

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS
INFORMATIKAI KAR**

NÖVÉNYBIOLÓGIAI TANSZÉK

**37. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT**

**Szilícium-dioxid nanopartikulum-előkezelés hatása a
későbbi CuO nanopartikulum-indukált
stresszválaszra egyszikűekben**

Kovács Kamilla

Biológus MSc. II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Feigl Gábor

Egyetemi adjunktus

SZEGED

2024

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	3
1 Irodalmi áttekintés	4
1.1 A nanopartikulumok általános jellemzői	4
1.2 Réz-oxid nanopartikulumok	7
1.3 Réz-oxid nanopartikulumok általános hatásai a növényekre.....	8
1.4 A réz-oxid nanopartikulumok hatása egyszikűekre.....	9
2 A szilícium általános jellemzése	10
2.1 A szilícium nanopartikulumok felvétele és szállítása.....	11
2.2 Szilícium nanopartikulumok hatása növényekre	11
2.3 Szilícium hatása abiotikus stresszfolyamatok esetén	12
3 Célkitűzések	14
4 Anyagok és módszerek	15
4.1 Felhasznált növények	15
4.2 Nanopartikulumok	15
4.3 Kísérleti rendszer	15
4.4 Gyökérnövekedési paraméterek vizsgálata	16
4.5 Reaktív jelmolekulák detektálása	16
4.6 Sejtfalmódosulások vizsgálata.....	16
4.7 Festési technikák mikroszkópos háttere	17
4.8 Western blot.....	17
4.9 Statisztikai elemzés.....	18
5 Eredmények	19
5.1 Reaktív jelmolekulák egyensúlyának vizsgálata	21
5.2 További változások vizsgálata.....	26
5.3 A fehérje tirozin nitrációban bekövetkező változások vizsgálata	29
6 Összefoglalás	30
7 Irodalomjegyzék	33
8 Tételes szerzői hozzájárulás.....	39
9 Köszönetnyilvánítás	40

Tartalmi összefoglaló

A mezőgazdasági növényeket érintő abiotikus környezeti stresszorok, mint a só, hőmérséklet, szárazság vagy nehézfémzennyezés mellett az ipar fejlődésével a nanoanyagok okozta stressz is kihívások elé állíthatja a növénytermesztést. Ilyenkor a növények nem érik el hozamuk maximumát, csökkent növekedést és biomassza mennyiséget mutatnak, ezért a növények stressz alatti fejlődését támogató, a termés hozamot növelő eljárások tanulmányozása kiemelkedően fontos a társadalom számára. A különböző nanoanyagok változatos tulajdonságainak köszönhetően széleskörű hatást képesek gyakorolni a növények növekedésére. A nagyobb mennyiségben a rhizoszférába kerülő réz-oxid nanopartikulumok (CuO NP) gátolhatják a gyökérnövekedést, míg a nem esszenciális szilícium, illetve szilícium alapú nanoanyagok számos tanulmány szerint képesek enyhíteni a különböző abiotikus stresszorok, így a nehézfémstressz hatásait is. A CuO NP egyszikű növényekre gyakorolt hatásának korábbi vizsgálata során kiderült, hogy az eltérő toleranciát mutató növényfajok gyökérnövekedés-gátlásának hátterében eltérően változik a reaktív jelmolekulák egyensúlya.

A dolgozatomban a CuO nanopartikulum-indukált stressz lehetséges enyhítését vizsgáltuk szilícium-dioxid (SiO₂ NP) nanopartikulummal előkezelt magokból fejlődő egyszikű csíranövényekben (cirok, búza, rozs és tritikálé), különös tekintettel a gyökérnövekedésére és a hátterében húzódó nitro-oxidatív stresszválaszokra.

A munka során *in vitro* szemihidropónikus rendszert alkalmaztunk annak érdekében, hogy kizárólag a nanoanyagok hatását tudjuk vizsgálni a növények csírázására és korai gyökérfejlődésre, majd detektáltuk a reaktív jelátviteli molekulák egyensúlyában és a nitro-oxidatív stressz eredményeként kialakuló fehérje tirozin nitrációban bekövetkező változásokat.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a magok SiO₂ NP előkezeltése képes volt enyhíteni a CuO NP-indukált gyökérnövekedés-gátlást cirok, rozs és búza esetén, miközben további negatív kihatása volt a tritikálé gyökérfejlődésére. A növekedési válaszok hátterében növényfajtól és alkalmazott SiO₂ NP-koncentrációtól függő változásokat detektáltunk a reaktív jelmolekulák gyökércsúcsi mennyiségében, valamint változások történtek a fehérje tirozin nitráció mértékében és megoszlásában egyaránt. Összességében elmondható, hogy a nanopartikulumok okozta stressz enyhítése más nanoanyagokkal lehetséges, aminek hátterében komplex változások állnak a reaktív jelmolekulák homeosztázisában.

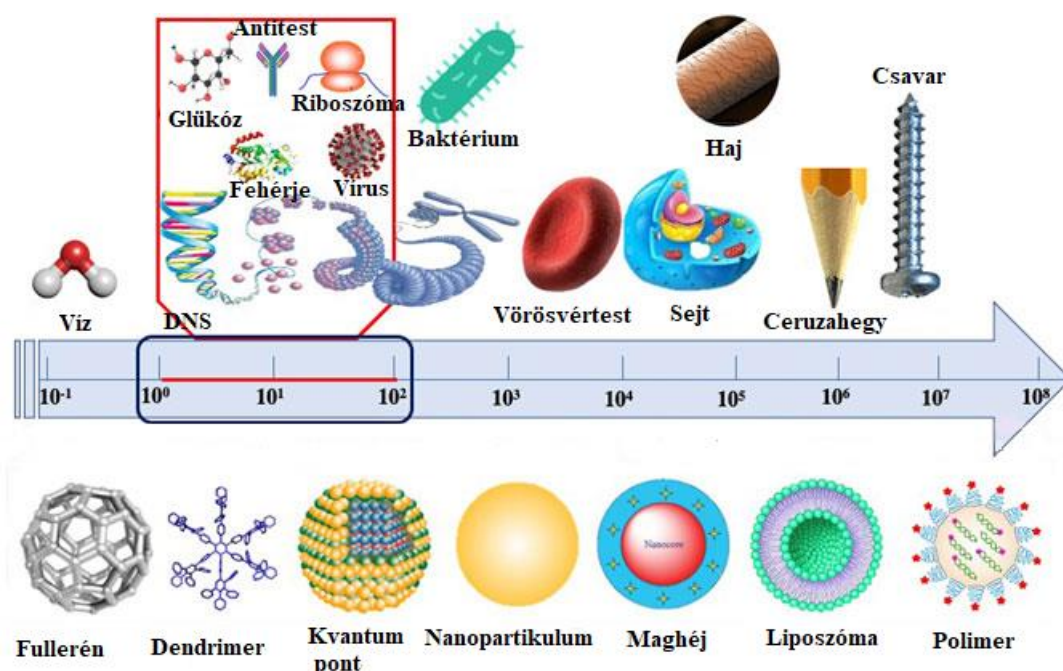
Kulcsszavak: egyszikűek, Si nanopartikulum mag előkezelés, CuO nanopartikulum stressz, nitro-oxidatív homeosztázis

1 Irodalmi áttekintés

1.1 A nanopartikulumok általános jellemzői

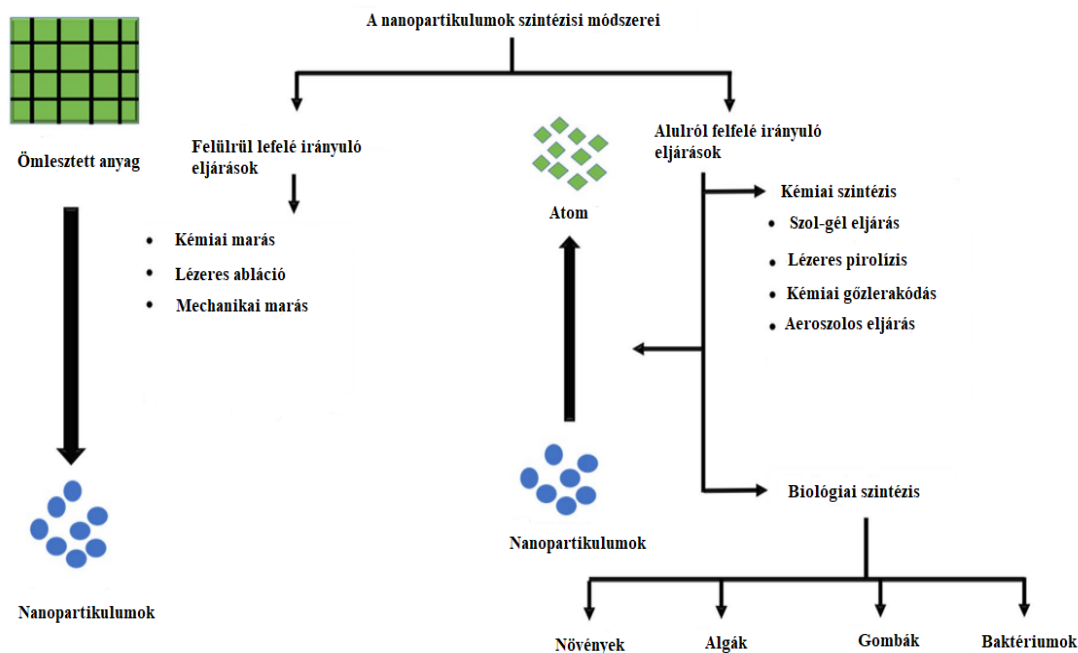
A nanopartikulumokkal való kutatások már régebb óta zajlanak, elsőként Zsigmondy Richárd, az 1925-ös kémiai Nobel-díjas vegyész alkotta meg a nanométer kifejezést, a részecskeméret jellemzésére. A modern nanotechnológia kiemelkedő alakja Richard Feynman Nobel-díjas fizikus. Feynman, már 1959-ben az Amerikai Fizikai Társaság ülésén előadást tartott a Caltech-en a nanopartikulumok lehetséges létezéséről, teóriáját akkor azonban elutasították. Mára az általa felvetett hipotézisek nagy része igaznak bizonyult. Feynman előadása után 1974-ben, egy japán tudós, Norio Taniguchi definiálta először a nanotechnológia fogalmát, a nanométeres nagyságrendű félvezetők működésének leírására. A következő előrelépés az 1980-as években történt, amikor Kroto, Smalley és Curl a Massachusetts Institute of Technology kutatói felfedezték a fulleréneket, valamint Eric Drexler megírta az "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology" című könyvét. A tudományág tovább fejlődött, amikor egy másik japán tudós, Iijima szén nanocsöveket állított elő. Az azóta eltelt idő alatt megnőtt az érdeklődés a nanotechnológia feltörekvő területei iránt. A nanotechnológia ipari alkalmazása exponenciális növekedésnek indult, hatást gyakorolva az orvostudománytól kezdve az élelmiszer-és kozmetikai iparra, de mezőgazdaságra is egyaránt [Hulla és társai, 2015].

A nanopartikulumok úgy definiálhatóak, mint kisméretű, környezetüktől jól elkülönülő objektumok, amelyek mérete legalább két dimenzióban az 1 és 100 nm közötti tartományba esik [1.ábra]. A nanopartikulumoknak nagyon változatos tulajdonságaik lehetnek az alapján, hogy milyen az összetételük, eredetük, és hogyan állították elő. Osztályozásuk az anyagi összetétel alapján négy nagy csoportba osztható: (1) szervetlen alapú nanoanyagok, melyek különböző fém és fém-oxid nanoanyagokat foglalnak magukba (pl réz-oxid); (2) szénalapú nanoanyagok, mint a fullerének és szén-nanocsövek; (3) szerves alapú nanoanyagok; (4) kompozit alapú nanoanyagok, amelyek az előzőek tetszőleges kombinációjából készülnek és bonyolult szerkezetűek [Kartick és társai, 2021].



1.ábra: Különböző biomolekulák és tárgyak segítségével ábrázolt méretarányok összehasonlítása [Shukla és társai, 2021].

A nanopartikulumok szintézisét kémiai, fizikai és biológiai módszerekkel végzik. Fizikai módszerek közé sorolhatóak többek között az elektrokémiai, ultrahangos, besugárzásos, párologtatásos és kondenzációs folyamatok. A kémiai módszerek lehetnek mikroemulzió, mikrohullámú és hidrotermális szintézis folyamatok. Biológia módszerrel való előállításuk is lehetséges baktériumok, cianobaktériumok, gombák, algák és növények kivonatának előállításával, valamint mezőgazdasági hulladékok felhasználásával is [Ijaz és társai, 2020; Razak és társai, 2022]. A részecskék szintézise alapvetően két módszerrel történhet, felülről lefelé és alulról felfelé irányuló eljárásokkal [Ayuk és társai, 2017] [2.ábra]. A felülről lefelé irányuló módszerekben nagyobb anyagokat bontanak kisebb molekulákra pl. mechanikus marassál, amely egy száraz szintézismódszer [Hamatani és társai, 2022]. Ezzel szemben nedves módszereknek nevezik azokat a fizikai, kémiai és biológiai eljárásokat, amelyek alulról felfelé irányulnak. Ezek építkező módszerek, itt az anyag molekuláról molekulára, aggregálódva épül fel [De Oliveira és társai, 2020].

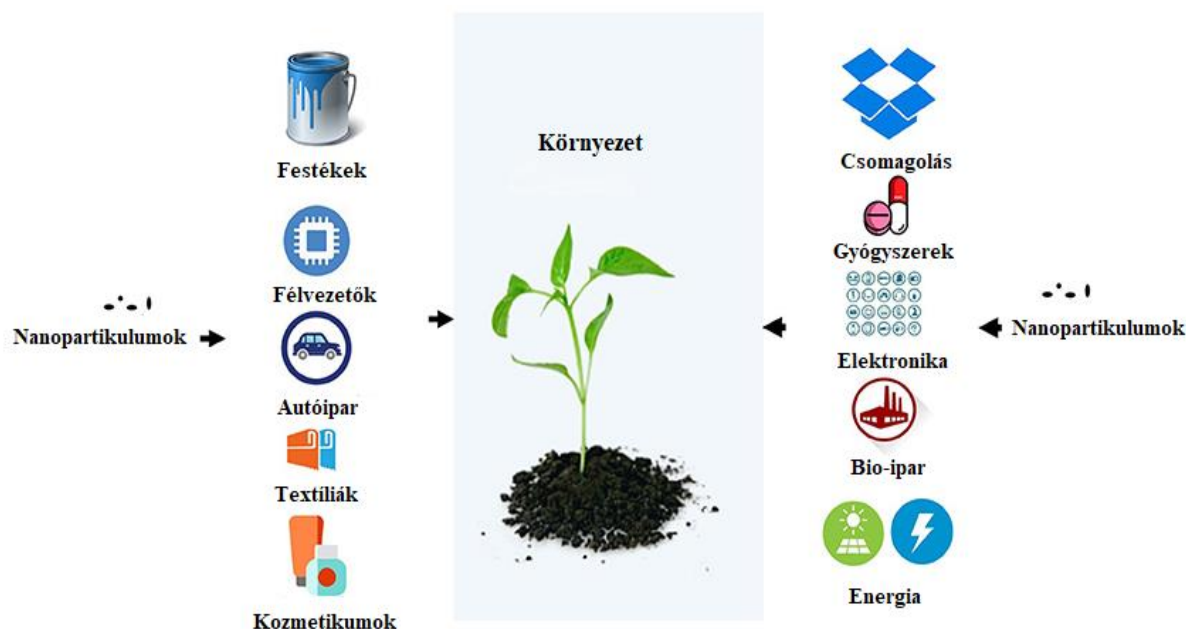


2.ábra: A nanopartikulumok szintézisének módszerei [Naaz és társai, 2023].

