

kolzsu\_21\_22

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÉZISEK

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

**Ördögné Kolbert Zsuzsanna**

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

2022

kolzsu\_21\_22

## ***1. BEVEZETÉS ÉS KUTATÁSI CÉL***

A gyökérzet a növények életében több szempontból is nagy jelentőségű szerv. A talajban való rögzítésen túl a gyökérzet fő feladata a víz és az ásványi anyagok felvétele a talajból, és azok továbbítása a hajtás felé. Könnyen belátható tehát, hogy a jól fejlett gyökérzet alapvetően fontos a hajtás megfelelő víz- és tápanyagellátásában, így végső soron részben meghatározója a növényi produktivitásnak. A gyökérzet fejlődését olyan abiotikus környezeti körülmények szabályozzák, mint a talaj vízellátottsága, sókoncentrációja, tápanyagtartalma, és ezek befolyásolásán keresztül, közvetett módon a globális klímaváltozás is hatással van a gyökérrendszer növekedési folyamataira. A tápanyagok hiánya mellett azok (pl. nitrogén, foszfor, réz, cink, nikkel) többlete és nemesszenciális elemek (pl. szelén, ólom, kadmium) felhalmozódása a talajban szintén gyökérfejlődést befolyásoló tényezők. Továbbá természetes folyamatok vagy a nanoipari-tevékenység révén a talajba kerülő nanorészecskék (pl. nano cink-oxid) szintén hatnak a gyökérzet növekedésére. Az említett hatásokra bekövetkező növekedés-átprogramozódás a stresszindukált morfogénikus válasz (röviden SIMV), ami a gyökérzetben növekedésgátlási (főgyökérrövidülés) és -indukciós (fokozott oldalgyökérképzés) folyamatok összessége. A gyökérnövekedés átprogramozását endogén jelátviteli-hálózat irányítja, melynek résztvevői közül kiemelendők a fitohormonok (pl. auxin, citokinin, etilén, strigolakton) és a nem fitohormon jellegű növekedésszabályozó-jelek (pl. nitrogén-monoxid, NO; karrikinok). Az elmúlt két évtized aktív kutatásai felvetették, hogy a NO és reakciótermékei, a reaktív nitrogénformák (RNF) részei a gyökérrendszer fejlődését reguláló jelátviteli-hálózatnak, melyben fitohormonok és nem fitohormon jellegű növekedésszabályozó-jelek közötti komplex interakciók révén valósul meg a szabályozás. A NO/RNF élettani funkciói azonban nem korlátozódnak a gyökérrendszer fejlődésének szabályozására. Kétcélú molekulacsaládként, elsősorban reaktív oxigénformákkal (ROF) való interakciók révén, másodlagos (nitro-oxidatív) stressz kialakításán keresztül fokozhatják a károsodások mértékét, vagy éppen hozzájárulhatnak a kedvezőtlen hatások mérsékléséhez abiotikus stressz esetén.

A növények abiotikus stressztűrésének fokozása a klímaváltozás tükrében is kiemelt feladat, ezért az alkalmazkodást segítő molekulák, mint amilyen a NO részletes vizsgálata időszerű. Jelen munkában a NO fitohormonokkal és nem fitohormon jellegű jelekkel való kapcsolatait és ezek szerepét tártuk fel az elemtöbbletek által befolyásolt gyökérfejlődés során. Továbbá tanulmányoztuk a NO ROF-kal való kapcsolatát az elemtöbbletekkel szembeni tolerancia kialakításában és a nitro-oxidatív stresszjelátvitel kialakításában.

Kutatásaink középpontjában a NO és a RNF állnak, és a munka célja az alábbi tudományos kérdések megválaszolása:

**(1) Milyen általános következtetések vonhatók le a SIMV-gyökérfenotípus megjelenésére vonatkozólag különböző kémiai elemek többlete esetén különböző növényfajokban?** A kérdés megválaszolása céljából réz-, cink-, szelén-, nikkell- vagy ólomkezelések mellett tanulmányoztuk a SIMV megjelenését táptalajon vagy tápoldatban nevelt *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* növényekben.

**(2) Van-e összefüggés a SIMV megjelenése és az elem-hiperakkumuláció/tűrés között?** A kérdés megválaszolása céljából összehasonlítottuk a szelénnel kezelt hiperakkumuláló/tűró *Astragalus bisulcatus* és a szelénérzékeny *Astragalus membranaceus* valamint egy másik rendszerben a nikkellel kezelt hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* két ökotípusának gyökérnövekedési válaszait.

**(3) Milyen jelkapcsolatok azonosíthatók a NO és a fitohormonok között az elemtöbblet által szabályozott gyökérféjlődés során?** Vizsgáltuk az auxin-NO jelkapcsolatot rézstressznek kitett lúdfűben, az auxin-NO, citokinin-NO és az etilén-NO kapcsolatot szelénkezelés mellett, és a strigolakton-NO valamint karrikin-NO jelkapcsolatot stresszmentes körülmények között.

**(4) Részt vesz-e a NO a növények elemtöbblettel szembeni toleranciájának kialakításában?** A NO stresszt enyhítő hatását tanulmányoztuk rézstressz, szelenitstressz valamint cinkterhelés esetén lúdfűben.

**(5) Részt vesz-e a NO az elemtöbbletek által kiváltott nitro-oxidatív stressz kialakításában?** A nitro-oxidatív stressz folyamatait vizsgáltuk cink- vagy cink-oxid nanorészecske-kezelést kapott *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* és *Brassica napus* fajokban, szelénkezelt *Brassica* és *Astragalus* fajokban valamint nikkellel kezelt *Arabidopsis thaliana*-ban, *Brassica juncea*-ban és *Odontarrhena lesbiaca* ökotípusokban.

