

Doktori (Ph.D.) értekezés tézise

**A NITROGÉN-MONOXID (NO) SZEREPE, KELETKEZÉSE ÉS
FORRÁSA AUXIN KEZELÉS, VALAMINT OZMOTIKUS STRESSZ
ALATT GYÖKEREKBE**

KOLBERT ZSUZSANNA

Témavezető: Prof. Dr. Erdei László

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

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.

Laboratóriumunk ennek, a gyökérfejlődésben megnyilvánuló kettős szabályozási rendszernek a vizsgálatát tűzte ki célul. Összehasonlítottuk egy jelentős környezeti stressz faktor, 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.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e hasonlóság az exogén alkalmazott auxin és az ozmotikus stressz gyökérmorfológiára gyakorolt hatása között?
- Az auxin vagy az ozmotikus stressz indukálja-e a NO szintézisét a gyökerekben?
- Van-e különbség az auxin-indukált valamint az ozmotikus stressz-indukált NO képződésének mértéke vagy időbeli tulajdonságai között?
- Mely enzim lehet felelős a NO szintéziséért auxin kezelés és ozmotikus stressz alatt?

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi anyag

- *Pisum sativum* L. cv. Rajnai törpe
- *Triticum aestivum* L. cv. GK Öthalom
- *Arabidopsis thaliana* L. vad típus (Col-1 és Col-0)
- *Arabidopsis thaliana* L. *pxa1* mutáns
- *Arabidopsis thaliana* L. *Atnoa1* mutáns

- *Arabidopsis thaliana* L. *nia1*, *nia2* mutáns

Gyökérnövekedési paraméterek meghatározása (oldalgyökér szám, főgyökér hossz)

A NO fluoreszcens mikroszkópos detektálása 4,5-diaminofluoreszcein diacetáttal (DAF-2DA)

EREDMÉNYEK

A NO meghatározási módok közül az egyik legszélesebb körben alkalmazott (a felmerülő kritikák ellenére is) a DAF-2DA használata, mivel *in vivo* és *in situ* detektálást tesz lehetővé. A gyökérszegmenseket és keresztmetszeteket DAF-2DA-val festettük, majd Zeiss Axiovert 200M-típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk a minták által emittált fluoreszcenciát.

I. Az exogén auxin és az ozmotikus stressz hatása a gyökérszet fejlődésére és NO tartalmára

Kísérleti eredményeink alapját az a felismerés képezi, hogy a növekvő ozmotikus stressz és külső auxin hatására adott gyökérfejlődési válaszok hasonlóak. Mindkét kezelés esetében, a főgyökér (FGY) hosszának csökkenése elérte a kontroll kb. 50%-át. Az oldalgyökér (OGY) szám növekedése ozmotikus stressz hatására 180%-os, míg a legmagasabb indol-3-vajsav (IBA) koncentrációnál kb. 280%-os volt. Az ozmotikus stressz és az auxin hatására kialakult gyökérfejlődési sajátosságok hasonlósága ellenére, jelentős különbséget tapasztaltunk a NO felszabadulás intenzitásában: míg a 10^{-5} M IBA koncentrációval kezelt gyökerekben 3-szoros, addig a 400 mOsm-os polietilén glikollal (PEG 6000) (-0.98 MPa) kezelt gyökerekben 14-szeres NO szint növekedést detektáltunk a kontrollhoz képest. Az oldalgyökerek iniciációját a NO produkció intenzív növekedése kísérte mindkét esetben. A széles koncentrációtartományban exogén módon alkalmazott IBA lehetővé tette gyökérnövekedésre- és fejlődésre irányuló kettős hatásának vizsgálatát: az IBA alacsony koncentrációi (10^{-9} M- 10^{-8} M) a főgyökér megnyúlásnak kedveztek, melyet nem követett NO felszabadulás, míg a magasabb IBA koncentrációk (10^{-7} M- 10^{-3} M) az oldalgyökér fejlődésért és a NO keletkezés indukálásáért voltak felelősek. Az oldalgyökér szám emelkedése és az auxin koncentráció között egyenes arányosság volt megállapítható, de a NO fluoreszcencia a 10^{-5} M-os IBA kezelésnél mutatott maximumot.

Az intenzív NO felszabadulás szorosan kapcsolt az oldalgökök fejlődéséhez, mivel a NO fluoreszcencia csökkenését és a rövid primordiumok megnyúlását detektáltuk, miután a növényeket nagy koncentrációjú IBA-at tartalmazó oldatból alacsony IBA koncentrációjú közegbe helyeztük át. A NO tartalom növekedett, és új primordiumok jelentek meg fordított kezelés esetén. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy szoros kapcsolat van a gyökök auxin tartalma (exogén IBA kezeléssel módosítottuk) és a NO képződése között a gyökerekben.

