

Tartalomjegyzék

Gyakrabban előforduló rövidítések	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi összefoglalás	6
2.1. Az oxidatív stressz, a reaktív oxigénformák károsító hatásai	6
2.2. Szelektív génindukció biotikus stressz és H ₂ O ₂ esetén; reaktív oxigénformák szerepe az akklimatizációban	9
2.3. Az enzimatikus védő mechanizmusok	10
2.4. Glutation, a nem-enzimatikus védő mechanizmus része	12
2.5. A glutation S-transzferázok	14
2.5.1. általános jellemzésük, csoportosításuk, szerkezetük	14
2.5.2. a GST-k funkciói	14
2.5.3. a GST-k kapcsolata az auxinokkal	18
2.6. Az auxin jelentősége	19
2.6.1. Az IES szerepe a növekedési és fejlődési folyamatokban	19
2.6.2. Hormon autotrófia	21
2.6.3. Az auxin-indukált jelátvitel	23
2.7. Az etilén	28
2.8. A <i>mas</i> promóter	30
3. Célkitűzés	31
4. Anyag és módszer	33
4.1. A kísérletekben használt kalluszok előállítása, fenntartása, a kezelések kivitelezése	33
4.2. Aldehid oxidáz aktivitásának vizsgálata natív gélben	34
4.3. IES oxidáz aktivitás mérése	34
4.4. Kationok mennyiségének meghatározása	35
4.5. Antioxidáns enzimek aktivitásának mérésénél alkalmazott módszerek	35
4.6. H ₂ O ₂ és MDA koncentrációjának meghatározása	37
4.7. Etilén képződésének meghatározása	38
4.8. β-glukuronidáz aktivitás mérése	38

5. Eredmények és értékelésük	40
5.1. Az auxin autotróf és heterotróf kalluszok növekedése és auxin metabolizmusuk	40
5.2. A kalluszok növekedése különböző hőmérsékleten ill. abiotikus stresszorok jelenlétében	43
5.3. Sóstressz hatásának tanulmányozása auxin heterotróf és autotróf sejtvonalakban	45
5.3.1. 100 mM NaCl hatása a kationok mennyiségére	45
5.3.2. Sóstressz hatása az antioxidáns enzimek aktivitására, a H ₂ O ₂ tartalomra és az etiléntermelésre	47
5.3.3. Glutationhoz kapcsolódó védekező enzimek aktivitásának és a malondialdehid szintjének alakulása	52
5.4. Exogén H ₂ O ₂ hatása a kalluszok növekedésére, GST és GSH-PX aktivitására	54
5.5. Exogén auxin hatásának tanulmányozása a kalluszok növekedésére, GST- és <i>masI</i> '::GUS aktivitására	57
5.6. 2,4-D hatása a kalluszok etilén termelésére	59
5.7. Az etilén receptor gátló NBD hatása a GST- és GUS aktivitásokra	60
5.8. Az auxin-etilén interakció eltérésének feltételezett okai a heterotróf és auxin autotróf kalluszokban	62
6. Összefoglalás	66
7. Summary	71
8. Felhasznált irodalmak jegyzéke	76

Gyakrabban előforduló rövidítések

2,4-D	2,4-diklór-fenoxiecetsav
2,4,5-T	2,4,5-klórphenoxiecetsav
ABP1	auxin binding protein1, feltételezett auxin receptor
ACC	1-aminociklopropán-1-karbonsav
ALA	δ -aminolevulinsav
AO	aldehid oxidáz
APX	aszkorbinsav peroxidáz
ARF(7)	auxin response factor, auxin-válasz faktor
Aux/IAA	auxin-általi indukcióval azonosított auxin-válasz fehérje
AXR1	<i>auxin resistant 1</i> mutánsban azonosított fehérjel
CDK(A,B,D)	ciklin-függő protein kinázok
CDNB	1-klór-2,4-dinitrobenzol
CHP	kumén hidroperoxid
CTR1	<i>constitutive triple response1</i> mutánsban azonosított fehérje
CYC(A,B,D)	A,B, vagy D-típusú ciklin
DHA	dehidroaszkorbinsav
DHAR	dehidroaszkorbinsav reduktáz
DTT	ditiotritol
E1, E2, E3	az ubiquitinálási út E1, E2, E3 enzimeinek jelölése
ECR1	E1 enzim C-terminális részével homológ fehérje
EIN (2-6)	<i>ethylene insensitive (2-6)</i> , etilén-inszenzitív mutánsokkal azonosított fehérjék
ERF1	ethylene response faktor 1, etilén-válasz faktor
ERS(1,2)	ethylene response sensors (1,2), etilén-válasz szenzor
ETR(1, 2)	ethylene receptor (1,2), etilén receptor
GPX	guajakol peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	redukált glutation
GSH-PX	glutation peroxidáz

GSSG	glutation diszulfid, vagy oxidált glutation
GST	glutation S-transzferáz
GS-X	glutation S-konjugátum
<i>GUS</i>	<i>β-glukuronidáz</i> riporter gén
4HNE	4-hidroxinonenal
IAAld	indol-3-acetaldehid
IAld	indol-3-aldehid
IES	indol-3-ecetsav
MAPK	mitogén-aktiválta protein kináz
<i>mas1</i> ' promóter	mannopin szintáz1 promótere
MDA	malondialdehid
NBD	2,5-norbornadién
<i>ocs</i>	oktopin szintáz promóterben azonosított elemek
<i>par (A,B,C)</i>	auxin-regulált protoplaszt gének
RUB	related to ubiquitin, ubiquitinhez hasonló fehérje
SCF	ubiquitin-protein ligáz komplex
SOD	szuperoxid dizmutáz
<i>sur1</i>	<i>superroot1</i> , auxin-túltermelő mutáns
TIR1	<i>auxin transport inhibitor resistant 1</i> mutánsban azonosított fehérje
α-NES	α-naftilecetsav

1. Bevezetés

A klasszikus növényélettani kutatások fontos fejezete a növényi növekedésszabályozó anyagok hatásának vizsgálata, és az auxin felfedezésétől számított mintegy 75 év alatt ezek a kutatások aktuálisak maradtak és időről-időre a szakmai figyelem középpontjába kerülnek. A legfontosabb biológiailag aktív vegyületek azonosítása után az anyagcsere-folyamatok felderítése, majd gyakorlati, szövettenyésztési alkalmazása lett a vizsgálatok célja. Az *in vitro* sejt- és szövetkultúrák kísérletek bebizonyították, hogy különböző növényi hormonok szükségesek a sejtosztódáshoz, az osztódás, a növekedés és differenciálódás, a szervek kialakulása, azaz az egyedfejlődés szabályozása kapcsolatban van különböző gének expressziójával és bizonyos fehérjék, enzimek meghatározóak a folyamatok specifikussága szempontjából. A növények növekedését és a terméshozamot nagyban befolyásolják a környezeti tényezők, de a károsító hatások és az ezekhez történő alkalmazkodás vizsgálata nemcsak a mezőgazdasági alkalmazás szempontjából érdekes. A növény külső- és belső (környezeti ill. hormonális) hatásokra bekövetkező válaszreakcióinak megértése, a folyamatban szereplő lépések és kapcsolatrendszerük felderítése a kutatások hosszú távú feladata. Nagy haladás történt a jelátvitelben résztvevő molekulák, anyagcsereutak és szabályozási mechanizmusok megismerésében, a növényi sejtek, szövetek működése bonyolult folyamatok összehangolt hálózatának eredménye. Ennek a megismerési folyamatnak csak a kezdetén vagyunk.

A molekuláris biológia fejlődésének és alkalmazásának köszönhetően évről-évre nagyon sok gén, sőt egyre több növényi genom teljes szekvenciájának megismeréséről számolnak be a tudományos folyóiratokban, különféle adatbázisok állnak rendelkezésünkre egy-egy folyamatban fontos szerepet játszó DNS-szakasz vagy mRNS szerepének azonosításához, funkcionális vagy evolúciós homológia kereséséhez. A gének szerkezetének megismerése után is, a funkció és a működés szabályozásának tanulmányozása során a molekuláris módszerek szerves egységet kell, hogy alkossanak a sejt-, szövet-, vagy növény szinten végzett élettani vizsgálatokkal.

2. Irodalmi összefoglalás

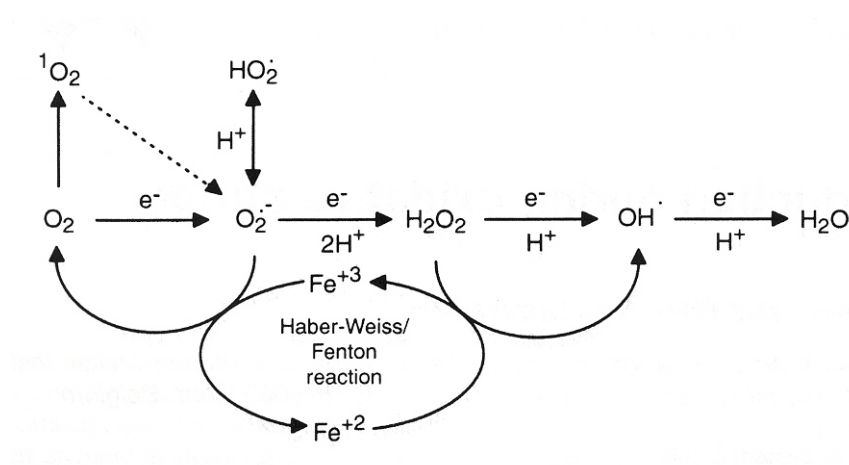
2.1. Az oxidatív stressz, a reaktív oxigén formák károsító hatásai

Az evolúció során kifejlődött aerob metabolizmus nagyon hatékony ugyan, de az oxigén jelenléte a sejtekben potenciális veszélyt jelent a biokémiai folyamatok és a szerkezeti elemek számára. Az $O_2 \rightarrow H_2O$ redukció közben igen reaktív szabad gyökök vagy vegyületek keletkezhetnek, pl. a szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil gyök ($OH^{\cdot}$), és a H_2O_2 (2.1. ábra). Bizonyos esetekben a reaktív oxigén formák koncentrációja megemelkedhet. Ha képződésük sokkal nagyobb arányú, mint lebontásuk, oxidatív stressz alakul ki. Oxidatív stressznek szűkebb értelemben a reaktív oxigénszármazékok által előidézett sejtkárosodást nevezzük. A legtöbb környezeti stresszhatásnak van oxidatív komponense, különböző sejtkompartimentumokban jelenhetnek meg reaktív oxigén formák. Különösen gyakran keletkezhetnek a kloroplasztisban, ugyanis pl. az ózon, a szárazság- és sóstressz, a magas vagy alacsony hőmérséklet is gátolja a CO_2 fixációt, csökkenti a $NADP^+$ Calvin ciklus általi regenerációját. Ennek következtében a I. fotokémiai rendszerhez (PSI) kapcsolódó fotoszintetikus elektron transzportlánc redukált állapotú lesz, az elektronokat az oxigénmolekula veszi át, szuperoxid gyökion ($O_2^{\cdot-}$), majd ebből más reaktív oxigénforma keletkezik (2.1. ábra). A mitokondriumban a légzési elektron transzportláncához kapcsolódva hasonló folyamatok játszódhatnak le. A lánc első lépése energiaigényes, azonban a további átalakulások spontán is végbemehetnek (Vranová és mtsai, 2002).

A keletkező szabad gyökök közül a $O_2^{\cdot-}$ kinonokat és Fe^{3+} -, Cu^{2+} -tartalmú fémkomplexeket is redukálhat, így befolyásolhatja közvetlenül a fémtartalmú enzimek aktivitását. A $O_2^{\cdot-}$ könnyen alakul H_2O_2 -dá, dizmutálását a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim segíti, de vizes oldatokban egy proton felvételével perhidroxil gyök ($HO_2^{\cdot}$) is keletkezhet, ami a membránba jutva a többszörösen telítetlen zsírsavakból és lipid hidroperoxidokból hidrogén atomot von el, így iniciálva a zsírsavak autooxidációját (Halliwell és Gutteridge, 1989; Vranová és mtsai, 2002). A reaktív oxigénvegyületek egyik legkárosabb hatása a membránlipidek peroxidációja, amely igen toxikus vegyületeket eredményez, mint a 13-hidroperoxi-linolénsav vagy a malondialdehid (MDA) és a 4-

hidroxi-alkenálok. Ezek a molekulák közvetlenül is károsítják a DNS-t, RNS-t, a fehérjéket és a membránokat, enzimeket gátolnak, csökkentik a DNS- és fehérjeszintézist (Mittler, 2002).

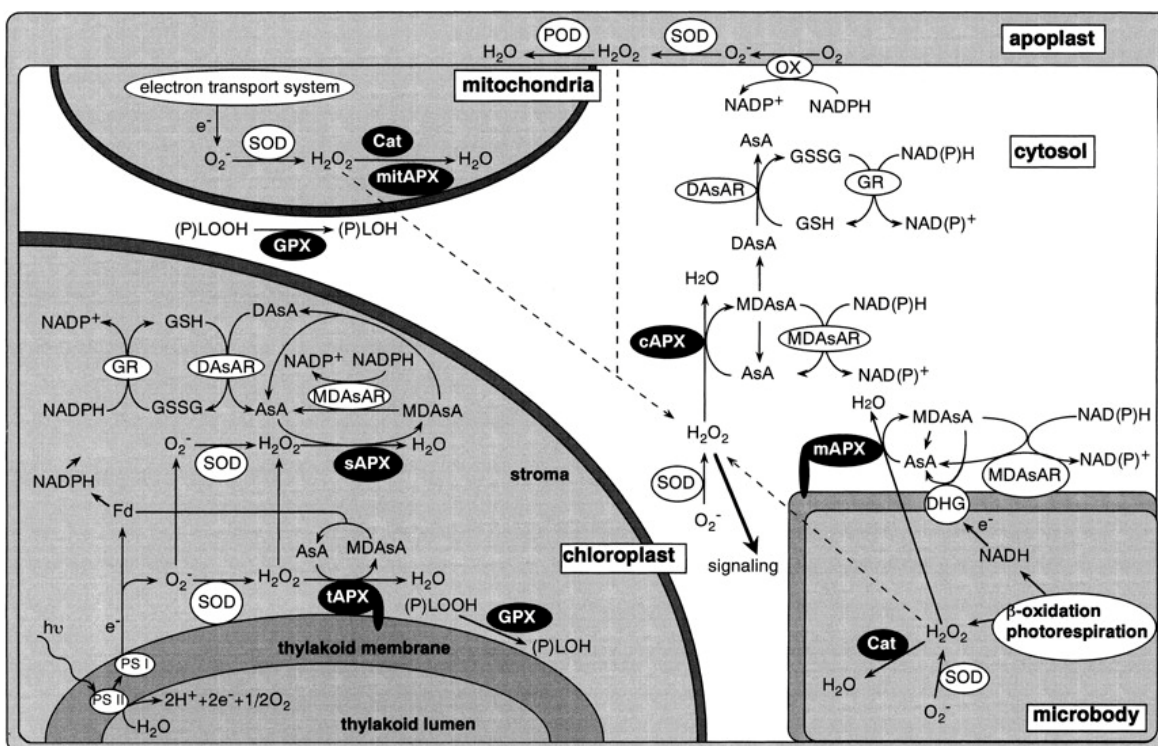
A H_2O_2 hosszabb életidejű, diffúzibilis oxigénvegyület, amely enzimeket inaktíválhat a tiol csoportjukat oxidálva - pl. a Calvin-ciklus enzimeit, Cu/Zn SOD és Fe SOD izoenzimeket (Charles és Halliwell, 1980; Bowler és mtsai, 1994) - és a sejten belül molekuláris, biokémiai és fiziológiai válaszreakciók sorát indukálhatja. H_2O_2 keletkezhet szinte minden sejtpartikulumban, így a kloroplasztisz és mitokondrium mellett a peroxiszómákban, citoszólban és az apoplasztban is (2.2. ábra). Specifikus enzimek működése is vezethet H_2O_2 képződéshez, így az apoplasztban a NADPH oxidáz, sejtfal peroxidázok, amin oxidázok termelhetnek H_2O_2 -ot (Vranová és mtsai, 2002; Neill és mtsai, 2002). Hidroxil gyökké alakulásával (Haber-Weiss vagy Fenton reakció során elektronfelvétellel) még toxikusabb vegyület keletkezik, ugyanis a $\text{OH}^\cdot$ azonnal reagál különböző fehérjékkel, lipidekkel, DNS-sel, gyors sejtkárosodást előidézve, és a sejt nem rendelkezik ellene védő enzimekkel.



2.1. ábra: Reaktív oxigén formák képződése és átalakulásuk (Vranová és mtsai, 2002).

A reaktív oxigén formák keletkezése a sóstressz károsító tényezőinek is fontos eleme. A magas sókoncentráció elsősorban a vízháztartásban és ionhomeosztázisban okoz zavarokat sejt- és teljes növény vonatkozásában is; növekedésgátláshoz, pusztuláshoz vezethet. A NaCl stressz esetén fellépő károsodások kivédésének több lehetősége van. A növény csökkentheti a bejutó Na^+ mennyiségét pl. Na^+ - felvétel gátlásával, Na^+/H^+ antiporter aktivitások indukálásával, vagy a citoplazmából sejtorganellumokba, elsősorban

a vakuólumba történő transzportjával. A víz- és ozmotikus homeosztázist a megváltozott viszonyok között is igyekszik a sejt (növény) helyreállítani, összetett molekuláris változások figyelhetők meg, közöttük ozmotikusan aktív anyagok és stresszfehérjék szintéziséhez vezető lépések. Az aktiválódó vagy újonnan megjelenő proteineknek szerepe lehet a károsító reaktív oxigén formák elleni védekezésben, a sejt struktúrájának megőrzésében (Zhu, 2001).



2.2. ábra: Aktív oxigén gyökök ellen védő enzimatisz mechanizmusok a növényi sejtben. Alkalmazott rövidítések: SOD: szuperoxid dizmutáz; Cat: kataláz; AsA: aszkorbinsav; APX: aszkorbinsav peroxidáz; MDA: monodehidro-aszkorbát; MDAsAR: monodehidro-aszkorbinsav reduktáz; DAsA: dehidro-aszkorbát; DAsAR: dehidro-aszkorbinsav reduktáz; GSH: redukált glutation; GSSG: glutation diszulfid; GR: glutation reduktáz; GPX: glutation peroxidáz; OX: NADPH oxidáz; POD: peroxidáz. (Shigeoka és mtsai, 2002)

2.2. Szelektív génindukció biotikus stressz és H_2O_2 esetén; reaktív oxigénformák szerepe az akklimatizációban

Bár kezdetben a reaktív oxigén formákat sejtre káros vegyületeknek tartották, az újabb adatok szerint szerepet játszanak a sejtek különböző hatásokra kialakuló válaszreakcióinak közvetítésében mind növényekben, mind állatokban.

A H_2O_2 diffúzibilis jel szerepét a növényi védekezésben szerepet játszó gének indukciójában Levine és mtsai 1994-ben bizonyították szója sejtek patogén fertőzésével. A fertőzött és nem fertőzött sejtek közé H_2O_2 -ot bontó kataláz enzimet juttatva a jel diffúziója a szomszédos nem-fertőzött sejtekbe, és így azokban a védekező gének indukciója blokkolható volt. Nagyobb H_2O_2 koncentráció már rövid ideig (kb. 1 óra) alkalmazva is elegendő volt a patogénfertőzéskor megfigyelhető, lokalizált, programozott sejthalál kiváltásához. A jelenséget később igazolták *Arabidopsis* sejt kultúrában is (Desikan és mtsai, 1998), és olyan transzgénikus növények esetében, amelyek H_2O_2 -védő mechanizmusukban károsodtak (pl. kataláz-hiányos dohány növények), vagy a NADPH oxidáz enzim túltermelése miatt több H_2O_2 -ot tartalmaztak (Chammongpol és mtsai, 1998). Exogén H_2O_2 kezeléssel ki lehetett váltani biotikus és különböző abiotikus stresszfajtákkal szembeni toleranciát is (Van Camp és mtsai, 1998; Desikan és mtsai, 2000).

Megfigyelték, hogy egy stresszor alacsony intenzitású hatásával indukálni lehet a nagyobb mértékű stresszel szembeni ellenállóságot. Ezt edzésnek, ill. a kedvezőtlenebb körülmények között is túlélést biztosító folyamatot akklimatizációnak nevezzük. Kukorica csíranövények alacsony hőmérséklet által kiváltott akklimatizációja a megemelkedett antioxidáns mechanizmussal volt összefüggésben (Prasad és mtsai, 1994). Az őszi búza kezelése exogén H_2O_2 -dal vagy kataláz inhibitorral ugyanazon fehérjék szintézisét indukálta, mint az alacsony hőmérséklet (Matsuda és mtsai, 1994). A megemelkedett H_2O_2 szint jel lehet, ami antioxidatív enzimeket indukál, mint pl. kataláz, glutation S-transzferáz, amelyek védik a növényeket a termelődő H_2O_2 és más káros vegyületek ellen (Inzé és Van Montagu, 1995; Vranová és mtsai, 2002). *Arabidopsis*-ban 113 gén expressziójának módosítását bizonyították exogén H_2O_2 hatására, az indukálódó géntermékek között található pl. DNS-károsodást javító protein, protein kináz és öregedéssel kapcsolatos fehérje is (Desikan és mtsai, 2000).

Eltérő stresszorok hatására bekövetkező általános jelenség a H_2O_2 szintjének emelkedése, ami jelzi kulcsszerepét az akklimatizációban és megmagyarázza, hogy egy

stresszel szembeni akklimatizáció hogyan biztosít más stresszel szemben jobb ellenállóképességet (keresztrezisztencia) (Neill és mtsai, 2002). Exogén H_2O_2 alkalmazása kis koncentrációban meg tudja növelni a stressztoleranciát pl. alacsony és magas hőmérséklettel szemben, de növekedésgátlást eredményezhet (Prasad és mtsai, 1994; Foyer és mtsai, 1997). Szubletális koncentrációjú ózonnal vagy UV-B sugárzással történő előkezeléssel virulens patogén fertőzéssel szembeni rezisztenciát lehetett elérni (Sharma és mtsai, 1996). Hőstressz-kezelés is toleranciát indukált a későbbi patogén fertőzéssel szemben (Vallelian-Bindschedler és mtsai, 1998).

Az általánosságok ellenére a különböző stresszhatásra adott sejtválaszok bizonyos fokú specifitást mutatnak, és a H_2O_2 nem minden stresszhatás esetén indukálja a választ. Egyre több adat támasztja alá, hogy az aktív oxigénformák a jelátviteli útban szerepet játszó más molekulákkal kölcsönhatva több mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat.