Úgy gondolom, hogy a fenti kérdések megválaszolása során felhalmozott eredményeink beleilleszkednek a nemzetközi kutatási trendekbe, azokat kiegészítve új lehetőségeket tárnak fel, és új irányt mutatnak a növényi stresszválaszok megértésében.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Növényi anyag és nevelési körülmények a különböző rendszerekben

A szelénérzékeny *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge és a szelént hiperakkumuláló *Astragalus bisulcatus* L. (Hook.) A. Gray faj magjainak felszínét sterilizáltuk, majd a magok felszínét steril fémrácsokon leszárítottuk, és P400-as dörzspapírral eltávolítottuk a külső maghéjat a csírázás lehetővé tétele céljából. A magokat szögletes, műanyag Petri-csészékben feles erősségű Murashige-Skoog táptalajra (0,8 (w/v) % agar, 1% szacharóz) helyeztük. A táptalajokat 0 (kontroll), 50 vagy 100  $\mu\text{M}$  nátrium-szelenáttal ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) kiegészítettük. A növények az alábbi körülmények között nevelkedtek 14 napig: 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitás, 12 órás nappali és 12 órás sötét periódus, 55-60% páratartalom,  $25 \pm 2$  °C hőmérséklet.

Az *Odontarrhena lesbiaca* P. Candargy (= *Alyssum lesbiacum* (P. Candargy) Rech. f.) maganyag Leszbosz szigetének két geográfiailag elkülönülő területéről (Ampeliko és Loutra) származott. A magokat 72 óráig, 26 °C-on, sötétben csíráztattuk, majd a talajjal töltött rizotron felszínére helyeztük. A 15 cm széles, 30 cm magas és 1,6 cm vastagságú rizotronokat Klasman Potgrond P szubsztrát és 20% homok keverékével töltöttük meg, és a kezdeti víztartalmat 70%-ra állítottuk be. A kezelt rizotronok talajába 3000 mg/kg nikkel-kloridot ( $\text{NiCl}_2$ ) adagoltunk. A növények 14 napig növekedtek ellenőrzött körülmények között (lásd előbb).

Kísérleteink során minden esetben az *Arabidopsis thaliana* (L. Heynh.) Columbia-0 ökotípusát (Col-0) használtuk vad típusként. Minden esetben a magokat etanollal, majd nátrium-hipoklorit oldattal sterilizáltuk, majd feles erősségű Murashige-Skoog táptalajra (0,8% agar, 1% szacharóz) helyeztük azokat. A táptalajokat kiegészítettük az elemkezelésekkel. Minden esetben a növénynevelés függőlegesen elhelyezett, szögletes Petri-csészékben folyt ellenőrzött körülmények között (lásd előbb). A réztöbblet vizsgálatok a táptalajokba 0 (kontroll), 5, 25 vagy 50  $\mu\text{M}$  réz-szulfátot ( $\text{CuSO}_4$ ) adagoltunk, és a növények 7 napig növekedtek a táptalajokon. További kezelések: 100  $\mu\text{M}$  nátrium-nitroprusszid (SNP), 100  $\mu\text{M}$  [2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid] cPTIO, 10  $\mu\text{M}$  naftilftálsav (NPA) vagy 50  $\mu\text{M}$  cPTIO, 10  $\mu\text{M}$  SNP. A kezeléseket a táptalajhoz adagoltuk a növények ültetését megelőzően. A szelén esetén a táptalajok 0 (kontroll), 10, 15, 20 vagy 40  $\mu\text{M}$  nátrium-szelenitet ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) tartalmaztak, és a növények 2, 4 vagy 7 napig növekedtek azokon. További kezelések: 100  $\mu\text{M}$  S-nitrozo-N-acetil-penicillamin (SNAP), 0,1  $\mu\text{M}$  6-benzilaminopurin (BA), 5 nM 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC), 1,5  $\mu\text{M}$  aminoetoxivinilglicin (AVG), 250  $\mu\text{M}$  GSNO, 800  $\mu\text{M}$  cPTIO. A BA, AVG, ACC kezeléseket steril szűrővel ellátott fecskendővel adagoltuk az 50 °C-ra hűtött táptalajhoz. A NO donor és gyökfogó kezeléseket a kész táptalaj

felszínére cseppentettük steril szűrőn keresztül a növénynevelés 4. napján, így ezek a kezelések 72 óra időtartamúak voltak. A strigolakton-NO vizsgálati rendszerben az Arabidopsis növények kezelés-nélküli, kontroll, feles erősségű Murashige-Skoog táptalajokon növekedtek 7 napig. Az 50 °C hőmérsékletűre hűlt táptalajhoz adagoltuk, steril szűrővel ellátott fecskendővel a *rac-GR24*-et (2 µM). A GSNO-t (250 µM) a 4 napos csíranövényeket tartalmazó táptalaj felszínére cseppentettük steril szűrővel ellátott fecskendő segítségével, vagyis ebben az esetben a kezelés 72 óra időtartamú volt. A cinktolerancia vizsgálatához a lúdfű vonalakat 250 µM cink-szulfát tartalmú vagy 15 µM cinket tartalmazó, kontroll táptalajon neveltük 7 napig. Négy nappal a csírázást követően 1 mM glutationt adtunk a táptalaj gyökereket tartalmazó felszínére, steril szűrő és fecskendő segítségével.

A *Brassica juncea* L. Czern. (cv. Negro Caballo, indiai mustár) és a *Brassica napus* L. (cv. GK Gabriella, olajrepece) magjait etanollal, ezt követően pedig nátrium-hipoklorit oldattal sterilizáltuk, majd perlittel megtöltött Eppendorf-csövekbe helyeztük, melyek teljes erősségű Hoagland tápoldat felszínén úsztak. A növényeket az első valódi levelek megjelenéséig (9 napig) előneveltük, majd a tápoldatot lecseréltük 50, 150 vagy 300 µM cink-szulfátot ( $ZnSO_4$ ) tartalmazó tápoldatokra. A kontroll növények teljes, módosított Hoagland tápoldaton növekedtek a teljes kísérleti periódus alatt, ami 5 µM  $ZnSO_4$ -ot tartalmazott. A növények ellenőrzött körülmények között növekedtek 7 vagy 14 napig (lásd előbb).

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

A szelénformákkal való kezelésekhöz a *Brassica juncea* L. Czern. (cv. Negro Caballo) magok felszínét nátrium-hipoklorit oldattal fertőtlenítettük, majd azok perlittel töltött Eppendorf-csövek felszínére kerültek. A csövek teljes erősségű Hoagland tápoldat felszínén lebegtek és a növények 9 napig előnevelkedtek, majd megtörtént a növények szelénkezelése a tápoldaton keresztül, mely 0 (kontroll), 20, 50 vagy 100 µM nátrium-szenitet ( $Na_2SeO_3$ ) vagy nátrium-szenátot ( $Na_2SeO_4$ ) tartalmazott. A mintavétel minden kezelés esetében 14 nap múlva történt. A növények ellenőrzött körülmények között nevelkedtek (lásd előbb).