Az elmúlt évtizedekben a nanotechnológia széleskörű alkalmazása a különféle iparágakban számos helyen eredményezte a nanopartikulumok megjelenését, köztük a mezőgazdaságban. Ebben az ágazatban a nanoanyagokat számos módon használják fel, többek között trágyázásnál, kártevő irtásban és mag előkezelésben. Elmondható az is, hogy a nanopartikulumok kijutása nem csak a direkt alkalmazásuk révén kerülhet a mezőgazdasági talajokba, hanem véletlenül, egyéb emberi tevékenység hatására is. Fontos, hogy a nanopartikulumok statikus természete, valamint a talajjal és levegővel való kölcsönhatásai miatt a növények ki vannak téve a környezetbe kerülő részecskék hatásainak. Az elmúlt néhány évben beszámoltak számos káros hatásról, melyek függtek a nanopartikulumok típusától, forrásától, részecske méretétől és a növényfajtól egyaránt. A nanopartikulumok károsítják a sejtosztódás stádiumait számos növény gyökércsúcsában és megváltoztatták a gyökérnövekedéssel kapcsolatos gének expresszióját. Közvetett toxicitást is okoznak azáltal, hogy megváltoztatják a talaj baktériumközösségeit, más szennyezőanyagok felvételét idézik elő. Elmondható, hogy egyaránt növelhetik vagy csökkenthetik a terméshozamot, és bekerülhetnek a táplálékláncba, jobbra ismeretlen következményekkel az emberekre és állatokra nézve [Rizwan és társai, 2017].

A nanopartikulumok széleskörű alkalmazásuknak köszönhetően könnyen jutnak a talajba, ahol hosszú ideig létezhetnek [3.ábra]. Befolyásolhatják a talaj fizikai kémiai tulajdonságait, így megzavarva a talaj mikrobiális működését, a növények növekedését és terméshozamát.

[Rajput és társai 2018]. A nanopartikulumok jelen vannak a szennyvíziszapban is, amely mezőgazdasági hasznosítása révén is bekerülhetnek a környezetbe így szennyezve a talajkörnyezetet és közvetlen kapcsolatot alakíthatnak ki a mezőgazdasági növényekkel [Brar és társai, 2010]



3.ábra: Nanopartikulumok környezetbe kerülésének lehetséges forrásai [Rastogi és társai, 2017].

A nanopartikulumok felvétele, szállítása és felhalmozódása függ a részecskék tulajdonságaitól, mint például a méret, alak, kémiai összetétel, emellett a növény környezetétől és állapotától [Wang és társai, 2022]. A növények gyökereinek membrántranszporterei, aquaporinjai, hordozófehérjéi és csatornái kerülnek kapcsolatba a nanopartikulumokkal, melyek segítségével belépnek a sejt belsejébe [Ma és társai, 2008]. Belépés után az apoplasztikus úton történik a szállítás, azonban elakadhatnak a sejtmembránnál vagy a Caspary-csíknál, így a mozgás szimplasztikus útra vált [Rico és társai, 2011]. A nanopartikulumok tömörülhetnek, és a nagy méret akadályozhatja a sejtfalból a sejtmembránba való belépést [Popp és társai, 2005].

1.2 Réz-oxid nanopartikulumok

A réz (Cu) könnyű megmunkálhatósága miatt meghatározó szereppel bírt az emberiség kultúrtörténetében. A réz a földkéregben egy gyakran előforduló átmenetifém. Ionjai képesek elektronokat fogadni, illetve leadni, ezáltal pedig magas redoxpotenciált mutatnak [Foley és társai, 2002]. Jó áram- és hővezető képességének köszönhetően széles körben alkalmazzák. A növények számára esszenciális mikroelem. Részt vesz számos fő élettani és biokémiai

folyamatban, mint a fotoszintézis, mitokondriális légzés, és az oxidatív stressz válasz [Marschner, 2011]. Magas koncentrációban toxikus, csökkenti más elemek felvételének hatékonyságát, oxidatív stresszt okoz, károsítja sejtkomponenseket, valamint a fotoszintetikus pigmentekre is negatív hatással van [Shabbir és társai, 2020].

A fém-oxid nanopartikulumok, mint a CuO, egyike a legfontosabb nanopartikulumoknak. Olyan lényeges elemet tartalmaz, amely elengedhetetlen a növény megfelelő fejlődéséhez, valamint az emberben lejátszódó anyagszere folyamatokhoz is. Kiváló vezetőképességgel, katalitikus aktivitással, és antimikrobiális tulajdonsággal is rendelkezik [Rajput és társai, 2018]. Ezen tulajdonságainak köszönhetően számos felhasználási módjuk létezik, például műtrágyákban, üvegekben, kerámiákban, fényérzékeny elektromos eszközökben, félvezetőkben réz helyettesítésére [Ochoa és társai, 2018].

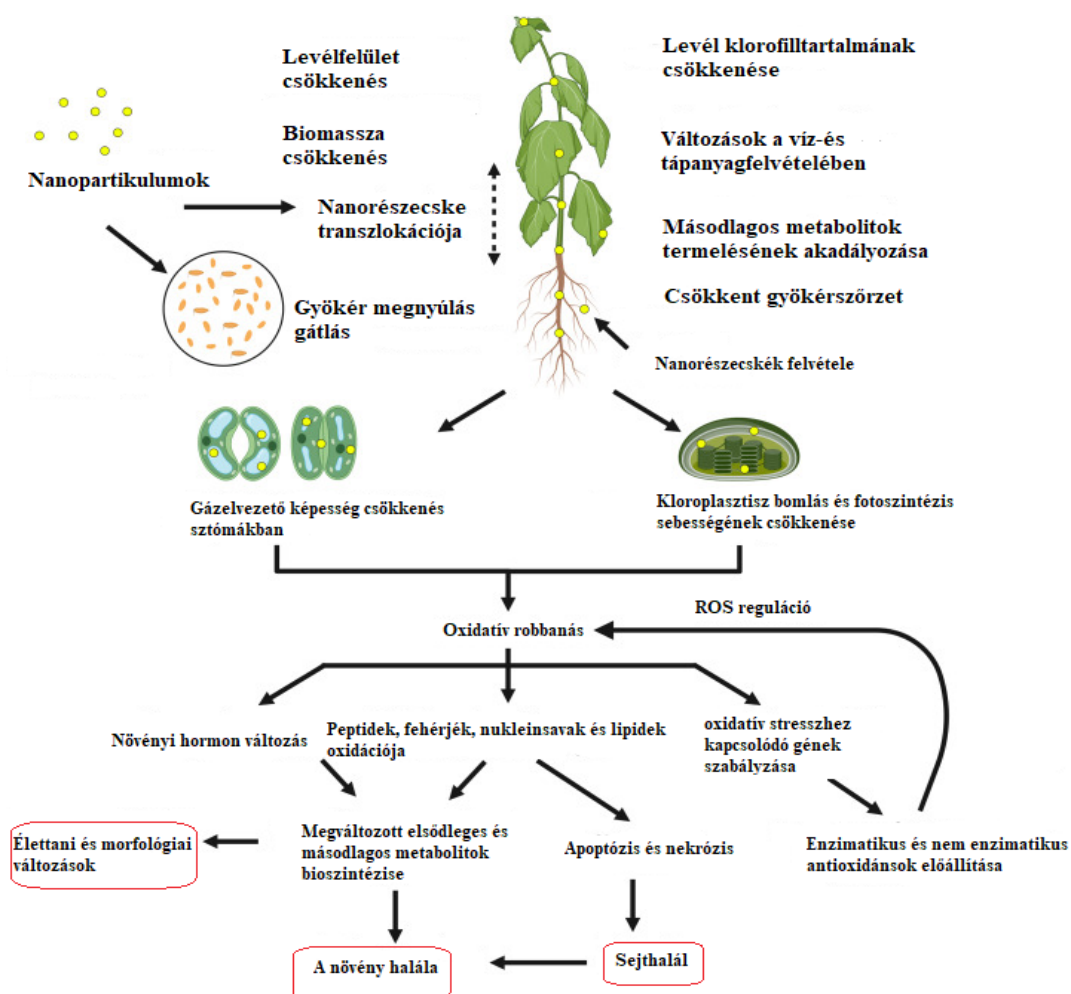
A réz-oxid nanopartikulumokat számos különféle módszerrel lehet előállítani. A számos eljárás közül a leggyakrabban alkalmazott módszerek a hőbontás, kémiai kicsapás, valamint szol-gél eljárások mind különböző méretű és tulajdonságú nanopartikulumokat eredményeznek [Grigore és társai, 2016].

1.3 Réz-oxid nanopartikulumok általános hatásai a növényekre

A CuO nanopartikulum növényekbe történő felvétele, szállítása, bioakkumulációja függ a részecske alakjától, méretétől, és a növény anatómiájától egyaránt. A nanopartikulumok legtöbb esetben a gyökéren keresztül jutnak be a növényekbe, mivel elsődlegesen a gyökér az érintett szerve a nanopartikulumok talajszennyező hatásának. A gyökerek által felvett nanopartikulumok szállítását, és elosztását a további szövetek felé a xilém végzi. A gyökér mellett további bejutási pontot jelentenek a föld feletti növényi szövetek, mint a kutikula, sztomák, trichómák, valamint a különböző sérülések [Rico és társai, 2011].

A CuO nanopartikulumok a bejutást követően két módon hatnak a növényekre, vagy rezet szabadítanak fel, vagy részecskestresszt okoznak, aminek hátterében a reaktív oxigénformák (ROF) képződése áll [Rajput és társai, 2018a]. A felszabaduló réz a növények számára esszenciális mikroelem, azonban magas koncentrációban mérgező. Az abiotikus stressz, kiváltképp a nehézfémek ROF és reaktív nitrogénformák (RNF) túlzott mértékű képződéséhez vezet. A ROF leggyakoribb képviselői a szuperoxid-gyökanion ($O_2^{\cdot-}$), szinglet oxigén (1O_2), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és oxigénygök ($O^{\cdot}$) [Hossain és társai, 2015], melyek fő célpontjai a sejtek. A ROF káros hatásai közé tartozik a membránlipidek peroxidációja, amely további toxikus vegyületeket generál, továbbá csökkenti a DNS és RNS tartalmat, valamint fehérjéket és enzimeket gátolnak [Madian és társai, 2010]. A nitrozatív stressz alatt a

nitrogén-monoxid (NO) és az ebből képződő rokon molekulák által kiváltott stresszt értjük, melynek célkeresztjében a fehérjék állnak. A ROF és RNF metabolizmusának összefüggésének egy jól szemléltető példája a szuperoxidgyök anion és NO reakciója, amely peroxinitritet termel és ez által fehérje tirozin nitrációt idéz elő [Gow és társai, 2004]. A fehérjék nitrációja egy irreverzibilis folyamat, ami egy nitrát csoport hozzáadását jelenti a tirozin aminosav aromás gyűrűjének ortho szénatomján [Radi, 2004]. Ez a módosítás a fehérjék funkcióvesztését és gyors lebomlását is eredményezheti, emiatt jelzésértékű a nitrozatív stressz súlyosságának szempontjából [Corpas és társai, 2007] A 4. összefoglaló ábrán látható a nanopartikulumok hatása a növényekre.



4.ábra: Összefoglaló ábra a nanopartikulumok növényekre gyakorolt hatásairól [Murali és társai, 2022].

1.4 A réz-oxid nanopartikulumok hatása egyszikűekre

A réz-oxid nanopartikulumok hatását vizsgálva egyszikű növényekben a kísérletek jelentős száma rizsre, búzára és kukoricára irányult. A rizs (*Oryza sativa* L.) esetében növekedés-gátlást figyeltek meg, az alkalmazott koncentrációk és kísérleti rendszerek

többségében [Feigl, 2023]. Ezzel szemben a búzával (*Triticum aestivum* L.) végzett kísérletek változatos eredményeket produkáltak. Bizonyos esetekben a nanopartikulumok alkalmazása pozitív hatást váltott ki, növelve a növények növekedési paramétereit és termés hozamát [Badawy és társai, 2021]. Más tanulmányok koncentrációfüggő változást mutattak ki. Magas nanopartikulum koncentráció növekedést indukált, alacsonyabb viszont csökkent növekedést eredményezett [Ibrahim és társai, 2022]. Kukoricával (*Zea mays* L.) végzett kísérletekben a gyökér és hajtásnövekedés csökkent a nanopartikulumok hatására, hidropónikus és talaj rendszerekben egyaránt. Az árpa eltérő választ mutatott a kezelés koncentrációjától és időtartalmától függően [Feigl, 2023]: *in vitro* kísérletekben a nanopartikulumok hozzáadása javította az árpa (*Hordeum vulgare* vagy *Hordeum sativum* L.) csírázási képességét [Kadri társai, 2022], viszont talajkísérletekben növekedés visszamaradása figyelhető meg [Burachevskaya és társai, 2021; Fodorenko és társai, 2021].

Vízi egyszikűek, a *Landoltia punctata* (G.Mey.) [Shi és társai, 2011] és a *Lemna minor* (L.), tekintetében is végeztek vizsgálatokat: mindkét növény esetében növekedésgátlás tapasztalható a nanopartikulumok koncentrációjától és méretétől függetlenül [Song és társai, 2016; Koce és társai, 2017; Yue és társai, 2018]. Az eddigi tanulmányok alapján elmondható, hogy az egyszikűek legtöbb esetben negatívan reagáltak a CuO nanopartikulumos kezelésre.

