevenson CEM, Andrew CR, Eady RR** (2000) Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *EMBO Journal* 19:5661-5671
- Laxalt AM, Raho N, ten Have A, Lamattina L** (2007) Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282:21160-21168
- Leshem YY, Haramaty E** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology* 148:258-263
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV** (1998) Evidence for the function of the free radical gas — nitric oxide (NO<sup>•</sup>) — as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 36:825-833
- Leshem YY, Pinchasov Y** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* 51:1471-1473
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137:921-930
- Liu X, Wang Y, Jia W, Lou C, Zhang S** (2007) Localization of NOS-like protein in guard cells of *Vicia faba* L. and its possible function. *Chinese Science Bulletin* 52:84-90
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L** (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling & Behavior* 1:28-33
- Lopez-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sanchez-Calderon L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129:244-256
- Ludidi N, Gehring C** (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278:6490-6494
- Ludwig-Müller J, Epstein E** (1991) Occurrence and *in vivo* biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* 97:765-770
- Ludwig-Müller J, Sass A, Sutter EG, Wodner M, Epstein E** (1993) Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. I. Identification and quantification. *Plant Growth Regulation* 13:179-187
- Ludwig-Müller J, Epstein E** (1993) Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. II. *In vivo* metabolism. *Plant Growth Regulation* 13:189-195
- Ludwig-Müller J, Schubert B, Pieper K** (1995) Regulation of IBA synthetase from maize (*Zea mays* L.) by drought stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* 46:423-432
- Ludwig-Müller J** (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32:219-230
- Magalhaes JR, Monte DC, Durzan D** (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 6:117-127

- 
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science* 2:390-396
- Malamy JE** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* 28:67-77
- Marti MA, Capece L, Crespo A, Doctorovich F, Estrin DA** (2005) Nitric oxide interaction with cytochrome c' and its relevance to guanylate cyclase. Why does the iron-histidine bond break? *Journal of the American Chemical Society* 127:7721-7728
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I** (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* 130:1288-1297
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I** (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* 71:34-40
- Moreau M, Lee GI, Wang Y, Crane BR, Klessig GF** (2008) AtNOS/A1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 283:32957-32967
- Mur LAJ, Santosa IE, Laarhoven L-JJ, Harren F, Smith AR** (2003) A new partner in the *danse macabre*: the role of nitric oxide in the hypersensitive response. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* (special issue: 110-123)
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murgia I, Delledonne M, Soave C** (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 30:521-528
- Murphy ME, Noack E** (1994) Nitric oxide assay using haemoglobin method. *Methods in Enzymology* 233:241-250
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y** (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4:423-430
- Nathan C, Xie Q-W** (1994) Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918
- Navarre DA, Wendehenne D, Durner J, Noad R, Klessing DF** (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology* 122:573-582
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst DR, Hancock JT** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1237-1247
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159:11-35
- Neill SJ, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I** (2008) Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59:165-176
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC** (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* 179:595-614

- Ninnemann H, Maier J** (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology* 64:393-398
- Nodzon LA, Xu WH, Wang Y, Pi LY, Chakrabarty PK, Song WY** (2004) The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 40:996-1006
- Notton BA, Hewitt EJ** (1971) The role of tungsten in the inhibition of nitrate reductase activity in spinach (*Spinacea oleracea* L.) leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44:702-710
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M** (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:118–130
- Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA** (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology* 130:487-493
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS** (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* 58:93–113
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorgjotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A** (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal* 43:849-860
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* 129:954-956
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L** (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132:1241-1248
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L** (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* 135:279-286
- Parry G, Marchant A, May S, Swarup R, Swarup K, James N, Graham N, Allen T, Martucci T, Yemm A** (2001) Quick on the uptake: characterization of a family of plant auxin influx carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* 20:217-225
- Pasternak TP, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK** (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56:1991-2001
- Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D** (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany* 51:1027-1036
- Petroski MD, Deshaies RJ** (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6:9-20
- Pfeiffer S, Gorren ACF, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B** (1997) Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 272:3465-3470