A nikkellel kezelt lúdfű és mustár összehasonlító vizsgálata céljából a magvakat az előzőek szerint felületi sterilizálásnak tettük ki, majd szögletes, műanyag Petri-csészékben elkészített 0 (kontroll), 25, 51, 75 vagy 100  $\mu\text{M}$  nikkel-kloridot ( $\text{NiCl}_2$ ) tartalmazó, feles erősségű Murashige-Skoog táptalaj felszínére helyeztük. Az *A. thaliana* esetén a kezelési periódus 7 napos volt, a *B. juncea* esetében 5 napos. A függőlegesen elhelyezett Petri-csészékben a növények ellenőrzött körülmények között nevelkedtek (lásd előbb).

## 2.2. Fiziológiai, biokémiai és génexpressziós vizsgálatok

Csírázás, biomassza-produkció és gyökérnövekedés meghatározása: A csírázási százalékot a csírázott magok számának az összes kiültetett mag számával való elosztásával határoztuk meg. A gyökér és a hajtás friss tömegének megállapítása analitikai mérleggel történt. A főgyökérhosszmérés az *Astragalus* fajok esetén vonalzóval történt, az *Odontarrhena lesbiaca* esetén a szkennelt rizotronokról készült digitális felvételeken a Fiji szoftver segítségével (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsi. 2012). Az *Arabidopsis* esetén a toleranciaindex kiszámítása Tamaoki és mtsai. (2008) alapján történt. A látható összes oldalgyökérszám meghatározása az *Astragalus* fajok esetén a főgyökér teljes hosszában, manuálisan történt, az *Odontarrhena lesbiaca* esetén szoftveresen (lásd előbb). Az *Arabidopsis thaliana* esetén mikroszkóp segítségével elkülönítettük az oldalgyökér-kezdeményeket (kisebb, mint VII. stádium) és a kifejlett oldalgyökereket (nagyobb, mint VII. stádium) Malamy és Benfey (1997) szerint.

Elemtartalom-analízis: A gyökér- és hajtásmintákat 70 °C-on, 72 órán keresztül szárítottuk. A száraz növényi anyagot salétromsavval és hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oldattal kezeltük, majd roncsolásra kerültek. Ezt követően induktív csatolású plazma-tömegspektrometriával megállapításra került a nikkel- és a szeléntartalom.

Mikroszkópos vizsgálatok: A  $\beta$ -glükuronidáz (GUS) aktivitását a transzgenikus *Arabidopsis*-vonalakban X-Gluc szubsztrátfestéssel tettük láthatóvá Zhong és mtsi. (2014) alapján. A cink-oxid nanorészecskék *Brassica*-gyökérszövetekben való internalizációját transzmissziós elektronmikroszkópiával detektáltuk. A főgyökér felszívási zónájából származó szegmenseket 3% glutáraldehid oldatban fixáltuk. A mintákat Embed812 segítségével beágyaztuk, és 70 nm vékonyágú metszeteket készítettünk. Az uranil-acetáttal és ólom-citráttal történő festést követően a mintákat mikroszkóp alatt tanulmányoztuk. A lipidperoxidáció során keletkezett reaktív aldehideket Arasimowicz-Jelonek és mtsi. (2009) nyomán mutattuk ki. A növények sziklevelében a szuperoxid gyökéanion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) detektálása nitro-kék-tetrazólium (NBT) festéssel történt. A cinkszint kimutatására alkalmaztuk a Zinquin [etil (2-metil-8-p-toluénszulfonamid-

6-kinoliloxid) acetát] próbát (Sarret és mtsi. 2006). A gyökércsúcsi merisztéma sejtjeinek életképességét fluoreszcein-diacetát (FDA) fluorofórral mutattuk ki. A NO-molekula jelölésére DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein diacetát) oldatot használtunk. A peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) detektálására dihidrorodamin (DHR) 123 próbát alkalmaztunk Sarkar és mtsi. (2014) alapján. Néhány kísérletben alkalmaztuk az aminofenil-fluoreszcein (APF) fluorofórt a ONOO<sup>-</sup> specifikusabb detektálása céljából (Chaki és mtsi. 2009). A gyökerek O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-szintjének kimutatására dihidroetídium (DHE) fluorofórt használtunk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelölésére Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin, ADHP vagy Ampliflu<sup>TM</sup>) reagenst használtunk. Az *S*-nitrozoglutation (GSNO) és a 3-nitrotirozin indirekt immunfluoreszcens detektálása során a gyökér- vagy (szik)levélszegmenseket fixálást követően bakteriológiai agarba ágyaztuk. A mintákból 100 µm vastagságú metszetek készültek vibratómmal. Elsődleges antitestként 1:2500 arányban hígított patkányból származó GSNO elleni antitestet, másodlagos antitestként 1:1000 hígítású nyúlból származó, patkány elleni fluoreszcein-izotiocianát (FITC) kapcsolt antitestet használtunk. Ezt a minták mikroszkópos vizsgálata követte (Corpas és mtsi. 2008). A proteintirozin-nitráció láthatóvá tételére szintén immunjelölést használtunk Valderrama és mtsi. (2007) alapján. Az elsődleges antitest 1:300-as hígítású, nyúlban termeltetett 3-nitrotirozin elleni antitest volt, míg a másodlagos antitest 1:1000 hígítású kecskében termelt nyúl elleni FITC-kapcsolt másodlagos antitest. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok a legtöbb esetben Zeiss Axiovert 200M inverz mikroszkóppal történtek. A mikroszkóp különböző szűrőkombinációi különböző excitációs és emissziós tartománnyal rendelkeznek, így minden fluoreszcens molekulához a megfelelőt alkalmaztuk. A fluoreszcens felvételeken az Axiovision Rel. 4.8 szoftver segítségével kvantifikáltuk a pixelintenzitásokat, ami arányos a jelölt molekula koncentrációjával. A konfokális lézerszenking-mikroszkópos vizsgálatokhoz a négynapos *ARR5::GFP* és *TCS::GFP* csíranövényeket propídium jodid próbával jelöltük. A mikroszkópos vizsgálat Zeiss LSM 880 készülék segítségével történt. A propídium jodidot 488 nm-es lézerdióddal gerjesztettük, az emissziót pedig 620 és 700 nm között detektáltuk. GFP-fluoreszcenciát 488 nm lézerdióddal gerjesztettük, és 555 nm hullámhossz alatt detektáltuk. A relatív pixelintenzitásokat a gyökércsúcsokban Zeiss Zen10 szoftverrel kvantifikáltuk.