2 A szilícium általános jellemzése

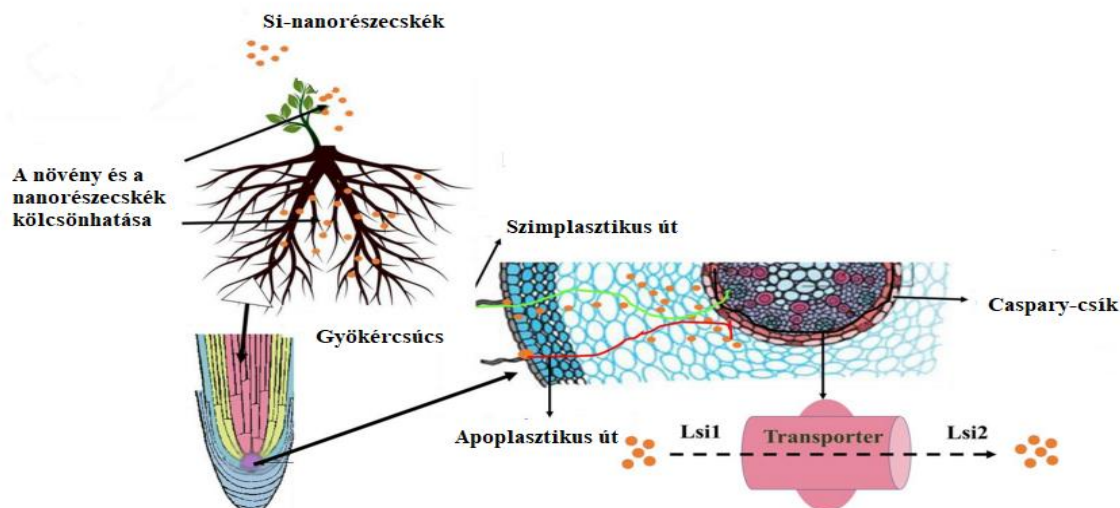
A szilícium a földkéreg második leggyakoribb eleme az oxigén után. Fémeselem, amely több mint 370 kőzetalkotó ásványban megtalálható, így a legtöbb talajtípus részét képezi. A természetben háromféle oxidációs állapotban létezik, ezek a -4, +2 és a +4. A legtöbb talajképző kőzetben a +4-es oxidációs állapot a leggyakoribb előfordulása [Tubaña és Heckman, 2015].

A különböző talajokban a szilícium mennyisége 23-35 tömegszázalék között változik, azonban a legtöbb szilícium vegyület oldhatatlan formában található [Richmond és Sussman, 2003; Prychid és társai, 2003]. Növényekben fajonként változó a mennyisége, ami a különböző felvételi képességgel bíró szilícium transzporterekkel magyarázható [Hodson és társai, 2005; Deshmukh és Bélager, 2016]. A szilícium a talajban szilikagél, szilícium-dioxid és szilikát formában fordul elő. Ezen felül halmazállapota szerint megkülönböztetünk szilárd és folyékony formát. A szilárd fázis túlnyomó többségben kvarcból tevődik össze, kristályos szilikátformákkal, amorf szilícium-dioxiddal, valamint agyagásványokkal együtt [Savant és társai, 1999]. A szilícium folyékony fázisban elsősorban ortokovaszavként van jelen [Casey, 2003], de megtalálható még, szerves anyagokkal és szerves szilícium vegyületekkel képzett

komplexek formájában is. A szilícium az emberi egészség egyik kulcsfontosságú nyomeleme, emellett a növények egészsége szempontjából is meghatározó: különböző környezeti körülmények között enyhíti az abiotikus stresszek számos formáját [Martin, 2013; Ali és társai, 2013].

2.1 A szilícium nanopartikulumok felvétele és szállítása

Rao és munkatársai [2017] arról számoltak be, hogy számos szállítófehérje, mint az Lsi1, Lsi2 és Lsi6 hatékonyan szállítja a Si-nanopartikulumokat a gyökerektől a hajtás felé. Az Lsi1 gén kifejeződése magasabb volt a gyökerekben Si-nanopartikulumos kezelés után. Az Lsi1 és Lsi2 gén expressziója sóstressz alatt is növekedett rizsnövényekben Si-nanopartikulumos kiegészítés mellett, ami azt mutatja, hogy ezek a transzporterek hozzájárulnak a felvételhez és szállításhoz [Jadhao és társai, 2020; Yamaji és társai, 2015]. A Si- nanopartikulumok szállításának összefoglalója az 5. ábrán látható.

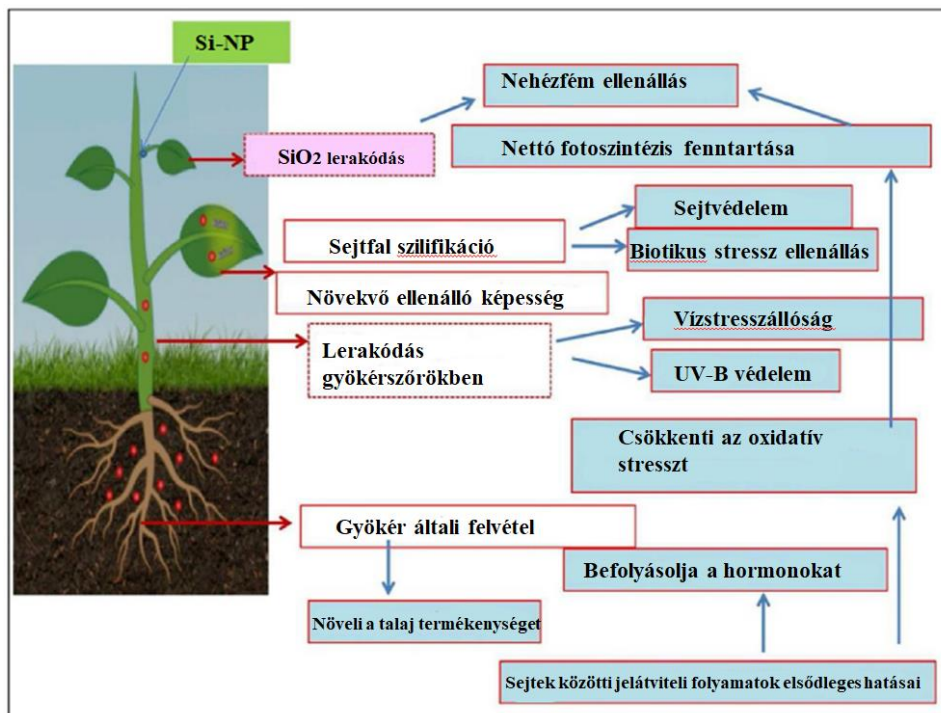


5.ábra: Az Si- nanopartikulumok szállítása növényekben [Haleema és társai, 2023].

2.2 Szilícium nanopartikulumok hatása növényekre

A szilícium növényekre gyakorolt jótékony hatását számos korábbi tanulmány alátámasztja. Az előnyök több mechanizmuson keresztül is kimutathatóak. Az amorf részecskék képezhetnek egyfajta mechanikai gátat a kórokozókkal szemben, emellett lignin, fitoalexinek és fenolok szintézisének keresztül fokozhatják a védekezőképességet [Guntzer és társai, 2012; Ma és társai, 2006]. A védekezésben játszott szerepén túl, a magok csírázásban is kifejti pozitív tulajdonságait. A Si-nanopartikulumokkal történő előkezelés javította a magok átlagos csírázási idejét, és növelte a palánták friss és száraz tömegét paradicsom növényekben [Siddiqui és Al-Wahaibi, 2014]. A szilícium továbbá megemelte Changbai vörösfenyő (*Larix olgensis*) palánták átlagos magasságát, a főgyökerek hosszát, átmérőjét, valamint az

oldalgyökerek számát [Bao és társai, 2004]. A különböző koncentrációban (5 g/L és 3 g/L) alkalmazott Si-nanopartikulumok növelték a paradicsom levélszámát, és növények magasságát is [Fitriani és Haryanti, 2016]. Mindezek mellett a fotoszintézis folyamatát is segíti úgy, hogy növeli a fotoszintetikus pigmentek szintézisét, az elektrontranszport sebességét és a fotokémiai kioltást [Siddiqui és társai, 2014; Xie és társai, 2012].



6.ábra: Általános összefoglaló a Si- nanopartikulumok hatásairól [Goswami és társai, 2022].

2.3 Szilícium hatása abiotikus stresszfolyamatok esetén

Számos kutatás kimutatta, hogy a szilícium alkalmazása képes számos abiotikus stressz negatív hatásait enyhíteni [Frew és társai, 2018]. Megfigyelték, hogy a szilícium képes volt több módon is a sóstressz hatásait enyhíteni, így például képes megváltoztatni a gyökérsejtek membránjának áteresztőképességét, ezzel stabilizálva a szerkezetüket, valamint blokkolhatja a só áramlását a gyökerekben [Luyckx és társai, 2017]. A szilícium hatékonyan képes továbbá megelőzni, vagy csökkenteni a szárazságstresszt, mivel segít fenntartani az ozmotikus egyensúlyt, támogatja az ásványi anyagok felvételét, és aktiválja a növények antioxidáns védelmi rendszerét [Gunes és társai, 2008]. Számos növényfaj esetében bizonyított továbbá, hogy a szilícium segít mérsékelni a hőstressz hatásait [Malhotra és Kapoor, 2019]. Beépülve a xilém sejteinek falába, így elleállóvá téve azokat [Takahashi és Kurata, 2007].

A fémtoxicitás jelentős következményekkel jár az egész ökoszisztémára, amelyben a növények kulcsfontosságú résztvevők. Azok a növények, amelyek fémekkel szennyezett

környezetben nőnek, csökkent növekedést és magas fémfelhalmozódást mutatnak [Liang és társai, 2007]. A nehézfémek magasabb koncentrációja lényegesen befolyásolja a kritikus fontosságú elemek felvételét, felhalmozódását és transzlokációját [Zia-ur-Rehman és társai, 2015]. A nehézfémek gyakori hatásai közé tartoznak a klorózis, csökkent biomassza, fotoszintézis gátlása, megváltozott tápanyag asszimiláció, öregedés, amely tulajdonságok végső soron a növények pusztulásához vezetnek [Ali és társai, 2011; Bhat és társai, 2019]. A szilícium nehézfém stressz tüneteit is képes enyhíteni, egyrészt azért, hogy lerakódhat a sejtek közötti terekben, így gátolva meg a nehézfémek növényen belüli mozgását [da Cunha és do Nascimento, 2009]. Emellett a szilícium vegyületei képesek komplexeket létrehozni a nehézfémekkel így csapdázva azokat. A szilícium hatással van a növényen belüli fémion kompartmentalizációjára és elosztásra [Adrees és társai, 2015]. Továbbá morfológiai változásokat is okozhat, például megnöveli a levelek méretét, számát, a gyökerek hosszát és tömegét, illetve megváltoztatja a növényi hormonok termelését [Hernandez-Apaolaza, 2014].

3 Célkitűzések

Az ipar fejlődésével egyre szélesebb körben elterjedt a nanopartikulumok, mint a réz-oxid használata, amely míg kis mennyiségben pozitív hatást gyakorolhat a növények fejlődésére, mint mikroelem-forrás, azonban magas koncentrációban részecskestresszt okozhat. Számos tanulmány beszámolt arról, hogy a szilícium, annak ellenére, hogy nem esszenciális tápanyag, mérsékelheti bizonyos növényi stresszorok hatását.

A munkánk alapjául egy korábbi tanulmány eredményei szolgálnak, ami szerint az 50%-os gyökérnövekedés-gátlást okozó CuO-nanopartikulum stressz eltérő nitro-oxidatív választ váltott ki a relatív érzékeny cirok és a toleráns búza, rozs és tritikálé gyökereiben. Ennek folytatásaként, a dolgozatban elsőként vizsgáljuk CuO nanopartikulum-indukált stressz lehetséges enyhítését szilícium-dioxid nanopartikulum mag-előkezeléssel egyszikű csíranövényekben, aminek során a következő kérdésekre kerestük a választ.

- Képes-e módosítani, és ha igen, hogyan a magok szilícium-dioxid nanopartikulummal történő előkezelése a belőlük fejlődő csíranövények 50%-os gyökérnövekedés gátlást okozó réz-oxid nanopartikulum-koncentrációra adott gyökérnövekedési válaszát?
- Hogyan változik a reaktív jelmolekulák egyensúlya a módosult gyökérnövekedési válaszok hátterében?
- Hogyan változik a fehérje tirozin nitráció intenzitása és mintázata a szilícium-dioxid nanopartikulum mag-előkezelés hatására réz-oxid nanopartikulum stressz alatt, mutat-e ez összefüggést a módosult gyökérnövekedési válaszokkal?

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált növények

A felhasznált kísérleti növények magjait a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft. biztosította. A következő egyszikűeket használtuk: cirok (*Sorghum bicolor* L., GK Emese), rozs (*Secale cereale* L., Wibro), tritikálé (*x triticosecale*, GK Maros) és búza (*Triticum aestivum* L., GK Békés).

4.2 Nanopartikulumok

A kísérlet során két különböző fféle nanopartikulumot alkalmaztunk.

Korábbi kísérletek során meghatároztuk a vizsgált növényfajok gyökérnövekedését 50%-ban gátló CuO nanopartikulum koncentrációkat [Kacziba és társai, 2023]. A relatív érzékeny cirok esetében ez a koncentráció 50 mg/L, míg a relatív toleráns rozs, tritikálé és búza esetében 150 mg/L volt. A CuO nanopartikulumokat módosított precipitációs módszerrel készítették [Phiwdang és társai, 2013; Molnár és társai, 2020 (b)]. A CuO nanopartikulumokat korábban transzmissziós elektronmikroszkóppal vizualizálták, ami azt mutatta, hogy elipszoid és pálcika alakúak, a részecskék laza aggregátumokat alkottak. A részecskék átlagos mérete $48, 2 \pm 6,3$ nm volt.

A magok előkezeléséhez egy 10-20 nanométeres részecskeméretű szilícium-dioxid nanoport (Sigma-Aldrich, 637238) használtunk, amelyből különböző koncentrációjú szuszpenziót készítettünk (100, 200, 400 és 800 mg/L) 30 perces ultrahangos szonikálással. A magokat 6 órán keresztül kezeltük a szuszpenziókban, sötétben, szobahőmérsékleten. A 6 óra elteltével eltávolítottuk a magokat a folyadékból, majd 24 óra alatt megszáritottuk és felhasználásig hűtőszekrényben tároltuk.