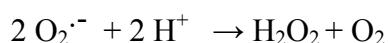
Az inkompatibilis mikroba-növény kapcsolatban, a patogén fertőzésre adott hiperszenzitív reakció folyamatainak tanulmányozása során bizonyították, hogy a H_2O_2 keletkezésével egyidejűleg nitrogénmonoxid (NO) is keletkezik, amely a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat módosíthatja sokrétű és áttételes folyamatokon keresztül. Diszulfid kötések vagy protein-glutation kevert diszulfidok képződhetnek, amelyek a különböző jelátviteli utakban transzkripciós faktorok, protein kinázok, protein foszfatázok aktivitását módosíthatják (Foyer és mtsai, 1997; Delledonne és mtsai, 2001). Az egyéb jelátvivő molekulák közül az etilén, abszcizinsav, szalicilsav, jázmonsav szerepét is bizonyították a növényi védekező gének aktiválásában (Bowler és mtsai, 1989; Ievins és mtsai, 1995; Overmyer és mtsai, 2000).

A H_2O_2 mellett és tőle részben függetlenül a $O_2^{\cdot-}$ is idézhet elő sejthalált, mint azt *Arabidopsis* mutánsokban bizonyították (Jabs és mtsai, 1996; Overmyer és mtsai, 2000), és megállapították, hogy a $O_2^{\cdot-}$ akkumulációját a sejtben az etilén is szabályozza.

2.3. Enzimatisz védő mechanizmusok

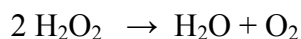
Az oxigéntartalmú gyökök keletkezéséhez vezető fontosabb reakciókat és a védő mechanizmusokat a 2.2. ábra szemlélteti. A reaktív oxigén formák elleni enzimatisz védekező rendszer első vonalát a szuperoxid dizmutázok jelentik, amelyek a szuperoxid

gyökök következő reakcióját katalizálják:



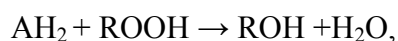
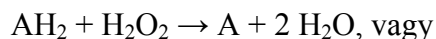
Minden aerob szervezetben előforduló, fémtartalmú enzimek. A bennük található fém prosztetikus csoport alapján 3 fő típusuk van, növényekben mindhárom előfordul. A Fe SOD a kloroplasztiszban, a Mn SOD a mitokondriumban és a peroxiszómákban, a Cu/Zn SOD a legtöbb sejtpartikulumban, így a citoplazmában, kloroplasztiszban, peroxiszómában és sejtfalban lokalizálódik (Alscher és mtsai, 2002). Az enzim aktivitása stressz hatására általában megemelkedik, pl. a szárazságtűrő dohány fajoknál nagyobb mértékben, mint az érzékeny növényeknél (Willekens és mtsai, 1994).

A sejt számára toxikus H_2O_2 elbontását elsősorban a katalázok és peroxidázok végzik. A kataláz hem tartalmú tetramer enzim, amely főként a peroxiszómákban és glioxiszómákban valamint a mitokondriumokban fordul elő. A H_2O_2 átalakítása során az enzim két lépésben köti a H_2O_2 -t, a reakció eredményeként víz és O_2 keletkezik, majd az enzim szabaddá válik. A folyamat a következő egyenlettel összegezhető :



Willekens és mtsai (1994) *Nicotiana plumbaginifolia*-ban 3 kataláz gént azonosítottak, és megállapították, hogy mindegyiknek más specifikus H_2O_2 -termelő folyamatban van szerepe. A *CAT1* gén terméke a fénylégzés során keletkező H_2O_2 eltávolításában, a *CAT3* géné a glioxiszómákban a zsírsavak β -oxidációja során keletkező H_2O_2 elleni védelemben, a *CAT2* gén specifikusan az oxidatív stressz során keletkező H_2O_2 eliminálásában játszik szerepet. Savas közegben a kataláz is peroxidatív aktivitást mutat, H_2O_2 segítségével pl. metanolt, etanolt, hangyasavat vagy fenolszármazékokat képes oxidálni.

A peroxidázok számos különböző reakciót katalizálhatnak. Élettani funkciójukat tekintve egyik nagy csoportjukba azok a peroxidázok tartoznak, amelyeknek alapvető szerepe a reaktív oxigénformák átalakítása. Jelentőségük a H_2O_2 és szerves hidroperoxidok elleni védekezésben van. A sejtkomponenseket H_2O_2 -dal vagy szerves hidroperoxidokkal oxidálják, általánosságban a következő folyamat szerint:



ahol AH_2 a redukált eletronodonort, ROOH és ROH a szerves hidroperoxidot és a megfelelő alkoholszármazékot jelöli. Ide tartoznak pl. az élesztőkben a citokróom c peroxidázok, emlősökben a glutation peroxidázok, a növényekben az aszkorbinsav peroxidázok (APX), amelyek a kloroplasztiszban, mitokondriumban, a peroxiszómális membránhoz kötve, a

citoplazmában és az apoplasztban is megtalálhatóak nagy mennyiségben (Asada, 1992; Shigeoka és mtsai, 2002). Újabban kimutatták növényekben is a glutation peroxidázokat (GSH-PX), amelyek stresszhatásra indukálódnak (Beeor-Tzahar és mtsai, 1995). Fehérje analízis és génszekvencia homológia segítségével megállapították, hogy a növényi GSH-PX enzimek a foszfolipid hidroxid glutation peroxidázok családjába tartoznak. A foszfolipid hidroxid GSH-PX-k funkciója különböző alkil hidroxidok, köztük a lipid peroxidok redukciója; ezért legfontosabb szerepük a lipidperoxidációs termékek mennyiségének csökkentése (Eshdat és mtsai, 1997).

A növényi peroxidázok másik nagy csoportját olyan enzimek alkotják, ahol az e^- - donor fiziológiai szereppel bír. Összefoglaló elnevezésük guajakol peroxidáz (GPX), a kimutatásukra általánosan használt guajakol szubsztrát alapján. Elektron donoroként sokféle molekulát használhatnak, kulcsszerepet töltenek be pl. a lignin bioszintézisben, IES lebontásban, etilén bioszintézisben (García-Florenciano és mtsai, 1991; Hatfield és mtsai, 1999, Quiroga és mtsai, 2000). A működésüknél felhasznált H_2O_2 intracelluláris mennyisége szigorúan szabályozott, számítások szerint a steady state H_2O_2 koncentráció általában 5-15 μM (Asada, 1992; Polle, 2001).

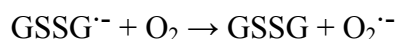
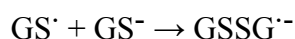
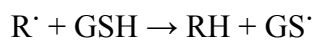
2.4. A glutation, a nem-enzimatisz védőmechanizmus része

Szabadgyök kioltó hatással különböző kis molekulaszúlyú vegyületek is rendelkezhetnek, amennyiben a reaktív oxigénformákkal közvetlenül reagálva tőlük elektront vonnak el, vagy azoknak protont adnak át. Ennek a nem-enzimatisz védő rendszernek tagja pl. az aszkorbinsav, α -tokoferol és a glutation.

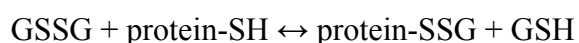
Az oxidatív stressz során képződő gyökök - és különösen a továbbalakulásukkal keletkező H_2O_2 - redukatív detoxifikációjának fő szubsztrátja növényekben az aszkorbinsav, amelynek folyamatos regenerációját az aszkorbinsav - glutation ciklus biztosítja (2.2. ábra). A redukált glutation (GSH) egy tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly), a dehidroaszkorbinsavat (DHA) redukálja nem-enzimatisz és dehidroaszkorbinsav reduktáz (DHAR) enzim által katalizáltan is. A folyamat során glutation diszulfid, általánosan használt elnevezéssel oxidált glutation (GSSG) keletkezik, amelynek visszaredukálását a glutation reduktáz (GR) enzim végzi a funkcionálisan kapcsolódó aszkorbinsav ciklus elemeivel együtt. Ebben az esetben a glutation a ciklus tagjaként közvetve vesz részt a keletkezett reaktív oxigén gyökök és H_2O_2 eltávolításában. A glutation a H_2O_2 -dal közvetlenül nem reagál, de pl. a

peroxiredoxin enzimek GSH felhasználásával redukálják a H_2O_2 -t vízzé (Dickinson és Forman, 2002), és a lipidperoxidációs termékek átalakítását végző GSH-PX enzim regenerációja is redukált GSH felhasználásával történik; a folyamatok során $\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$ átalakulás játszódik le (Noctor és mtsai, 1998).

A GSH közvetlen szabadgyökkioltó szerepe a következőképpen írható le:



(A szuperoxid gyök a korábban említett reakciók szerint alakulhat tovább kevésbé reaktív formává.) Az összes glutation 90-99 %-a redukált formában van jelen. Koncentrációja a citoplazmában és a kloroplasztiszbán mM-os nagyságrendű (Foyer és Halliwell, 1976; Vranová és mtsai, 2002). Stressz hatásra a GSH szint általában *de novo* szintézis eredményeként emelkedik (May és Leaver, 1993; Noctor és mtsai, 1998). A GSH a legfontosabb nem-fehérje tiolkomponens a sejtben, amely redox pufferként szerepelhet (Foyer és Halliwell, 1976; Noctor és mtsai, 2002). Oxidatív stressz esetén gyakran megfigyelhető a GSH/GSSG arány eltolódása, ami a sejt redox állapotának meghatározója és regulációs jelentősége is van. Az –SH csoportok, ill. diszulfid kötések fontos szerepet töltenek be a fehérjék térszerkezetének alakulásában, állapotváltozásuk bizonyos enzimek aktiválásához vagy inaktiválásához vezethet (Foyer és mtsai, 1997; Dickinson és Forman, 2002). A GSH „pool” a szabad szulfhidril csoportok védelmét biztosítja, míg a GSSG a fehérjék szabad –SH csoportjához kapcsolódva kevert diszulfidokat képezhet:



A GSH szint ill. a GSH/GSSG arány és redox állapot géntranszkripciók aktivátorként is fontos szerepet tölt be: indukálhatja bizonyos védekező gének expresszióját és ezt követően pl. a patogénellenes fitoalexinek, patogenezis-kapcsolt fehérjék, glutation S-transzferázok szintézisét. A GSH kofaktora a glutation S-transzferáz (GST) enzimnek, amely részletesebb bemutatásra kerül.

2.5. A glutation *S*-transzferázok

2.5.1. Általános jellemzésük, csoportosításuk, szerkezetük

A GST-k a baktériumoktól az emlősökig általánosan előforduló többfunkciós fehérjék. Legismertebb reakciójuk a GSH kapcsolódásának katalizálása endogén vagy exogén eredetű elektrofil molekulákhoz. Az *Arabidopsis* genomban több, mint 25 *GST* gént azonosítottak. A géntermékek elsődleges szerkezete és szubsztrát specifitásuk nagy variabilitást mutat. A legjobban tanulmányozott emlős GST-eket 6 fő osztályba sorolták, a növényi izoenzimek egy része besorolható ezekbe, de elkülönítettek két növény-specifikus osztályt is (2.3. ábra; Edwards és mtsai, 2000). Az intronok száma és pozíciója a *GST* génekben minden csoporton belül meghatározott, lehet 1, 2 vagy 9 is; a szekvenciaazonosság az azonos osztályba tartozó gének esetében ugyan meghaladja az 50 %-ot, de az osztályok között csak 10-30 %.

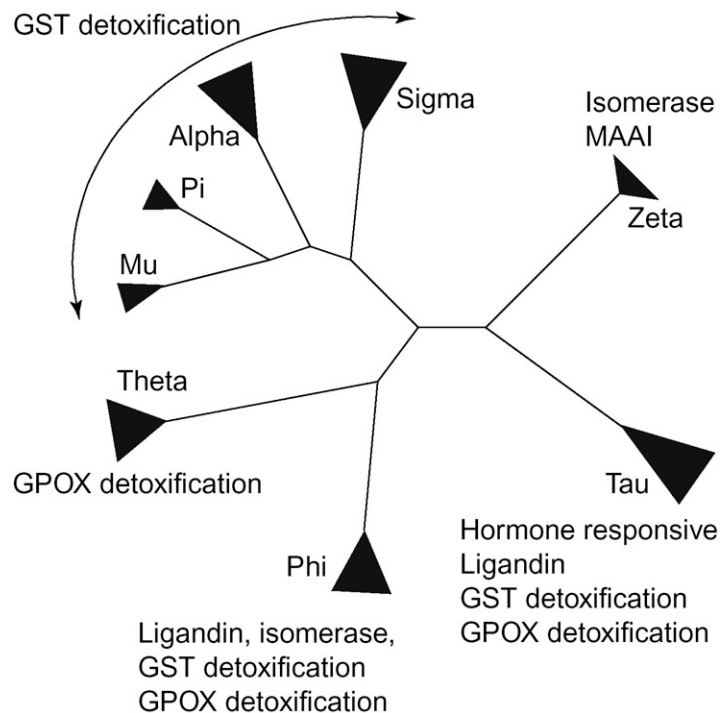
Általában citoszolikus enzimek, az azonos osztályba tartozó alegységekből feltehetően spontán képződnek a mono- ill. gyakrabban heterodimerek. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatokkal megállapították, hogy az eltérő aminosavszekvencia ellenére a fehérjék háromdimenziós szerkezete nagyon hasonló. Globuláris dimerek, az alegységek között középen nagyobb molekulák számára is jól hozzáférhető aktív centrum található. Minden alegységben az N-terminális domén tartalmazza a szelektív GSH-kötő helyet (G-site), a nagy szekvencia-variabilitást mutató C-terminális domén pedig a kosubsztrát-kötő, ún. hidrofób szubsztrát helyet (H-site) (Reinemer és mtsai, 1996; Edwards és mtsai, 2000).

2.5.2. A GST-k funkciói

Detoxifikáció GSH konjugációval

A GST izoenzimek széles szubsztrátspecifitása azzal magyarázható, hogy valamennyi szubsztrátjának kémiai szerkezetében meghatározó egy kettős kötéssel is rendelkező szénatomhoz kapcsolódó elektronegatív csoport (pl. $-\text{NO}_2$, $-\text{CHO}$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{CN}$ vagy $-\text{CONH}_2$) (Talalay és mtsai, 1988; Marrs, 1996).

A növényi GST-k első ismert funkciója a fotoszintetikus gyomirtószer GSH konjugációval történő detoxifikációja volt, amely a gyomirtószer szelektivitását magyarázza: a rezisztens biotípusok GSH-herbicid konjugátumokat képeznek (Frear, 1970).



2.3. ábra: Glutation S-transzferáz osztályok és feltételezett filogenetikai kapcsolatuk, jelezve az osztályok közti távolságot és az egyes osztályokon belüli diverzitást, és feltüntetve az osztályba tartozó enzimek funkcióját (GST detoxifikálás, detoxifikálás glutation peroxidáz = GPOX aktivitással, ligandin, izomeráz funkciók és/vagy növényi hormon válaszbán játszott szerep). (Edwards és mtsai, 2000)

GST aktivitás indukciójával lehet kapcsolatba hozni bizonyos antidótum (safener) vegyületekkel történő előkezelés hatását is tiokarbamát és klóracetamid gyomirtószerekkel szembeni ellenállóképesség növelésében (Fuerst és Gronwald, 1986; Dean és mtsai, 1990; 1991). Az antidótumok önmagukban nem toxikusak, de szerkezetileg hasonlóak a gyomirtószerekhez; hatásmechanizmusukról bebizonyosodott, hogy a mezőgazdaságilag fontos növényekben szelektíven indukálják a GST aktivitást és így a herbicid GSH konjugációval kezdődő hatástalanítását (Fuerst és mtsai, 1993; Marrs, 1996). A folyamat nemcsak exogén eredetű „xenobiotikumok”, hanem endogén vegyületek esetén is végbemegy. Patogén által indukált GST izoenzimekről megállapították, hogy szerepet játszhatnak a növényi, gomba vagy mikroorganizmus eredetű elicitorok hatásmechanizmusában is (Darvill, 1984). A GST-k szerepét sokáig abban tartották legfontosabbnak, hogy a reaktív oxigén gyökök által iniciált oxidatív károsodás toxikus termékeit, ill. a citoszolban keletkező, esetleg fitotoxikus másodlagos anyagcseretermékeket GSH-val konjugálják, így jelölve meg azokat a transzmembrán

transzporthoz. A glutation S-konjugátumokat (GS-X) a tonoplasztban található ún. GS-X pumpa ismeri fel és juttatja a vakuólumba, ahol a konjugátumok általában további átalakuláson mennek keresztül. Az endogén növényi produktumok GSH általi konjugációjára azonban kevés adat van. A folyamat valószínűleg igen nagy jelentőségű, igazolása mégsem történt meg, feltehetően a kivonási eljárás alatt a konjugátumok degradálódnak pl. a vakuólumnedv pH-t csökkentő hatása miatt, enyhén savas pH-n a konjugátumok már nem stabilak (Marrs, 1996; Li és mtsai, 1997; Edwards és mtsai, 2000).

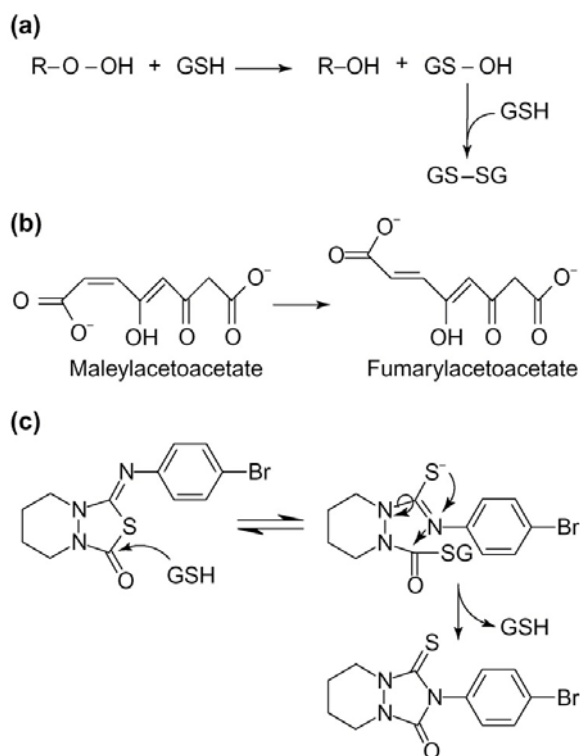
Glutation peroxidáz aktivitás

Néhány GST izoforma GSH-PX aktivitással is rendelkezik. Bartling és mtsai (1993) kimutatták az *Arabidopsis* PM239 GST-ről, hogy szubsztrátjai különböző lipidperoxidok, mint pl. a 13-hidroperoxi-linolénsav és a glutation peroxidázok modellszubsztrátja, a kumén hidroperoxid. Különböző osztályba tartozó enzimekről mutatták ki, hogy aktívan detoxifikálják a 4-hidroxinonenált (4HNE), a membránok oxidatív károsodásánál keletkező vegyületet (Cummins és mtsai, 1997; Gronwald és Plaisance, 1998). A GST-k a szerves hidroperoxidok (ROOH) GSH-val történő konjugálása mellett a kevésbé toxikus monohidroxi-alkohollá (ROH) történő redukciót is katalizálják (2.4. ábra a). Szerepüket bizonyították pl. az *Alopecurus myosuroides* (parlagi ecsetpázsit) vonalak esetében, ahol a herbicid rezisztenciában nagy GSH-PX aktivitással rendelkező GST izoenzimek játszanak szerepet, megakadályozva a gyomirtószer-kezelés következtében direkt vagy indirekt módon keletkező citotoxikus hidroperoxidok felhalmozódását (Cummins és mtsai, 1999). GSH-PX aktivitással rendelkező GST gént tartalmazó transzgenikus dohány növények vizsgálatánál megállapították, hogy stressztoleranciájuk megemelkedett, a lipidperoxidáció mértéke pedig magas hőmérséklet és sókezelés hatására sem változott (Roxas és mtsai, 2000).

A GST-k GSH-függő izomeráz reakciók katalizátorai

A tiódiazolidin proherbicid fitotoxikus triazolidinné történő alakítását is GST-k végzik. Az izomerizációhoz hasonló reakció során a GSH kapcsolódásával az 5-tagú gyűrű felnyílik (2.4. ábra c; Jablonkai és mtsai, 1997). A gyűrű felnyílása az N-C kötés körül rotációt enged meg, kettős kötés- (elektron) átrendeződés következik be, majd a N atom karbonil csoporthoz való kapcsolódásával új gyűrű képződik és a GSH leválik. Humán GST-nél bizonyították, hogy az enzim maleilacetoacetát-izomeráz (MAAI) funkcióval rendelkezik, amely a fenilalanin bioszintézis kulcsenzime (maleilacetoacetát →

fumarilacetoacetát átalakítást végzi). A GST-közvetített *cisz-transz* izomerizáció során a GSH a *cisz*-kettős kötéshez kapcsolódik, rotáció után *transz* izomer keletkezik (2.4. ábra b). Hasonló szerepe lehet a szegfűből izolált, öregedési folyamatok során indukálódó GST-knek az aromás aminosavak lebontásában (Fernández-Cañón és Peñalva, 1998; Edwards és mtsai, 2000).



2.4. ábra: GST által katalizált egyéb átalakulások, amelyekben nem képződik GSH-szubsztrát konjugátum.

a: glutation peroxidáz reakcióval szerves hidroperoxid átalakítása monohidroxi alkohollá; **b:** *cisz-transz* izomerizációval maleilacetoacetát átalakítása fumarilacetoacetáttá; **c:** tiodiazolidin proherbicid átalakulása fitotoxikus triazolidinné GSH-konjugált intermedier segítségével. (Edwards és mtsai, 2000)

GST-k, mint kötő- és szállító fehérjék

Antocián bioszintézisben mutáns kukorica növények analízisével mutatták ki, hogy a cianidin-3-glükozid vakuólumba történő transzportjáért egy GST enzim felelős. Az antocián mélyvörös- vagy lila színű formája normális körülmények között a vakuólumban található. GST hiányában a prekursor a citoplazmában halmozódik fel, és a jellegzetes bronzvörös szín (angolul: bronze pigmentation) mellett nekrozist, csökkent növekedést, sőt pusztulást idézhet elő (Marrs és mtsai, 1995). A legújabb elmélet szerint ebben az esetben

nem a konjugátumképzés a GST legfontosabb szerepe, hanem szállító-molekulaként funkcionál, ami ahhoz kell, hogy az antocián a vakuólumba jusson.