- Planchet E, Kaiser WM** (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF-fluorescence and chemiluminescence: comparison using biotic and abiotic NO sources. *Journal of Experimental Botany* 57:3043-3055
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK** (2007) Stress-induced morphogenetic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12:98-105
- Poulos TL, Raman CS, Li H** (1998) NO news is good news. *Structure* 6:255-258
- Poupart J, Waddell CS** (2000) The *rib1* mutant is resistant to indole-3-butyric acid, an endogenous auxin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1739-1751
- Poupart J, Rashotte AM, Muday GK, Waddell CS** (2005) The *rib1* mutant of *Arabidopsis* has alterations in indole-3-butyric acid transport, hypocotyl elongation, and root architecture. *Plant Physiology* 139:1460-1471
- Qi X, Wu Z, Li J, Mo X, Wu S, Chu J, Wu P** (2007) AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 64:575-587
- Rani Debi B, Taketa S, Ichii M** (2005) Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology* 162:507-515
- Rashotte AM, Poupart J, Waddell CS, Muday GK** (2003) Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:761-772
- Ribeiro EA, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS** (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* 445:283-286
- del Rio LA, Corpas FJ, Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase in plants. *Phytochemistry* 65:783-792
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* 53:103-110
- Romanov AG, Lomin SN, Rakova NY, Heyl A, Schmülling T** (2008) Does NO play a role in cytokinin signal transduction? *FEBS Letters* 582:874-880
- Rustérucci C, Espunya MC, Diaz M, Chabannes M, Martínez MC** (2007) S-Nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* 143:1282-1292
- Sandermann H** (2001) Ozon: Entstehung, Wirkung, Risiken. Verlag C. H. Beck, München, pp:23-28
- Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinohl V, Friml J, Benkova E** (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes & Development* 20:2902-2911
- Scherer GFE, Holk A** (2000) NO donors mimic NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation* 32:345-350
- Scherer GFE** (2007) Nitric oxide in cytokinin and polyamine signaling: similarities and potential crosstalk. In: Plant Cell Monographs (szerk.: Lamattina L, Polacco JC: Nitric oxide in plant growth) 6:131-152

- Schneider EA, Kazakoff CW, Wightman F** (1985) Gas chromatography-mass spectrometry evidence for several endogenous auxins in pea seedling organs. *Planta* 165:232-241
- Schwager KM, Calderon-Villalobos LI, Dohmann EM, Willige BC, Knierer S, Nill C, Schwechheimer C** (2007) Characterization of the VIER F-BOX PROTEINE genes from *Arabidopsis* reveals their importance for plant growth and development. *The Plant Cell* 19:1163-1178
- Shi S, Wang G, Wang Y, Zhang L, Zhang L** (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13:1-9
- Shukla RK, Raha S, Tripathi V, Chattopadhyay D** (2006) Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 142:113-123
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S** (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167:839-847
- Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H** (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371:169-178
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J** (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 258:1898-1902
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC** (2001) Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675-683
- Stöhr C, Ullrich, WR** (1997) A succinate-oxidising nitrate reductase is located at the plasma membrane of plant roots. *Planta* 203:129-132
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835-841
- Stöhr C, Ullrich WR** (2002) Generation and possible roles of nitric oxide in plant roots and their apoplasmic space. *Journal of Experimental Botany* 53:2293-2303
- Stöhr C, Stremlau S** (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 57:463-470
- Suzuki N, Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Hirata Y, Nagano T** (2002) Orthogonality of calcium concentration and ability of 4,5-diaminofluorescein to detect NO. *The Journal of Biological Chemistry* 277(1):47-49
- Szmidt-Jaworska A, Jaworski K, Tretyn A, Kopcewicz J** (2003) Biochemical evidence for a cGMP-regulated protein kinase in *Pharbitis nil*. *Phytochemistry* 63:635-642
- Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A, Takahashi H** (2003) Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of *Arabidopsis* and radish. *Plant Physiology* 132:805-810
- Torrey JG** (1950) The induction of lateral roots by indoleacetic acid and root decapitation. *American Journal of Botany* 37:257-264
- Tun NN, Holk A, Scherer GFE** (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters* 509:174-176