4.3 Kísérleti rendszer

Az első lépés a kísérlethez használt, kezeletlen és előkezelt magvak csíráztatása volt üveg Petri-csészékben. A kísérletek *in vitro*, szemihidropónikus rendszerben történtek, steril, két réteg szűrőpapírral bélelt Petri-csészékben. A szűrőpapírokat 5 ml ioncserélt vízzel (kontroll), vagy 5 ml, korábban meghatározott réz-oxid nanopartikulum-szuszpenzióval itattuk át. Minden csészébe 10 magot helyeztük egyenlően elosztva, majd jelöltük és lezártuk azokat fóliával. A fóliával lezárt csészéket 5 napra növénynevelő szobába helyeztük, ahol kontrollált körülmények között csírázhattuk, $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitással megvilágítva (fehér LED 5700 K), távoli vörös kiegészítéssel (PSI, Drásov, Csehország) 12 órás nappali és sötét periódussal, valamint 55-60%-os páratartalommal 25 ± 2 °C hőmérsékleten.

4.4 Gyökérnövekedési paraméterek vizsgálata

A termesztési ciklus végén megmértük a növények főgyökérhosszát, valamint megszámláltuk a gyökereket, illetve oldalgyökereket

4.5 Reaktív jelmolekulák detektálása

A szuperoxid gyök-anion kimutatásához 10 μM -os dihidroetídiumot (DHE) használtunk Tris-HCl-ben (10 mM, pH 7,4). Az inkubációs időt (30 perc 37 °C sötétben), majd kétszeri mosást követően kihelyeztük a megfestett gyökereket tárgylemezre [Pető és társai, 2013].

A hidrogén-peroxid meghatározása 50 μM Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) fluorofórral történt. Egy 20 perces inkubációt követően a gyökereket egyszer mostuk Na-foszfátpufferben (50 mM, pH 7,5) [Lehotai és társai, 2012].

A NO kimutatásához a gyökércsúcsokat DAF-FM DA (4-amino-5metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein diacetát) festékkoldatba helyeztük, 10 μM -os koncentrációban. A festés 30 perc alatt sötétben történt, majd kétszeri mosást követően kihelyeztük a megfestett gyökereket tárgylemezre, és fluoreszcens mikroszkóp segítségével dokumentáltuk [Kolbert és társai, 2012].

A peroxinitrit vizsgálata APF festékkel történt. A mintákat szobahőmérsékleten és sötétben 10 μM -os koncentrációjú festékkoldatban inkubáltuk egy órán keresztül. Ezt követően kétszer mostuk Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) pufferben, majd tárgylemezre helyeztük és fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk [Chaki és társai, 2009].

A hidrogén-szulfid kimutatásra WSP-1 (Washington State Probe 1) fluoreszcens festéket használtunk. A növényi gyökereket foszfát pufferrel mostuk, majd hozzáadtuk a WSP-1 festéket 15 mM-os koncentrációban (20 μM Hepes-NaOH, pH 7,5 pufferben készítve). Szobahőmérsékleten 40 percen keresztül inkubáltuk, majd 3 desztillált vizes mosást követően tárgylemezre helyeztük, és fluoreszcens mikroszkóp segítségével dokumentáltuk [Li és társai, 2014].

4.6 Sejtfalmódosulások vizsgálata

Difenil-bórsav-2-amino-etil-észter (DPBA; 0,25 tömeg/térfogatszázalék, desztillált vízben, 0,005 térfogatszázalék Triton X-100-zal előállítva) festék alkalmazható a kvercetin kimutatására. A gyökereket 7 percre festékkoldatba helyeztük és szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után egyszeri desztillált vizes mosást következett. A gyökereket tárgylemezre pakoltuk, majd legvégül a fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk [Sanz és társai, 2014].

Anilin-kék festéket használtunk kallóz vizsgálatára. A gyökércsúcsokat 0,1%-os anilin (1M glicinben oldva) festékoldatba helyeztük, és 5 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintákat egyszer desztillált vízzel mostuk és fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk [Feigl és társai, 2015].

4.7 Festési technikák mikroszkópos háttere

A növények gyökércsúcsainak vizsgálatát minden esetben Zeiss Axiovert 200 M inverz mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük. A mikroszkóphoz csatlakozik egy nagy felbontású digitális kamera (Axiocam HR, HQ CCD, Carl Zeiss, Jena, Németország). Az általunk használt mikroszkóp szűrői különböző excitációs és emissziós tartománnyal rendelkeznek. A reaktív nitrogénformák kimutatására alkalmazott festési technikák esetében a 10-es szűrő-szett (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-565 nm) bizonyult megfelelőnek. A DHE, DPBA és WSP-1 esetében pedig a 9-es szűrő-szett (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-∞ nm) volt megfelelő. Anilin-kék esetében 49-es szűrő-szett (excitációs hullámhossz tartománya: 365nm, emissziós tartomány 445-50 nm), míg 20HE-szűrő-szetett használtunk Amplex Red kimutatásra (excitációs hullámhossz tartománya: 546/12 nm, emissziós tartomány 607/80 nm).

A növények gyökerének osztódási zónájáról készített felvételeket az Axiovision Rel. 4.8 szoftver segítségével elemeztük. A pixel intenzitást egy 50 mikrométer sugarú körben mértük, mely arányos a detektált molekula mennyiségével.

4.8 Western blot

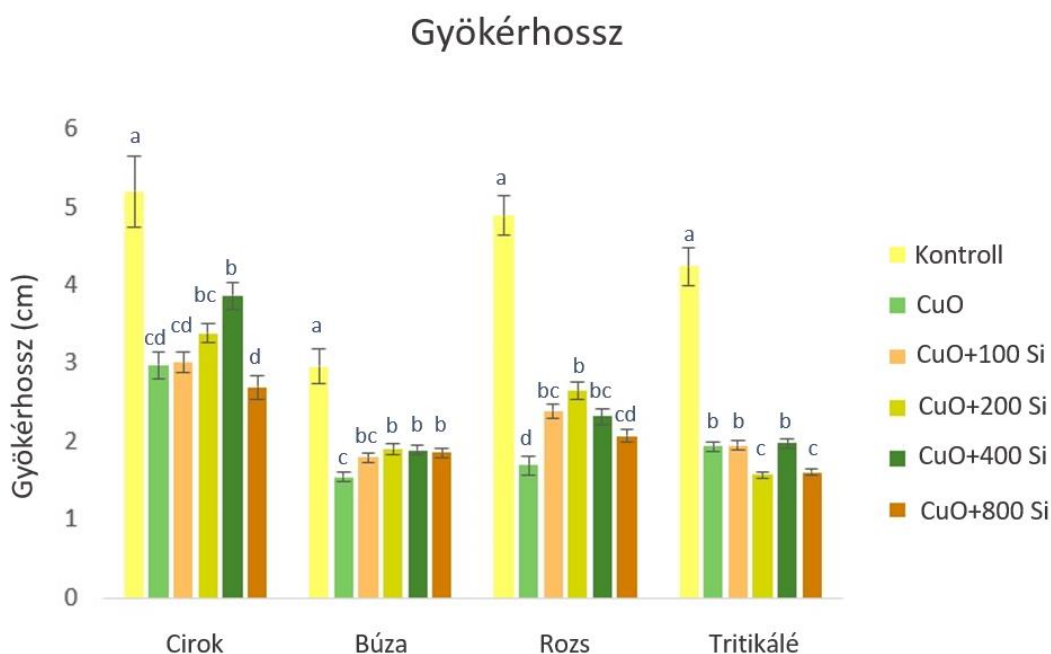
Western blot analízist végeztünk a fehérjék tirozin nitrációjának kimutatásához. A fehérjekivonat elkészítéséhez először a megfelelő mennyiségű gyökérmintát hűtött mozsárban kétszeres mennyiségű kivonópufferben (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 % TritonX-100 és 10% glicerol) homogenizáltunk. A mintát 12000 rpm-en centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on. Ez után a felülúszót denaturáltuk nemredukáló mintapufferrel. A denaturált fehérjemintákat SDS poliakrilamid (4% stacking, 12% running) gélre vittük fel, és gélelektroforézisnek vetettük alá, amely hatására a fehérjék méret szerint elkülönültek. A szeparálódott fehérjéket PVDF membránra transzfereltük, majd jelöltük 1:2000 arányban hígított 3-nitrotirozin elleni antitesttel jelöltük, (4 °C, egy éjszaka) [Corpas és társai, 2008]. Másnap alkalikus foszfáttal konjugált 1:10000 arányban hígított másodlagos antitestet használtunk az immuno-detekcióra. Végezetül a nitrált fehérjék láthatóvá tételére BCPIP/NBT reakciót végeztünk.

4.9 Statisztikai elemzés

Az eredmények átlag $\pm$ standard hiba (s.e.) értékben tüntettük fel. A statisztikai elemzések során a minták közötti különbségek feltárása érdekében többszörös összehasonlító elemzéseket végeztünk a SigmaStat 12 szoftverrel. A variancianalízist (ANOVA, $P < 0,05$) alkalmaztuk, hogy meghatározzuk a csoportok közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket. Ezt követően a Duncan-tesztet használtuk a konkrét csoportok közötti különbségek részletes vizsgálatára, lehetővé téve a poszt-hoc összehasonlításokat. Az így kapott eredmények megbízhatóságát és érvényességét a statisztikai szignifikancia szintje biztosította, amely alapján a P-érték kisebb volt, mint 0,05.

5 Eredmények

A kísérletek során először azt vizsgáltuk meg, hogy a SiO₂ NP mag előkezelés hogyan hatott a vizsgált fajok gyökérnövekedésére 50%-os növekedésgátlást okozó CuO NP kezelés mellett.

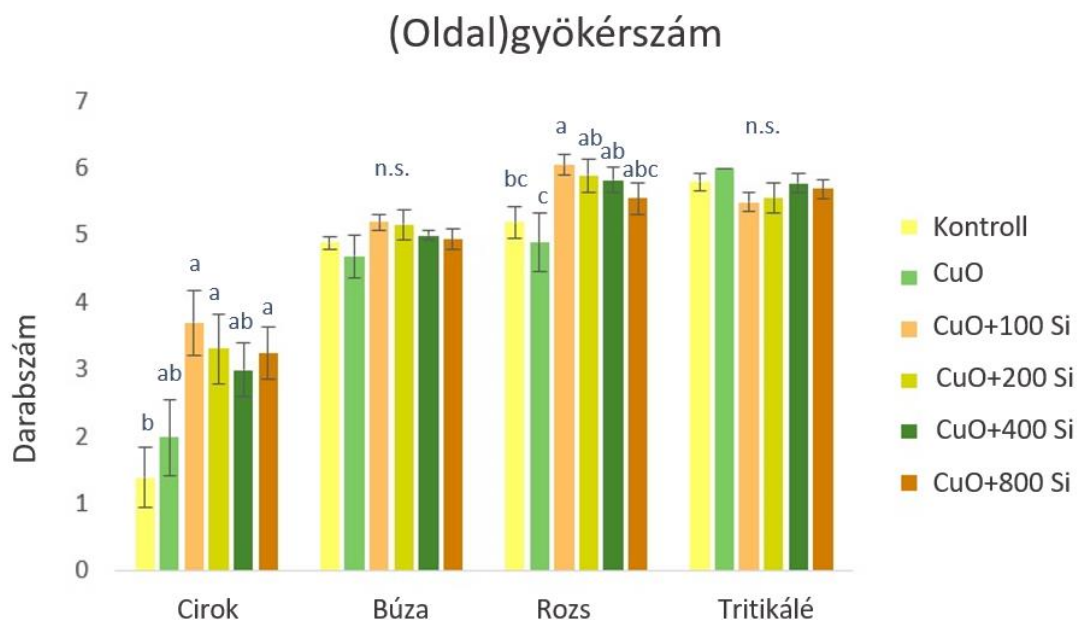


7.ábra: A CuO nanopartikulum stressz és SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása a főgyökérhossz változásra. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$)

A 7. ábrán megfigyelhető, hogy a magok SiO₂ NP előkezelése képes volt kompenzálni a CuO NP-ok gyökérhossznövekedését gátló hatását a cirok, búza, valamint rozs esetében, miközben a tritikálé gyökérnövekedését két koncentrációban is tovább gátolta. A leginkább szembetűnő pozitív eredmény a cirok esetében figyelhető meg a 400 mg/L SiO₂ NP koncentrációnál, míg 800 mg/L-es előkezelés inkább gátlóan hatott a főgyökerek növekedésére a tisztán CuO NP-os kezelést kapott növényekhez viszonyítva. A búza esetén több SiO₂ NP előkezelés volt képes csökkenteni a CuO-indukált gyökérnövekedés-gátlást, a 200, 400, 800 mg/L-es koncentrációk közel azonos hossznövekedést eredményeztek, melyek közül a 400 mg/L koncentráció érte el a legjobb eredményt. Rozs esetében a 100, 200 és 400 mg/L koncentrációjú SiO₂ NP előkezelés okozott szignifikáns pozitív gyökérnövekedési választ, míg a legmagasabb koncentráció kisebb mértékben, de még mindig javította a gyökérnövekedést a tisztán CuO NP-os kezelést kapott növényekhez képest. Triticálénál nem figyelhető meg a gyökérnövekedés gátlásának enyhülése, a 100 és 400 mg/L koncentrációjú SiO₂ NP-mal előkezelték azonos eredményt mutatnak a kizárólag CuO NP-mal kezeltékkel,

míg a 200 és 800 mg/L-es előkezelést kaptak szignifikánsan tovább csökkentették a gyökérhosszokat.

A gyökér fejlődését szemléltető másik paraméter a gyökérszám (búza, rozs, tritikálé), illetve az oldalgyökérszám (cirok), amit szintén vizsgáltunk.