Az az elképzelés, hogy a GST-k „hordozó-fehérjeként”, ligandinként működnek, az 1970-es évek elejéről származik, hiszen állati sejtekben kimutatták, hogy a GST-k különböző szteroidok és metabolitok (többek között bilirubin, hem, epesav sói) intracelluláris transzportjában nem-enzimatisz szállítóként közreműködnek. A ligandumok kapcsolódása az ún. ligand-kötő helyen történik (Marrs, 1996). Növényekben is találtak magas tetrapirrol- és porfirin-metabolit affinitással rendelkező GST izoenzimeket, és egyre több bizonyíték van arra, hogy bizonyos specifikus növényi GST-k, amelyek meghatározott növényi metabolitokat kötnek, „kielégítik a ligandin fogalmát” (Edwards és mtsai, 2000). Az a tény, hogy auxin- és citokininkötő fehérjék kutatása során fotoaffinitás-jelölést alkalmazva izoláltak GST-ket (Macdonald és mtsai, 1991; Bilang és mtsai, 1993; Zettl és mtsai, 1994; Gonneau és mtsai, 1998), azt jelzi, hogy ezeknek a proteineknek szerepe lehet a növényi hormonok intracelluláris transzportjában. Mind a tetrapirrol molekulák, mind a növényi hormonok kötése gátolja a GST xenobiotikumokkal szembeni aktivitását, miközben a kapcsolódott ligandum nem konjugálódik (Edwards és mtsai, 2000).

2.5.3. A GST-k kapcsolata az auxinokkal

Auxin receptorok tanulmányozása során az 5-azido-IES-hez kötődő fehérjék közül beléndekből (*Hyosciamus muticus*), és *Arabidopsis*-ből izoláltak GST aktivitással rendelkező proteineket, ami az auxinok és a GST-k között kialakuló direkt kapcsolatot mutatja (Bilang és mtsai, 1993; Zettl és mtsai, 1994). Homológ géneket mutattak ki kukoricában, búzában, paradicsomban, burgonyában, petúniában és szójában is (Marrs, 1996). Különböző auxinoknak és inaktív auxinanalógoknak a CDNB (2,6-klórdinitrobenzol) modellszubsztráttal mért GST aktivitásra gyakorolt hatását tanulmányozva Bilang és Sturm (1995) feltételezték, hogy az indol-3-ecetsav (IES), α -naftilecetsav (α -NES) és az indol-3-vajsav a GST nem-katalitikus helyén kapcsolódik, míg a szintetikus auxin 2,4-diklórfenoxiecetsav (2,4-D), 2,4,5-klórfenoxiecetsav (2,4,5-T) valamint az inaktív hormonanalógok a katalitikus H-helyre kötődnek. A szintetikus auxinok egy részének katalitikus helyre történő kötődése a detoxifikálási folyamat kezdetét jelentheti, míg az IES nem-katalitikus kapcsolódása szerepet játszhat az auxinok aktivitásának szabályozásában, transzportjában vagy raktározásában. Azonban IES-GSH

vagy IES-cisztein konjugátumot nem sikerült eddig kimutatni, és az IES-GSH kapcsolódását tisztított *Arabidopsis* és burgonya GST-vel *in vitro* nem sikerült katalizálni (Marrs, 1996).

A GST és az auxinok kapcsolatának további érdekessége, hogy számos GST-t auxin-indukálta géntermékként izoláltak. Takahashi és mtsai dohány mezofillum sejtek protoplasztjaiból izoláltak auxin-regulált *par* géneket, amelyek a G₁ - S fázis átmenet során expresszálódtak, és közülük később hármat GST-kódoló szekvenciaként azonosítottak (Takahashi és mtsai, 1989; Takahashi és Nagata, 1992). Sitbon és mtsai (1996) vizsgálták az auxin-indukálta GST-ket kódoló *parA* és *parB* gének expresszióját különböző *Nicotiana tabacum* SR1 vonalakban. Az mRNS szint mindegyik vizsgált génnél magasabb volt az IES-túltermelő transzformánsoknál, de nem találtak korrelációt az elsődlegesen auxinra reagáló *parA* és a tőle eltérő szekvenciájú *parB* gén relatív mRNS szintje és az endogén IES tartalom között, jelezve, hogy ezeknek a géneknek az expresszióját más faktorok is befolyásolják. A *parA* (*NT 114*) és egy másik GST-t kódoló gén, az *NT 103* egyaránt indukálható volt inaktív auxin analógokkal, más növényi hormonokkal (köztük etilénnel) és nehézfémekkel. Néhány növényi *GST* gén promóterében találtak ún. *ocs*- (oktopin szintáz), vagy *ocs*-szerű szekvenciákat (Zhang és Shing, 1994; Marrs 1996). Az *ocs* elemek felelősnek bizonyultak a stressz-általi indukcióért, azonban különböző elektrofil molekulák mellett biológiailag aktív hormonok és inaktív hormon analógok is aktiválták a promótert (Ulmasov és mtsai, 1994; 1995; Marrs 1996). Az indukció rövid időn belül mRNS szint emelkedést eredményez: a *parA* transzkriptum akkumulálódása 2,4-D hatására 30 percen, az *Arabidopsis GST6* mRNS a H₂O₂ kezelést követően 45 percen, egy petrezselyemből izolált *GST* transzkriptum esetében UV-B hatásra 2 órán belül volt kimutatható (Takahashi és mtsai, 1989; Chen és mtsai, 1996; Loyall és mtsai, 2000).

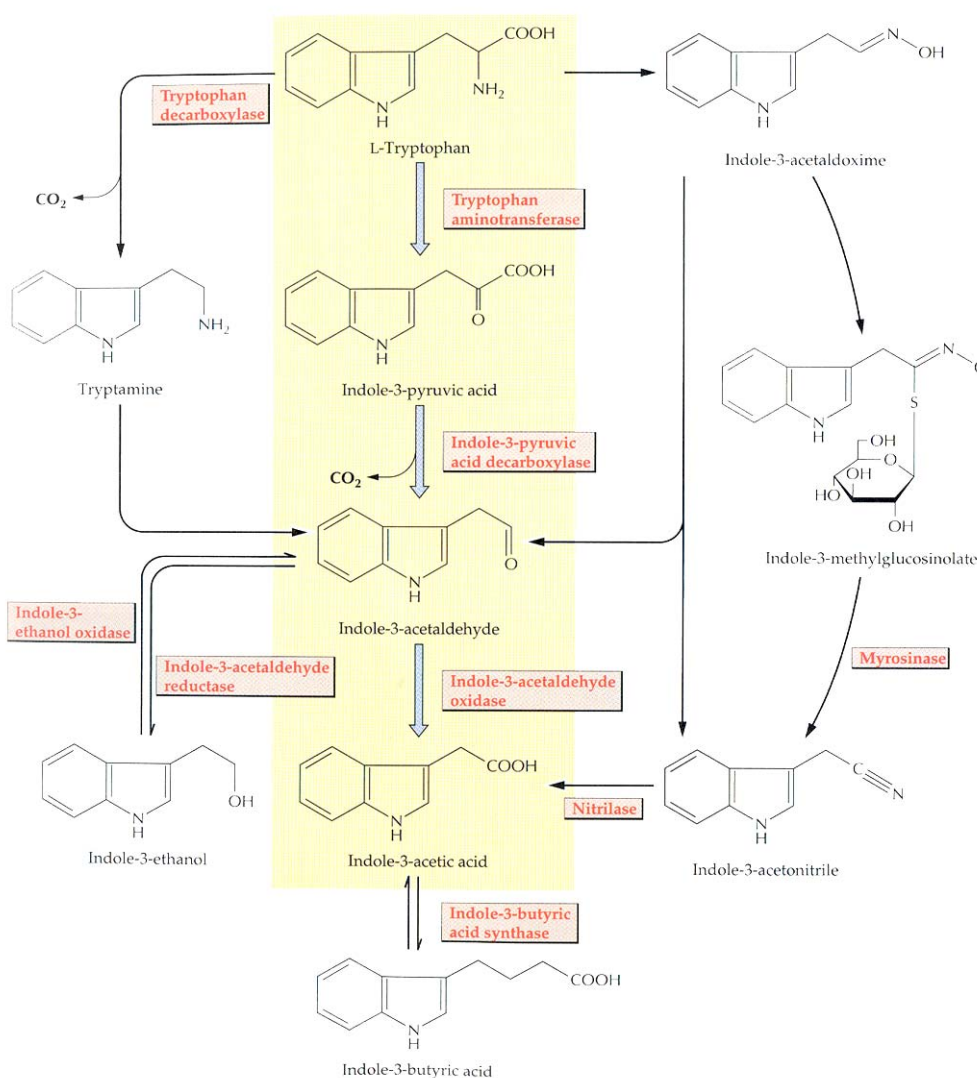
2.6. Az auxin jelentősége

2.6.1. Az IES szerepe a növekedési és fejlődési folyamatokban

Az auxin (IES) a növekedési és fejlődési folyamatok széles körénél kulcsszerepet tölt be. A teljes növényt tekintve fontos szerepe van pl. a gyökérképzésben, tropizmusokban, apikális dominancia kialakulásában és az öregedésben. Az auxin egyik legfontosabb hatása a fiatal száraz, koleoptilok megnyúlásos növekedésének szabályozása.

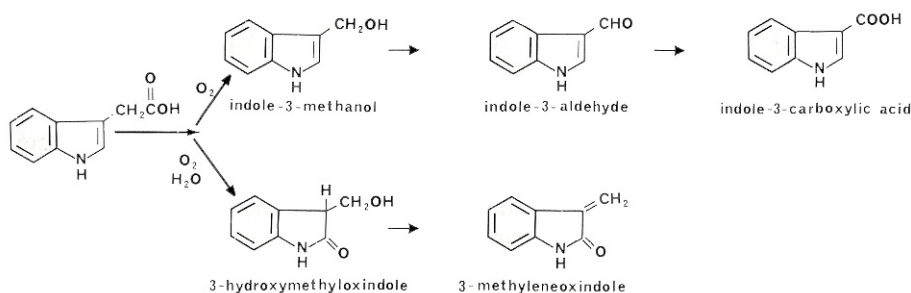
Szükséges a gyökerek megnyúlásos növekedéséhez is kis koncentrációban, azonban a száraz- és koleoptilek növekedését serkentő koncentrációk itt már növekedésgátlást okoznak, amelynek pontos magyarázata még nem ismert. Sejtszinten vizsgálva az auxin szerepét kiemelhetjük, hogy hat a sejtosztódásra, megnyúlásra és differenciálódásra is.

A növényi szövetek IES tartalmát több tényező határozza meg. Bioszintézise általában triptofánból kiindulva történik, leggyakrabban indol-3-piruvát és indol-3-acetaldehid (IAAld) közttermékeken keresztül (2.5. ábra), emellett azonban triptofántól független szintézisutak is vannak, amelyek jelentőségéről keveset tudunk.



2.5. ábra: A triptofánból (L-tryptophan) kiinduló IES (Indole-3-acetic acid) bioszintézis főbb útjai a növényekben, a reakciókat katalizáló enzimek feltüntetésével, közepén kiemelve a legfontosabb reakcióutat. (Buchanan és mtsai, 2000)

A szövetek hormon tartalma növekedhet az IES-konjugátumok hidrolízisével, a transzport folyamatok és a kompartmentáció - iránytól függően - emelhetik vagy csökkenthetik a szabad auxin mennyiségét. Az IES inaktiválásában a konjugátum képzés mellett enzimatis lebontó folyamatok vesznek részt, amelyek közül a peroxidázok által katalizált reakcióutak a legfontosabbak. A keletkező vegyületeket a 2.6. ábra foglalja össze.



2.6. ábra: Peroxidázok által katalizált IES-lebontás termékei. (Davies, 1995)

2.6.2. Hormon autotrófia

Régóta ismert, hogy a növényi szövetkultúrák növekedésének fenntartásához szükséges a növényi hormonok közül az auxin (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1939; White, 1939) és a citokinin (Miller és mtsai, 1955). Bizonyos körülmények között azonban a sejtosztódás exogén auxin és/vagy citokinin nélküli táptalajokon is végbemehet; ezeket a hormon-független kultúrákat autotróf vagy habituált szöveteknek, a folyamatot - amely során a sejtek visszanyerhetik hormonszintetizáló képességüket - habituációnak nevezzük.

A habituáció epigenetikai, vagyis fenotípusban bekövetkezett változásként definiálható. A DNS szekvenciája nem módosul, azonban pl. a DNS metilációja, a transzkripciós aktivitás, a transzlációs kontroll vagy poszttranszlációs modifikáció megváltozik. Jellemzője a nagyfokú stabilitás, a változás sejtszinten öröklődik, előfordulása a mutációk 10^{-5} - 10^{-6} gyakoriságához viszonyítva nagyobb, meghaladja a 10^{-3} -t (Meins, 1983). A habituációt gyakran párhuzamba állítják a rákos sejtek képződésének folyamatával, hiszen az ún. neoplasztikus transzformáció egyik fő kritériuma a hormon-független növekedés, amely a növényi tumoros sejteket is jellemzi. A tenyésztett sejtek

hormon-autonómmá válása fokozatos, több formája lehet, amelyek a neoplasztikus átalakulás egyes lépéseinek is tekinthetők (Bisbis és mtsai, 1999).

A habituációt a hormonális kezelés maga is indukálhatja: Bennici és mtsai (1972) kimutatták, hogy 8-12 napig tartó 2,4-D- vagy kinetin kezelés jelentősen megnövelte az autotróf kalluszok képződésének gyakoriságát. A habituált kalluszok jelentős részéből néhány hónapig még lehetett hajtást és teljes növényt regenerálni, azonban ez a képesség később fokozatosan elveszett. Ezt a jelenséget a szakirodalomban többen a teljes neoplasztikus átalakulás jeleként értelmezik (Bennici és Bruschi, 1999; Bisbis és mtsai, 1999).

Az auxin autotróf kultúrák hormon metabolizmusának vizsgálata kiderítette, hogy az endogén szabad auxin szintjük még magasabb is lehet, mint a heterotróf vonalaké (Nakajima és mtsai, 1979). Az auxinszint megemelkedéséhez különböző folyamatok vezethetnek, pl. az IES bioszintézis növekedése a sejtekben már működő reakciókon vagy más szintézisutak aktiválódásán keresztül (Jackson és Lyndon, 1990; Szabó és mtsai, 1994; Michalchuk és Druart, 1999), az IES konjugáció és/vagy degradáció különböző szintje (Bouchet és mtsai, 1978; Syono, 1979; Michalchuk és Druart, 1999). Az auxin autotróf és heterotróf szövetek különbözhetnek egymástól az IES-sel szemben mutatott érzékenységekben és a receptorok számában is, ezért az az auxin szint, amely a heterotróf szövetek osztódásához optimális, csökkenti az autotróf vonalak növekedését (Szabó és mtsai, 1981).

A hormon autotrófia tanulmányozása az utóbbi évtizedben több megközelítésben került az érdeklődés középpontjába. Nagata és mtsai (1992) izolálták a *Nicotiana tabacum* BY-2 sejtvonalat, amely elegendő citokinint szintetizált a növekedés fenntartásához az exogén citokinin-ellátástól függetlenül, és amely azóta a sejtosztódás szabályozásának tanulmányozása mellett széles körű, intenzív kutatások tárgyává vált. Citokinin-független növekedést eredményezett pl. egy feltételezett citokinin receptor túltermeltetése *Arabidopsis*-ban (Kakimoto, 1996), és a sejtciklus szabályozásának tanulmányozása során egy D-típusú ciklin gén (*CycD3*) konstitutív kifejezése is helyettesítette az exogén citokinin hatását kallusz sejtek osztódásánál (Riou-Khamlichi és mtsai, 1999). Cukorrépa kalluszok habituációjának tanulmányozása során Bisbis és mtsai (1999) azt tapasztalták, hogy a neoplasztikus átalakulással párhuzamosan a kultúrák peroxidáz aktivitása fokozatosan csökkent. Kimutatták, hogy a habituált szövetek primer anyagcseréje módosul, aminek következtében csökken a klorofilltartalom, a hem- és a hemtartalmú enzimek (peroxidáz, kataláz) bioszintézise.

2.6.3. Az auxin-indukált jelátvitel

Az auxin hatásának molekuláris mechanizmusa a receptorhoz való kötődéstől a fiziológiai válaszig részleteiben, az intenzív kutatások ellenére, még mindig nem ismert.

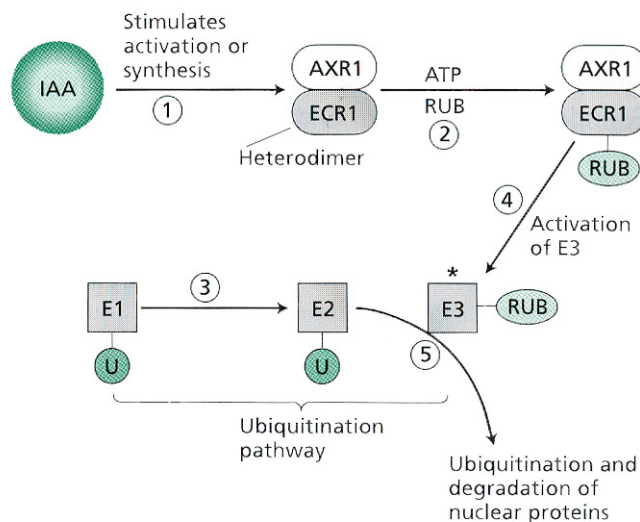
Az auxin receptora a többi hormonéhoz hasonlóan membránhoz kötött. Fehérjéhez kapcsolt auxin-származékokkal kimutatták, hogy az auxinnak a hatás kifejtéséhez nem kell belépnie a sejtbe (Venis és mtsai, 1990). A sejtmembránban legjelentősebb ABP1 (auxin binding protein1) feltételezett auxin receptor azonban nagy mennyiségben az endoplazmatikus retikulumban található, és csak kis része kerül a plazmamembránba és a tonoplastba. Kukorica koleoptil protoplasztokban immuncitokémiai módszerekkel Diekmann és mtsai (1995) igazolták, hogy az ABP1 fehérjének kb. 2 %-a a felszínre szekretálódik, ez a mennyiség elegendő ahhoz, hogy a sejt felszínén auxin receptorként működjön.

Auxin hatására protoplasztok plazmamembránján 1-2 percen belül hiperpolarizáció következik be, aktiválódik a H^+ -pumpa és az anioncsatornák működése módosul. Az auxin hatásában a jelátviteli út számos eleme részt vesz. A különböző szövetek, szervek auxinra adott eltérő válaszáért feltehetően különböző típusú auxin receptorok és szignál transzdukciós mechanizmusok működése felelős (Guilfoyle és mtsai, 1998). Auxin hatására kimutatható volt a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció növekedése, a citoszol pH-jának csökkenése (Gehring és mtsai, 1990), a foszfolipáz A_2 aktivitásának emelkedése (Scherer és André, 1989), a cAMP szintjének átmeneti növekedése (Ehsan és mtsai, 1998). Bár az egyes jelátviteli lépések aktiválásának bizonyítása nehéz, általánosan elfogadott, hogy az auxin jelátviteli útjában szerepet játszanak a heterotrimer G-proteinek is.

Arabidopsis mutánsok segítségével bizonyították, hogy az auxin hatásban centrális szerepe van egyes nukleáris fehérjék ubiquitinálásának (Leyser és mtsai, 1993). Az „ubiquitin-út” első enzime (E1) ATP felhasználásával köti és aktiválja az ubiquitint. Az *Arabidopsis axr1* (*auxin resistant 1*) mutánsról - amely nem mutat gravitropos és egyéb, pl. génexpressziós választ auxinhatásra - megállapították, hogy a jelenségért felelős gén terméke (AXR1) az ubiquitinálási út E1 enzimének N-terminális részéhez hasonló fehérjét kódol. Az AXR1 fehérje heterodimert képez egy másik fehérjével, ami az ubiquitinálási út E1 enzimének C-terminális részével homológ (ECR1) (2.7. ábra; del Pozo és mtsai, 1998). A két fehérje által képzett AXR1-ECR1 heterodimer, amely hasonlóságot mutat az E1 enzimmel, egy ubiquitinhez hasonló, kis molekulású fehérjét köt, amelyet RUB-nak neveznek (related to ubiquitin). Ezzel a kapcsolódással a RUB aktiválódik (Ruegger és mtsai, 1998). A RUB

fehérje átadásával az AUX1-ECR1 komplex az ubiquitin út E3 enzimét aktiválja, ami után az ubiquitin az E2 enzimről a sejtmag specifikus fehérjéire kerül és a nukleáris fehérjék 26S proteoszóma általi degradációját idézi elő. Az auxin-indukált gének gyakran represszált állapotban vannak, a represszor fehérjék eltávolításában játszik szerepet ez a folyamat. Az auxin növeli az AXR1-ECR1 aktivitását vagy a sejtben már meglévő enzimre hatva, vagy szintézisének aktiválásán keresztül (2.7. ábra; Taiz és Zeiger, 1998). *Arabidopsis tir1* (auxin transport inhibitor resistant 1) mutánsnál igazolták, hogy a gyökér periciklusban a sejtosztódást az auxin által indukált ubiquitin-protein ligáz komplex (SCF) közvetíti, a sejtciklus egy vagy több negatív regulátorának degradációját segítve (Gray és mtsai, 1999; Stals és Inzé, 2001).

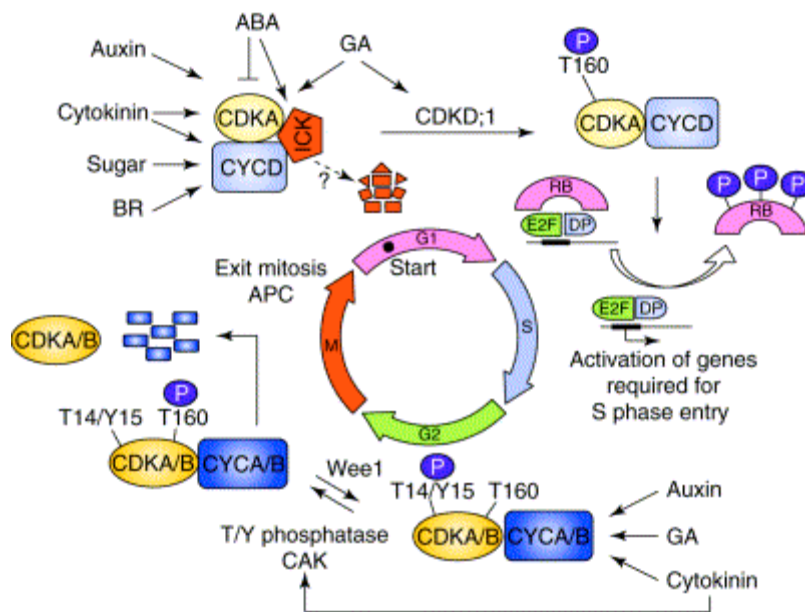
Az auxin-indukálta sejtosztódás tanulmányozása során mutatták ki, hogy az auxin jelátviteli útban a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) kaszkád közvetítheti az auxin hatását (Hirt, 1997). Ha a dohány sejt kultúrához nem adnak auxint, a sejtek az osztódási ciklus G₁ vagy G₂ fázisában maradnak. Az auxin serkenti a ciklin-függő protein kináz (CDKA;1) szintézisét és növeli a mitotikus ciklin mRNS-ének szintjét (Dudits és mtsai, 1993; Doerner és mtsai, 1996). A CDKA;1 expresszió indukciója a legtöbb kultúrában



2.7. ábra: Az auxin által indukált ubiquitinálási út modellje. Magyarázat a szövegben.