- Tun NN , Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47:346-354
- Tun NN, Livaja M, Kieber JJ, Scherer GFE** (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytologist* 178:515-531
- Ullah H, Chen JG, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM** (2003) The beta-subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *The Plant Cell* 15:393-409
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varera P, del Río LA, Barroso JB** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581:453-461
- Vanneste S, De Rybel B, Beemster GT, Ljung K, De Smet I, Van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruissem W, Tasaka M** (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17:3035-3050
- Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F, Loreto F** (2005) Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist* 166:419-425
- Wang YS, Yang ZM** (2005) Nitric oxide reduces aluminium toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 46:1915-1923
- Wang X, Xu Y, Han Y, Bao S, Du J, Yuan M, Xu Z, Chong K** (2006) Overexpression of RAN1 in rice and *Arabidopsis* alters primordial meristem, mitotic progress, and sensitivity to auxin. *Plant Physiology* 140:91-101
- Wang C, Yang A, Yin H, Zhang J** (2008) Influence of hormone contents and cell damage of maize seedlings. *Journal of Integrative Cell Biology* 50:427-434
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51:1555-1562
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* 15:2532-2550
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterization of a chlorate resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Molecular and General Genetics* 239:289-297
- Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH, Leyser HM** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126:875-882
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* 31:622-631

- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95:707-735
- Wyn Jones RG, Gorham J** (1983) Osmoregulation. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Zeigler H (szerk.) *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 12C*. Springer-Verlag, Berlin, pp:35-58
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* 14:3024-3036
- Xing H, Tan L, An L, Zhao Z, Wang S, Zhang C** (2004) Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regulation* 42:61-68
- Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM** (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* 142:1065-1074
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS** (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279:234-237
- Xu M, Dong J, Zhu M** (2006) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. *Science in China Series C: Life Sciences* 49:379-389
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* 468:89-92
- Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Tsukihara T** (2000) X-ray structure and the reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 82:1-7
- Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J** (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15811-15816
- Zemojtel T, Fröhlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, Durner J** (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science* 11:524-525
- Zhang H, Forde BG** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409
- Zhang X, Kim W-S, Hatcher N, Potgieter K, Moroz LL, Gillette R, Sweedler JV** (2002) Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 277:48472-48478
- Zhang C, Czymbek KJ, Shapiro AD** (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:962-972

- 
- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W** (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na(+)/H(+) antiport in the tonoplast. *Planta* 224:545-555
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L** (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology* 134:849-857
- Zhao MG, Tian QY, Zhang WH** (2007) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144:206-217
- Zolman BK, Yoder A, Bartel B** (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* 156:1323-1337
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The *Arabidopsis* pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiology* 127:1266-1278
- Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, Lo Schiavo F** (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58:1397-1405



## **IX.2. Ph. D. thesis**

### **Introduction and aims**

A marvelous property of plants is the rapid and efficient adaptability to dynamically variable environment. Plants regulate growth and development of their organs (e.g. root system) acted on the actual status of the environment (e.g. water supply). Beside environmental factors, the endogenous hormonal system (auxin and other hormones) of the root is the major regulator of developmental processes. In the rich signal transduction network between the external and internal regulatory elements, signal molecules make contact between the components to ensure the phasing of signals.

The main goal of our laboratory was to investigate this binary regulatory system manifested itself under root development. We compared the effects of a notable stress factor, osmotic stress and an endogenous regulator, auxin on root growth and development. We paid special attention on investigation of nitric oxide (NO) in this system, since we supposed that this novel, bioactive molecule can be a key component of the signal network regulating root development.

In my thesis I present the results which intend to answer the following questions:

- Is there a similarity between the effects of exogenously applied auxin and osmotic stress on root morphology?
- Is NO synthesis induced by auxin or osmotic stress in roots?
- Are there any differences between the degree and the temporal properties of NO production induced by auxin or osmotic stress?

- Which enzyme can be the possible candidate for generating auxin- or osmotic stress-induced NO?