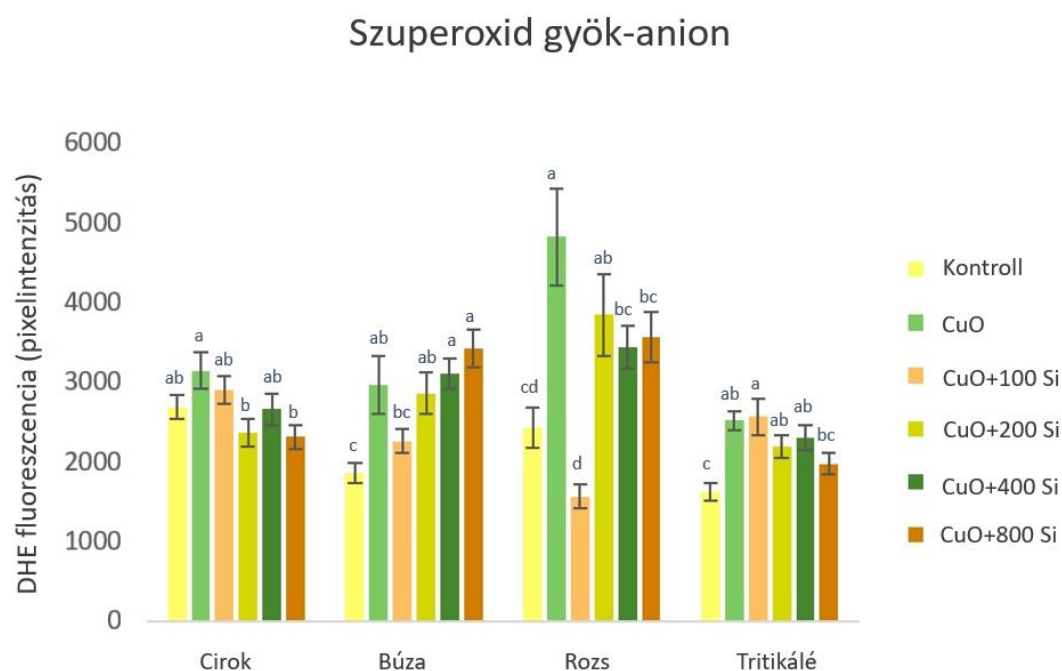
8.ábra: A CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása az oldalgyökérszám változásra. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$. N.s.-nincs szignifikáns változás).

A 8. ábrán látható, hogy SiO₂ NP előkezelés pozitívan befolyásolta az oldalgyökerek számát a cirok és rozs növények esetében, miközben a búza és tritikálé esetében sem a CuO, sem a SiO₂ NP kezelés nem módosította érdemben a gyökérszámot. Cirok esetében a CuO NP-os kezelés enyhén megemelte az oldalgyökérszámot, azonban a különböző koncentrációjú SiO₂ NP előkezelések jelentősen tovább emelte az oldalgyökerek mennyiségét CuO NP stressz alatt. A búza minden esetben pozitív, de nem szignifikáns választ mutatott. A rozs esetén 100 mg/L koncentrációs előkezelés érte el a legpozitívabb hatást, míg az annál nagyobb koncentrációk esetében folyamatos csökkenő tendencia látható, viszont még ezekben az esetekben is magasabbnak bizonyult a gyökérszám, mint a kizárólag CuO NP-n nevelkedett csíranövények esetén. Végül tritikálénál a CuO NP-os kezelés eredményezett egy enyhe növekedést a gyökérszámban, azonban szilíciummal kiegészítve egy enyhe csökkenés látható.

Tanulmányok kimutatták, hogy a szilícium lényeges szerepet játszik a növények stressz folyamatainak enyhítésében. Dey és társai (2023) beszámoltak arról, hogy a szilícium exogén alkalmazása fokozza a növekedést és a tápanyagfelvételt *Solanum tuberosum* gumóiban. Megfigyelték továbbá, hogy kadmium stressz, alatt a szilícium nanopartikulumos kezelés jelentősen csökkentette moso-bambuszban a növekedésgátlást [Emamverdian és társai, 2021]. Emellett a szilícium javította veteménybab növekedési paramétereit nehézfémekkel és sóval szennyezett talajban is [El-Saadony és társai, 2021].

5.1 Reaktív jelmolekulák egyensúlyának vizsgálata

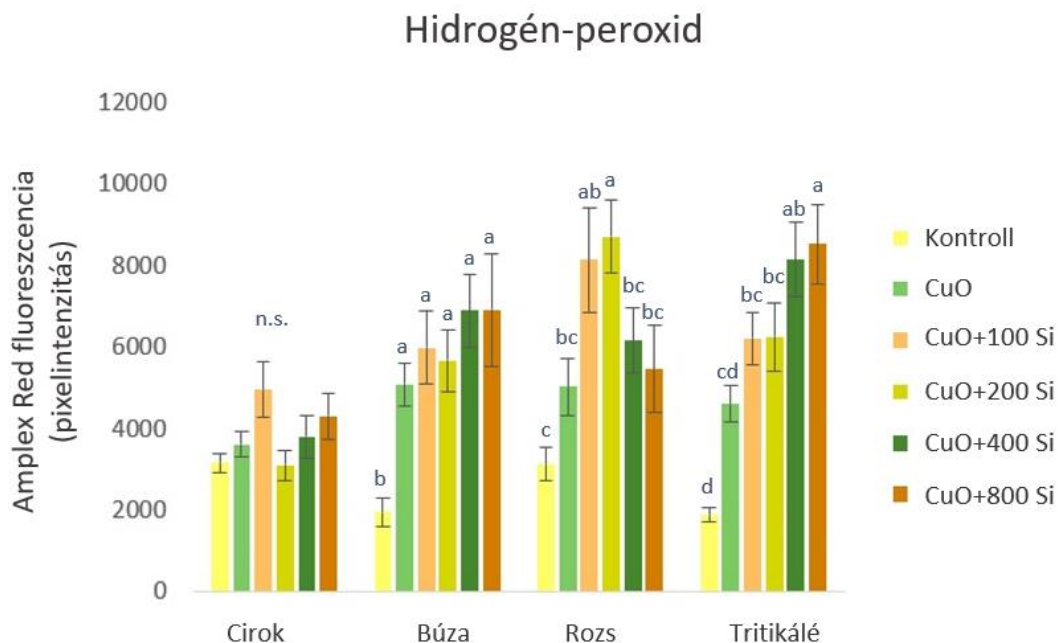
A növekedésgátlás hátterében gyakran felborul a nitro-oxidatív homeosztázis egyensúlya. E jelátvitel rendszer legfontosabb elemei közül elsőként szuperoxid gyök-aniont vizsgáltam, amely az első képződő reaktív oxigénforma a sejtben, így meghatározó szerepű az oxidatív stressz kialakulásában.



9.ábra: A szuperoxid gyök-anion szint változásának mérése CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$)

A gyökérnövekedési válaszok hátterében a reaktív jelmolekulák dinamikájában is változás történt kísérleti rendszerünkben. A cirok gyökércsúcsaiban CuO kezelés hatására csak enyhén emelkedett meg a szuperoxidgyök-anion mennyisége, amit 200 és 800 mg/L-es

SiO₂ NP kezelés szignifikánsan, a kontroll szintje alá csökkentett, míg a 100, 400 mg/L-es koncentrációban alkalmazott kezelés kontrollhoz hasonló O₂^{•-} mennyiségéhez vezetett. Búzában a CuO NP-indukált jelentősen megemelkedett O₂^{•-} mennyiséggel szemben a 100 mg/L-es koncentrációjú előkezelés okozott kimutatható különbséget, itt a magok SiO₂ NP kezelése szignifikánsan, a kontrolltól csak kis mértékben eltérő szintre csökkentette a szuperoxid gyök-anion felhalmozódást. Ezzel szemben a 200 mg/L-es SiO₂ NP előkezelés nem változtatott, ennél magasabb koncentrációkban pedig enyhén megemelték a szuperoxid gyök-anion mennyiségét a tisztán CuO NP-os kezeléssel összehasonlítva. Rozsban a CuO NP-os kezelés jelentősen megnövelte a szuperoxid gyök-anion szintjét. A réz-oxid okozta stresszel szemben a 100 mg/L -es koncentrációjú SiO₂ NP előkezelés a legerősebb hatású, ahol jelentősen, a kontroll gyökércsúcsokban tapasztalt szint alá csökkent a szuperoxid-anion szint a gyökerek merisztematikus zónáiban. A három másik SiO₂ NP előkezelés szintén csökkentette a mennyiségét a CuO NP kezelés által kiváltotthoz képest, azonban csak kisebb mértékben. Tritikáléban a 800 mg/L-es kezelést kapott növényeknél figyelhető meg a legnagyobb különbség CuO NP-indukált válasszal szemben, míg a legalacsonyabb, 100 mg/L-es kezelés kis mértékben tovább emelte a O₂^{•-} mennyiségét a gyökércsúcsokban.

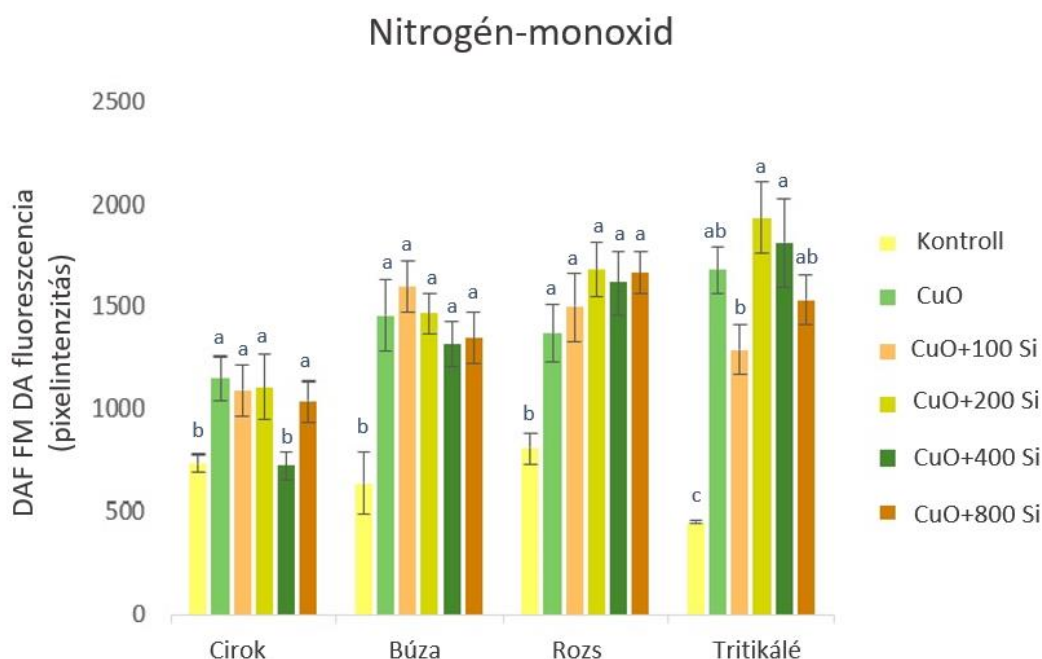


10.ábra: A hidrogén-peroxid szint változásának mérése CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$. N.s-nincs szignifikáns változás).

A reaktív oxigénformák közül a H₂O₂ egy kevésbé reaktív forma, azonban magas koncentrációban toxikussá válhat. A cirok gyökércsúcsaiban miközben a CuO NP kezelés nem emelte meg a H₂O₂ mennyiségét, a 100 és 800 mg/L SiO₂ NP előkezelések enyhén növelték a szintjét. A búza esetében a CuO NP kezelés jelentős mértékben növelte H₂O₂ szintjét, amelyet kis mértékben, nem szignifikáns módon tovább emelte a SiO₂ NP előkezelés. A CuO NP kezeléshez képest tovább emelte a H₂O₂ mennyiségét rozsnál 100 és 200 mg/L, és tritikálénál 400 és 800 mg/L SiO₂ NP előkezelések esetében.

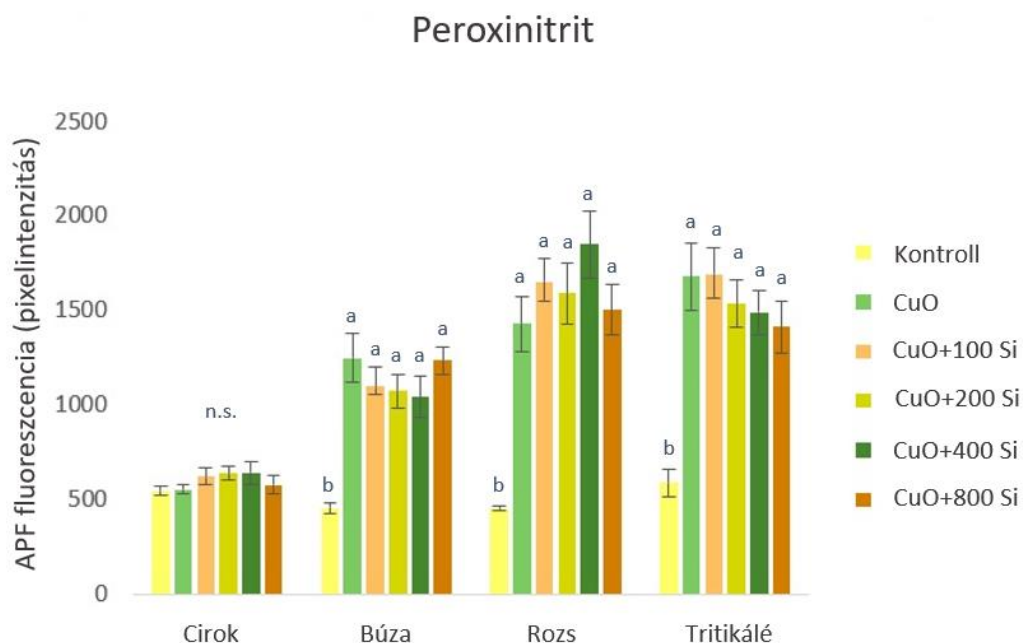
A nehézfémstressz gyakran megváltoztatja a reaktív oxigén és nitrogénformák arányát. Korábbi kutatások már foglalkoztak a SiO₂ potenciális alkalmazásával nehézfémstressz enyhítésére, azonban ezek a kísérleti rendszerek különbözőek voltak a dolgozatban bemutatotthoz képest. Kimutatták, hogy a szilíciumos magkezelés enyhítheti a rézstressz hatásait búza palántákban az oxidatív károsodás csökkentésével és a réz koncentrációjának csökkentésével a növényi szövetekben. A Si fokozta az antioxidáns enzimek aktivitását, köztük a peroxidázét, katalázét és szuperoxid-diszmutázét [Riaz és társai, 2022] Króm terhelés alatt a szilícium csökkentette az oxidatív stresszt borsó növényekben [Tripathi és társai, 2015].

Megjegyzendő azonban, hogy bár a SiO₂ kezelés hatása bizonyítottan képes hatást gyakorolni a ROF metabolizmusára, a RNF homeosztázisára gyakorolt hatásairól még szinte semmit nem tudunk.