Az ábrában az AXR1 = *auxin resistant 1* mutánsban azonosított fehérje, ECR1 = az ubiquitinálási út E1 enzimének C-terminális részével homológ fehérje, RUB = ubiquitinhez hasonló fehérje, E1 = ubiquitin-aktiváló enzim, E2 = ubiquitin konjugáló enzim, E3 = ubiquitin-protein ligáz jelölése. (Taiz és Zeiger, 1998)

tartott sejtnél önmagában nem elegendő a sejtosztódáshoz. Zhang és mtsai (1996) dohány gyökér explantátumon végzett kísérletekkel kimutatták, hogy a kináz katalitikus aktivitása és a mitózisba való átmenet csak citokinin hozzáadásával indukálódott, amely a CDKA;1 kináz tirozin csoportjának defoszforilációját stimulálja (2.8. ábra; Stals és Inzé, 2001).



2.8. ábra: A növényi sejtciklus szabályozásának fontosabb elemei, feltüntetve a növényi hormonok (auxin, citokinin, abszcizinsav, gibberellin, brassinoszeroidok) hatásának helyét. (A szabályozó fehérjék jelölései: CYCA,B,D = A,B, vagy D-típusú ciklin, CDKA,B,D = ciklin-dependens kinázok, ICK = CDK-gátló fehérje, CAK = CDK-aktiváló kináz, RB = retinoblasztóma fehérje, E2F-DP = transzkripció represszor komplex, APC = anafázist segítő enzim komplex.) (Stals és Inzé, 2001)

Az auxin hatásmechanizmusára igaz, hogy a receptor sajátosságaitól és az auxin hatás közvetítésében részt vevő jelátviteli úttól függetlenül az exogén auxin transzkripció faktorok aktiválását idézi elő, amelyek a sejtmagban bizonyos gének expresszióját regulálják. Azokat a géneket, amelyeknek expresszióját fehérje szintézis inhibitorral (pl. cikloheximiddel) nem lehet gátolni, mert a sejtben már meglévő transzkripció faktorok aktiválásával stimulálódnak, korai válasz géneknek nevezzük. A korai válasz gének, vagy elsődleges auxin-válasz gének expressziójához szükséges idő rövid, néhány perctől néhány óráig változik. A korai auxin-válasz gének közé tartoznak az *Aux/IAA*, a *SAUR* (*small auxin upregulated*), a *GH3*, GST-szerű fehérjét kódoló géncsaládok és az etilén

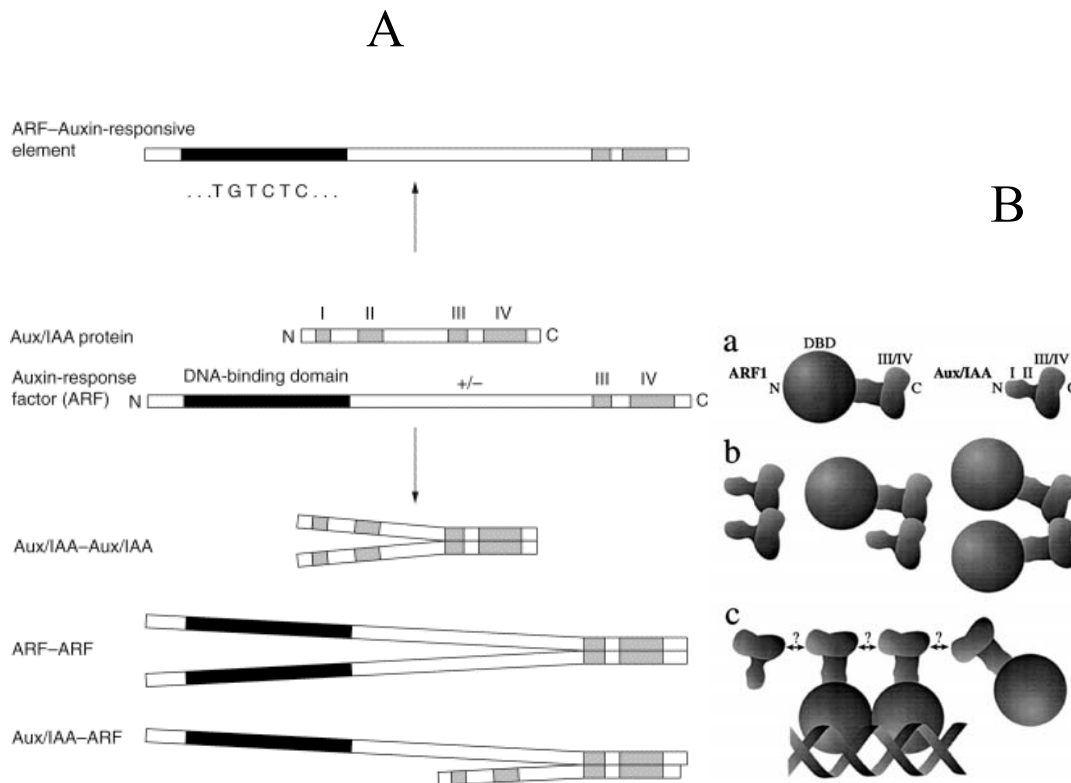
bioszintézis kulcsenzimét, az ACC szintáz kódoló gének (Guilfoyle és mtsai, 1998). Az auxin által szabályozott transzkripciójú mRNS-ek között vannak olyanok, amelyek a növekedési folyamatokat közvetlenül befolyásoló fehérjéket kódolnak, mint pl. az α -expanszin (Cosgrove, 1999). Az elsődleges auxin-válasz gének nagyobb része azonban olyan fehérjét kódol, amely további auxin-válasz gének transzkripcióját szabályozza. Ezeket másodlagos válasz géneknek, vagy késői géneknek nevezzük; termékeik a hormon hosszú távú hatásához szükségesek.

Az auxin-függő génexpressziót szabályozó proteineknek 2 nagy családja került a figyelem középpontjába: az Aux/IAA és az ARF (auxin response factors) fehérjék.

Az Aux/IAA gének rövid életidejű, kis hidrofil nukleáris fehérjéket kódolnak, amelyek transzkripció represszorként működnek. *Arabidopsis*-ban 24 *Aux/IAA* gént azonosítottak (Liscum és Reed, 2001). Auxinra adott válaszukban mind kinetikájukat, koncentrációfüggésüket, mind szervspecifitásukat illetően lehetnek különbségek. Exogén auxin alkalmazása után 5-20 perccel mRNS szintjük megemelkedik. Promóterükben megtalálható specifikus *cisz*-szekvenciák az ún. AuxRE elemek, jellemző szekvenciájuk az 5'-TGTCTC-3'. Ezekhez az elemekhez kapcsolódnak az ARF auxin válasz proteinek, és ezáltal szabályozzák expressziójukat. Az Aux/IAA fehérjék négy konzervált régiót tartalmaznak, jelölésük: I, II, III, és IV (2. 9. ábra A; Guilfoyle, 1998). A C-terminális részükön található domének kölcsönhatásával a fehérjékből homo- ill. heterodimerek keletkezhetnek. A II. domén feltehetően az ubiquitin-protein ligázok kapcsolódásában és a fehérje degradálásában játszik fontos szerepet (Rogg és Bartel, 2001). A III. és IV. domén az ún. dimerizációs domén, amely az Aux/IAA és ARF fehérjék közötti homodimerek és heterodimerek kialakításáért felelős. Valószínű, hogy az Aux/IAA proteinek a transzkripciót indirekt módon, az ARF aktivitásának módosításával szabályozzák.

Az ARF proteinek is transzkripció regulátorok, azonban génexpressziójuk nem érzékeny az auxin koncentrációjára, és többnyire transzkripció aktivátorok. N-terminális részükön nagyobb DNS-kötő domén található, C-terminális végükön az Aux/IAA fehérjékhez hasonló konzervált régiók (III, IV) vannak, amelyek a két fehérjetípus közötti kölcsönhatást biztosítják. Az ARF proteinek az auxin-függő transzkripciót módosíthatják DNS-hez való kapcsolódással, vagy a DNS-hez már kötődött ARF molekulák C-terminálisához asszociálódva, protein-protein kölcsönhatáson keresztül (Ulmasov és mtsai, 1999). Hatásuk egyik lehetséges magyarázata, hogy néhány ARF a DNS-hez dimerként kötődve transzkripciót aktivál, de ha Aux/IAA proteinnel asszociálódik, inaktivál (Rogg és Bartel, 2001). Feltételezik, hogy az auxin az ARF aktivitását befolyásolja sejt- és

szövet-specifikus ARF-ARF és ARF-Aux/IAA dimerizáció segítségével (2.9. ábra B; Guilfoyle és mtsai, 1998; Ulmasov és mtsai, 1999). *Arabidopsis*-ban 24 *Aux/IAA* és 23 *ARF* gént azonosítottak (Reed, 2001); a különböző fehérjék C-terminális része közötti interakció kialakulását figyelembe véve nagy számú kombináció lehetséges (Guilfoyle és mtsai, 1998). A növekedési és fejlődési folyamatokat befolyásoló gének ezért valószínűleg bonyolult transzkripciós reguláció alatt állnak (Rogg és Bartel, 2001).



2.9. ábra: Az ARF, auxin-válasz transzkripciós faktor és az Aux/IAA auxin regulátor fehérjék sematikus rajza (A), ill. -tér szerkezete (B). A fehérje alegységek kapcsolódásával Aux/IAA-Aux/IAA és ARF-ARF homodimerek, ill. Aux/IAA-ARF heterodimerek képződhetnek. Az ARF fehérjék DNS-kötő régiót tartalmaznak, amely az auxin-válasz gének AuxRE elemeihez kapcsolódhatnak. (Guilfoyle, 1998; Guilfoyle és mtsai, 1998)

A csökkent fototrópos választ mutató *Arabidopsis nhp4* mutánst - amely az egyenlőtlen növekedéssel járó folyamatokban, mint pl. a gravitropos válaszban, fitokróm-regulált szár-görbülésben, apikális kampó kialakulásában szintén különbözött a vad típustól - Harper és mtsai (2000) tanulmányozták. A mutációért felelős gén egy transzkripciós aktivátort kódol (ARF7, auxin reguláló faktor), amely az egyenlőtlen növekedés fontos regulátora lehet. A különböző környezeti jelre adott egyenlőtlen

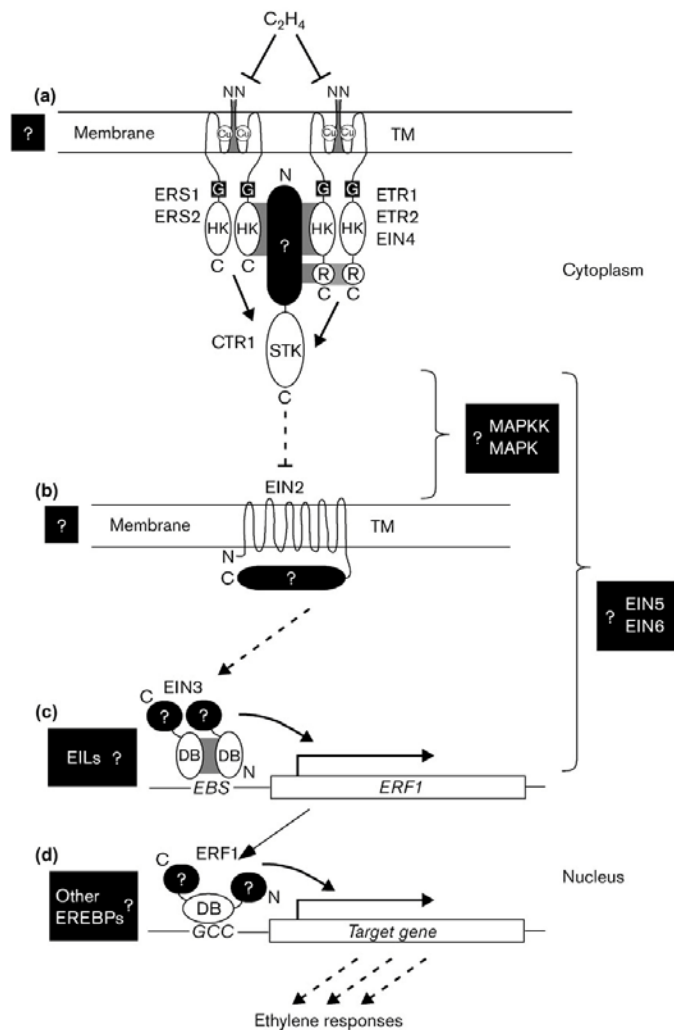
növekedési válasz - amely pl. a hajtás- és gyökértropizmusban, levelek nasztikus mozgásában, apikális kampó szerkezetének megváltozásában nyilvánul meg - auxin- és etilén által szabályozott. Bár külsőleg alkalmazva mindkettő módosítja a választ, genetikai és molekuláris vizsgálatok alapján ezekben a válaszokban az auxin lehet a fő regulátor, míg az etilén módosítja az auxin választ (Romano és mtsai, 1993; Lehman és mtsai, 1996; Chen és mtsai, 1998; Madlung és mtsai, 1999).

Az etilén és auxin bioszintézisének útjaiban ill. a szignálban és a kialakult válaszban sok esetben van kapcsolat vagy átfedés (Harper és mtsai, 2000).

2.7. Az etilén

Az etilén gáz halmazállapotú növényi hormon, amelyet a legtöbb növényi sejt képes szintetizálni. A termelés mértékét több tényező befolyásolja, pl. a fejlődési állapot, más növényi hormonok, elsősorban az auxin szintje (Peck és Kende, 1995), környezeti tényezők, fizikai és kémiai ágenssek. Szintézise az S-adenozil metioninból kiindulva 1-aminociklopropán-1-karbonsavból (ACC) történik az ACC szintáz és ACC oxidáz enzimek közreműködésével. Az etilén jelátviteli útja a növényi hormonok közül a legjobban ismert, modellként használják más növényi szignalizációs utak jellemzésénél is.

Arabidopsis-ban 5 etilén receptor ismert: ETR1, ETR2 (ethylene receptors 1,2), EIN4 (ethylene insensitive 4), ERS1, ERS2 (ethylene response sensors 1,2). Felépítésük és működésük a bakteriális kétkomponensű hisztidin kinázokhoz hasonló. Az etilént a diszulfid kötéssel létrejövő dimer fehérje forma köti az N terminális részen, Cu kofaktor segítségével (2.10. ábra). Az etilén kötődése után a citoplazmatikus oldalon kapcsolódó CTR1 (constitutve triple response) negatív regulátor inaktiválódik. A CTR1 homológiát mutat az emlős Raf szerin/treonin protein kinázokkal, funkcióját tekintve egy növényi MAPKKK (mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz) lehet, és feltételezések szerint a MAPK kaszkád részeként aktiválhat transzkripciós faktorokat és effektor proteineket. A CTR1 inaktiválódása aktiválja az EIN2 transzmembrán fehérjét, ami feltehetőleg egy ioncsatorna protein. A transzport növekedése következtében bejutó ionok elősegítik a sejtmagban az EIN3 transzkripciós faktor defoszforiláció általi aktivációját. Ez a transzkripciós faktor indítja be az ERF1 (ethylene response faktor 1) protein szintézisét, ami az ún. szekunder válaszgének promóterében speciális, etilén válaszáért felelős



2.10. ábra: Az etilén (C_2H_4) jelátviteli mechanizmusának modellje *Arabidopsis*-ban. Magyarázat a szövegben.

Az ábrán feltüntetett fontosabb reguláló elemek: ERS1,2 = etilén-válasz szenzor 1,2; ETR1,2 = etilén receptor 1,2; EIN2-6 etilén-inszenzitív mutánsokkal azonosított fehérjék; CTR1 = konstitutív „hármás válasz”1 fehérje; EIL = EIN3-hoz hasonló fehérje; ERF1 = etilén válasz faktor1; HK = hisztidin kináz; STK = szerin/treonin kináz; MAPK = mitogén-aktiválta protein kináz; DB = DNS- kötődés; EREBP = etilén-válasz transzkripció faktor kötődési helye. (Stepanova és Ecker, 2000)

szekvenciákhoz (ethylene response element, ERE) kötődve etilén-indukálta géneket kapcsol be (Stepanova és Ecker, 2000).

Bár a csírázástól a különböző szervek öregedéséig az etilén a növények növekedésének és fejlődésének számos folyamatát befolyásolja, mégis leggyakrabban „stresszhormon”-ként említik, hiszen képződése megemelkedik sebzés, alacsony hőmérséklet, hőstressz,

szárazság, ársztás, ózon, nehézfémek stb. hatására. Szerepe a stresszfolyamatokban is többretű, transzkripciós szinten indukálhatja a védekezési mechanizmust, ill. aktiválhat reaktív oxigénformák képződéséhez (O_2^- , H_2O_2), és a programozott sejthalál beindulásához vezető folyamatokat is (Stearns és Glick, 2003). Az etilén a stressz ill. betegségek esetén is más hormonokkal és a jelátvitelben szerepet játszó tényezőkkel együttműködve fejti ki hatását.

2.8. A *mas* promóter

A hormonális tényezők kölcsönhatásának vizsgálatára gyakran használt kísérleti objektum az *Agrobacterium tumefaciens*, amelynek T-DNS génjei a növényi genomba beépülve működnek és expressziójukat a növényi transzkripciós faktorok és hormonok szabályozzák. A tumor-indukáló Ti-plazmid tartalmaz többek között tumor-specifikus nitrogéntartalmú vegyületek szintéziséért felelős géneket is. A géntermékek opinok - ide tartozik az oktopin, mannopin, nopalín - amelyeket a baktériumok N-forrásként hasznosítanak. A mannopin szintézisben szerepet játszó 2 enzim génjének expresszióját befolyásoló *mas* promóter egy kétirányú promóter, aktivitását többek között az etilén és az auxin is befolyásolja (Langridge és mtsai, 1989). Guevara-Garcia és mtsai (1998) kimutatták, hogy a *masI'* promóteren belül egy 42 bázispárnyi, *ocs* (oktopin szintáz) -szerű *cisz*-ható elemeket tartalmazó szakasz a felelős a fejlődés-, sebzés- és kémiai anyagok által indukálható expressziós mintázatért. A promóter deléciós analízisével megállapították, hogy a *masI'* gén expresszióját legalább 2 negatív és 1 pozitív szabályozó szekvencia-elem interakciója határozza meg, a gátlás azonban sebzésre és metiljazonát alkalmazásával feloldható (Guevara-Garcia és mtsai, 1999).

Több növényi *GST* promóterében is azonosítottak *ocs*- vagy *ocs*-szerű szekvenciákat, amelyek a biológiailag aktív hormonok és inaktív hormon analógok-kiváltotta aktiválás mellett a stressz-általi indukcióért is felelősnek bizonyultak (Ulmasov és mtsai, 1994; 1995; Zhang és Shing, 1994; Marrs, 1996). Tehát mind a *GST*, mind a *masI'* promóter régiók tartalmaznak *ocs*- vagy *ocs*-szerű *cisz*-reguláló elemeket, amelyek felelősek lehetnek az erős és gyenge auxinok, auxin analógok, etilén vagy sebzés általi indukcióért.

3. Célkitűzés

A hormon autotrófia jelenségével már régóta foglalkoznak, de lényegét, biokémiai és molekuláris hátterét még mindig nem ismerjük. Ezért tűztük ki célul mannopin szintáz *mas1* ' promótert és *GUS* riporter gént tartalmazó transzgénikus *Nicotiana tabacum* SR1 növények protoplasztjaiból auxin heterotróf és autotróf szövetek előállítását és annak megvizsgálását, hogy az IES metabolizmusban és/vagy regulációban bekövetkezett változás hogyan hat egyes auxin- és etilén által indukált folyamatoknak és a stresszválasz kulcsenzimeinek szabályozására.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. - Mi az oka az auxin bioszintézis hiányának ill. jelenlétének a heterotróf és az autotróf kalluszokban?
Az auxin bioszintézis feltételezett regulációs pontjának, az aldehid oxidáz (AO) izoenzim mintázatának és aktivitásának vizsgálata a két vonalban.
2. Előkísérletek során kiderült, hogy a heterotróf és autotróf vonal eltérő rezisztenciát mutat a növekedési paraméterek alapján abiotikus stresszorokra, így magas hőmérséklet, KNO_2 - és sóstressz, valamint supraoptimális exogén auxinok jelenlétében.
- Mi az oka az eltérő abiotikus stresszrezisztenciának?
3. A vizsgált paraméterek közös eleme az oxidatív stressz, a reaktív oxigén gyökök képződése. A reaktív oxigén formák egyik hosszabb élettartamú formája a H_2O_2 .

A sóstressz példáján vizsgáltuk:

- Van-e eltérés a heterotróf és autotróf kalluszok H_2O_2 tartalma között az intenzív növekedési szakaszban sóstressz esetén?

- Hogyan alakul NaCl stressz hatására a H_2O_2 szintézisét katalizáló SOD, és a H_2O_2 koncentrációt csökkentő kataláz, guajakol peroxidáz, indolecetsav peroxidáz enzimek aktivitása az eltérő auxin-igényű heterotróf és az autotróf szövetekben?

- Hogyan aktiválódnak a glutation-homeosztázis kialakításában szerepet játszó enzimek aktivitásai a heterotróf és autotróf kultúrákban?

- Van-e különbség a detoxifikációs folyamatok aktiválódásában a heterotróf és autotróf kalluszok között, különös tekintettel a glutation peroxidáz aktivitásra?

A GSH-PX szerepe a membránintegritás megőrzése; ha a membrán ép, akkor esély van a védekező mechanizmusok beindítására és sikeres működésére.

- Mi az etilén szerepe az abiotikus stresszrezisztencia kialakulásában a heterotróf és autotróf szövetekben?

4. - Mi a H_2O_2 -által indukált oxidatív stressz közvetlen hatása a heterotróf és autotróf kalluszok növekedésére, az extrahálható GST és GSH-PX aktivitásokra?

5. -A heterotróf és autotróf szövettenyészetek érzékenysége hogyan különbözik exogén auxinnal szemben?

- Hogyan kapcsolódik az exogén 2,4-D auxin által indukált etiléntermelés és az auxin/etilén által szabályozott *mas1* ' promóter aktivitás a heterotróf és az autotróf vonalakban?

- Hogyan függ össze az exogén 2,4-D által indukált etiléntermelés és az auxin/etilén által szabályozott GST aktivitás a heterotróf és az autotróf kultúrákban?