*S*-nitrozotiol (SNO) koncentráció mérése: Az SNO-koncentráció meghatározása Sievers 280i típusú NO analyzer készülék (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA) segítségével történt, Kovács és mts. (2016) alapján.

Etilénkoncentráció meghatározása: Teljes Arabidopsis csíranövényekben mértük az etilén koncentrációját gázkromatográf segítségével, Poór és mtsi. (2015) alapján.



S-nitroziláció kimutatása: A fehérje S-nitroziláció mértékének meghatározása RSNO-RAC (resin-assisted capture of SNO proteins) módszerrel történt Thompson és mtsi. (2013) alapján. A megfelelő mintaelőkészítést követően azokat LC-MS/MS analízisnek vetettük alá (részletek: Kolbert és mtsi. 2019).

Enzimaktivitás vizsgálatok: A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim aktivitásának fotometriás vizsgálatára a Dhindsa és mtsi. (1981) által leírt módszert alkalmaztuk. Az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzim aktivitását az aszkorbáttartalom nyomon követésével határoztuk meg spektrofotométerrel (Nakano és Asada 1981). A kataláz (KAT) enzim aktivitását Kato és Shimizu (1987) módszere alapján detektáltuk. A NADPH-függő tioredoxin-reduktáz (NTR) aktivitását Arnér és mtsi. (1999) módszere alapján egy kit felhasználásával, a gyártó utasításait követve határoztuk meg. A GSNO-reduktáz (GSNOR) aktivitását a NADH GSNO jelenlétében történő oxidációjának kimutatásával határoztuk meg (Sakamoto és mtsi. 2002). Az összes glutation mennyiségi meghatározását Griffith (1980) módszere alapján végeztük el. Az aszkorbát/dehidroaszkorbát koncentrációk meghatározása céljából Law és mtsi. (1983) módszerét alkalmaztuk.

Génkifejeződés vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR-rel: NucleoSpin RNA Plant mini spin kit (Macherey-Nagel) felhasználásával RNS-t tisztítottunk 90 mg növényi anyagból a gyártó utasításai szerint. Egy további DNáz-os emésztést alkalmaztunk, majd RevertAid reverz transzkriptáz (Thermo Scientific) felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk. A primereket a Primer3 szoftver segítségével terveztük meg. A gének expressziós szintjét qPCR készülék (QTOWER 2.0, Jena Instruments) segítségével, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Mix) felhasználásával határoztuk meg (Gallé és mtsi. 2009). Az adatokat qPCRsoft 3.2 szoftverrel (Jena Instruments) elemeztük. Az adatokat a kontrollmintákban mért transzkript szintekre normáltuk, és *ACTIN2* (At3918780) és *GAPDH2* (At1913440) gének szolgáltak belső kontrollként (Papdi és mtsi. 2008).

Izoenzimek azonosítása és aktivitásvizsgálata natív gélelektroforézissel: A NADPH-oxidáz izoenzimek vizsgálata 10 (w/v) %-os natív poliakrilamid-gélelektroforézissel történt López-Huertas és munkatársai 1999-es módszere alapján. A SOD enzim aktivitását és izoformáit 10 (w/v) %-os natív gélelektroforézis után határoztuk meg (Beauchamp és Fridovich 1971). A GSNOR enzim aktivitását Seymour és Lazarus 1989-es módszere nyomán határoztuk meg a NADH autofluoreszcencia nyomonkövetésével.

Western blot analízisek: A hajtásból vagy gyökérből vagy teljes Arabidopsis csíranövényből származó fehérjekivonatot 12 (w/v) %-os denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézisnek (SDS-PAGE) vetettünk alá. Az így szeparált fehérjéket tanktranszfer segítségével transzfereltük

PVDF membránra. Az így kapott membránok tejfehérjeoldatban blokkolva lettek, majd 1:2000 arányban hígított nyúl 3-nitrotirozin elleni antitesttel jelöltük őket. Másodlagos antitestként 1:10000 arányban hígított kecske nyúl IgG elleni antitestet alkalmaztunk, mely alkalikus foszfátáz hordozott a detektáláshoz. A nitrált fehérjék láthatóvá tételére 2,6-diklórfenol-indofenol/NBT reakciót használtunk, ahol az antitesttel jelölt fehérjéknél fekete színű formázán keletkezik. A reakció pozitív kontrolljaként nitrált borjú szérum albumint vittünk fel a géltre. Loading kontrollként a membránokat Coomassie R 250 festéssel vizsgáltuk Welinder és Ekblad (2011) alapján, kisebb módosításokkal. Néhány esetben loading kontrollként anti-aktin antitestet és fehérje standardként aktint (borjú izomból) használtunk. A fehérje karboniláció tanulmányozására egy kitet használtunk fel a gyártó utasításainak kismértékű módosítása mellett. GSNOR és az APX fehérjemennyiség kimutatása céljából a denaturált fehérjekivonatot SDS-PAGE elválasztásnak vetettük alá (12%). A nedves blottolást követően a membránokat különböző antitestekkel reagáltattuk (nyúlból származó anti-GSNOR és anti-APX 1:2000 hígításban). Loading kontrollként anti-aktin antitestet és fehérjestandardként aktint (borjúizomból) használtunk. Másodlagos antitestként affinitás-tisztított, kecskéből származó anti-nyúl alkalikus foszfátáz-kapcsolt IgG-t (1:10000) használtunk.