## Results

Among several NO detection manners one of the most frequently used is the fluorescent microscopic determination of NO by DAF-2DA, since it makes possible *in vivo* and *in situ* visualization of it in plant tissues. Root segments and cross-section were dyed with DAF-2DA and they were investigated under Zeiss Axiovert 200M-type fluorescent microscope.

### **I. The effects of exogenous auxin and osmotic stress on root development and NO content of roots**

The basis of our experimental results is constituted by the recognition, that the developmental responses of roots to auxin and osmotic stress are similar. In both cases, the reduction of primary root (PR) length reached approximately 50% of the control and the increase of number of lateral roots (LRs) were 180% under osmotic stress and about 280% at the highest indole-3-butyric acid (IBA) concentration. Despite the similarities in characteristics of root growth and development under osmotic stress and auxin load, there is a significant difference in the intensity of the accompanying NO generation: while the maximal value is three-fold in the roots with the high auxin load (at  $10^{-5}$  M IBA), osmotic stress response resulted in 14-fold increase of NO level at 400mOsm (-0.98 MPa) polyethylene glycol (PEG 6000) concentration. In both cases LR initiation was followed by an intensive enhancement

---

of NO production. The wide concentration range of exogenously applied IBA made possible to investigate the binary effect of it on root growth and development: low concentrations of IBA ( $10^{-9}$  M- $10^{-8}$  M) were favorable for PR elongation, which was not followed by NO accumulation. Higher IBA concentrations ( $10^{-7}$  M- $10^{-3}$  M) were responsible for LR development and induction of NO generation. The increase in LR number was directly proportional to the auxin concentration, but NO fluorescence showed a maximum in  $10^{-5}$  M IBA-treated roots.

We found that the intensive NO formation is closely linked to LR development, since transferring plants from a solution containing high concentration of IBA to low hormone containing nutrient solution, elongation of LR primordia and decrease of NO fluorescence were detected. In the case of a conversely treatment NO levels increased in roots and new primordia appeared on PRs. According to these results we established that there is a close relationship between auxin content (modified by exogenous IBA treatments) and NO formation in roots.

As we stated, under osmotic treatments root development was similar to that of IBA treated plants. The question arose if under osmotic stress acropetally transported auxin was responsible for the intensified formation of LR and NO synthesis. Using the auxin polar transport inhibitor, naphthylphthalamic acid (NPA), the number of LR initials and the NO level were decreased, while the growth of PR practically was not affected. The relative low inhibition of LR development by NPA can be explained by the fact that NPA is not an inhibitor of transport of IBA but it indicates that at least for a low extent, indole-3-acetic-acid (IAA) can also be responsible for LR formation.

We investigated the time dependence of PR elongation, LR initiation and NO formation under osmotic stress or exogenous auxin. The elongation of primary root proved to be equal in time, and this constant, linear growth of PR was effected neither

---

by auxin nor by PEG treatment. The lateral root initiation is more interesting, because as the effect of IBA treatment the short LR initials appeared only after the 48th hours of treatment. Interestingly, the situation is similar under osmotic stress, namely the number of the 400 mOsm PEG induced LRs increased after 48 hour- treatment. The most exciting result was that under osmotic stress a rapid phase of NO generation was distinguishable which is followed by a slower but more significant NO accumulation. In exogenous auxin treated roots this fast NO generation could not be found. In these plants NO formed only after the 48th hour of treatment parallel with appearance of laterals. The osmotic stress induced transient NO accumulation was named as “stress-NO”. We found this early NO burst also in PEG-treated *Arabidopsis* and wheat roots, which refers to the general nature of this phenomenon.

To answer the question, whether the early NO burst has a role in PEG-induced LR development, we suppressed the PEG-induced transient NO burst with 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid (cPTIO) in the first 36 h. These samples showed decreased LR number compared to control and 400 mOsm PEG-treated roots in the 120<sup>th</sup> h of treatment. This strongly suggests that “stress-NO” is needed to PEG-induced LR development.