6. Mi lehet az oka az auxin-etilén interakció eltérésének a heterotróf és auxin autotróf kalluszokban?

4. Anyag és módszer

4.1. A kísérletekben használt kalluszok előállítása, fenntartása, a kezelések kivitelezése

A kallusz kultúrákat bakteriális *masI'* promótert és *GUS* (β -glukuronidáz) riporter gént tartalmazó *Nicotiana tabacum* SR1 növények protoplasztjaiból indítottuk (Csiszár és mtsai, 2001). A transzformációt az SZBK Növénybiológiai Intézetében I. Stefanov végezte (I. Stefanov, 1992). Auxin heterotróf és autotróf kultúrák előállítása céljából az egy sejtből származó 2-3 hetes mikrokolóniákat 2 μ M kinetint tartalmazó, 17,1 μ M IES és 0,45 μ M 2,4-D tartalmú RM táptalajra (= Revised medium, Murashige és Skoog, 1962), ill. auxin nélküli táptalajra helyeztük. A kalluszokat elkülönítve ültettük át, és 3 passzálás után választottuk ki az auxin-mentes táplajon jól növény, magas GUS aktivitással rendelkező kalluszokat a további fenntartásra. Kísérleteinket egy kolóniából származó szövetekkel végeztük. Az auxin heterotróf kultúrákat auxin- és citokinin tartalmú táptalajon tartottuk fenn, míg az autotróf szövetek RM táptalaja a növényi növekedésszabályozók közül csak kinetint tartalmazott. A kultúrákat 25 °C-on, 8,4 Watt/m² fehér fluoreszcens fény alatt (Tungsram F29 fénycsővek), növekedési kamrában tartottuk, kísérlettől függően 2-3 hétig.

A növekedési paraméterek meghatározásánál megmértük a kiültetett inokulum átlagos tömegét (20 - 30 mg), egy Petri csészébe 25 kallusz izolátumot helyeztünk. Abiotikus stressz kezelést Conviron növénynevelő kamrában beállított 15-35 °C alkalmazásával végeztünk, ill. kiegészítettük a táptalajokat 50-300 mM NaCl-dal vagy 0,1-5 mM KNO₂-tel. Az exogén H₂O₂ hatásának vizsgálatokor sterilen szűrve adtuk a megfelelő mennyiségű H₂O₂-ot a táptalajhoz, és szilárdulás után azonnal ráültettük a kalluszokat (Csiszár és mtsai, 2003). Az exogén auxinra adott válasz tanulmányozásakor kísérleteinkben az auxin koncentrációja 17,1-171,4 μ M IES (természetes auxin) vagy 0,5-5 μ M 2,4-D (szintetikus auxin) között volt (1-10-szer nagyobb, mint a nevelésre használt táptalajban). Az etilén receptor gátló 2,5-norbornadién (NBD) hatásának vizsgálatokor a kalluszokat a keletkezett etilén meghatározásához használt 100 ml-es tenyészedényekben neveltük steril körülmények között. Az edényeket a fejlődő etilén eltávolításának megakadályozása céljából a kezelés kezdetekor légmentesen záró steril szűrősapkával

láttuk el, amelyen keresztül 2 µl NBD-t párologtattunk el, a lombikok falára injektálva. Ez megfelel 4500 µl gáz halmazállapotú NBD/liter levegő mennyiségnek (Curtis, 1987).

4.2. Aldehyd oxidáz aktivitásának vizsgálata natív gélben

Az aldehid oxidázok különböző aldehidek és N-tartalmú heterociklusos vegyületek oxidációját katalizálják O₂ vagy bizonyos redoxfestékek jelenlétében. Tartalmaznak molibdopterin- és FAD kofaktort, nem-hem vas prosztetikus csoportot. Aktivitását poliakrilamid gélben vizsgáltuk natív elektroforézis utáni, specifikus reakcióval végzett festést alkalmazva.

2 g kalluszt jégen homogenizáltunk 2 ml extrakciós puffer hozzáadásával. A 250 mM Tris-HCl puffer (pH 7,5) tartalmazott 1 mM EDTA-t, 1 mM DTT-t (ditiotritol), 10 mM GSH-t (redukált glutation), 30 µM FAD-ot (flavin-adenin-dinukleotid, oxidált forma), 5 mM L-ciszteint, 5 mM Na₂MoO₄-ot, 100 mM PMSF-et (fenil-metil-szulfonil-fluorid) és 10 mM antipain-t. Eppendorf centrifugában 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, a felülúszót használtuk enzimkivonatként. Meghatároztuk a kivonatok fehérjetartalmát és 100-100 µg fehérjét vittünk fel mintánként, elektroforézis előtt 1:10 térfogatarányban szacharózos festékoldatot (50 % szacharóz, 0,1 % brómfenolkék) adtunk hozzá.

A poliakrilamid gélelektroforézist 7,5 % akrilamidot tartalmazó, SDS (nátrium-dodecil- szulfát) nélküli gélben végeztük (Laemmli, 1970). A futtatást 4 °C-on kiviteleztük Hoefer SE 600 (Amersham Pharmacia) készülékkel. Elektroforézis után a gél 0,2 M, pH = 8,0-as foszfátpufferbe helyeztük 10 percre, majd átraktuk 0,1 mM PMS (fenazin metosulfát), 1 mM MTT (3(4,5-dimetiltiazolil-2)2,5-difenil-tetrazólium-bromid) és 1 mM indol-3-acetaldehid (IAAId) vagy indol-3-aldehyd (IAId) tartalmú, 0,1 M Tris-HCl, pH= 8,0-as pufferbe. A géleket 25 °C-on 1-3 óráig inkubáltuk enyhe rázatás közben. Az enzim aktivitásának kimutatása az MTT redukcióján alapul, amelynek következtében formazán sávok figyelhetők meg (Sagi és mtsai, 1998).

4.3. IES oxidáz aktivitásának mérése

Az enzim aktivitását a korábban közölt acetonos csapadékképzés módszere alapján határoztuk meg (Szabó és mtsai, 1981). 2 g kalluszt dörzsöltünk el 4 ml 0,1 M-os foszfát pufferrel (pH 6,0), gézen átszűrtük majd 20 percig centrifugáltuk 4 °C-on, 15000 g-n. A

felülúszóhoz 10-10 ml hideg acetont adtunk és hűtőben tartottuk 12 órán keresztül. Másnap 4 °C-on, 15000 g-n 10 percig centrifugáltuk, majd az acetonos csapadékot 15 ml foszfát pufferben (0,1 M, pH 6,0) oldottuk. A reakció elegy 10 ml-ébe 0,1 M-os (pH 6,1) foszfát-pufferbe bemértünk 2 ml 1 mM-os IES-t, 1 ml 1 mM-os MnCl_2 -t, 0,1 ml 1 mM-os H_2O_2 -t és 2 ml enzimkivonatot. 30 percig inkubáltuk 25 °C-on, majd az el nem bontott IES mennyiségét a Gordon-Weber reagenssel (10 mM FeCl_3 40 %-os perklórsavban oldva) keletkező szín intenzitásának 530 nm-nél, IES-t nem tartalmazó mintával szemben történő mérésével határoztuk meg. Kalibrációs görbét készítettünk, a nem-specifikus IES-csökkenést forralt enzim kivonattal összeállított minta felhasználásával vettük figyelembe. Az elbontott IES mennyiségét μg -ban megadva 1 mg fehérjére, 1 órára vonatkoztattuk az enzim aktivitásának kifejezésére.

4.4. Kationok mennyiségének meghatározása

Két hetes kallusz szöveteket 72 °C-on szárítottunk 72 óráig. A Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} - és össz Fe- (Fe^{2+} és Fe^{3+}) tartalmat ismert mennyiségű (kb.100 mg) száraz anyag savas feltárása után határoztuk meg. A mintákat 5 ml koncentrált salétromsavban tartottuk 12 óráig, majd cc. HNO_3 és 30% H_2O_2 5:4 térfogatarányú elegyében 200 °C-ra hevítve újabb 3 óráig. Az ionok koncentrációját megfelelő hígítás után Hitachi Z-8200 Zeeman polarizált atomabszorpciós spektrofotométerrel mértük.

4.5. Antioxidáns enzimek aktivitásának mérésénél alkalmazott módszerek

A két hetes kalluszokat 3 mM EDTA-t, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF) és 1 % polivinil-polipirrolidont (PVPP) tartalmazó 100 mM-os foszfát pufferben (pH=7,0) jégen homogenizáltuk. A homogenizátumot gézen átszűrtük, majd centrifugáltuk 4 °C-on 15 percig, 15000 g-n. A felülúszót használtuk az enzimek aktivitásának meghatározásához. A kivonatok összfehérje tartalmát Bradford (1976) módszerével mértük meg.

A guajakol peroxidáz aktivitását meghatároztuk oldható- és sejtfalhoz kötött frakcióban is. Ehhez a szöveteket 1 mM Tris-MES pufferrel homogenizáltuk 2 % PVPP és 0,2 % Triton X-100 detergens hozzáadásával. 18000 g-n, 20 percig tartó centrifugálás után még kétszer ismételtük a kivonást az üledékkel, a felülúszókat összeöntve kaptuk az oldható peroxidázokat tartalmazó frakciót. A sejtfalhoz ionosan kötött peroxidázokat

ugyancsak háromszori ismétléssel extraháltuk az üledékből 1 M KCl-ot tartalmazó Tris-MES pufferrel, 2-2 ml pufferben 1 óráig 4 °C-on tartva biztosítottuk a peroxidázok oldását. Az üledéket az utolsó centrifugálás után 0,1 M-os Tris-MES pufferben oldott (pH=5,8) peroxidáz mentes celluláz (Onozuka R-10, Serva, 2%) és pektináz enzimek hatásának tettük ki 8 óra időtartamig. Az így kinyert, szűrt és lecentrifugált frakció tartalmazta a sejtfalhoz kovalensen kötött peroxidázokat (Hendricks és mtsai, 1985).

A szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1) aktivitásának meghatározásakor felhasználtuk, hogy az enzim gátolja a formazánnak a nitro blue tetrazolium-ból (NBT) történő képződését fényben, riboflavin jelenlétében (Dhindsa és mtsai, 1981). A reakcióelegy 3 ml-e tartalmazott 50 mM-os, pH 7,0-es, 13 mM metioninnal és 0,1 mM EDTA-val kiegészített foszfát pufferben 100 µl 5 mM NBT-t, 100 µl 0,2 mM riboflavint és 100 µl enzimkivonatot. A mintákat intenzíven megvilágított helyen 15 percig tartottuk, majd a keletkezett formazán fényelnyelését 560 nm-en mértük. Referenciaként sötétben tartott sorozatot állítottunk be, ill. enzim nélküli oldatban is mértük a reakciót. Azt az enzimmennyiséget, ami az NBT redukciójának 50 %-os gátlását eredményezi fényben, egy enzimegységnek nevezzük (U). Az enzim aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztatva specifikus aktivitásban kifejezve adtuk meg (U/mg fehérje).

A kataláz (EC 1.11.1.6) aktivitásának meghatározása a H₂O₂ kimutatásán alapul, amelynek abszorpció csökkenését 240 nm-en mértük (Upadhyaya és mtsai, 1985). A reakcióelegy összeállításánál 2750 µl 50 mM-os, pH 7,0-es foszfát pufferhez adtunk 150 µl enzimkivonatot és 100 µl 1%-os H₂O₂-t. Az extinkcióváltozást fél perc után kezdtük mérni szobahőmérsékleten kvarcküvetében, foszfátpufferrel szemben 2 percig. Kiszámoltuk azt az enzimmennyiséget, amely katalizálja 1 µmól H₂O₂ elbomlását 1 perc alatt ($\epsilon_{240}=43,6 \text{ mmól}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $U = \text{elbontott H}_2\text{O}_2 \text{ µmól/perc}$, specifikus aktivitás = U/mg fehérje).

A guajakol peroxidáz (EC 1.11.1.7) aktivitást a guajakol oxidációjának 470 nm-en mért abszorpció növekedésével határoztuk meg (Upadhyaya és mtsai, 1985). A 3 ml reakcióelegybe 50 mM, pH 7,0-es foszfát pufferhez adtunk 750 µl 1 %-os guajakolt, 10-50 µl fehérjekivonatot és 300 µl 1 %-os H₂O₂-t. Az 1. és 2. perc közötti extinkcióváltozásból kiszámoltuk azt az enzimmennyiséget, amely katalizálja 1 µmól tetraguajakol képződését ($\epsilon_{470}=26,6 \text{ mmól}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $U = \text{keletkezett tetraguajakol /perc}$).

A glutation reduktáz (EC 1.6.4.2) működését 412 nm-en történő abszorpcióváltozás méréssel követhetjük nyomon, amikor a glutation diszulfidból keletkező GSH a DTNB-t /5,5'-ditio-bis(2-nitro-benzoészav), Ellman reagens/ redukálja. A reakcióelegy 0,1 mM NADPH-t, 10 mM GSSG-t, 0,75 mM DTNB-t tartalmazott 50 mM-os, pH 7,0-es

foszfátpufferben (Smith és mtsai, 1988). A mintákat fél perc után GSSG-t nem tartalmazó kontrollal szemben mértük 2 percig. Meghatároztuk az egy perc alatt redukálódott DTNB mennyiségét és 1 mg fehérjére vonatkoztatva specifikus aktivitás értékeket számoltunk ($\epsilon_{412}=13,6 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, specifikus aktivitás = redukált DTNB $\mu\text{mol}/\text{perc}/\text{mg}$ fehérje).

A glutation S-transzferáz (EC 2.5.1.18) aktivitást Habig és mtsai módszere alapján határoztuk meg (Habig és mtsai, 1974), 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mesterséges szubsztrát felhasználásával. 2 ml reakcióelegy tartalmazott 0,1 M pH 6,5-ös foszfát pufferben 200 μl enzim kivonatot, 3 μmol GSH-t, 1 μmol CDBN-t. A reakciót a CDBN hozzáadásával indítottuk és az extinkció változását 340 nm-en 3 percig mértük. $\epsilon_{340}=9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, U = az egy perc alatt keletkezett konjugált termék mennyisége μmol -ban megadva. Az enzim működését specifikus aktivitás egységben fejeztük ki (U/mg fehérje).

A glutation peroxidáz (EC 1.11.1.9) aktivitást Awasthi és mtsai (1975) módszere szerint, Gronwald és Plaisance (1998) módosítása alapján határoztuk meg kumén hidroperoxid (CHP) szubsztráttal. A kimutatási reakció alapja a szerves hidroperoxidok átalakítása közben keletkező GSSG visszaredukálásához használt NADPH mennyiségének mérése. A reakcióelegy 2 ml végtérfogatban tartalmazott 0,1 M pH 7,0-es foszfát pufferben 0,2 mM NADPH-t, 4 mM GSH-t, 0,05 U búza extraktumból tisztított GR enzimet (Type II, Sigma), 200 μl enzimkivonatot és 0,1 mM CHP-t. A reakciót CHP hozzáadásával indítottuk, 1 perc után mértük az extinkció változását 340 nm-en GSH-t és NADPH-t nem tartalmazó mintával szemben 2 percig. A nem-specifikus NADPH-oxidáció figyelembe vételéhez az extinkció különbséget meghatároztuk CHP nélkül is. $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, az egy perc alatt fogyott NADPH-t μmol -ban megadva fejeztük ki az U enzimegységet, a specifikus aktivitást 1 mg fehérjére vonatkoztatva adtuk meg.

4.6. H_2O_2 és tiobarbiturát-reaktív anyagok (malondialdehid) koncentrációjának mérése

A szövetek H_2O_2 tartalmát Asada és mtsai (1974) fluorometriás módszere alapján határoztuk meg. 0,5 g kalluszt folyékony N_2 -ben lefagyasztottunk, majd 0,5 ml 0,1M-os, pH = 7,0-es foszfátpufferrel homogenizáltuk. Centrifugálás után 25 μl kivonatot adtunk a reakcióelegybe, amely 0,5 mM homovanillinsavat és 0,25 U torma peroxidázt tartalmazott 3 ml végtérfogatban. A kivonatok fluoreszcenciáját 295 nm excitációs és 415 nm emissziós hullámhosszak alkalmazásával mértük meg. Kalibrációt 10 μM H_2O_2 törzsoldat megfelelő hígításával készítettünk.

A lipidek oxidatív-peroxidatív bomlástermékeit, amelyek közül legjelentősebb a malondialdehid (MDA), tiobarbitúrsavval való reakciójuk alapján lehet meghatározni (Ederli és mtsai, 1997). Megjegyezzük, hogy a tiobarbitúrsav egyéb - stresszhatások következtében keletkező - reaktív aldehid kimutatására is alkalmas, ezért a malondialdehid tényleges szintje kisebb lehet a kapott értéknél. 0,5 g kalluszt 5 ml 0,1 %-os triklórecetsavval (TCA) homogenizáltunk, a további lipidperoxidáció megakadályozása érdekében 500 µl 4 %-os butilhidroxi-toluént (BHT) adtunk az extraktumhoz. 15000 g-vel centrifugáltuk 4 °C-on 25 percig, majd a felülúszó 1 ml-ét összekevertük 4 ml, 20 %-os TCA-ban oldott, 0,5 %-os tiobarbitúrsavval és 100°C-on 30 percig inkubáltuk. Az abszorbanciát 532 nm-nél mértük, amit a 600 nm-nél mért nem-specifikus értékkel korrigáltunk. Az MDA tartalmat a $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens felhasználásával számoltuk.

4.7. Etiléntermelés mérése

A különböző korú kalluszok etiléntermelését a Tari és Mihalik (1998) által közölt módszer alapján mértük. 0,5 g kallusz szövetet légmentesen zárt csőben tartottunk 1 óráig, majd a gáztérből 2 ml-t injektáltunk a gázkromatográfba (Hewlett-Packard 5890 Series II), amely lángionizációs detektorral volt ellátva.

Az auxinok etiléntermelésre kifejtett hatásának vizsgálatakor a kalluszokat 0,5-5 µM 2,4-D-vel kiegészített táptalajon, üveg tenyészedényekben neveltük. Adott idő után (0, 2, 11, vagy 13 nap) az edényeket fél óráig steril fülke alatt levegőztettük, majd légmentesen lezártuk és 25 °C-on tartottuk. A keletkezett etilén mennyiségét 24 órás inkubálás után határoztuk meg.

Az etilén receptor gátló 2,5-norbornadiénnel (NBD) végzett kezelés esetén az etiléntermelés meghatározása után a kalluszok GST és GUS aktivitását mértük.

4.8. β -glukuronidáz aktivitás meghatározása

A GUS aktivitást Jefferson (1987) módszere alapján határoztuk meg (Szabó és mtsai, 1995). A kalluszokat Eppendorf centrifugacsőben homogenizáltuk kvarchomokkal, 200 µl jéghideg extrakciós pufferrel (50 mM, pH 7,0-es foszfát pufferben 10 µM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100). 5 perc centrifugálás után 25 µl mintát vettünk és 75 µl,

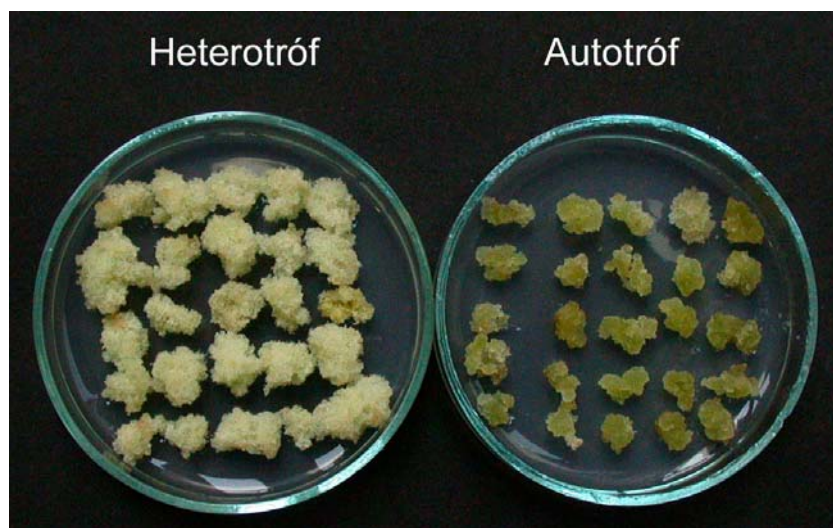
1 mM 4-metilumbelliferil- β -D-glukuroniddal kiegészített extrakciós puffer hozzáadásával inkubáltuk 0 vagy 30 percig 37 °C-on. A reakciót 100 μ l 2 M-os Na₂CO₃ hozzáadásával állítottuk le. A keletkező metilumbelliferon (MU) fluoreszcenciáját határoztuk meg, az excitációs hullámhossz 365 nm, az emissziós hullámhossz 455 nm volt. A képződött MU mennyiségét nmól-ban megadva, 1 mg fehérjére, 1 órára vonatkoztatva fejeztük ki a GUS aktivitást.

A kísérleteket legalább 3 független ismétlésben kiviteleztük, ezekből átlagot és szórást számoltunk. A glutation peroxidáz aktivitás és az etilénfejlődés meghatározásánál egy reprezentatív kísérlet min. 4 mérésének adataiból számolt átlagot és szórást ábrázoltuk.

5. Eredmények és értékelésük

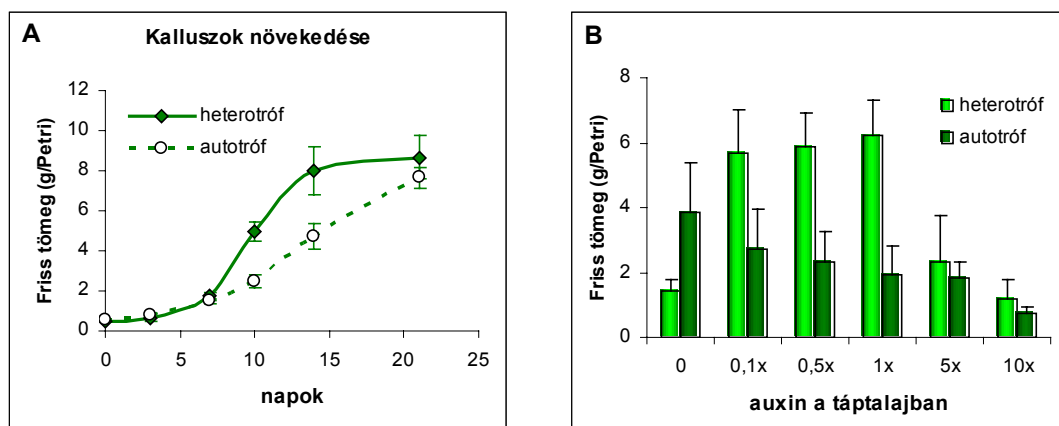
5.1. Az auxin autotróf és heterotróf kalluszok növekedése és auxin metabolizmusuk

Az auxin autotróf és heterotróf kallusz vonalak növekedési rátáját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az autoróf szövetek auxin nélküli táptalajon citokinin jelenlétében nevelve lassabban nőttek, mint a heterotróf kalluszok a 17 μM IES és 0,5 μM 2,4-D auxinokkal kiegészített RM táptalajon (5.1. ábra). A legnagyobb különbség 10-14 napos korban, az intenzív növekedés időszakában mutatkozott (5.2. ábra A).