Statisztikai analízis: A grafikonokon és a táblázatokban az átlageredményeket ábrázoltam a mintacsoportok standard hibájának feltüntetésével. Az eredmények statisztikai elemzése Microsoft Excel 2010 és SigmaPlot 12 programokkal történt. A szignifikancia megállapítására néhány esetben a Student-féle t-próbát alkalmaztunk, ahol a statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük az alábbiak szerint: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Más esetekben az adatokat egyutas varianciánálízisnek vetettük alá (one-way ANOVA) és a Duncan teszttel elemeztük ( $P \leq 0,05$ ) azokat. Az adatok homogenitásának vizsgálatára a Hartley's  $F_{\max}$  tesztet, a normalitás vizsgálatára pedig a Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztuk.

### 3. EREDMÉNYEK

A növények bámulatos képessége a környezeti körülmények változásaihoz (pl. elemtöbbletek a talajban) való dinamikus alkalmazkodás, ami nagyrészt a szervnövekedésük módosításán keresztül valósul meg. Ezeknek a folyamatoknak a megértése feltáró kutatások révén meg kell, hogy előzze stressztűrést fokozó gyakorlati eljárások (pl. nemesítés vagy kezelések) kidolgozását, ami szükségessé teszi a növekedési válaszok molekuláris szinten való megismerését. Ez új szabályozókomponensek azonosítását, szerepük és interakcióik feltárását is jelenti a szervfejlődést irányító komplex jelátviteli hálózatokban.

#### **3.1. A NO fitohormonokkal és nem fitohormon jellegű növekedésszabályozókkal való kapcsolata elemtöbbletnek kitett gyökérzetben**

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

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

### 3.2. A NO részvétele a növények elemtöbblettel szembeni toleranciájának kialakításában

A NO gyökérnövekedést szabályozó szerepének megértésén túl arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a NO hozzájárul-e, és ha igen hogyan a stressztűréshez elemtöbbletek esetén. Rézterhelt lúdfű vad típusa és mutáns vonalai esetén kimutattuk, hogy *a csökkent endogén NO-szint rézérzékenységet okoz*, valamint hogy *a NO-ot külsőleg alkalmazva a tolerancia fokozható*. A rézérzékenységhez magas ROF-szint társul, ami jelzi az *NO- és a ROF-szintek ellentétes irányú, réz-indukált változását*. Szelenitkoncentrációk jelenlétében az etilénérzékelésben és -jelátvitelben hibás (*etr1-1*) valamint a citokinintúltermelő (*ipt-161*) mutáns törőnek bizonyult, míg az alacsony citokinintartalmú *35S::CKX2* szelenitérzékenységet mutatott, ami az *etilén és a citokininek széleskörű szeléntűrésben játszott szerepét jelzi*. Mindemellett *a magas endogén NO-szint illetve NO adagolása fokozza a szelenittűrést*. A cinkterhelésnek kitett *gsnor1-3* növények esetén a NO/SNO-jelátvitelt feltehetőleg az NTR enzimrendszer korlátozza GSNOR hiányában. A vad típusban *az NO/SNO-jelátvitel fokozódásának hátterében a GSNOR cinktöbblet általi poszttranszlációs szintű down-regulációját valószínűsítjük, aminek a mechanizmusaként a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-akkumuláció enzimet módosító hatását azonosítottuk*.

### 3.3. A NO részvétele a nitro-oxidatív jelátvitel kialakításában elemtöbbletek hatására különböző növényfajokban

Az előző kísérleti rendszerben tapasztalt *cink-indukált NO/SNO-növekedés következtében enyhén fokozódik az S-nitroziláció, és ezen poszttranszlációs módosítás célpontjai között megtalálható az APX és a KAT enzim*, melyek összes aktivitása csökkenést mutat. Vagyis az előzőekben bemutatott eredményekkel együtt levonható az a következtetés, hogy a cink többlete esetén akkumulálódó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a GSNOR gátlásának következtében fokozza a fehérje S-nitrozilációt, ami alulszabályozza az APX és a KAT antioxidáns enzimeket, így ez az *autoregulációs folyamat a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szint növekedését eredményezheti*. Ebben a kísérleti rendszerben a vad típusú és a GSNOR-túltermelő vonalak a cinkindukált tirozinnitráció fokozódását mutatják, míg a GSNOR-hiányos növényben a fehérjenitráció cink hatására csökken, feltehetőleg fokozott fehérjedegradációs mechanizmusoknak köszönhetően.

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

*megjelenéséhez*. Hosszabb távú cinkterhelés esetén a fehérjenitráció szervspecifikus módon fokozódik.

A cink-oxid nanorészecskék (~8 nm, ZnO NP) a gyökér felszínén cinkionokat szabadítanak fel, melyek a növényi szövetekben felvéve/transzlokálódva koncentrációfüggő módon növekedést indukálnak avagy gátolnak. Továbbá az alkalmazott nanorészecskék a növényi szöveten belül kimutathatóak. A koncentrációfüggő hatáson túl a ZnO NP-hatás fajfüggő is, hiszen a *Brassica juncea* jobb tűrőképességet mutat, mint a *Brassica napus*. A ROF szintek a cinkérzékenységtől függetlenül változnak a ZnO NP kitettség hatására, míg a vizsgált antioxidánsok aktivitásában és mennyiségében adódnak különbségek a fajok között. A NO és a ONOO<sup>-</sup> szintjei csak a *Brassica juncea*-ban növekednek, míg a GSNO szintje és a GSNOR aktivitása csökken mindkét fajban. A GSNOR ZnO NP által indukált inaktiválódásának hátterében feltételezzük a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produkciónak fokozódását. A fehérjekarboniláció mértéke dózisfüggést mutat, és a nagyobb ZnO NP-koncentráció esetén tapasztalt csökkenés -melynek mértéke nagyobb a *B. napus*-ban- a fokozott proteaszómális degradáció következménye lehet. Ami a tirozinnitrációt illeti, a *B. napus*-ban a mintázat nem változik, míg a *B. juncea*-ban újonnan nitrált fehérjesávok is megjelennek a ZnO NP-terhelés esetén. Összességében elmondható, hogy *a ZnO NP-k nitro-oxidatív stresszt alakítanak ki a Brassica fajokban, ami hozzájárulhat a toxicitásukhoz*.