Az ozmotikus stressz kezelés hatására kialakult gyökérszerkezet hasonló volt ahhoz, amit IBA kezelés esetén tapasztaltunk. 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 (NPA) 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 csekély hatását azzal a ténnyel magyarázhatjuk, hogy az NPA nem gátolja az IBA transzportját. Ez az eredmény azonban azt is mutatja, hogy bár kis mértéken, de az indol-3-ecetsav (IAA) is felelős az OGY képzésért.

A gyökeresedési folyamat és a NO keletkezés időfüggésének vizsgálata során azt találtuk, hogy a 10^{-5} M IBA oldalgökök számra és NO fluoreszcenciára gyakorolt hatása a kezelés 48. órája után jelentkezett. Az auxin-indukált NO szintézis és oldalgökök indukció hasonló időbeli alakulása arra enged következtetni, hogy ezen folyamatok között funkcionális kapcsolat van. Ezt a feltételezést támasztja alá az az eredményünk is, hogy a NO fluoreszcencia szorosan kapcsolt a gyökök auxin szintjéhez. Az ozmotikus stressznek kitett valamint az IBA-kezelt gyökerekben a NO keletkezés időgörbéje jelentős különbséget mutatott, hiszen az előbbi növénycsoportban az iniciálisok megjelenését egy tranziens NO felszabadulás („stressz-NO”) előzte meg. Az ozmotikus stressz által indukált NO képződés e korai fázisa - mely a 24. órában tetőzik - világosan elkülöníthető az oldalgökök iniciációt kísérő NO felszabadulástól. A PEG-indukált két fázisú NO produkciót *Arabidopsis* és búza növények gyökerében is megtaláltuk, ami a jelenség általános jellegére utal.

Feltételeztük, hogy a korai NO tranziens és a később megjelenő NO forrása és szerepe különbözik. Ez utóbbi NO szintézis a kezelések 48. órája után, a tranziens csökkenését követően indukálódott. A gyors NO akkumuláció kinetikája a NO forrásának függvénye lehet. Amikor az ozmotikus stressz-indukált NO felhalmozódást borsó gyökerekben a NO gyökfogó 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxiddal (cPTIO) alkalmazásával elimináltuk, a kontrollhoz és a 400 mOsm PEG-kezelt gyökerekhez képest csökkent oldalgökök számot tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a korai NO tranziens („stressz-NO”)

szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgökér fejlődéshez. Ezen eredmények a NO különböző forrásaira és a szignáltranszdukciós útban elfoglalt különböző lokalizációjukra utalnak, ugyanis a NO a stressz válaszok korai lépéseiben szerepel, melyet a különböző útvonalak specifikációja előz meg.

Az indol-3-vaajsav számos növényfajban (borsó, kukorica, dohány, lúdfű) természetesen előforduló auxin. Az irodalomban ellentmondó eredmények vannak arra vonatkozólag, hogy az IBA IAA-on keresztül hat-e, vagy önálló auxin hatással rendelkezik. Ez a kérdés a saját kísérleti rendszerünkben is jelentőséggel bír, vagyis, hogy az OGY iniciálisban tapasztalt NO felhalmozódás az IBA közvetlen hatása-e, vagy sem. Ennek a kérdésnek a vizsgálatához a peroxiszómális zsírsav β -oxidációban deficiens *pxa1* mutáns *Arabidopsis* növényeket használtuk, melyekben az IBA nem képes átalakulni IAA-vá. A kontroll *pxa1* mutáns gyökerek a vad típusnál magasabb NO tartalommal rendelkeznek. Ennek oka az lehet, hogy több IBA-t tartalmaznak (bár erre vonatkozó irodalmi adat jelenleg nem áll rendelkezésre), mivel ezekben nem történik meg annak átalakulása IAA-vá. 10^{-5} M indol-3-vaajsavval történő kezelés a mutáns oldalgökér primordiumokban megnövelte a NO fluoreszcenciát a vad típusú növényekhez hasonló mértékben, ami arra enged következtetni, hogy a NO szintézisét az IBA nem IAA-n keresztül, hanem közvetlenül indukálja.

Az exogén auxin és az ozmotikus stressz gyökérfejlődésre és NO produkcióra gyakorolt hatását az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Az ozmotikus stresszhatás és az exogén auxin kezelés hasonló gyökér morfológiát alakított ki borsó növényben: a kezelések koncentrációjának növekedésével a főgyökerek megrövidültek, az oldalgökér szám gyarapodott.
2. Mindkét faktor NO felhalmozódást idézett elő a gyökerekben. A NO képződés időbeli tulajdonságai azonban különböztek. Az ozmotikus stressz hatására kétfázisú NO akkumuláció történt, melynek két szakaszát különítettük el: egy tranziens NO felszabadulás („stressz-NO”), melyet egy lassú, nagymértékű NO képződés követ. Ezt a PEG indukált, két szakaszban történő NO felszabadulást búza és *Arabidopsis thaliana* L. gyökerekben is megtaláltuk. Exogén auxin kezelés hatására ilyen tranziens NO-csúcs megjelenését nem tapasztaltuk.