5.1. ábra: Két hetes auxin heterotróf dohány kalluszok kinetin- és auxintartalmú RM táptalajon, ill. auxin autotróf kalluszok auxint nem tartalmazó táptalajon nevelve.

Ha a kalluszokat olyan táptalajra helyeztük, amely az általánosan használt auxin mennyiségnek 0,1–10-szeresét tartalmazta, a heterotróf kalluszok az alacsonyabb auxin koncentrációk jelenlétében fenntartották növekedésüket, de auxin nélkül csak rövid ideig tudtak osztódni, később növekedésük megszűnt. Az 5- és 10-szeres auxin koncentrációk szupraoptimálisnak bizonyultak, a növekedést gátolták. A habituált sejtek növekedését már a legkisebb auxin koncentráció alkalmazása is csökkentette, számukra az auxin nélküli táptalaj az optimális (5.2. ábra B). Az idő függvényében vizsgálva a növekedést megállá-



5.2. ábra: Auxin autotróf és heterotróf dohány kalluszok növekedése.

A: friss tömeg gyarapodás 17 μM IES-t és 0,5 μM 2,4-D-t tartalmazó RM táptalajon (heterotróf kalluszok), ill. auxin nélkül (autotróf kalluszok esetében).

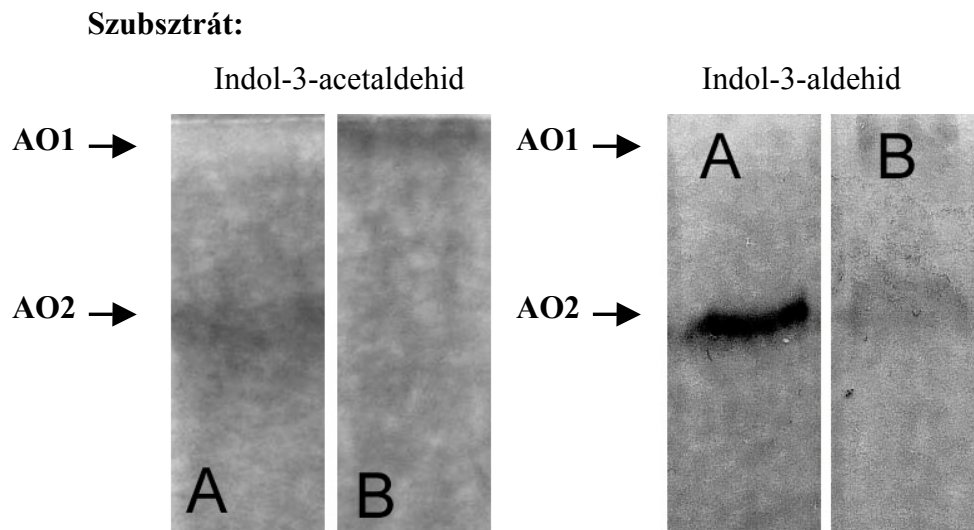
B: a kultúrák növekedése 0,1-10-szeres mennyiségű auxin jelenlétében 2 héttel a táptalajra ültetés után. A heterotróf kalluszok fenntartásához használt táptalaj auxintartalma: 17 μM IES és 0,5 μM 2,4-D (1x).

píttottuk, hogy az auxin-igényes szövetekben a növekedés exponenciális, majd lineáris fázisa korábban következik be; az autotróf szövetnél a növekedési görbe ellaposodó és a 3. hét végére közelíti meg tömegük átlaga a heterotróf vonalét.

A heterotróf kalluszsejtek növekedését az exogén auxinok serkentik, illetve növekedésükhöz exogén auxint igényelnek, hiszen a sejtek auxin bioszintézisére nem képesek. Az autotróf kallusz indolecetsav tartalma saját bioszintetikus folyamatainak eredménye. Az auxin bioszintézis első enzimatis reakcióját, a triptofán aminoszferáz által katalizált reakciót széles szubsztrátspecifitású enzimek is katalizálják, és a triptofán mennyisége sem limitáló a növényi szövetekben (2.5. ábra; Wightman és Forest, 1978; Koshiba és mtsai, 1993). A reakcióban keletkező indol-3-piroszölösav bomlékony vegyület, amely *in vitro* is gyorsan dekarboxilációt szenved és indol-3-acetaldehiddé (IAAld) alakul. Az indol-3-acetaldehid $\rightarrow$ indol-3-ecetsav átalakulást az aldehyd oxidáz (AO) enzim katalizálja (Seo és mtsai, 1998), amelynek aktivitását poliakrilamid gélelektroforézissel, natív gélben történő elválasztás után, indol-3-acetaldehid (IAAld) és indol-3-aldehyd (IAld) szubsztrátokkal határoztuk meg.

Az IES bioszintézis meglétét IAAld szubsztrát alkalmazásával mutattuk ki. Mind a heterotróf, mind az autotróf vonalban találtunk AO aktivitást, azonban az izoenzim

Aldehyd oxidáz aktivitás



5.3. ábra: Két hetes dohány kallusz szövetek aldehid oxidáz aktivitása IAAld és IAld szubsztrát jelenlétében. A heterotróf kalluszokat (**A**) 17 μ M IES-t és 0,5 μ M 2,4-D-t tartalmazó táptalajon, az autotróf kalluszokat (**B**) exogén auxin nélküli táptalajon neveltük.

mintázat különbözött: az auxin autotrófokban új izoenzim aktivitása volt kimutatható (5.3. ábra). Az indol-acetaldehydet szubsztrátként elfogadó AO aktivitás azt mutatja, hogy az IES bioszintézisét a heterotróf sejtekben nem ennek az enzimnek a hiánya limitálja.

Az aldehid oxidázok is széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek. Koshiba és mtsai (1996) kukorica koleoptil AO enzimről kimutatták, hogy elfogadja az IAAld-et és az IAld-et is szubsztrátként, így feltételezhetően szerepe van az IES bioszintézisben és/vagy lebontásban is. *Arabidopsis sur1* (*superroot1*) auxin túltermelő mutánsban kimutatták, hogy a három aldehid oxidáz izoenzim közül (AO1; AO2; AO3) a legkisebb mobilitással rendelkező AO1 aktivitása jóval kisebb volt a vad típusban, mint az auxin túltermelő *sur1* mutánsban. A legnagyobb mobilitású AO3 aktivitása a csírázást követő néhány napban a vad típusú növényben nagyobb volt, később kiegyenlítődött a két vonalban. Az AO1 ötször nagyobb aktivitást mutatott IAAld szubsztráttal a *sur1* mutánsban, mint a kontrollban, így a szerzők feltételezik részvételét az IES bioszintézisben (Seo és mtsai, 1998).

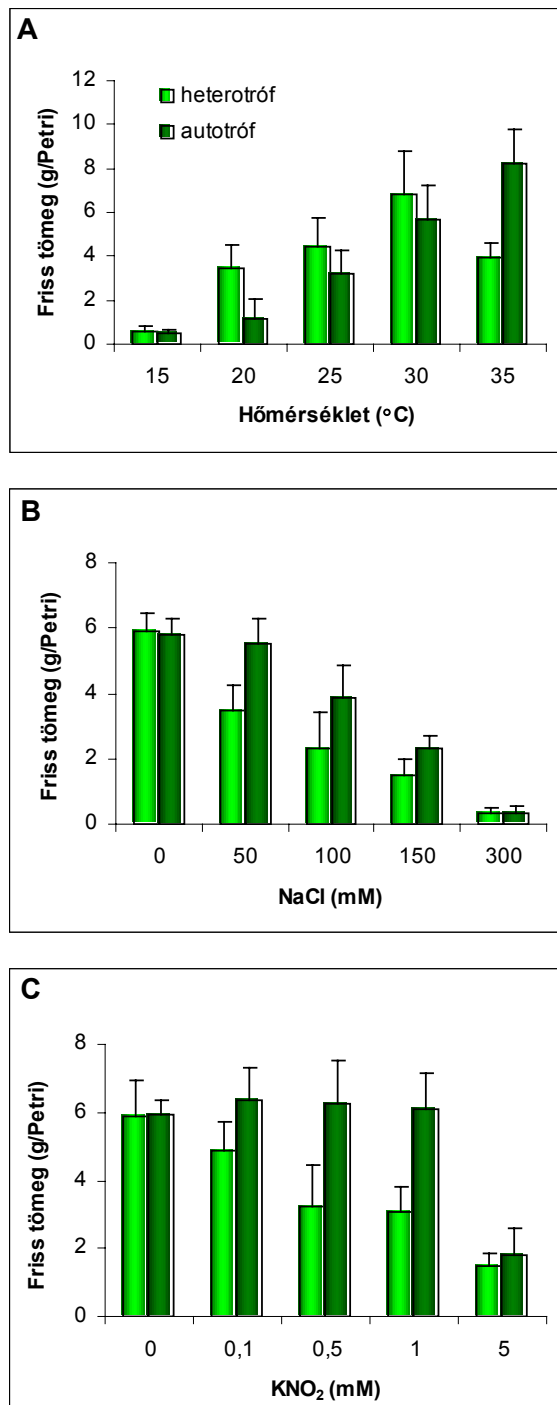
Az új AO izoenzim (AO1) megjelenése a dohány autotróf szövetekben jelezheti az IES bioszintézis aktiválódását egy új, eltérő szabályozottságú enzimfehérje révén. IAld szubsztrát alkalmazásával a két vonalban azonos izoenzimeket tudtunk kimutatni, az

enzimek aktivitása szintén a hormon heterotróf szövetekben volt magasabb (5.3. ábra), itt a táptalaj exogén auxint tartalmazott. Az AO2 izoenzim szerepet játszhat az IES lebontásában, amikor az ecetsav-oldallánc peroxidázok által iniciált dekarboxilációja után keletkező indol-aldehidet indol-karbonsavvá oxidálja (2.6. ábra). Ez az aktivitás a peroxidázok által megkezdett, hatékony inaktiválás befejező lépése, tehát nem határozza meg közvetlenül az endogén IES szinteket.

Az auxin autotróf és heterotróf kalluszok növekedése az 5.2. A. ábra alapján csak kinetikájában tér el, ami azt mutatja, hogy az autotróf kallusz növekedését az endogén IES szint nem limitálja. Ez összhangban van Köves és Szabó eredményeivel, akik az IES-t spektrofotometriás módszerrel meghatározva azt tapasztalták, hogy az auxin autotróf szövetek IES tartalma kinetikájában eltér a heterotrófokétól, egy hét után alacsonyabb, két- és három hét után magasabb IES koncentrációt mutattak ki a habituált szövetekben. A különbség az endogén IES koncentrációban nem olyan mértékű, ami a külső auxinra adott eltérő növekedési választ magyarázná (Köves és Szabó, 1987).

5.2. A kalluszok növekedése különböző hőmérsékleten ill. abiotikus stresszorok jelenlétében

A kalluszok növekedését megvizsgáltuk 15-35 °C közötti hőmérsékleten tartva a kultúrákat a táptalajok hormonösszetételének változatlanul hagyásával. A heterotróf kalluszok növekedése a hőmérséklet függvényében 30 °C-ig nőtt, afölött már gátlódott. A növekedés lassítása kedvezőtlen körülmények között a növények egyik adaptációs stratégiája, amelynek szerepe lehet többek között az energia megőrzése a védekező mechanizmusok számára (May és mtsai, 1998). Az auxin autotróf szövetek növekedési rátája azonban még 35 °C-on is emelkedő tendenciát mutatott, a kalluszok friss tömege 2 hét után ezen a hőmérsékleten meghaladta a heterotrófokét (5.4. ábra A). Ez arra utal, hogy a habituált szöveteknek nemcsak a hormon metabolizmusuk változott meg, hanem stressztoleranciájuk is. 50-300 mM NaCl- és 0,1-5 mM KNO₂ által előidézett stressz hatására a kalluszok friss tömegét mérve megállapíthattuk, hogy az auxin autotróf szövetek a növekedési rátájukat magasabb sókoncentrációk alkalmazásakor is fenn tudták tartani. Ez az autotróf vonalak nagyobb abiotikus stressztoleranciáját jelzi (5.4. ábra B,C).



5.4. ábra: Két hetes auxin heterotróf és autotróf kalluszok növekedése **A:** különböző hőmérsékleten, **B:** NaCl jelenlétében, **C:** KNO₂ alkalmazása esetén.

5.3. Sóstressz hatásának tanulmányozása heterotróf és autotróf sejtvonalakban

5.3.1. 100 mM NaCl hatása a kationok mennyiségére

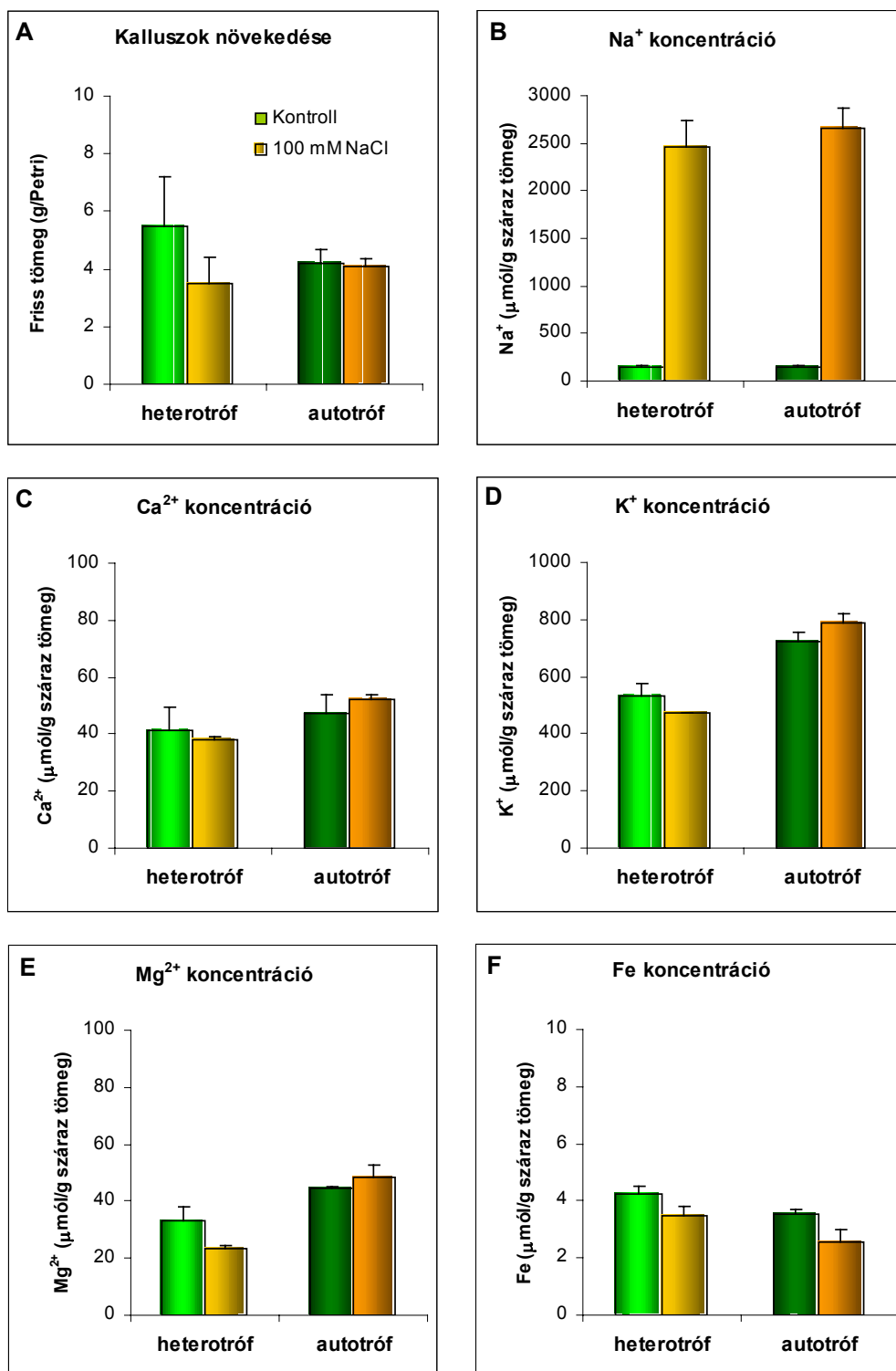
A továbbiakban a heterotróf és az auxin autotróf vonalak abiotikus stresszorokkal szemben mutatott eltérő érzékenységet a 100 mM NaCl kezeléssel kiváltott sóstressz esetében tanulmányoztuk. Ez a koncentráció a növekedés alapján a heterotrófnál jelentősebb stresszt okozott, mint az autotróf vonalnál (5.4. ábra B, 5.5. ábra A). A méréseket kéthetes korban, az intenzív növekedési szakaszban végeztük.

A Na^+ koncentráció atomabszorpciós meghatározásával megállapítottuk, hogy az endogén Na^+ tartalom a 100 mM NaCl-dal kiegészített táptalajokon nevelt szövetekben 2 hét után hasonló mértékben, közel 10-szeresére nőtt. A habituált kalluszok Na^+ felvétele nem gátolt, hiszen a Na^+ koncentráció a sókezelt autotróf vonalban csaknem azonos a heterotróféval (5.5. ábra B).

Ezek az adatok egyben arra is utalnak, hogy az autotróf sejtek sórezisztenciája nem a Na-ionok Na^+/H^+ antiporter által történő aktív kipumpálásán alapul. A sejteknek tehát a Na^+ felvétele után aktiválnia kell azokat a mechanizmusokat, amelyek a nagyobb citoplazmatikus Na^+ koncentráció átmeneti tolerálását jelentik, majd lehetővé teszik az ion vakuólumba irányuló transzportját (Zhu, 2001).

Az egyéb kationok közül a Ca^{2+} , K^+ és Mg^{2+} nagyobb koncentrációban volt jelen az autotróf kalluszokban, mint a heterotrófokban. A K^+ és Mg^{2+} növényi sejtek turgorának, ionfelvételi folyamatainak és különböző enzimek működésének fenntartásához szükséges, míg a Ca^{2+} számos enzim aktivitásának befolyásolása mellett a jelátvitelben másodlagos „messenger” funkcióval is rendelkezik. 100 mM NaCl hatására ezeknek az ionoknak a koncentrációja a heterotróf szövetekben csökkent, míg az auxin autotrófokban tovább emelkedett (5.5. ábra C,D,E).

Az össz vas - Fe^{2+} és Fe^{3+} - koncentrációját atomabszorpciós méréssel meghatározva az autotróf kalluszokban kevesebb vasat lehetett kimutatni. A Fe^{2+} a Fenton reakcióban részt vesz a reaktív $\text{OH}\cdot$ gyökök generálásában és az oxidatív stressz folyamatokban is; kísérleteinkben a sókezelés mindkét kultúrában további Fe-tartalom csökkenést eredményezett (5.5. ábra F), ennek mértékéből arra következtethetünk, hogy ez hozzájárulhat az autotróf sejtek oxidatív stresszel szemben mutatott rezisztenciájának növekedéséhez. Az adatok azt jelzik, hogy az autotróf kalluszokban a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodás során aktiválódtak ionháztartás módosulását



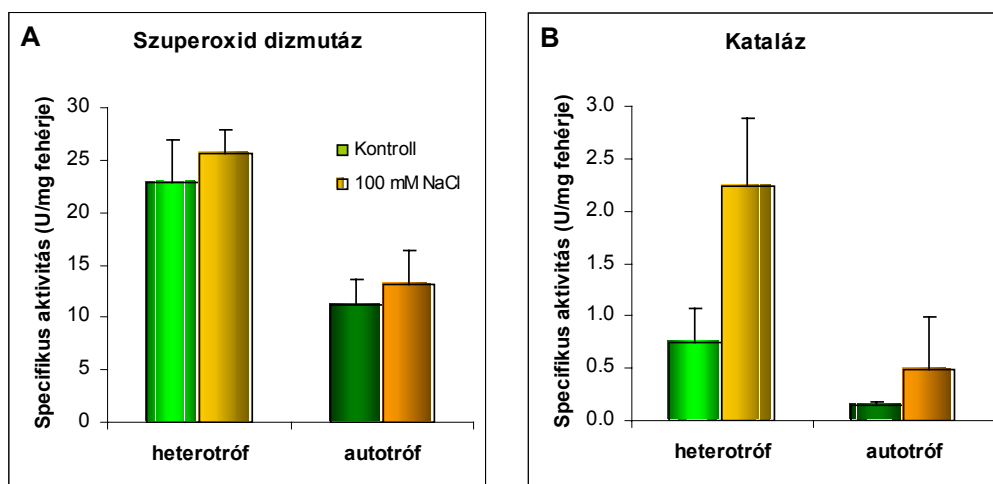
5.5. ábra: 100 mM NaCl hatása 2 hetes dohány kalluszok növekedésére (A), Na⁺ koncentrációjára (B), Ca²⁺-, K⁺-, Mg²⁺- és Fe^{2+/3+}-tartalmára (C-F).

eredményező folyamatok, amelyek segítik a sejtek növekedésének fenntartását stressz esetén.

5.3.2. Sóstressz hatása az antioxidáns enzimek aktivitására, a H_2O_2 tartalomra és az etiléntermelésre

Az oxidatív stressz a legtöbb abiotikus stresszor hatására indukálódik, így a növények sóstresszre adott válaszreakcióinak is lényeges elemét jelentik az antioxidáns védőmechanizmusok.

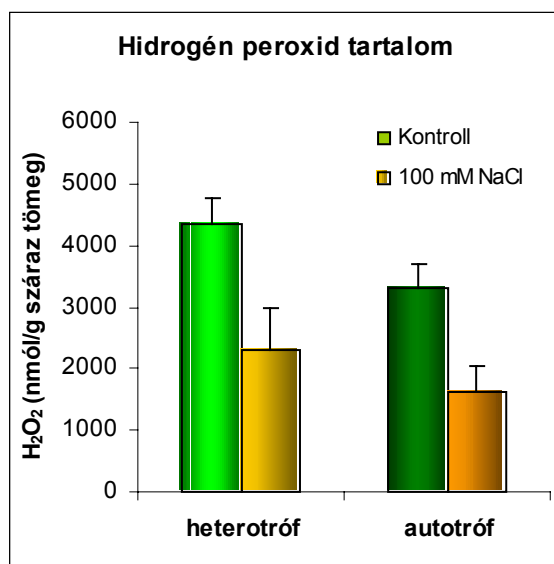
A H_2O_2 -ot termelő SOD aktivitását tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy az autotróf kalluszokban az enzim aktivitása kb. fele volt a heterotrófban mértnek. 100 mM NaCl stressz a SOD működését mindkét vonalban kismértékben, nem-szignifikánsan serkentette (5.6. ábra A).



5.6. ábra: SOD (A) és kataláz (B) aktivitásának változása heterotróf és auxin autotróf dohány kalluszokban 2 héttel a 100 mM NaCl tartalmú táptalajra helyezés után.