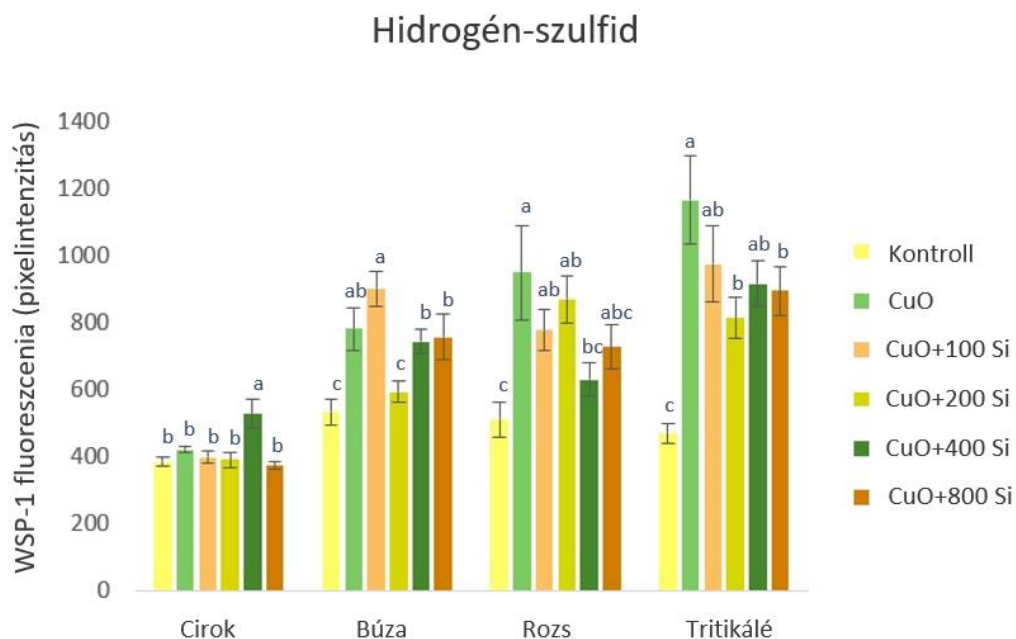
11.ábra: A nitrogén-monoxid szint változásának mérése CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$).

A nitrogén-monoxid egy fontos jelátviteli molekula, és a reaktív nitrogénformák legismertebb képviselője, amely sok biológiai folyamatban játszik szerepet. A cirok gyökércsúcsaiban mért NO-szint a CuO NP kezelés hatására jelentősen megemelkedett. Ezt a 100, 200, valamint 800 mg/L koncentrációban alkalmazott SiO₂ NP előkezelések ezt mindössze enyhén, míg 400 mg/L kezelés szignifikáns módon csökkentette. Búza gyökércsúcsaiban a CuO NP-indukált magas NO szint a legalacsonyabb koncentrációban alkalmazott SiO₂ NP kezelés hatására további enyhe emelkedést mutatott, miközben a magasabb koncentrációk hatására az NO szintje a gyökércsúcsokban csökkenő tendenciát követett. Rozs esetében a kezelések csak tovább fokozták a CuO NP által indukált NO felhalmozódását. A tritikálé gyökércsúcsaiban a legalacsonyabb SiO₂ NP mag előkezelés statisztikailag kimutathatóan csökkentette a felhalmozódott NO mennyiségét, miközben a 200 és 400 mg/L enyhén emelte azt.



12.ábra: A peroxinitrit szint változásának mérése CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$. N.s.-nincs szignifikáns változás).

A reaktív oxigén-és nitrogénformák szoros kapcsolatának egy jó szemléltető példája a NO és szuperoxid gyök-anion reakciója, amelyből peroxinitrit (ONOO⁻) képződhet. A ONOO⁻ képes reakcióba lépni makromolekulákkal és protein tirozin nitrációt okozni, így funkcióvesztést és gyors lebontást eredményez [Gow és társai, 2004]. A cirok gyökércsúcsinak ONOO⁻ tartalmát a CuO NP stressz nem befolyásolta, és a SiO₂ NP előkezelések hatására is csupán enyhe felhalmozódás volt kimutatható. A búza gyökércsúcsaiban CuO NP hatására képződő magas ONOO⁻ tartalmat a SiO₂ NP kezelések fokozatosan, de statisztikailag nem szignifikáns mértékben mérsékeltek a 800 mg/L kivételével, ahol a CuO NP által kiváltott mennyiséghez közeli értéket detektáltunk. A rozsgyökércsúcsiban további ONOO⁻ felhalmozódást mértünk a CuO NP által kiváltott akkumuláción felül a SiO₂ NP előkezelések hatására. Eközben tritikálé gyökércsúcsaiban a SiO₂ NP előkezelés nem szignifikáns mértékben, de koncentráció függő módon csökkentette a ONOO⁻ mennyiségét.



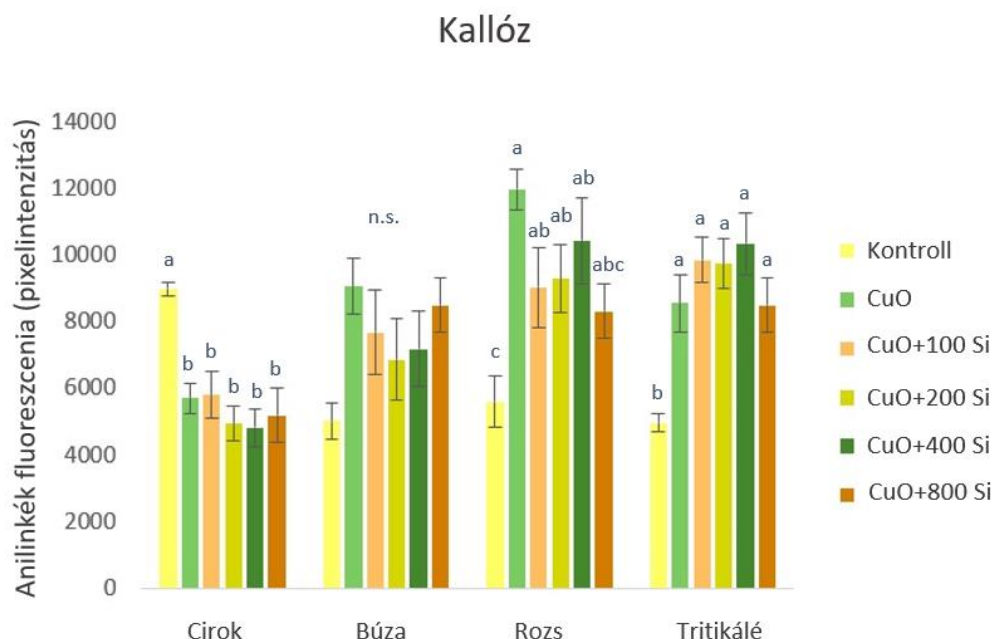
13.ábra: A hidrogén-szulfid szint változásának mérése CuO nanopartikulum stressz, majd SiO₂ nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$).

A H₂S egy gáznemű szignálmolekula, amely indukálja az oldalgyökéreképződést, fontos szerepet játszik a magok csírázásában és gyümölcs érésben, részt vesz a stresszválaszreakciókban, ugyanakkor szabadgyököket is képezhet (Corpas és társai, 2020). A cirok merisztematikus zónájában a CuO NP kezelés nem okozott változást a H₂S mennyiségében, miközben a 400 mg/L SiO₂ NP előkezelés következtében szintje szignifikánsan megemelkedett. Búza és tritikálé hasonlóképpen reagál, CuO NP stressz hatására jelentős H₂S felhalmozódás történt a gyökércsúcsaiban, és mindkét faj esetében a 200 mg/L SiO₂ NP előkezelés volt képes a legnagyobb mértékben csökkenteni azt. Rozsnál is elmondható, hogy a CuO NP megemelte jelentősen H₂S mennyiségét a stressz bizonyítékeként, míg kezelések következményeként csökkent a mennyisége, legfőképp 400 mg/L-es SiO₂ NP kezelés hatására.

5.2 További változások vizsgálata

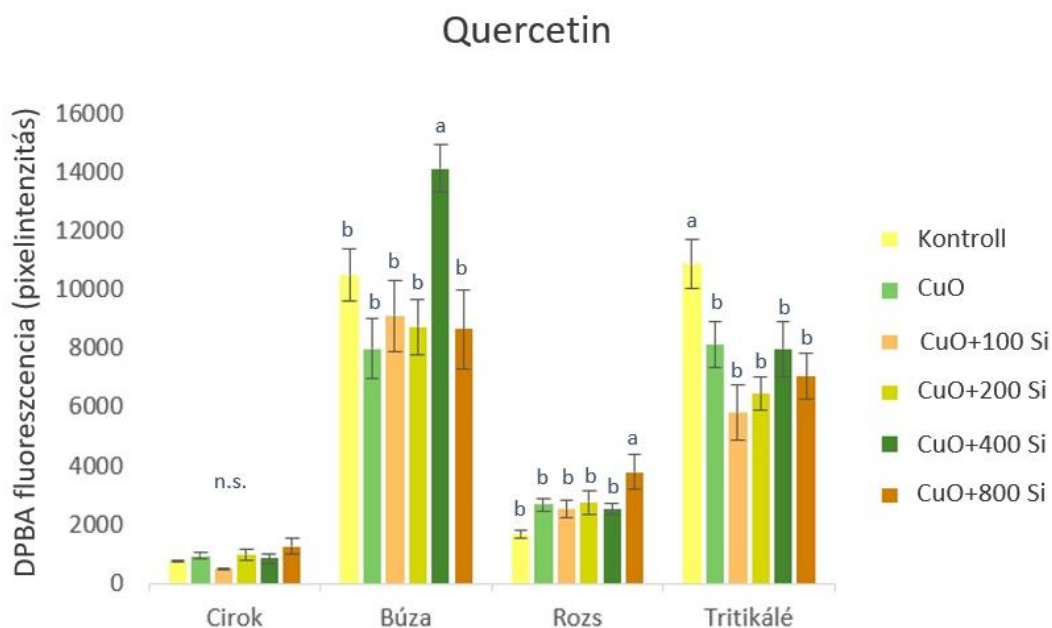
A növények számtalan módon védekezhetnek a nehézfémekkel szemben, ennek egyik módja a sejtfalak módosulása. Ezek a módosulások magukba foglalhatják a sejtfalak vastagodását, kémiai összetételének megváltozását [Houston és társai, 2016]. Törpe banán esetében só és szárazságstressz alatt a szilícium segítette fenntartani a nátrium/kálum egyensúlyt és csökkentették a sejtfalkárosodást [Mahmoud és társai, 2020], valamint a

szilíciumoldatos kezelés javította a görögszénában a szilícium-nanopartikulumok felvételét, szállítását, továbbá növelte a sejtfalak lignifikációját [Nazaralian és társai, 2017].



14.ábra: A kallóz változásának mérése CuO- nanopartikulum stressz, majd SiO₂- nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$. N.s.- nincs szignifikáns változás).

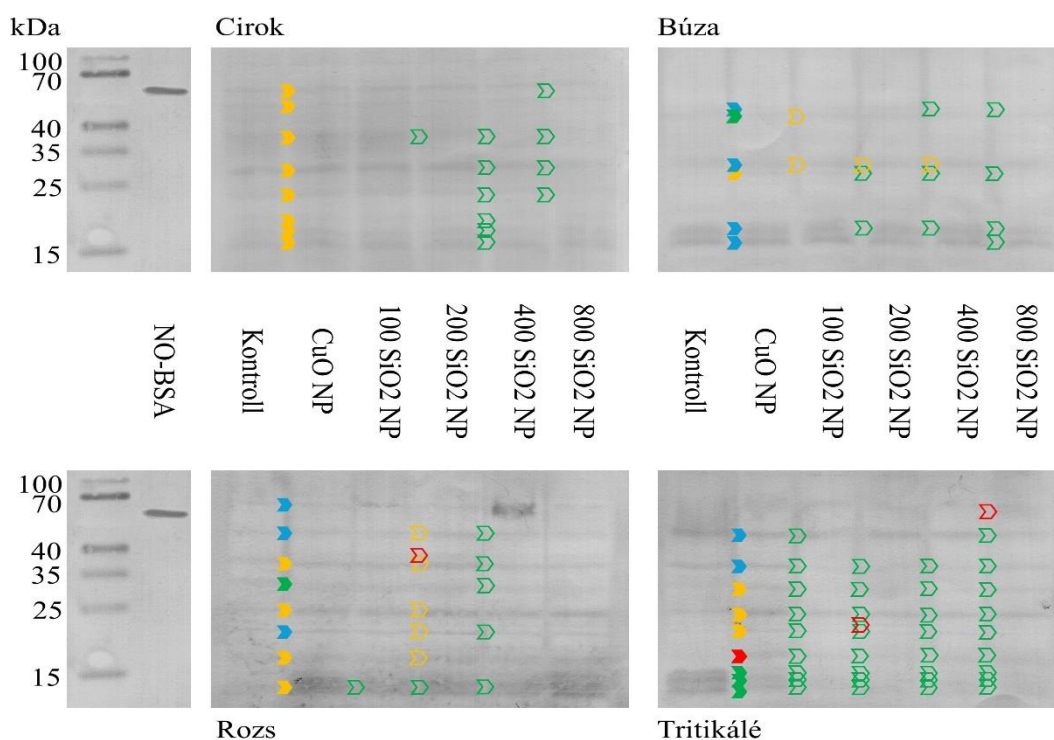
A kallóz a cellulózhoz hasonló poliszacharid, amely fontos szerepet játszik a sejtfal szerkezetének és védelmének szempontjából a növényekben. A kallóz a növények elsődleges mechanikai védelmi rendszerének tekinthető környezeti stresszhatásokkal szemben [Li és társai, 2023]. A relatív érzékeny cirok gyökércsúcsaiban kallóz mennyisége csökkent CuO NP stressz hatásár, amit a magasabb koncentrációjú SiO₂ NP előkezelések kis mértékben még tovább is csökkentettek. Ezzel szemben a toleránsabb fajoknál, a CuO NP terhelés hatására nagyobb mértékű kallóz lerakódás volt kimutatható. Búza és rozs gyökércsúcsainak kallóz tartalma a SiO₂ NP előkezelések hatására csökkenő tendenciát mutatott, ezzel szemben a tritikálében tovább emelkedett a kallóz mennyisége a gyökércsúcs sejtfalaiban.



15.ábra: A quercetin változásának mérése CuO- nanopartikulum stressz, majd SiO₂- nanopartikulum előkezelés hatása. Az eredményeket átlag± standard hiba alakban tüntettem fel. (Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a Duncan-teszt szerint $P \leq 0,05$ N.s- nincs szignifikáns változás).