3. A „stressz-NO” szükséges az ozmotikus stressz által indukált oldalgökér fejlődés indukálásához borsóban.
4. Az IBA közvetlen módon - tehát nem IAA-vá alakulása után - indukálja a NO képződését *Arabidopsis thaliana* L. oldalgökér iniciálisokban.

II. Az auxin- valamint az ozmotikus stressz indukálta NO lehetséges enzimátikus forrása

Miután részleteket dolgoztunk ki a NO gyökérfejlődésben játszott szerepére vonatkozólag borsó növényben, a NO lehetséges enzimátikus forrásának mibenlétére kerestük a választ. Ezen kísérleteinkhez vad típusú (Col-1), *Atnoa1* mutáns (mitokondriális GTP-áz aktivitásban hibás) és nitrát reduktáz (NR) deficiens *nia1*, *nia2* *Arabidopsis thaliana* L. növényeket használtuk fel. Az exogén alkalmazott auxin (10^{-5} M IBA) a vad típusú és az *Atnoa1* növények OGY sűrűségét a kontrollhoz képest 4-szeresre növelte. Az auxin-kezelt *nia1*, *nia2* mutáns növények oldalgökér sűrűsége csupán a kontroll 2-szeresére változott. Vad típusú gyökérben az IBA által indukált NO fluoreszcencia a primordiumok területére lokalizálódott, a főgyökérben kontroll szinten maradt. Az állati NOS enzim gátló N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA) nem volt hatással a NO képződésre, a NR enzim gátló wolframát azonban csökkentette az IBA-indukált NO fluoreszcenciát. Az L-NMMA a főgyökerek alap NO szintjét sem befolyásolta, a NR enzim aktivitásának gátlása viszont a kontroll gyökerek NO tartalmának csökkenését eredményezte. A mutánsok gyökerében különböző alap NO szinteket detektáltunk kontroll állapotukban (auxin kezelés nélkül). A *nia1*, *nia2* mutáns gyökerekben a NO tartalom a másik két növénycsoportéhoz képest alacsonyabb volt, ami a gyökérszövetekben működő NR-függő NO szintézis meglétére utal. Ez azt jelenti, hogy az exogén IBA képes volt a NO felszabadulást indukálni a vad típusú és az *Atnoa1* növényekben, de teljesen hatástalan volt a NR-deficiens mutánsban. Ez világosan rámutat arra, hogy az auxin hatására képződő NO a NR enzim aktivitásától függ. Az ozmotikus stressz-indukált NO produkció két szakaszát különítettük el *Arabidopsis* gyökérben is, ezért szükséges volt külön vizsgálnunk a „stressz-NO” és a késői NO forrását. Az ozmotikus stressz kezelést követő 24 órában a L-NMMA nem gátolta a NO szintézisét a vad típusban, viszont a *nia1*, *nia2* mutáns gyökerekben a „stressz-NO” megjelent. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a „stressz-NO” keletkezése független a NOS és a NR enzim aktivitásától. További kísérletünkben kiderült, hogy a második szakaszban

megjelenő PEG-indukált NO enzimátikus úton, NR enzim aktivitásához kapcsoltn keletkezik, hiszen a vad típusú és az *Atnoal* mutánsban a NO képződés fokozódott, míg a NR mutánsban a PEG kezelést nem követte NO felszabadulás.

Az exogén auxin valamint az ozmotikus stressz kezelés hatására megjelenő NO forrásával kapcsolatos vizsgálataink eredményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Az exogén auxin kezelés hatására bekövetkező NO produkció NR enzim működéséhez kapcsolt *Arabidopsis thaliana* L. gyökér primordiumokban.
2. Az ozmotikus stressz során tranziens módon megjelenő „stressz-NO” képződésében sem a NR, sem pedig a NOS-enzim nem vesz részt. Ezen folyamat háttérében nem enzimátikus szintézis utak állhatnak.
3. Az ozmotikus stressz által indukált késői NO megjelenése egyértelműen függ a nitrát reduktáz enzim működésétől *Arabidopsis thaliana* L. gyökér iniciálisokban.

Fent részletezett eredményeink nemzetközi, referált folyóiratokban kerültek közlésre (lásd. publikációs lista). Tudomásunk szerint ez az első olyan értekezés, amely részleteket dolgoz ki a NO szerepére, enzimátikus forrására vonatkozólag az auxin és az ozmotikus stressz által szabályozott gyökérfejlődési folyamatokban.

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 Oktatási és Kulturális Minisztérium Deák Ferenc Ösztöndíj Pályázata (2008/2009) támogatta.

NYILATKOZAT

Alulírott (társszerző) kijelentem, hogy az alábbiakban felsorolt közös publikációk tudományos eredményeinek elérésében a jelölt, Kolbert Zsuzsanna munkája meghatározó volt, ezért a jelölt téziseiben foglalt eredményeket Ph.D. fokozat megszerzésére nem használtam fel, és azokat a jövőben sem használom fel.

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

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

Szeged, 2009. március 30.

.....
Bartha Bernadett

.....
Prof. Dr. Erdei László