Az antioxidáns enzimek közül a H_2O_2 -t bontó kataláz aktivitása rendkívül alacsony volt a kalluszokban az intakt növényekben mért aktivitásokhoz képest (5.6. ábra B). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a táptalaj tartalmaz redukált cukrot, ezért a kalluszok nem fotoszintetizálnak, vagy fotoszintézisük minimális (Cséplő és Medgyesy, 1986). A fotoszintetikus elektrontranszport és a fotorespiráció alacsony szintje mellett kevesebb reaktív szabad oxigéngyök ill. H_2O_2 keletkezik, ezért nincs szükség a védő enzimek

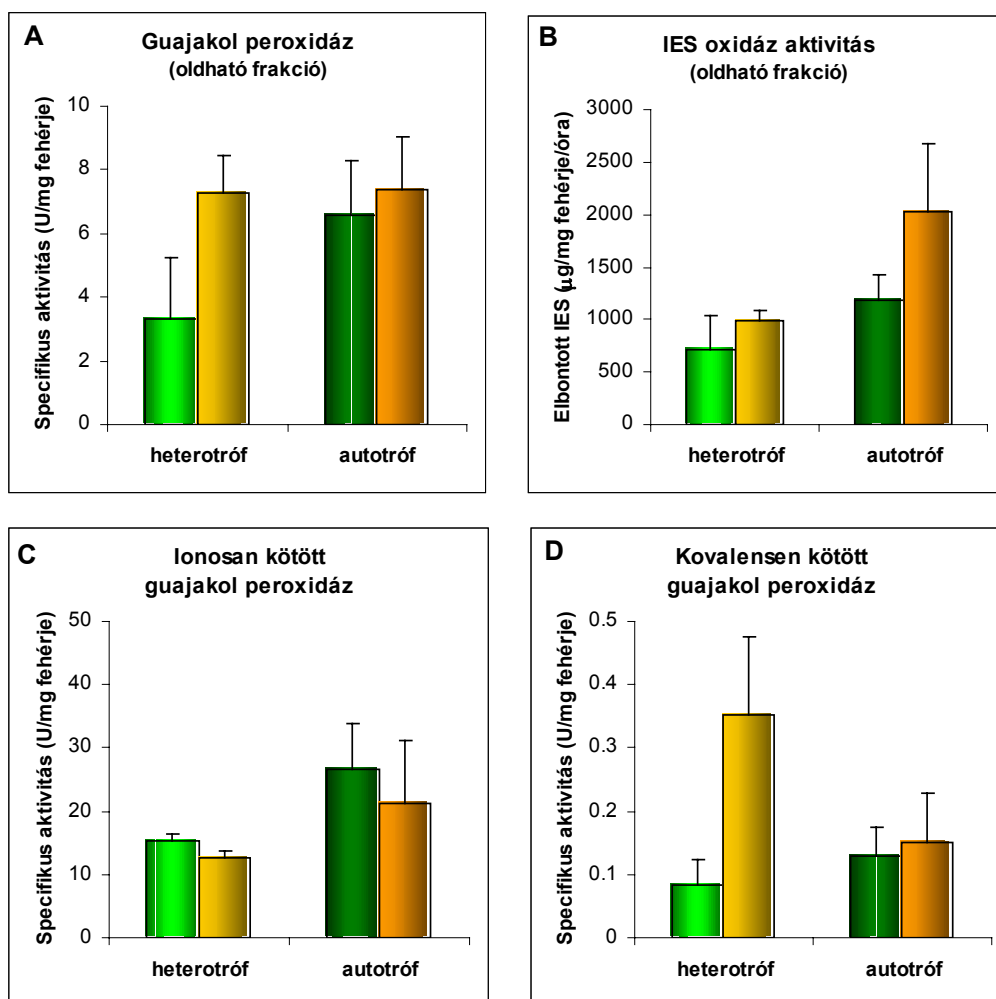
nagyobb aktivitására. NaCl hiányában a H_2O_2 -t bontó kataláz aktivitása az autotróf vonalakban tizedrésze volt a heterotrófokénak. A sóstressz növelte az enzim aktivitását, de ez sokkal kisebb mértékű volt, mint a heterotróf szövetekben (5.6. ábra B). Az autotróf szövetek alacsony kataláz aktivitása ellenére a kalluszok H_2O_2 szintje kisebb volt, mint a heterotrófoké. A NaCl kezelés csökkentette mindkét vonal H_2O_2 tartalmát (5.7. ábra).



5.7. ábra: A H_2O_2 koncentrációjának változása dohány kalluszokban 100 mM NaCl hatására 2 hétig tartó kezelés után.

Mivel sóstressz hatására szignifikánsan csak a heterotróf kalluszokban emelkedik meg a H_2O_2 eltávolításában fontos kataláz aktivitása, arra következtethetünk, hogy az autotróf szövetek valószínűleg más védekező mechanizmusokat indukálnak, amelyek eredményeként NaCl kezelés után még alacsonyabb H_2O_2 koncentráció mutatható ki (5.6. és 5.7. ábrák). Ilyen - hidrogén peroxid koncentrációt csökkentő - enzimek lehetnek a peroxidázok, amelyek széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, bár vannak közöttük viszonylag jól definiált funkcióval rendelkező enzimek is, mint pl. az indol-ecetsav oxidálását katalizálók (Asada, 1992). Az egyik általános szubsztrátjuk a guajakol.

A kultúrák peroxidáz aktivitását guajakol szubsztráttal mérve a heterotróf mintákhoz viszonyítva az autotrófok az oldható- és a sejtfalhoz ionosan kötött frakcióban kb. kétszeres peroxidatív kapacitást mutattak, és a sejtfal poliszacharidokhoz kovalensen kötött enzim aktivitása is magasabb volt (5.8. ábra A,C,D). 100 mM NaCl az ionosan



5.8. ábra: Peroxidáz aktivitásának változása dohány kallusokban 100 mM NaCl hatására a kezelés után 2 héttel. **A:** oldható guajakol peroxidáz (GPX) aktivitás, **B:** oldható IES oxidáz aktivitás, **C:** ionosan kötött frakció GPX aktivitása, **D:** kovalensen kötött frakció GPX aktivitása.

kötött frakcióban mindkét sejttípusnál kismértékű GPX aktivitás csökkenést eredményezett. Az oldható- és kovalensen kötött peroxidázok aktivitása 2 - 4-szeresére nőtt a heterotrófoknál, a habituáltaknál nem következett be további szignifikáns aktiválódás (5.8. ábra A,C,D).

Az oldható frakció peroxidáz aktivitását specifikusan IES szubsztráttal mérve szintén az autotrófokban tapasztaltunk nagyobb aktivitást. Eredményeink különböznek az aldehid oxidáz aktivitásának natív gélben, indol-3-aldehid szubsztráttal történő meghatározással kapott aktivitásoktól, amelyek az IES lebontás egy H_2O_2 -t nem igénylő reakciólépésének működését mutatja. Az auxinok lebontásában azonban fontos szerepet

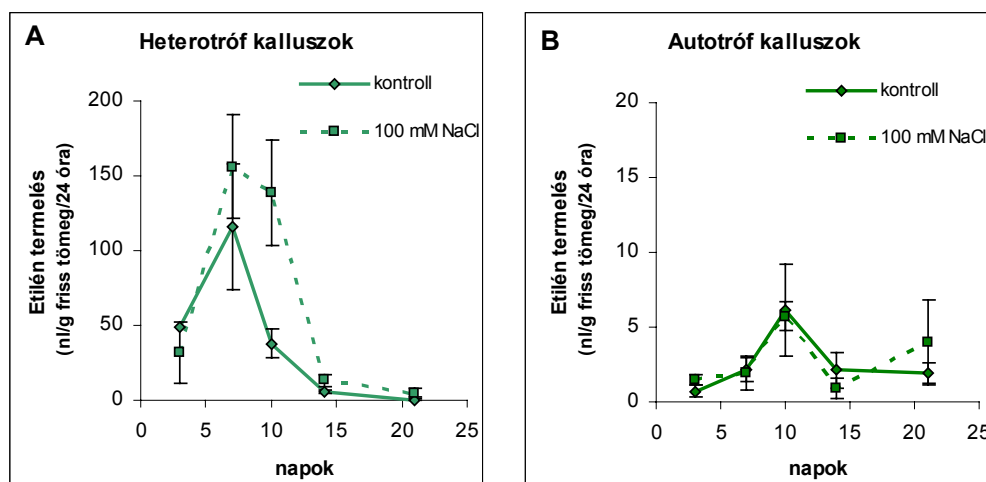
töltenek be a peroxidázok. NaCl kezelés az autotróf szövetek IES oxidáz/peroxidáz aktivitásában az oldható GPX aktivitáshoz hasonlóan további növekedést eredményezett, míg a heterotrófoknál nem okozott szignifikáns változást (5.8. ábra B).

Bisbis és mtsai (1999) auxin- és citokinin-független cukorrépa kalluszok tanulmányozása során kimutatták, hogy a porfirinvázis vegyületek koncentrációja, így a klorofill- és a hemtartalom is alacsonyabb volt az autotróf vonalakban. A jelenség oka, hogy a pirrol bioszintézis intermedierjének, a δ -aminolevulinsav (ALA) szintézisének kloroplasztisban végbemenő folyamata gátlódik, valamint a habituált szövetekben felhalmozódó benzolszármazékok gátolják az ALA $\rightarrow$ porfirin átalakítást végző enzim működését. Az anyagcserefolyamatokban bekövetkezett változás a hemoproteinek szintézisének csökkenéséhez vezet, amely alacsonyabb peroxidáz- és kataláz aktivitást eredményez a teljesen habituált cukorrépa kalluszokban.

Az auxin autotróf dohány vonalaink fenotípusa különbözik a teljesen habituált, klorofillt nem tartalmazó cukorrépa vonaltól, amelyet valódi növényi rákos szövetnek tekintenek (Gaspar, 1998). Autotróf kultúránk a heterotrófhoz viszonyítva nem tartalmaz kevesebb klorofillt (5.1. ábra), ez arra utal, hogy itt a tetrapirrol bioszintézis nem gátolt. Az autotróf kalluszok kataláz aktivitása ugyan alacsonyabb, mint a heterotrófoké, azonban a peroxidáz aktivitásuk minden sejtfrakcióban magasabb; ez valószínűsíti, hogy hemoprotein bioszintézisük zavartalan; ennek igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

A peroxidázok egyik legfontosabb funkciója a növényi sejtekben a sejtfalkomponensek keresztkötéseinek kialakítása, amely akadályozza a sejt méretének további növekedését (Andrews és mtsai, 2002). A sejtfal-kötött peroxidázok aktivitásában meglévő különbség lehet közvetlen oka a heterotróf és autotróf vonal 100 mM NaCl kezelés esetén mutatott eltérő növekedésének. A kovalensen kötött peroxidáz aktivitás 100 mM NaCl jelenlétében a heterotróf szövetekben jelentősen megemelkedett (kb. 4-szeresére), az autotróf kalluszokban nem változott. Ez az aktivitás a sejtfalpolimerek keresztkötéseinek kialakításával csökkenti a sejtfal elasztikusságát, és ez hozzájárulhatott ahhoz, hogy NaCl hatására a heterotróf szövetek növekedése gátlódott, az autotróf kalluszok ugyan a kontrollnál is lassabban nőttek, de az alkalmazott NaCl koncentráció nem idézett elő szignifikáns növekedésgátlást (5.5. ábra A, 5.8. ábra A,C,D).

Egyes peroxidáz izoenzimek bioszintézisét és apoplastba történő szekrécióját az etilén indukálja (Ishige és mtsai, 1993; Ito és mtsai, 1994). Korábban már ismert volt, hogy az autotróf szövetek RM táptalajon általában kevesebb etilént fejlesztenek, mint a



5.9. ábra: Auxin heterotróf (A) és autotróf (B) szövetek etiléntermelése 100 mM NaCl-dal kiegészített táptalajon.

heterotrófok (Köves és Szabó, 1987; Gaspar és mtsai, 1988; Hagege és mtsai, 1991), ez lehet mind oka, mind következménye a habituációnak (Bisbis és mtsai, 1998).

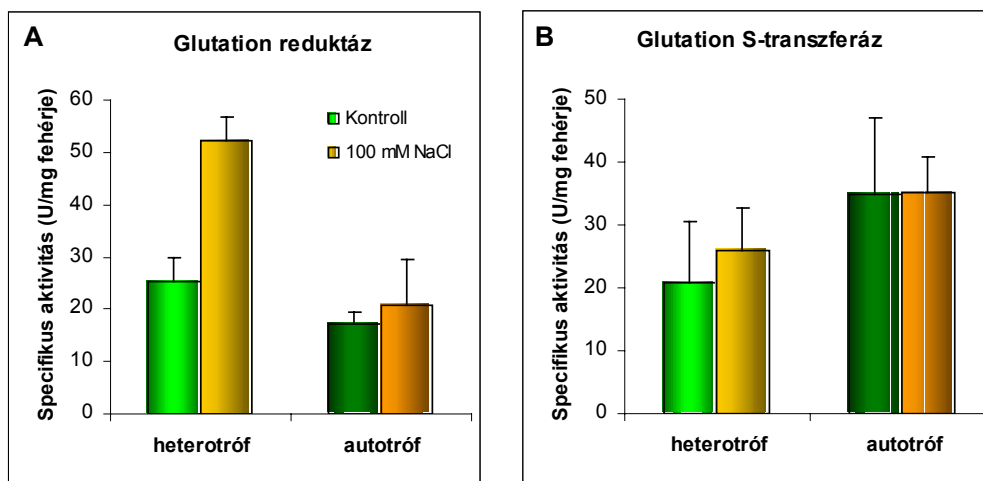
A két kallusz típus etiléntermelését megmérve azt tapasztaltuk, hogy a szövetek etilénfejlődése a korábban megfigyelthez hasonlóan alakult: az auxin-függő heterotróf szövetek etilénfejlődése 1 hét után érte el a maximális értéket; a felszabaduló etilén mennyisége kb. tízszer nagyobb volt, mint az autotróf vonalé. NaCl hatására a hormon-függő szövetek etilénszintézise megnő, ez szerepet játszhat az oldható- és kovalensen kötött peroxidázok sókezelés hatására bekövetkezett indukciójában. A habituált szövetekben NaCl jelenlétében az etilénprodukciónak nem változott szignifikánsan (5.9. ábra A, B).

Bár az autotróf kultúrák esetében sem az etiléntermelés, sem a peroxidatív kapacitásuk nem módosult NaCl hatására, a magas - heterotrófhhoz viszonyítva kétszeres - peroxidáz aktivitás értékeit a szövetek alacsony etilénprodukcója nem magyarázza. (5.8. és 5.9. ábrák). Ez azt jelzi, hogy az autotróf szövetekben a peroxidázok aktiválásában más mechanizmus játszik közre.

5.3.3. Glutationhoz kapcsolódó védekező enzimek aktivitásának és a malondialdehid szintjének alakulása

Az oxidatív stressz kivédésében fontos szerepet játszó oxidált glutation (GSSG) redukciója központi szereppel bír, amelyet enzimatikusan a glutation reduktáz katalizál. A GR aktivitása a SOD-hoz és katalázhoz hasonlóan alakult: az auxin heterotróf kultúrában magasabb volt, mint az autotrófban; a 2 hétig tartó 100 mM NaCl kezelés hatására indukálódott, míg a habituáltakban alacsonyabb értékeket mérhettünk, és két hetes sóstressz kezelést követően nem szignifikáns az aktiválódás (5.10. ábra A).

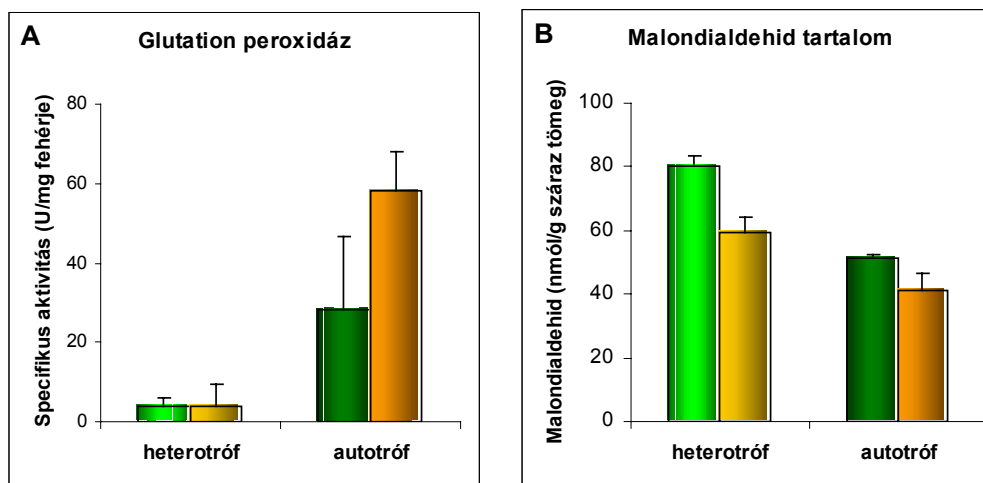
A redukált glutation szubsztrátja a glutation S-transzferáz enzimnek is. A GST aktivitás a két hetes autotróf szövetekben a heterotrófokhoz viszonyítva magasabb volt (5.10. ábra B). A GST-k nagy fontosságúak a sejtre káros vegyületek eltávolításában stressz esetén, hiszen a GSH addíciójával a nukleofil szubsztrátok toxikussága csökken és lehetővé válik vakuólumba történő kiválasztásuk. A GST-knek szerepük lehet egyéb endogén természetes növényi produktumok (másodlagos anyagcseretermékek és hormonok) konjugálásában, izomeráz reakciók katalizálásában és bizonyos vegyületek szállításában is, így döntő szerepet játszhatnak a növények normális fejlődésének elősegítésében (Martinoia és mtsai, 1993; Li és mtsai, 1995; Marrs, 1996; Droog, 1997; Edwards és mtsai, 2000).



5.10. ábra: Glutation reduktáz (A) és glutation S-transzferáz (B) aktivitásának változása 100 mM NaCl hatására auxin autotróf és heterotróf kalluszok 2 hetes kezelését követően.

Néhány GST izoforma glutation peroxidáz (GSH-PX) aktivitással is rendelkezik és GSH felhasználásával redukál szerves hidroperoxidokat monohidroxi- származékká. A növényi glutation peroxidázok stressz hatásra indukálódnak, szubsztrátjuk lehet pl. a linolénsav-hidroperoxid és a 4-hidroxinonenal (4HNE) is, ami a lipidperoxidáció károsító hatásai ellen védő szerepüket bizonyítja (Gronwald és Plaisance, 1998; Bianchi és mtsai, 2002). GSH-PX aktivitással rendelkező GST túltermeltetésével transzgénikus dohány növények stressz toleranciája jelentősen növelhető volt (Roxas és mtsai, 2000).

Kumén hidroperoxid (CHP) szubsztráttal mért glutation peroxidáz aktivitás az autotróf dohány szövetekben kb. 5-szöröse volt a heterotrófokban mérhetőnek, és értéke NaCl kezelés hatására tovább nőtt. Ezzel összhangban a stresszhatás következtében keletkező malondialdehid (ill. a tiobarbitúrsavval reagáló reaktív aldehidek) szintje csökkent az autotróf vonalban mind kontroll körülmények között, mind sóstressz hatására (5.11. ábra A,B). Az, hogy NaCl alkalmazásával az MDA koncentrációja - a H_2O_2 tartalomhoz hasonlóan - tovább csökkent, jelzi a GSH-PX szerepének, a membránintegritás fenntartásának fontosságát a sóstressz elleni védekezésben.



5.11. ábra: Glutation peroxidáz aktivitásának (A) és a malondialdehid szintjének (B) változása két hetes 100 mM NaCl kezelés hatására auxin autotróf és heterotróf kalluszokban.

Eredményeink arra utalnak, hogy az autotróf sejtek nagyon hatékony akklimatizációs mechanizmussal rendelkeznek: az alacsonyabb SOD, kataláz és GR aktivitás ellenére 100 mM NaCl nem csökkentette szignifikánsan a kontrollhoz viszonyított növekedésüket, H_2O_2 és MDA szintjük alacsonyabb volt a heterotróf szövetekénél. A sóstressz - és feltehetően egyéb stressz-indukált oxidatív károsodás - elleni enzimatisz védelemben a peroxidázok mellett a GST és különösen a GSH-PX aktivitás emelkedése játszik szerepet (Csiszár és mtsai, 2003).

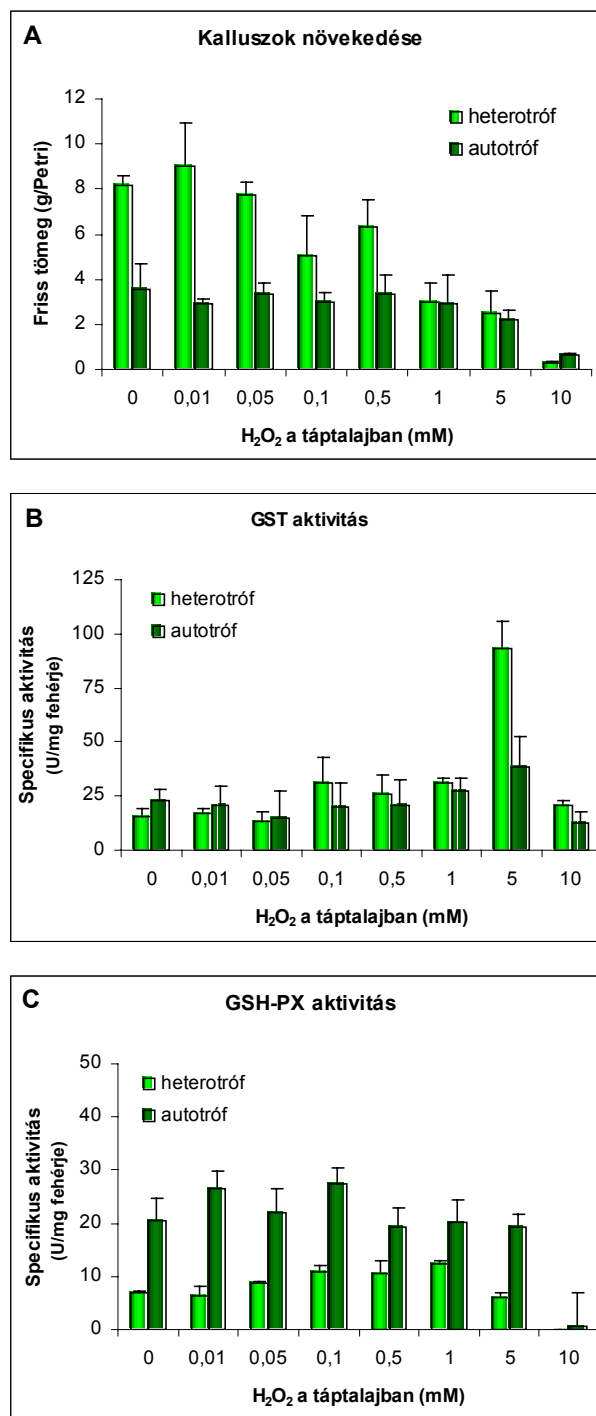
A különböző körülmények között nevelt kalluszok növekedési mérései igazolják, hogy általános jelenségről van szó. A kísérleteinkben alkalmazott stressz típusokban közös, hogy oxidatív stresszt okoznak, aktív oxigénformák keletkeznek, amelyek központi szerepet töltenek be a stresszválaszban. A reaktív oxigénvegyületek szintje meghatározza a válasz típusát: kis koncentrációban indukálják a védekező géneket és az adaptív folyamatokat, nagy koncentrációban beindítják a programozott sejthalálhoz vezető folyamatokat. Neill és mtsai *Arabidopsis* szuszpenziós kultúra vizsgálatával megállapították, hogy a sejtek H_2O_2 -dal szembeni toleranciája korrelációban volt a H_2O_2 -átalakító képességükkel (Desikan és mtsai, 1998; Neill és mtsai, 2002).