A továbbiakban két szelénforma nitro-oxidatív stresszt előidéző hatását vizsgáltunk a toxikusabb szelenit és a kevésbé toxikus szelenát hatásának összehasonlításával *Brassica juncea* fajban. Arra az eredményre jutottunk, hogy a O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- és a ONOO<sup>-</sup>-produkciónak csupán a szelenitkezelés fokozza, a szelenát nem. A szelenitterhelés fehérjenitrációra gyakorolt hatásának mértéke mind a hajtásban, mind pedig a gyökérben felülmúlja a szelenát hatását, vagyis *a szelén kémiai formája, illetve annak toxicitása összefügg a fehérjenitráció mértékével*. Szelén-hiperakkumuláló és nem -akkumuláló *Astragalus* fajok esetén a nem akkumuláló és érzékenységet mutató faj jelentős oxidatív stresszt szenved el. Továbbá a NO- és a ONOO<sup>-</sup>-szintek is növekedést mutatnak a szelénkezelt, nem akkumuláló *Astragalus* fajban, míg a hipertűrő fajban ez nem következik be, és a tirozinnitráció fokozódást sem tapasztalunk, ami arra utal, hogy *a hiperakkumuláló/toleráns Astragalus faj képes kivédeni a nitro-oxidatív stresszt*.

A nikkelterhelésre a *Brassica juncea* nagyobb fokú toleranciát mutat, mint az *Arabidopsis thaliana*, és ezzel összefüggésben jelentősebb nikkelindukált ROF- és RNF-produkciót detektáltunk a lúdfűben. *A nikkelterhelés nitrációs fehérjemódosító hatása a lúdfű esetén egyértelműen nagyobb mértékben jelentkezik, mint a Brassica juncea-ban*. A nikkel-

hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* két ökotípusával végzett kísérleteink rámutattak, hogy a nagyobb mértékű felhalmozást mutató Ampeliko esetén a nikkellekezelés a nitro-oxidatív jelátvitel kismértékű módosulását, a következményként jelentkező fehérjenitrációban pedig csökkenést eredményez a kontrollhoz képest. A Loutra ökotípus gyökérzetében a vizsgált jelmolekulák szintje jelentősebb nikkelindukált változásokat mutat, ennek ellenére azonban ebben a hiperakkumuláló ökotípusban sem fokozódik a nitrált fehérjék mennyisége, ami *hatékony fehérjebontás általi detoxifikációra utal.*

Az itt bemutatott eredményeink gyakorlati hasznosíthatóságát abban látom, hogy a feltárt összefüggések alapján alapot szolgáltathatnak jobb ellenállóságú haszonnövények előállításához, valamint toleranciafokozó mezőgazdasági kezelések és a károsodás mértékét detektáló biomarker-alapú eljárások kidolgozásához.

#### **4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

- Kimutattuk, hogy a SIMV-gyökérfenotípus megjelenése független az elem típusától (esszencialitás, redoxaktivitás, fém és nemfém jelleg), a növénynevelési-kezelési rendszertől és a növényfajtól, de függ az elem koncentrációjától és a terhelés időtartamától is.
- Megállapítottuk, hogy klasszikus SIMV-gyökérfenotípus nem jelenik meg hiperakkumuláló/tűrő fajokban, de a gyökérnövekedés átprogramozódik vagy fennmarad, amiből a gyökérnövekedési plaszticitás és az elemtűrési képesség közötti kapcsolatra következtetünk.
- Igazoltuk, hogy az elemtöbblet mellett növekedő növények gyökérzetében a fitohormonok (auxin, cikokinin, etilén) és a NO között antagonistá szabályozó kapcsolat áll fenn, ami hozzájárul a gyökérnövekedési válaszokhoz. Elsőként határoztuk meg, hogy a strigolaktinok és a NO egymás szintjét és jelátvitelét kölcsönösen szabályozva hatnak a gyökérmegyúlásra egészséges növényben. A NO növekedésszabályozó szerepe kapcsolódik a karrikin-jelátvitellel is, sőt feltehetőleg a D14, KAI2 és DLK receptorokat magába foglaló teljes receptorcsaládra kiterjed.
- Mutáns lúdfűvonalak és farmakológiai módszerek segítségével igazoltunk, hogy a NO fokozza az elemtöbbletekkel szembeni toleranciát. A cinkterhelés esetén elsőként mutattuk ki a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szinteknek a GSNOR-szabályozott SNO-jelátvitel részvételével megvalósuló autoregulációs folyamatát.
- Elsőként mutattuk ki a tirozinnitrációt mint a toxicitáshoz hozzájáruló fehérjemódosítást cink-, cink-oxid nanorészecske-, szelén- és nikkelstressznek kitett különböző növényfajokban. Összefüggéseket tártuk fel a RNF metabolizmusában, jelátvitelében és a fehérjenitrációban (összefoglalva nitro-oxidatív stresszben) beálló változások és az elemek kémiai típusa, a növényfajok tűrőképessége, a kezelési koncentrációk és időtartamok tekintetében. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a tirozinnitráció az elemtöbbletnek kitett növények általános, proteomot érintő válasza, vagyis megbízható biomarkernek tekinthető a károsodások detektálásában.