A quercetin egy flavonoid vegyület, amely elősegít számos növényélettani folyamatot, mint például a magok csírázását, növekedését és fejlődését. Erős antioxidáns, ezáltal hatékonyan lép fel számos biotikus és abiotikus stressz ellen [Singh és társai, 2021]. A cirok gyökércsúcsainak quercetin tartalma kontroll körülmények között is alacsonyabb koncentrációban van jelen, mint az általunk vizsgált másik három fajnál. A CuO NP stressz némileg növelte a mennyiségét, amin a magasabb koncentrációban alkalmazott SiO₂ NP előkezelések csak kis mértékben tudtak tovább emelni, miközben a legalacsonyabb SiO₂ NP koncentráció pedig tovább csökkentette a quercetin mennyiségét a gyökércsúcsokban. Búzában a CuO NP stressz enyhén csökkentette a gyökércsúcsok quercetin tartalmát. A SiO₂ NP előkezelések közül egyedülként a 400 mg/L-es koncentráció váltott ki nagymértékű felhalmozódást. A rozs gyökércsúcsainak quercetin tartalma búzával és tritikáléval összehasonlítva alacsonyabbnak bizonyult. A CuO NP stressz kis mértékben emelte a mennyiségét a gyökércsúcsokban, amely a legmagasabb alkalmazott SiO₂ NP előkezelés hatására szignifikánsan tovább emelkedett. Tritikálében a quercetin gyökércsúcsi mennyisége CuO NP stressz hatására jelentősen csökkent, de a 400 mg/L koncentráció kivételével további csökkenéshez vezetett.

5.3 A fehérje tirozin nitrációban bekövetkező változások vizsgálata



16.ábra: Reprezentatív immunoblot, amely a fehérje tirozin nitrációt mutatja a cirok, búza, rozs és tritikálé gyökerében kontroll körülmények között, valamint CuO NP stressznek kitéve és különböző mennyiségű SiO₂ NP-vel történt előkezelés után. A kék nyilak változatlan nitrált fehérjesávokat, a piros nyilak az új nitrált sávokat, a sárga nyilak fokozott nitrációjú fehérjesávokat, a zöld nyilak csökkent nitrációjú fehérjesávokat jelzik. (NO-BSA: nitrált szarvasmarha-szérumalbumin, pozitív kontrollként használva.)

Az egyszikűek gyökérzetében Western blot analízissel mutattuk ki a fehérje nitrációt, mint a nitro-oxidatív stressz markerét (16. ábra). Megállapítható, hogy hasonlóan korábbi eredményekhez, a kontroll növényekben is kimutathatóak a nitrációt jelző sávok, tehát stresszmentes körülmények között is lejátszódik a fehérjék nitrációjának folyamata [Chaki és társai, 2009, Kacziba és társai, 2023]. Cirok gyökereiben a CuO NP emelte a nitrációt, míg 400 és 800 mg/L-es SiO₂ NP koncentráció számos fehérjesáv esetén csökkentette a nitráció mértékét a CuO NP stresszhez képest. Búzában kontroll körülmények között kevesebb nitrált protein sáv látható, amik intenzitása CuO NP stressz hatására eltérően változott. Az SiO₂ NP előkezelés hatására a CuO NP stresszhez képest megjelent pár erősödő sáv is (40, 35 kDa), azonban többségében az SiO₂ NP előkezelés csökkenést eredményezett a nitrációban. Rózsgyökereiben a CuO NP stressz számos fehérjesáv esetén növelte a nitráció mértékét, emellett a 200 mg/L SiO₂ NP előkezelés esetében a 40 kDa mérettartományban megjelent egy új sáv, valamint öt erősödő sáv is a 40 és 15 kDa közötti tartományban CuO NP stresszhez

viszonyítva. Ezzel szemben a 400 mg/L SiO₂ NP kezelés már egységesen csökkentette a nitrációs jelet. Tritikálé gyökereiben a 200 mg/L előkezelt 25 kDa sávja és 800 mg/L 70 kDa sávja kivételével a nitrációs jel csökkent SiO₂ NP előkezelés hatására a CuO NP-stressz által indukált változásokhoz képest.

A fehérje tirozin nitráció számos stresszel kapcsolatos folyamatban vesz részt [Kolbert és társai, 2017]. A nehézfémekkel végzett korábbi vizsgálatokban, *Brassica juncea*-ban a nikkel kisebb mértékben növelte a fehérje nitráció mértékét, mint *Arabidopsis thaliana*-ban [Kolbert és társai, 2020]. Egy korábbi nem publikált eredmény szerint az ionos réz-stressz nem okozott fehérje tirozin nitrációt *Brassica juncea*, és *Brassica napus* növényekben [Feigl és társai, 2013]. Ez eltér az általunk ebben a kísérleti rendszerben tapasztalt változásoktól a CuO NP-indukált fehérje tirozin nitráció mértékében, ami arra utal, hogy a folyamat megjelenése és mértéke egyaránt függhet a vizsgált növényfajoktól, de a rézkezelés formájától is.

6 Összefoglalás

Faj	Előkezelés	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	NO	ONOO ⁻	H ₂ S	Quercetin
Cirok	400 SiO ₂	n.v.	n.v.	--	n.v.	++	n.v.
Búza	200 SiO ₂	n.v.	+	n.v.	-	--	n.v.
	400 SiO ₂	n.v.	+	-	-	n.v.	++
	800 SiO ₂	n.v.	+	-	n.v.	n.v.	n.v.
Rozs	100 SiO ₂	--	++	n.v.	n.v.	-	n.v.
	200 SiO ₂	-	++	+	n.v.	n.v.	n.v.
	400 SiO ₂	-	n.v.	+	+	--	-
Tritikálé	200 SiO ₂	-	+	+	n.v.	-	-
	800 SiO ₂	-	++	n.v.	-	-	n.v.

17.ábra: Egyszikűek magjainak előkezelése SiO₂ nanopartikulummal hatással van azok későbbi CuO-indukált stresszválaszaira. A piros szín erős csökkenő, míg a rózsaszín enyhén csökkenő szintet jelent, a zöld szín, erősen növekvő, a halványkék pedig enyhén növekvő szintet jelent a reaktív jelmolekulák vizsgálatában. N.v nincs szignifikáns változás.

A vizsgálat során SiO₂ NP előkezelt, majd CuO NP stressznek kitett különböző mezőgazdaságilag fontos egyszikű növényeket vizsgáltunk. Először vizsgáltuk, hogy a SiO₂ NP mag előkezelés hogyan hatott a vizsgált fajok gyökérnövekedésére 50%-os növekedésgátlást okozó CuO NP kezelés mellett. Kazciba és társai (2023) eredményeit kiegészítve megállapítottuk, hogy a magok SiO₂ NP előkezelése képes volt kompenzálni a CuO NP gyökér hossznövekedését gátló hatását a cirok, búza, valamint rozs esetében, miközben a tritikálé gyökérnövekedését két koncentrációban is tovább gátolta. Ebben az esetben a gyökérszám sem változott érdemben, azonban SiO₂ NP előkezelés pozitívan

befolyásolta a cirok és rozs növények oldalgyökérszámának, illetve gyökérszámának változását. A továbbiakban vizsgáltuk a reaktív oxigén- és nitrogénformák metabolizmusát, mert a megváltozott növekedési mintázat hátterében gyakran a felborult nitro-oxidatív homeosztázis áll. A relatív érzékeny cirokban a gyökérnövekedésre pozitív hatású SiO_2 NP előkezelés csökkenő NO szintet és emelkedő H_2S mennyiséget okozott a gyökércsúcsokban. Búzában és rozsban a SiO_2 NP mag-előkezelés hasonló növekedési választ okozott, azonban a fajok reakciója már eltér a reaktív jelmolekulák változását tekintve. Búzában a SiO_2 NP előkezelés hatására általánosságban csökkent a RNF mennyisége, miközben a H_2O_2 növekedett. Ezzel szemben a rozsban miközben az RNF mennyisége emelkedő tendenciát mutatott, a gyökércsúcsok $\text{O}_2^{\cdot-}$ szintje csökkent, amivel párhuzamosan emelkedett a H_2O_2 mennyisége. Ennek hátterében feltételezhetően a SOD enzim megemelkedett aktivitása állhat, ugyanis a H_2O_2 főleg $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ből képződik az enzim által. Tritikálében a SiO_2 NP előkezelés további gyökérnövekedésgátlást okozott két koncentrációban is, amelynek hátterében rozshoz hasonló változás jelentkezett ROF tekintetében. A RNF mennyisége viszont eltérően változott, a 200 mg/L SiO_2 NP előkezelés növelte, míg a 400 mg/L csökkentette azt. Megjegyzendő továbbá, hogy a három, eredetileg relatív toleráns fajban a CuO NP-indukált növekedésgátlásra pozitívan vagy negatívan ható SiO_2 NP előkezelések csökkentették a gyökércsúcsok H_2S mennyiségét. A reaktív oxigén- és nitrogénformák megjelenése mellett vizsgáltuk a fehérje tirozin nitrációt is, amelyet Western blot analízissel mutattunk ki. A CuO NP-ra adott válaszként a fehérje tirozin nitrációs szintje megnőtt a vizsgált fajokban, melyet összhangban van a Kazciba és társai (2023) eredményeivel, míg a SiO_2 NP előkezelésre eredményeként legtöbb esetben csökkent a nitráció erőssége, miközben rozsnál és tritikálénál új sávok is megjelentek. Az itt is tapasztalt változás a fehérje tirozin nitráció mintázataiban a korábbi eredményekkel összhangban jelezheti a SiO_2 NP előkezelés által kiváltott akklimatizációt a CuO NP stresszel szemben [Feigl és társai, 2019].

Az előzményként szolgáló tanulmányban az 50%-os gyökér hossznövekedés-gátlásának hátterében egységes mechanizmusok alakultak ki: a relatív érzékeny cirok fenti gátlásához kevesebb CuO nanopartikulumra volt szükség, és a háttérben a gyökércsúcsaiban nem változott érdemben a reaktív formák szintje, miközben erős fehérje tirozin nitráció volt kimutatható. Ezzel szemben a relatív toleráns búza, rozs és tritikálé növekedésgátlásához jóval nagyobb mennyiségű CuO NP-re volt szükség, valamint a háttérben miközben jelentősen megemelkedett a reaktív formák szintje, a nitráció nem emelkedett meg akkora mértékben. Egy előzetes kísérletsorozatban vizsgált SiO_2 NP mag előkezelés hatása, önmagában, a négy faj gyökérnövekedésére pozitívan hatott. Ezen körülmények között a

reaktív oxigén- és nitrogén formák szintjében viszont nem történt jelentős változás, a SiO₂ NP hatása a reaktív jelmolekulák homeosztázisára csupán más, jelen esetben CuO NP stressznek kitett mutatkozik meg.

Jelen kutatás bizonyította, hogy a magok SiO₂ NP-mal történő előkezelése számos esetben képes volt csökkenteni a CuO NP-indukált növekedésgátlást, viszont az ennek háttérében tapasztalt változások a reaktív formák homeosztázisában nem egységesek, hanem fajra jellemzőek. Összefoglalva elmondható tehát, hogy míg a CuO NP stresszorként egységes nitro-oxidatív választ okoz a búza, rozs és tritikálé gyökereiben, addig a SiO₂ NP-os előkezelés CuO stressz során kifejtett pozitív hatása mögött eltérő, fajfüggő nitro-oxidatív válasz áll.

Az eredmények alapján bizonyítást nyert annak a lehetősége, hogy a nanopartikulumok okozta stressz enyhítése más nanoanyagokkal lehetséges, viszont az is megállapítható, hogy az enyhülő stresszválasz háttérében húzódó jelátviteli folyamatok jóval komplexebbek, mint a stresszfolyamatok háttérében detektálhatóak.

7 Irodalomjegyzék

1. A.G. Madian, F.E. Regnier (2010) Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites J. Proteome Res., 9 (8) 3766-3780
2. Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., ... & Irshad, M. K. (2015). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 186-197.
3. Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I. H., Qiu, B., ... & Zhang, G. (2011). The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 70(2-3), 185-191
4. Ali, S., Farooq, M. A., Yasmeen, T., Hussain, S., Arif, M. S., Abbas, F., ... & Zhang, G. (2013). The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 89, 66-7
5. Ayuk EL, Ugwu MO, Aronimo SB (2017) A review on synthetic methods of nanostructured materials. *Chem Res J* 2(5):97–123
6. Badawy, A. A., Abdelfattah, N. A., Salem, S. S., Awad, M. F., & Fouda, A. (2021). Efficacy assessment of biosynthesized copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) on stored grain insects and their impacts on morphological and physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Biology*, 10(3), 233.
7. Bao-Shan, L., shao-qi, D., Chun-Hui, L., Li-Jun, F., Shu-Chun, Q., & Min, Y. (2004). Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *Journal of Forestry research*, 15, 138-140.
8. Bhat, J. A., Shivaraj, S. M., Singh, P., Navadagi, D. B., Tripathi, D. K., Dash, P. K., ... & Deshmukh, R. (2019). Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants*, 8(3), 71.
9. Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste management*, 30(3), 504-520.
10. Burachevskaya M, Minkina T, Mandzhieva S, Bauer T, Nevidomskaya D, Shuvaeva V, ... Rajput V. 2021. Transformation of copper oxide and copper oxide nanoparticles in the soil and their accumulation by *Hordeum sativum*. *Environ Geochem Health*. 43:1655–1672. doi:10.1007/s10653-021-00857-7.
11. Casey, W. H., Kinrade, S. D., Knight, C. T. G., Rains, D. W., & Epstein, E. (2004). Aqueous silicate complexes in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell & Environment*, 27(1), 51-54
12. Chaki, M., Valderrama, R., Fernandez-Ocana, A. M., Carreras, A., López-Jaramillo, J., Luque, F., ... & Barroso, J. B. (2009). Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of experimental botany*, 60(15), 4221-4234.
13. Corpas FJ, Carreras A, Esteban FJ, Chaki M, Valderrama R, del Río LA, Bassoso JB (2008), Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods Enzymol* 437:561–574.
14. Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2020). H₂S signaling in plants and applications in agriculture. *Journal of advanced research*, 24, 131-137.
15. Corpas, F. J., Del Rio, L. A., & Barroso, J. B. (2007). Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 436-438.
16. da Cunha, K. P. V., & do Nascimento, C. W. A. (2009). Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water, air, and soil pollution*, 197(1), 323-330.