Indole-3-butyric acid is a natural auxin form in several plant species (pea, maize, tobacco, *Arabidopsis*). However there are contradictory results in literature concerning that IBA acts via IAA, or it has its own auxin effect. This question has great importance in our experimental system, namely the discovered NO accumulation in LR primordia is the direct effect of IBA or not. For investigation of this we used peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation-deficient *pxa1 Arabidopsis* mutant, in which IAA is not able to convert IBA. In these control mutant roots higher NO fluorescence was found compared to wild type (Col-0). The reason of this difference can be that

mutants contain more IBA than wild type roots, because conversion of it to IAA does not happen (however literature data are not available). Treatment with  $10^{-5}$  M IBA resulted in enhancement of NO formation in mutant laterals comparably to wild type, which suggests the own auxin effect of IBA on NO production.

The effects of exogenous auxin and osmotic stress on root development and NO content of roots can be summarized as follows:

1. Osmotic stress and exogenous auxin treatment induced similar changes in root morphology of pea: i.e. increasing concentrations of both exogenous auxin and polyethylene glycol caused shortening of PRs and enhancement of LR number.
2. Both factors induced NO accumulation in roots, however temporal properties of NO formation were different. As the effect of osmotic stress, a two-phase NO generation was detectable, where a rapid, transient NO formation (“stress-NO”), could be distinguished followed by a slower, but more significant NO accumulation. These two periods of PEG-induced NO synthesis was found also in roots of wheat and *Arabidopsis thaliana* L. Transient NO peak was not observed in auxin-treated roots.
3. “Stress-NO” is required for osmotic stress-induced LR formation of pea.
4. IBA directly (not through its conversion to IAA) induces NO formation in LR initials of *Arabidopsis thaliana* L.

## II. Possible enzymatic source of auxin- and osmotic stress-induced NO

After we worked out the details concerning involvement of NO in root developmental processes, we tried to identify the possible source of NO. For these experiments wild type (Col-1), *Atnoa1* mutant (deficient in mitochondrial cGTP-ase activity) and nitrate reductase (NR)-deficient double mutant (*nia1*, *nia2*) *Arabidopsis* plants were used. Our results clearly show that exogenously applied IBA caused 4-fold increase in lateral root frequency of wild type and *Atnoa1* plants. The same concentration of auxin resulted in only 2-fold enhancement of LR frequency in the case of NR-deficient mutant. In wild type *Arabidopsis* IBA-induced NO fluorescence was restricted to the LR initials in contrast to PR sections, where it remained at the control level. The role of NR in auxin-induced NO accumulation was firstly proved by the fact that tungstate, a potent inhibitor of the enzyme decreased NO levels in LR primordia and N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and the inhibitor of mammalian NOS enzyme had no effect on it. Beside this, LNMMA treatment did not influence the basal NO level of root cells, while tungstate decreased it. Mutant plants showed different basal levels of NO in their control state (without treatment). In *nia1*, *nia2* mutant roots lower NO fluorescence compared to the other two groups was detected. This suggests NR-dependent NO synthesis in roots of *Arabidopsis*. Exogenous IBA was able to induce NO generation in wild type and *Atnoa1* LR initials, but it failed to do so in *nia1*, *nia2* roots. Since two phases of NO generation were distinguishable in PEG-treated *Arabidopsis*, we had to separately examine the sources of NO generated in the two processes. Within 24 hours after osmotic treatment, LNMMA did not inhibit NO formation in wild type laterals, and “stress-

NO” appeared in NR-deficient mutant. This led us to the conclusion that generation of early NO transient is independent from the activities of NOS and NR enzymes. The second phase of PEG-induced NO formation is NR-associated, because in roots of *nia1, nia2* double mutant IBA treatment did not result in enhanced NO level in contrast to wild type and *Atnoa1* roots, where NO fluorescence significantly increased after auxin treatment.

Our results obtained in association with possible enzymatic source of auxin- and osmotic stress-induced NO can be concluded as follows:

1. Exogenous auxin-induced NO synthesis is NR-associated in *Arabidopsis thaliana* L. root primordia.
2. Generation of “stress-NO” under osmotic stress is independent from NOS or NR activities. Presumably, early NO is formed by non-enzymatic pathways.
3. The second phase of PEG-induced NO formation is obviously related to the activity of nitrate reductase enzyme.