## 5. A TÉZISEKBEN SZEREPLŐ HIVATKOZÁSOK

- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubiś J (2009)** Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Sci* 177:682–690
- Arnér ESJ, Zhong L, Holmgren A (1999)** Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 300:226–239
- Beauchamp C, Fridovich I (1971)** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM és mtsi. (2009)** Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *J Exp Bot* 60:4221–4234
- Corpas FJ, Carreras A, Esteban FJ, Chaki M, Valderrama R, del Río LA, Barroso JB (2008)** Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and s-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods Enzymol* 437:561–574
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981)** Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 32:93–101
- Gallé Á, Csiszár J, Secenji M és mtsi. (2009)** Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. *J Plant Physiol* 166:1878–1891
- Griffith OW (1980)** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207–211
- Kato M, Shimizu S (1987)** Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can J Bot* 65:729–735
- Kolbert Zs, Molnár Á, Oláh D és mtsi. (2019)** S-Nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 60:2449–2463
- Kovács I, Holzmeister C, Wirtz M és mtsi. (2016)** ROS-mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. *Front Plant Sci* 7:1669
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983)** Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem J* 210:899–903
- López-Huertas E, Corpas JF, Sandalio ML, del Río LA (1999)** Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* 337:531–536
- Malamy JE, Benfey PN (1997)** Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci* 2:390–396
- Nakano Y, Asada K (1981)** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
- Papdi Cs, Abraham E, Joseph MP, Popescu C, Konecz Cs, Szabados L (2008)** Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* 147:528–542
- Poór P, Kovács J, Borbély P, Takács Z, Szepesi Á, Tari I (2015)** Salt stress-induced production of reactive oxygen- and nitrogen species and cell death in the ethylene receptor mutant Never ripe and wild type tomato roots. *Plant Physiol Biochem* 97:313–22
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002)** *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* 515:20–24
- Sarkar TS, Biswas P, Ghosh SK, Ghosh S (2014)** Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions. *PLoS One* 9:e107348
- Sarret G, Harada E, Choi Y-E és mtsi. (2006)** Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* 141:1021–1034
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E és mtsi. (2012)** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
- Seymour JL, Lazarus RA (1989)** Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal Biochem* 178:243–247
- Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH (2008)** Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:1219–1230
- Thompson JW, Forrester MT, Moseley MA, Foster MW (2013)** Solid-phase capture for the detection and relative quantification of S-nitrosoproteins by mass spectrometry. *Methods* 62:130–137
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A és mtsi. (2007)** Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 581:453–461
- Welinder C, Ekblad L (2011)** Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10:1416–1419
- Zhong S, Shi H, Xue C, Wei N, Guo H, Deng XW (2014)** Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 111:11



## 6. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

(a felelős szerzőség csillaggal jelölve)

- Pető A, Lehotai N, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L, **Kolbert Zs\*** (2011) Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Annals Bot* 108:449-457
- Lehotai N, **Kolbert Zs\***, Pető A, Feigl G, Ördög A, Kumar D, Tari I, Erdei L (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J Exp Bot* 63:5677-5687 (megosztott elsőszereplőség)
- Pető A, Lehotai N, Feigl G, Tugyi N, Ördög A, Gémes K, Tari I, Erdei L, **Kolbert Zs\*** (2013) Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 32:1913-1923
- Feigl G, Lehotai N, Molnár Á, Ördög A, Rodríguez-Ruiz M, Palma JM, Corpas FJ, Erdei L, **Kolbert Zs** (2015) Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. *Ann Bot* 116:613-625
- Kolbert Zs\***, Pető A, Lehotai N, Feigl G, Erdei L (2015) Copper sensitivity of *nial1nia2noa1-2* mutant is associated with its low nitric oxide (NO) level. *Plant Growth Regul* 77:255-263
- Lehotai N, Feigl G, Koós Á, Molnár Á, Ördög A, Pető A, Erdei L, **Kolbert Zs\*** (2016) Nitric oxide-cytokinin interplay influences selenite sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 35:2181-2195
- \***Kolbert Zs** (2016) Implication of nitric oxide (NO) in excess element-induced morphogenic responses of the root system. *Plant Physiol Biochem* 101:149-161
- Feigl G, **Kolbert Zs\***, Lehotai N, Molnár Á, Ördög A, Bordé Á, Laskay G, Erdei L (2016) Different zinc sensitivity of Brassica organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern. *Ecotox Environ Saf* 125:141-152 (megosztott elsőszereplőség)
- Molnár Á, Feigl G, Trifán V, Ördög A, Szöllősi R, Erdei L, **Kolbert Zs\*** (2018) The intensity of tyrosine nitration is associated with selenite and selenate toxicity in *Brassica juncea* L. *Ecotox Environ Saf* 147:93-101
- Kolbert Zs\***, Molnár Á, Szöllősi R, Feigl G, Erdei L, Ördög A (2018) Nitro-oxidative stress correlates with Se tolerance of *Astragalus* species. *Plant Cell Physiol* 59:1827-1843
- Kolbert Zs\***, Molnár Á, Oláh D, Feigl G, Horváth E, Erdei L, Ördög A, Rudolf E, Barth TK, Lindermayr C (2019) S-nitrosothiol signalling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 60:2449-2463
- Feigl G, Horváth E, Molnár Á, Oláh D, Poór P, **Kolbert Zs\*** (2019) Ethylene-nitric oxide interplay during selenium-induced lateral root emergence in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 38:1481-1488
- Oláh D, Feigl G, Molnár Á, Ördög A, **Kolbert Zs\*** (2020) Strigolactones interact with nitric oxide in regulating root system architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 11:1019
- Molnár Á, Papp M, Kovács DZ, Béteky P, Oláh D, Feigl G, Szöllősi R, Rázga Zs, Ördög A, Erdei L, Rónavári A, Kónya Z, **Kolbert Zs\*** (2020) Nitro-oxidative signalling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in Brassica species. *Chemosphere* 251:126419
- Kolbert Zs\***, Oláh D, Molnár Á, Szöllősi R, Erdei L, Ördög A (2020) Distinct redox signalling and nickel tolerance in *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana*. *Ecotox Environ Saf* 189:109989 (megosztott elsőszereplőség)
- Feigl G, Varga V, Molnár Á, Panayiotis DG, **Kolbert Zs** (2020) Different nitro-oxidative response of *Odontarrhena lesbiaca* plants from geographically separated habitats to excess nickel. *Antiox* 9:837

## 7. A TÉZISEKHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

(a felelős szerzőség csillaggal jelölve)