17. Deshmukh, R. (2020). Significance of silicon uptake, transport, and deposition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(21), 6703-6718.
18. Dey, S., Biswas, A., Kundu, R., & Paul, S. (2024). Role of Copper in Tolerance Against Different Environmental Stress. In *Biology and Biotechnology of Environmental Stress Tolerance in Plants* (pp. 351-386). Apple Academic Press.
19. El-Saadony, M. T., Desoky, E. S. M., Saad, A. M., Eid, R. S., Selem, E., & Elrys, A. S. (2021). Biological silicon nanoparticles improve *Phaseolus vulgaris* L. yield and minimize its contaminant contents on a heavy metals-contaminated saline soil. *Journal of Environmental Sciences*, 106, 1-14.
20. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Ahmad, Z., & Xie, Y. (2021). The Effect of Silicon Nanoparticles on the Seed Germination and Seedling Growth of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) under Cadmium Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(4).
21. Fedorenko, A. G., Minkina, T. M., Chernikova, N. P., Fedorenko, G. M., Mandzhieva, S. S., Rajput, V. D., ... & Soldatov, A. V. (2021). The toxic effect of CuO of different dispersion degrees on the structure and ultrastructure of spring barley cells (*Hordeum sativum distichum*). *Environmental Geochemistry and Health*, 43, 1673-1687.
22. Feigl, G. (2023). The impact of copper oxide nanoparticles on plant growth: a comprehensive review. *Journal of Plant Interactions*, 18(1), 2243098
23. Feigl, G., Czifra, Á., Molnár, Á., Bodor, A., Kovács, E., Perei, K., ... & Kolbert, Z. (2020). Reorganization of protein tyrosine nitration pattern indicates the relative tolerance of *Brassica napus* (L.) over *Helianthus annuus* (L.) to combined heavy metal treatment. *Plants*, 9(7), 902.
24. Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., ... & Kolbert, Z. (2013). Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 94, 179-189.
25. Feigl, G., Lehotai, N., Molnár, A., Ördög, A., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J. M., ... & Kolbert, Z. (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. *Annals of botany*, 116(4), 613-625.
26. Fitriani, H. P. Haryanti (2016) Effect of the use of nanosilica fertilizer on the growth of tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *Bul Anat dan Fisiol*, 24(1), 34-41.
27. Foley, S., Crowley, C., Smaih, M., Bonfils, C., Erlanger, B. F., Seta, P., & Larroque, C. (2002). Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(1), 116-119.
28. Frew, A., Weston, L. A., Reynolds, O. L., & Gurr, G. M. (2018). The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Annals of botany*, 121(7), 1265- 1273.
29. Goswami, P., Mathur, J., & Srivastava, N. (2022). Silica nanoparticles as novel sustainable approach for plant growth and crop protection. *Heliyon*, 8(7).
30. Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A., & Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(2), L262-L268.
31. Grigore ME, Biscu ER, Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. 2016. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles. *Pharmaceuticals*. 9(4):75. doi:10.3390/ph9040075.
32. Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A., & Coban, S. (2008). Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(13-14), 1885-1903.

33. Guntzer, F., Keller, C., & Meunier, J. D. (2012). Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 201-213.
34. Hamatani, S., Kitagawa, D., Maegawa, R. és Kobatake, S. (2022). A felülről lefelé és alulról felfelé irányuló megközelítéssel előállított diarilbenzol nanorészecskék fotokróm viselkedése. *Materials Advances*, 3 (2), 1280-1285.
35. Hernandez-Apaolaza, L. (2014). Can silicon partially alleviate micronutrient deficiency in plants? A review. *Planta*, 240(3), 447-458.
36. Hodson, M. J., White, P. J., Mead, A., & Broadley, M. R. (2005). Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of botany*, 96(6), 1027-1046
37. Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin S, Qian P, Xin W, Li HY, Burritt DJ, Fujita M, Tran LS (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science* 6:420.
38. Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in plant science*, 7, 205693.
39. Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.
40. Ibrahim, A. S., Ali, G. A., Hassanein, A., Attia, A. M., & Marzouk, E. R. (2022). Toxicity and uptake of CuO nanoparticles: evaluation of an emerging nanofertilizer on wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Sustainability*, 14(9), 4914.
41. Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 223-245.
42. Jadhao KR, Bansal A, Rout GR (2020) Silicon amendment induces synergistic plant defense mechanism against pink stem borer (*Sesamia inferens* Walker.) in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.). *Sci Rep* 10(1):1–15.
43. Kacziba, B., Szierer, Á., Mészáros, E., Rónavári, A., Kónya, Z., & Feigl, G. (2023). Exploration the homeostasis of signaling molecules in monocotyledonous crops with different CuO nanoparticle tolerance. *Plant Stress*, 7, 100145.
44. Kadri, O., Karmous, I., Kharbech, O., Arfaoui, H. és Chaoui, A. (2022). Cu és CuO nanorészecskék befolyásolták az árpa (*Hordeum vulgare* L.) csíranövény csírázását és növekedését. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108 (3), 585-593.
45. Kartick Chandra Majhi, Mahendra Yadav, in *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 2021
46. Koce, J. D. (2017). Effects of exposure to nano and bulk sized TiO₂ and CuO in *Lemna minor*. *Plant physiology and biochemistry*, 119, 43-49.
47. Kolbert, Z. (2012). In vivo and in vitro studies on fluorophore-specificity. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(1), 37-41.
48. Kolbert, Z., Feigl, G., Bordé, Á., Molnár, Á., & Erdei, L. (2017). Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 56-63.
49. Kolbert, Z., Oláh, D., Molnár, Á., Szöllösi, R., Erdei, L., & Ördög, A. (2020). Distinct redox signalling and nickel tolerance in *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109989.
50. Lehotai, N., Kolbert, Z., Pető, A., Feigl, G., Ördög, A., Kumar, D., ... & Erdei, L. (2012). Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5677-5687.

51. Li, N., Lin, Z., Yu, P., Zeng, Y., Du, S., & Huang, L. J. (2023). The multifarious role of callose and callose synthase in plant development and environment interactions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1183402.
52. Li, Y. J., Chen, J., Xian, M., Zhou, L. G., Han, F. X., Gan, L. J., & Shi, Z. Q. (2014). In site bioimaging of hydrogen sulfide uncovers its pivotal role in regulating nitric oxide-induced lateral root formation. *PLoS One*, 9(2), e90340.
53. Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y. G., & Christie, P. (2007). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environmental pollution*, 147(2), 422-428.
54. Luyckx, M., Hausman, J. F., Lutts, S., & Guerriero, G. (2017). Silicon and plants: current knowledge and technological perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8, 411.
55. Ma JF, Yamaji N (2008) Functions and transport of silicon in plants. *Cell Mol Life Sci* 65(19):3049–3057.
56. Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., ... & Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084), 688-691.
57. Mahmoud, L. M., Dutt, M., Shalan, A. M., El-Kady, M. E., El-Boray, M. S., Shabana, Y. M., & Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
59. Martin, K. R. (2013). Silicon: the health benefits of a metalloid. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, 451-473.
60. Molnár, Á., Rónavári, A., Béteky, P., Szöllösi, R., Valyon, E., Oláh, D., ... & Kolbert, Z. (2020). A ZnO nanorészecskék sejtfal-átalakítást indukálnak, és módosítják a ROS/RNS jelátvitelt a Brassica palánták gyökereiben. *Ökotoxikológia és környezetbiztonság*, 206, 111158.
61. Murali, M., Gowtham, H. G., Singh, S. B., Shilpa, N., Aiyaz, M., Alomary, M. N., ... & Amruthesh, K. N. (2022). Fate, bioaccumulation and toxicity of engineered nanomaterials in plants: current challenges and future prospects. *Science of The Total Environment*, 811, 152249.
62. Naaz, H., Rawat, K., Saffeullah, P., & Umar, S. (2023). Silica nanoparticles synthesis and applications in agriculture for plant fertilization and protection: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(1), 539-559.
63. Naaz, H., Rawat, K., Saffeullah, P., & Umar, S. (2023). Silica nanoparticles synthesis and applications in agriculture for plant fertilization and protection: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(1), 539-559.
64. Nazaralian, S., Majd, A., Irian, S., Najafi, F., Ghahremaninejad, F., Landberg, T., & Greger, M. (2017). Comparison of silicon nanoparticles and silicate treatments in fenugreek. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 25-33
65. Ochoa, et al., (2018). Copper oxide nanoparticles and bulk copper oxide, combined with indole-3-acetic acid, alter aluminum, boron, and iron in Pisum sativum seeds. *Science of the Total Environment*, 634, 1238-1245.
66. Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G., Tugyi, N., Ördög, A., Gémes, K., ... & Kolbert, Z. (2013). Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in Arabidopsis. *Plant cell reports*, 32, 1913-1923.
67. Phiw dang, K., Suphankij, S., Mekprasart, W., & Pecharapa, W. (2013). Synthesis of CuO nanoparticles by precipitation method using different precursors. *Energy procedia*, 34, 740-745.

68. Popp C, Burghardt M, Friedmann A, Riederer M (2005) Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: permeation of water and uncharged organic compounds. *J. Exp. Bot* 56(421), 2797–2806
69. Prychid, C. J., Rudall, P. J., & Gregory, M. (2003). Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review*, 69(4), 377-440.
70. Radi R., (2004), Nitric oxide, oxidants and protein nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4003-4008
71. Rajput, V. D., Minkina, T., Sushkova, S., Tsitsuashvili, V., Mandzhieva, S., Gorovtsov, A., ... & Gromakova, N. (2018). Effect of nanoparticles on crops and soil microbial communities. *Journal of Soils and Sediments*, 18, 2179-2187.
72. Rajput, V., Minkina, T., Fedorenko, A., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Lysenko, V., ... & Ghazaryan, K. (2018a). Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (*Hordeum sativum distichum*). *Science of the Total Environment*, 645, 1103-1113.
73. Rao, G. B., & Susmitha, P. (2017). Silicon uptake, transportation and accumulation in Rice. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 290-293.
74. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry*, 5, 78.
75. Razak NAA, Othman NH, Shayuti MSM, Jumahat A, Sapiai N, Lau WJ (2022) Agricultural and industrial waste-derived mesoporous silica nanoparticles: a review on chemical synthesis route. *J Environ Chem Eng* 107322. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107322>
76. Riaz, M., Zhao, S., Kamran, M., Ur Rehman, N., Mora-Poblete, F., Maldonado, C., ... & Elshikh, MS (2022). A nano-szilícium hatása az aszkbát-glutation tartalom szabályozására, az antioxidáns védekező rendszerre és a rézstresszes búza (*Triticum aestivum* L.) palánták növekedésére. *Frontiers in Plant Science*, 13 , 986991.
77. Richmond, K. E., & Sussman, M. (2003). Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 268-272.
78. Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3485-3498.
79. Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Adrees, M., Ibrahim, M., ... & Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: a critical review. *Journal of hazardous materials*, 322, 2-16.
80. Sanz, L., Fernández-Marcos, M., Modrego, A., Lewis, D. R., Muday, G. K., Pollmann, S., ... & Lorenzo, O. (2014). Nitric oxide plays a role in stem cell niche homeostasis through its interaction with auxin. *Plant physiology*, 166(4), 1972-1984.
81. Savant, N. K., Korndörfer, G. H., Datnoff, L. E., & Snyder, G. H. (1999). Silicon nutrition and sugarcane production: a review. *Journal of plant nutrition*, 22(12), 1853- 1903.
82. Shabbir Z, Sardar A, Shabbir A, Abbas G, Shamsad S, Khalid S, ... Shahid M. 2020. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere*. 259:127436.
83. Shi, J., Abid, A. D., Kennedy, I. M., Hristova, K. R., & Silk, W. K. (2011). To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution*, 159(5), 1277-1282.
84. Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic potential of nanoparticles: Structural and functional modifications in DNA. *Frontiers in Genetics*, 12, 728250.

85. Siddiqui, M. H., & Al-Whaibi, M. H. (2014). Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). *Saudi journal of biological sciences*, 21(1), 13-17.
86. Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Faisal, M., & Al Sahli, A. A. (2014). Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(11), 2429-2437.
87. Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10-19.
88. Song G, Hou W, Gao Y, Wang Y, Lin L, Zhang Z, ... Wang H. 2016. Effects of CuO nanoparticles on *Lemna minor*. *Botanical Studies*. 57:1–8. doi:10.1186/s40529-016-0118-x.
89. Takahashi, N., & Kurata, K. (2007). Relationship between transpiration and silica content of the rice [*Oryza sativa*] panicle under elevated atmospheric carbon dioxide concentration.
90. Tripathi, D. K., Singh, V. P., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 189-198
91. Tubaña, B. S., & Heckman, J. R. (2015). Silicon in soils and plants. In *Silicon and plant diseases* (pp. 7-51). Springer, Cham.
92. Wang L, Ning C, Cai PT (2022) Role of silica nanoparticles in abiotic and biotic stress tolerance in plants: a review. *Int J Mol Sci* 23(4):1947
93. Xie, Y., Li, B., Tao, G., Zhang, Q., & Zhang, C. (2012). Effects of nano-silicon dioxide on photosynthetic fluorescence characteristics of *Indocalamus barbatus* McClure. *Journal of Nanjing Forestry University*, 55(02), 59.
94. Yamaji N, Sakurai G, Mitani-Ueno N, Ma JF (2015) Orchestration of three transporters and distinct vascular structures in node for intervascular transfer of silicon in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(36):11401–11406
95. Yue, L., Zhao, J., Yu, X., Lv, K., Wang, Z., & Xing, B. (2018). Interaction of CuO nanoparticles with duckweed (*Lemna minor*. L): Uptake, distribution and ROS production sites. *Environmental pollution*, 243, 543-552.
96. Zia-ur-Rehman, M., Sabir, M., & Nadeem, M. (2015). Remediating cadmiumcontaminated soils by growing grain crops using inorganic amendments. In *Soil remediation and plants: Prospects and challenges* (pp. 367-396). Elsevier Inc., Academic Press

8 Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Kovács Kamilla** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Szilícium-dioxid nanopartikulum-előkezelés hatása a későbbi CuO nanopartikulum-indukált stresszválaszra egyszikűekben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Magok előkezelése, kísérleti növények nevelése	4
Növények morfológiai vizsgálata, mérések elvégzése	5
Mikroszkópos minták elkészítése, vizsgálata, képek kiértékelése	5
Mintaelőkészítés és western blot analízis	5
Az adatok statisztikai feldolgozása	4

Kelt: Szeged, 2024. június 18.



Pályamunkát benyújtó hallgató (*Kovács Kamilla*)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (*Dr. Feigl Gábor, SZTE TTIK*
Növénybiológiai Tanszék)
aláírása

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

9 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Feigl Gábornak, hogy lehővé tette és támogatta munkámat, az ő szakmai tudása nagymértékben hozzájárult a munkám sikerességéhez.