Our results detailed above were published in international, referred papers (see publication list). According to our best knowledge this is the first dissertation, in which details are worked out regarding to the role and enzymatic source of NO in root developmental processes regulated by auxin or osmotic stress.

---

### IX.3. Publikációs lista

(\* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

\***Kolbert Zs**, Bartha B, Erdei L. (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology* 165: 967-975 IF: 2,239

\***Kolbert Zs**, Bartha B, Erdei L. (2008) Osmotic stress- and indole-3-butyric acid - induced NO generations are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum* L. *Physiologia Plantarum* 133: 406-416 IF: 2,192

\***Kolbert Zs**, Bartha B, Erdei L (2005) Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2):13-16

Bartha B, **Kolbert Zs**, Erdei L. (2005) Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2):9-12

\***Kolbert Zs**, Erdei L. (2008) Involvement of nitrate reductase in auxin- induced NO synthesis. *Plant Signaling & Behavior* 12: 1-2

\*Erdei L, **Kolbert Zs**. (2008) Nitric oxide as a potent signaling molecule in plants. *Acta Biologica Szegediensis* 52:1-5

\***Kolbert Zs**, Sahin N, Erdei L. (2008) Early nitric oxide (NO) responses to osmotic stress in pea, *Arabidopsis* and wheat. *Acta Biologica Szegediensis* 52: 63-65

Csiszár J, Pintér B, **Kolbert Zs**, Erdei L, Tari I. (2008) Peroxidase activities in root segments of wheat genotypes under osmotic stress *Acta Biologica Szegediensis* 52: 155-156



---

**Poszterek**

Bartha B, **Kolbert Zs**, Sági B, Erdei L. (2005) Nitric oxide production induced by Cd, Cu and Zn in *Brassica juncea* and *Pisum sativum*. Cost Action 859 Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety, 2005. június 14-16., Pisa, Olaszország

**Kolbert Zs**, Erdei L. (2006) Relationship between nitric oxide (NO) and auxin during root processing of *Pisum sativum* L. III. EPSO Conference, 2006. május 28-június 1., Visegrád, Magyarország

Erdei L, Bartha B, Vashegyi Á, **Kolbert Zs**. (2006) Interaction between heavy metals and macroelements: review and a case study. Cost Action 859 Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety, 2006. június 22-24., Santiago de Compostela, Spanyolország

**Kolbert Zs**, Erdei L. (2006) Time -and concentration dependence of exogenous auxin- effect on NO generation and root development properties in pea. XV. FESPB Congress, 2006. július 17-21., Lyon, Franciaország

**Kolbert Zs**, Bartha B, Erdei L. (2007) Root development under osmotic stress and in the presence of exogenous auxin in *Pisum sativum* L.: The role of nitric oxide. World Conference of Stress, 2007. augusztus 23-26., Budapest, Magyarország

**Kolbert Zs**, Erdei L (2008) Osmotic stress- induced nitric oxide (NO) in drought tolerant and sensitive wheat cultivars and its source in *Arabidopsis* mutants. XVI. FESPB Congress, 2008. augusztus 17-22., Tampere, Finnország

**Konferencia előadások**

2005 VIII. Magyar Növényélettani Kongresszus

2008 DOSZ Tavaszi Szél Konferencia

2008 Magyar Növénybiológiai Társaság IX. Kongresszusa

**Díjak, elismerések**

MTA Szegedi Akadémiai Bizottság 2006. évi pályázata **I. Díj**

Frank-Helianthus Alapítvány 2007. évi pályázata **III. Díj**

Doktoranduszok Országos Szövetsége 2008. évi “*Pro Patria et Scientia*” pályázata **I. Díj**

Jelen Ph.D. értekezés elkészítését a T048436 számú OTKA pályázat, valamint az Oktatási és Kulturális Minisztérium Deák Ferenc Ösztöndíj Pályázata (2008/2009) támogatta.