- Kolbert Zs\***, Bartha B, Erdei, L (2008) Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol Plant* 133:406-416
- Kolbert Zs\***, Erdei L (2008) Involvement of nitrate reductase in auxin- induced NO synthesis. *Plant Signal Behav* 3:972-973
- Kolbert Zs\***, Bartha B, Erdei, L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* 165:967-975
- Kolbert Zs\***, Ortega L, Erdei L (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *J Plant Physiol* 167:77-80
- Lehotai N, Pető A, Bajkán Sz, Erdei L, Tari, I, **Kolbert Zs\*** (2011) *In vivo* and *in situ* visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiol Plant* 33:2199-2207
- Gémes K, Poór P, Horváth E, **Kolbert Zs**, Szopkó D, Szepesi Á, Tari I (2011) Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiol Plant* 142:179-192
- Kolbert Zs\***, Pető A, Lehotai N, Feigl G, Erdei L (2012) Long-term copper (Cu<sup>2+</sup>) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Growth Regul* 68:151-159
- Feigl G, Kumar D, Lehotai N, Tugyi N, Molnár Á, Ördög A, Szepesi Á, Gémes K, Laskay G, Erdei L, **Kolbert Zs\*** (2013) Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotox Environ Saf* 94:179-189
- Lehotai N, Lyubenova L, Schröder P, Feigl G, Ördög A, Szilágyi K, Erdei L, **Kolbert Zs** (2016) Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L). *Plant Soil* 400:107-122
- Kolbert Zs\***, Lehotai N, Molnár Á, Feigl G (2016) "The roots" of selenium toxicity: a new concept. *Plant Signal Behav* 11:e1241935
- Benyó D, Horváth E, Németh E, Leviczky T, Takács K, Lehotai N, Feigl G, **Kolbert Zs**, Ördög A, Gallé R, Csiszár J, Szabados L, Erdei L, Gallé Á (2016) Physiological and molecular responses to heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of *Populus deltoides* and *P. x canadensis*. *J Plant Physiol* 201:62-70
- Kolbert Zs\***, Feigl G, Bordé Á, Molnár Á, Erdei L (2017) Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiol Biochem* 113:56-63
- Molnár Á, **Kolbert Zs\***, Kéri K, Feigl G, Ördög A, Szöllősi R, Erdei L (2018) Selenite-induced nitro-oxidative stress processes in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica juncea*. *Ecotox Environ Saf* 148:664-674 (megosztott első szerzőség)
- Kolbert Zs\*** (2019) Strigolactone-nitric oxide interplay in plants: The story has just begun. *Physiol Plant* 165:487-497
- Kolbert Zs\***, Molnár Á, Feigl G, van Hoewyk D (2019) Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs. *J Plant Physiol* 232:291-300
- Kolbert Zs\***, Feigl G, Freschi L, Poór, P (2019) Gasotransmitters in action: nitric oxide-ethylene crosstalk during plant growth and abiotic stress responses. *Antioxidants* 8: 167.
- Kolbert Zs\***, Barroso JB, Brouquisse R, Corpas FJ, Gupta KJ, Lindermayr C, Loake GJ, Palma JM, Petrivalsky M, Wendehenne D et al. (2019) A forty year journey : the generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide-Biol Chem* 93:53-70
- Vollár M, Feigl G, Oláh D, Horváth A, Molnár Á, Kúsz N, Ördög A, Csupor D, **Kolbert Zs\*** (2020) Nitro-oleic acid in seeds and differently developed seedlings of *Brassica napus* L. *Plants-Basel* 9:406
- Szöllősi R, Molnár Á, Kondak S, **Kolbert Zs** (2020) Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: stimulation vs. phytotoxicity. *Plants-Basel* 9:1745
- Molnár Á, Rónavári A, Béteky P, Szöllősi R, Valyon E, Oláh D, Rázga Zs, Ördög A, Kónya Z, **Kolbert Zs\*** (2020) ZnO nanoparticles induce cell wall remodeling and modify ROS/RNS signalling in root of *Brassica* seedlings. *Ecotox Environ Saf* 206:111158
- Gupta KJ, Hancock JT, Petrivalsky M, **Kolbert Zs**, Lindermayr C, Durner J, Barroso JB, Palma JM, Brouquisse R, Wendehenne D et al. (2020) Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytol* 225:1828-1834
- Gupta KJ, **Kolbert Zs**, Durner J, Lindermayr C, Corpas FJ, Brouquisse R, Barroso JB, Umbreen S, Palma JM, Hancock JT et al. (2020) Regulating the regulator:nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytol* 227:1319-1325

- Lopes-Oliveira PJ, Caixeta Oliveira H, **Kolbert Zs**, Freschi L (2021) The light and dark sides of nitric oxide: multifaceted roles of nitric oxide in plant responses to light. *J Exp Bot* 72:885-903
- Oláh D, Molnár Á, Soós V, **Kolbert Zs** (2021) Nitric oxide is associated with strigolactone and karrikin signal transduction in *Arabidopsis* roots. *Plant Signal Behav* 16:e1868148
- Kolbert Zs\***, Szöllösi R, Feigl G, Kónya Z, Rónavári A (2021) Nitric oxide signalling in plant nanobiology: current status and perspectives. *J Exp Bot* 72:928-940
- Kolbert Zs\***, Lindermayr C (2021) Computational prediction of NO-dependent posttranslational modifications in plants: Current status and perspectives. *Plant Physiol Biochem* 167:851-861
- Kolbert Zs\***, Ördög A (2021) Involvement of nitric oxide (NO) in plant responses to metalloids. *J Haz Mat* 420:126606
- Borbély P, Molnár Á, Valyon E, Ördög A, Horváth-Boros K, Csupor D, Fehér A, **Kolbert Zs\*** (2021) The effect of foliar selenium (Se) treatment on growth, photosynthesis, and oxidative-nitrosative signalling of *Stevia rebaudiana* leaves. *Antiox* 10:72
- Kondak S, Molnár Á, Oláh D, **Kolbert Zs** (2022) The role of nitric oxide (NO) in plant responses to disturbed zinc homeostasis. *Plant Stress* 4:100068
- Kolbert Zs\***, Szöllösi R, Rónavári A, Molnár Á (2022) Nanoforms of essential metals: from hormetic phytoeffects to agricultural potential. *J Exp Bot* 73:1825-1840
- Seabra AB, Silveira NM, Riberio RV, Pieretti JC, Barroso JB, Corpas FJ, Palma JM, Hancock JT, Petrivalsky M, Gupta KJ, **Kolbert Zs** et al. (2022) Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. *New Phytol* 234:1119-1125
- Molnár Á, Kondak S, Benkő P, Janovszky P, Kovács K, Szöllösi R, Gondor OK, Oláh D, Gémes K, Galbács G, Janda T, **Kolbert Zs\*** (2022) Limited Zn supply affects nutrient distribution, carbon metabolism and causes nitro-oxidative stress in sensitive *Brassica napus*. *Environ Exp Bot* 202:105032

## ***KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Ajánlom Bencének és Marcinak.*