5.4. Exogén H_2O_2 hatása a kalluszok növekedésére, GST és GSH-PX aktivitására

A szöveteket 0,01 – 10 mM H_2O_2 -t tartalmazó táptalajokra ültetve vizsgáltuk a H_2O_2 -által kiváltott oxidatív stresszel szembeni toleranciát. A heterotróf vonal növekedése 2 hét után az 1 mM H_2O_2 -dal kiegészített táptalajon a kontroll értékének 40 %-ára csökkent, 10 mM alkalmazása esetén a sejtek elpusztultak (5.12. ábra A). Az autotróf kalluszok lassabban nőttek, mint a heterotrófok, tömegük kb. fele volt az auxin-függő kontrollokénak, azonban ezt a növekedési rátát magasabb H_2O_2 koncentráció jelenlétében is megtartották, ami mutatja az autotrófok hatékonyabb H_2O_2 -eliminálását. 5 mM exogén H_2O_2 mennyiség okoz a habituált kalluszok tömegében kisebb mértékű csökkenést, azonban a sejtek nagyobb részének pusztulása mindkét vonalnál azonos, 10 mM exogén H_2O_2 koncentrációnál következett be (5.12. ábra A).

Az auxin-függő szövetek GST aktivitása 0,1 mM H_2O_2 koncentrációtól emelkedett közel kétszeresére, 5 mM H_2O_2 kiemelkedően magas, a kontrollhoz viszonyítva ötszörös GST aktivitás-növekedést eredményezett, jelezve a GST indukcióját, szerepének fontosságát a nagyobb oxidatív stressz esetén (5.12. ábra B). Az autotróf vonal GST

aktivitása a kezelés után 2 héttel a 0-0,05 mM exogén H₂O₂ koncentrációknál magasabb értéket mutatott, mint a heterotrófoké, de a H₂O₂ mennyiségének növelésével az enzim aktivitása kevésbé változott (5.12. ábra B).



5.12. ábra: Exogén H₂O₂ hatása a kalluszok növekedésére (A), glutation S-transzferáz- (B) és glutation peroxidáz (C) aktivitására a táptalajra helyezés után két héttel.

A GSH-PX aktivitás alakulása eltért a GST-nél megfigyelttől: a heterotróf kallusznál 0,1 mM H_2O_2 koncentrációtól kezdődően volt ugyan kisebb mértékű növekedés glutation peroxidáz aktivitásukban, de 5 mM H_2O_2 táptalajhoz adása a kontrollnál alacsonyabb GSH-PX működést eredményezett (5.12. ábra C). Az autotróf kultúrában magasabb GSH-PX aktivitásokat mértünk, de értéke a H_2O_2 koncentráció függvényében nagymértékben nem változott.

Eredményeink szerint az autotróf vonal exogén H_2O_2 -dal szemben is hatékony védekező mechanizmussal rendelkezik, amelyben szerepet játszhatnak a GSH-PX és GST enzimek is, de aktivitásuk exogén H_2O_2 hatására 2 hétig tartó nevelés után - a heterotróffal ellentétben - nem növekedett. A tartósan magas GSH-PX aktivitás szoros korrelációt mutat az autotróf kalluszok növekedésével. A heterotróf sejtekben az alacsony GSH-PX aktivitás mérsékelt emelkedése nem elegendő a H_2O_2 -indukált oxidatív stressz kivédéséhez. Az autotróf vonalak exogén H_2O_2 kezelésre mutatott reakciójából arra következtethetünk, hogy a reaktív oxigénformák közvetlenül nem emelik meg szignifikánsan az extrahálható GST és GSH-PX enzimek aktivitásait.

A GST aktivitást a szöveten belül több tényező befolyásolja, köztük feltételezhetően az etilén is. Az etilén transzkripció szinten aktivál egy *GST* gént (*GST1*) a szegfű virág szíromlevelének öregedési folyamata során (Itzhaki és mtsai, 1994).

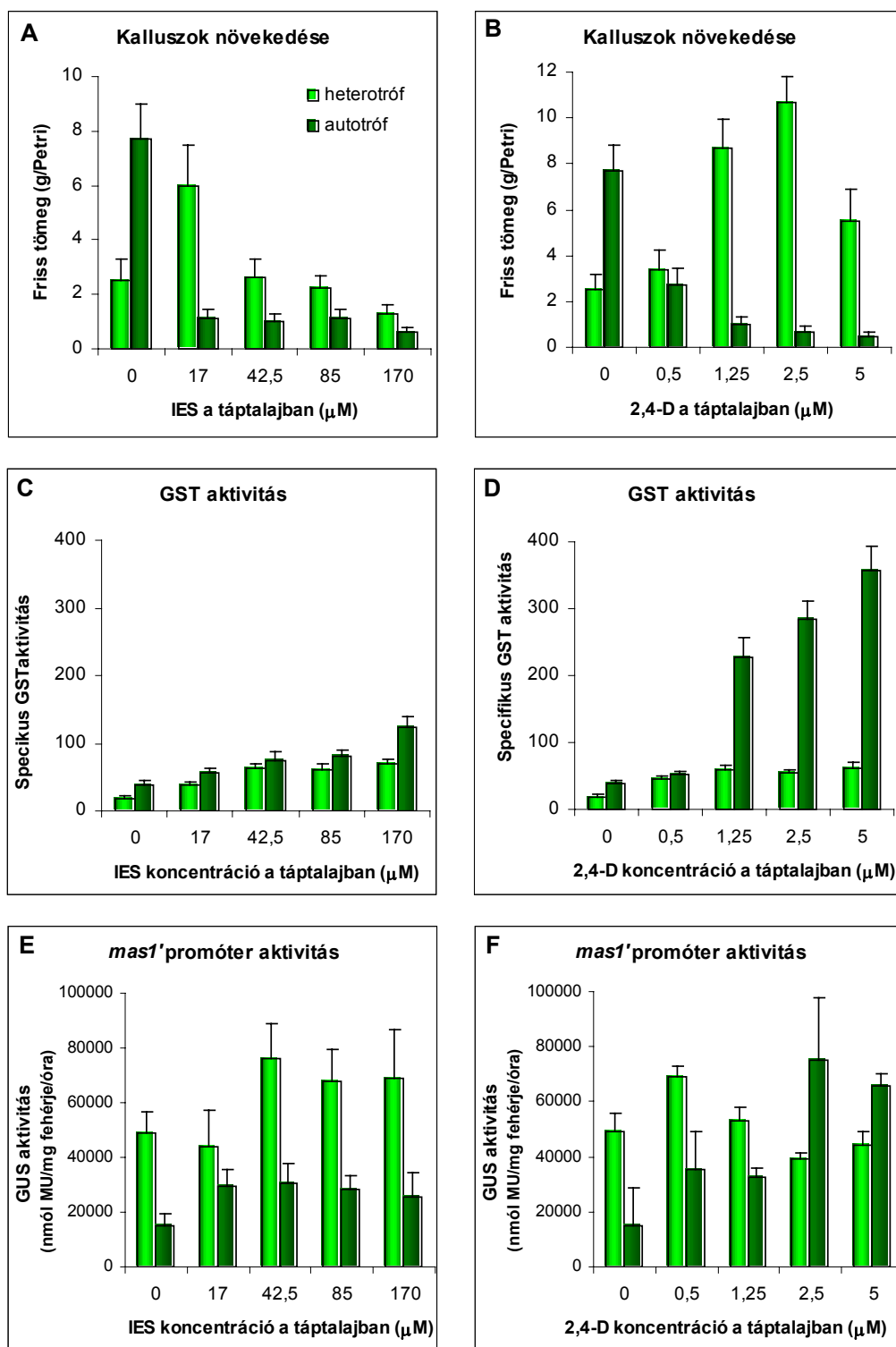
Több növényi *GST* promóterében azonosítottak *ocs*- (oktopin szintáz) vagy *ocs*-szerű szekvenciákat, amelyek felelősnek bizonyultak mind stressz-, mind biológiailag aktív hormonok és inaktív hormonanalógok általi indukcióért (Ulmasov és mtsai, 1994; 1995; Zhang és Shing, 1994; Marrs, 1996). A mannopin szintáz 1 génjének promóteréről (*mas1'*) szintén kimutatták, hogy az etilén és az auxin is befolyásolja (Langridge és mtsai, 1989). A *mas1'* promótert korábban az auxin általi indukálhatósága miatt kívántuk felhasználni a hormon által szabályozott folyamatok tanulmányozásában, ezért állítottunk elő *mas1':GUS* génkonstrukcióval transzformált dohány növényeket, majd azokból auxin autotróf vonalakat (Stefanov, 1992; Szabó és mtsai, 1994). Az autotróf kalluszok stresszre adott válaszána és a hormonális viszonyok összefüggésének vizsgálatához a továbbiakban felhasználtuk a *mas1'* promóterhez kapcsolt GUS aktivitás változásának mérését is, és az eddig tanulmányozott folyamatok közül a növekedés mellett a GST enzim aktivitását választottuk, mert mind a GST, mind a *mas1'* promóter régiók tartalmazznak *ocs*- vagy *ocs*-szerű *cisz*-reguláló elemeket, amelyek felelősek lehetnek az erős és gyenge auxinok, auxin analógok, etilén vagy más stressz általi indukcióért.

5.5. Exogén auxin hatásának tanulmányozása a kalluszok növekedésére, GST- és *masI'*::GUS aktivitására

Különválasztva tanulmányoztuk a természetes auxin IES és a szintetikus 2,4-D, mint növekedésgátlást eredményező stresszor hatását a kalluszok növekedésére, és összehasonlítottuk transzgénikus vonalainkban az auxin- és stressz által indukálható *masI'*::GUS génfúzió expresszióját és a glutation S-transzferáz aktivitását. A táptalaj IES- ill. 2,4-D tartalmát az eddigiekhez hasonló 0,1-10-szeres koncentráció-intervallumon belül változtatva az auxin-függő és auxin autotróf kalluszok növekedése jelentősen eltért a két auxin esetében is. A heterotróf szövetek 17 μM IES ill. 2,5 μM 2,4-D jelenlétében mutattak maximális növekedést, az autotróf szövetekben mindegyik alkalmazott IES- vagy 2,4-D koncentráció – a korábban tapasztaltaknak megfelelően – növekedésgátlást eredményezett (5.13. ábra A,B). A különböző lefutású növekedési görbék mutatják, hogy az auxint szintetizáló autotróf kalluszok sokkal érzékenyebbek az exogén auxinra.

A szupraoptimális auxinkoncentráció növekedésgátló hatása valószínűleg a jelátviteli utakon keresztül kifejtett összetett változások eredménye. Az utóbbi néhány évben jelentek meg közlemények arra vonatkozóan, hogy egyes hormonok jelátviteli folyamataiban a H_2O_2 -nak fontos szerepe van, így az abszcizinsav által indukált sztómazáródásban (Pei és mtsai, 2000), és az IES által szabályozott gravitropos válaszban is kimutatták szerepét (Joo és mtsai, 2001). A szintetikus auxin típusú növényvédőszer, mint pl. a pikloram, H_2O_2 -tútermelést eredményeztek a kétszikű galajban (*Galium aparine* L.) (Grossmann és mtsai, 2001). Az auxinokról ismert továbbá, hogy az etilén szintézisét indukálják génexpressziós szinten (Macdonald, 1997). A szupraoptimális auxin koncentráció tehát mind a H_2O_2 szint emelésével, mind az etilénprodukciónak indukciójával növekedésgátlást eredményezhet.

A GST aktivitás a növekedésre gyakorolt hatástól függetlenül nőtt a külső auxin mennyiségének emelésével mind az IES, mind a 2,4-D esetében. Mind a természetes auxin, az IES, mind a szintetikus 2,4-D lehet szubsztrátja és indukálója is a GST-nek. Az autotróf kalluszok GST aktivitása minden alkalmazott koncentráció esetében magasabb volt, mint a heterotróf szövetekben. A 17 - 170 μM IES és a 0,5 - 5 μM 2,4-D hasonló mértékben, 2-3-szorosra emelte a heterotróf kalluszokban az enzim aktivitását (5.13. ábra C,D). Az autotróf kalluszokban sokkal nagyobb volt az indukció, 1,25 - 5 μM 2,4-D esetében



5.13. ábra: IES és 2,4-D hatása a kalluszok növekedésére (A,B) GST aktivitásukra (C,D) és a *mas1'*::GUS aktivitásra (E,F) 2 hét után.

különösen magas, kb. 10-szeres értékeket mértünk (5.13. ábra C,D). Az alkalmazott auxinok által okozott eltérő GST aktivitás növekedés oka lehet, hogy a 2,4-D, mint stresszor is fejt ki indukáló hatást.

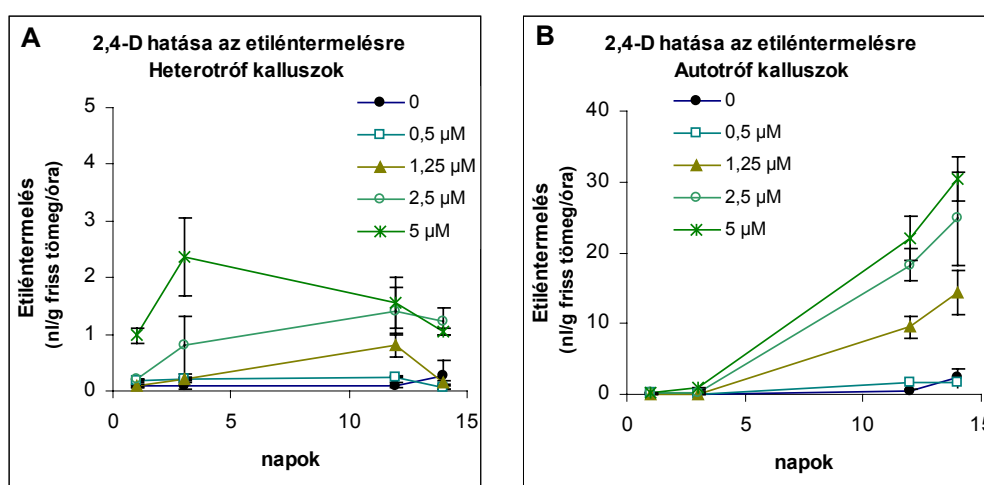
Összehasonlítottuk a heterotróf és auxin autotróf vonalakban a *masI*' promóterhez kapcsolt GUS riporter gén aktivitását is, amely egyes *GST* promóterekhez hasonlóan auxin által is indukált. Az autotróf szövetek *masI*'::GUS aktivitása alacsonyabb volt mind auxin nélküli, mind IES-tartalmú táptalajon, mint a heterotrófoké. A 17 μ M feletti külső IES koncentráció megemelte az auxin-függő heterotróf kalluszk GUS aktivitását, míg az autotrófnál mindegyik alkalmazott koncentráció hasonló, kisebb mértékű növekedést idézett elő a *masI*'::GUS működésben (5.13. ábra E). A 2,4-D hatását tekintve a heterotróf kalluszk fenntartásánál használt 0,5 μ M-hoz képest nem nőtt a *masI*'::GUS aktivitás, sőt a nagyobb 2,4-D koncentrációknál alacsonyabb volt. Ehhez hasonlóan az autotróf szövetekben a 2,4-D koncentrációi nem emelték szignifikánsan a promóterhez kapcsolt enzim aktivitását (5.13. ábra D).

A GST és a GUS aktivitás változások nem mutattak közvetlen korrelációt a kultúrák növekedési mintázatával, a maximális növekedést és a maximális GUS aktivitást kiváltó auxin koncentrációk sem egyeztek meg.

5.6. 2,4-D hatása a kalluszk etilén termelésére

A magas külső auxin koncentrációk a szövetek számára egyfajta stresszt jelenthetnek, stressz-etilén képződést indukálhatnak, amely bekapcsolja az inaktíváló- és detoxifikáló folyamatokat, így befolyásolhatja esetleg a GST aktivitást is. A további kísérleteket a szintetikus auxin 2,4-D alkalmazásával végeztük. A szövetek etiléntermelését 2 hetes korig 0,5 - 5 μ M 2,4-D jelenlétében az 5.14. ábrán (A,B) láthatjuk. Az etilén képződés kinetikája eltért a két kallusz típusnál. A heterotróf vonalaknál 2,4-D -függő növekedést tapasztaltunk az etiléntermelésben már az átültetést követő napon, amely tovább emelkedett a magasabb 2,4-D koncentrációknál. A 12. és 14. napon az etilén produkció már csökkent (5.14. ábra A). Az autotróf kultúráknál az etilén fejlődést a 2,4-D később indukálta, kinetikája a vizsgált időtartam alatt nem maximum görbe szerint alakult, és a termelt etilén mennyisége kb. 10-szerese volt a heterotrófokban mért értéknek (5.14. ábra B).

Összehasonlítva 2,4-D jelenlétében a szövetek etiléntermelését és a növekedést megállapítható, hogy azok a heterotróf kalluszok, ahol az etiléntermelés magasabb volt - pl. az 1,25; 2,5 és 5 μM 2,4-D esetében -, jobban növekedtek a 2 hét alatt (5.13. ábra A,B és 5.14. ábra). Ezzel ellentétben az autotróf kalluszok nem nőttek jól azoknál a 2,4-D koncentrációknál, ahol több etilén képződött, mint auxin-mentes táptalajon. Az, hogy az etilénfejlődést indukáló 2,4-D koncentrációk növelték a heterotróf szövetek növekedését, de gátolták a habituáltakét, arra utal, hogy a szövetek által termelt etilénnek is szerepe lehet az autotróf vonalak exogén auxinra mutatott növekedés gátlásában.



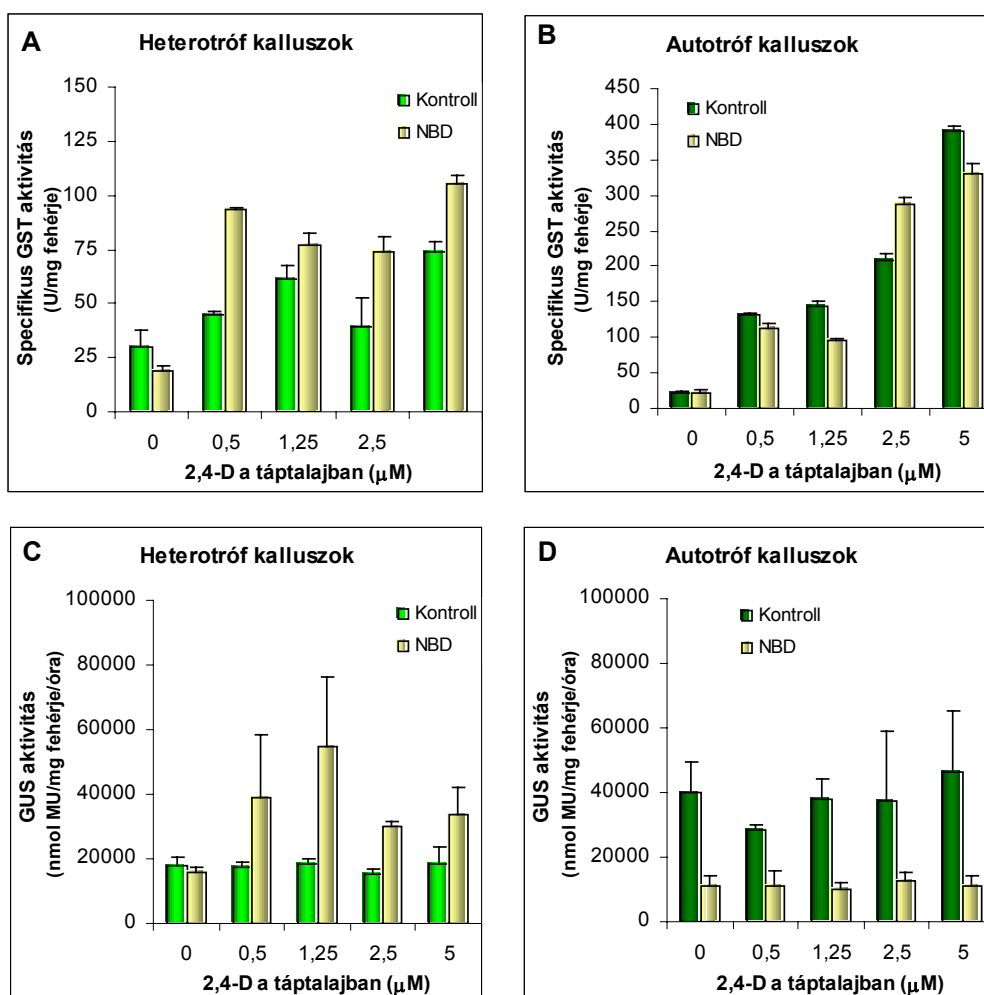
5.14. ábra: A kalluszok etilén termelése 14 napos korig nevelve különböző koncentrációjú 2,4-D jelenlétében. **A:** heterotróf, **B:** autotróf kalluszok

5.7. Az etilén receptor gátló 2,5-norbornadién (NBD) hatása a GST- és GUS aktivitásokra

Az etiléntermelés és az enzimaktivitások közti kapcsolat vizsgálatára több időpontban végeztünk méréseket, ezek közül a legjellemzőbbet mutatjuk be. Az etilén receptor gátlót 11 napos kalluszok légmentes lezárása után az edény falára befecskendezve és elpárologtatva alkalmaztuk, 24 óra után mértük az etiléntermelés meghatározása után az enzimek aktivitását is. Ekkor a 2,4-D -függő etilén-fejlődés sokkal nagyobb volt az autotróf szövetekben, mint a heterotrófokban (5.14. ábra).

A GST aktivitás a heterotróf sejtekben NBD jelenlétében megnőtt (5.15. ábra A). Ez azt jelzi, hogy az etilén receptor inhibitor NBD nélküli mintákban az etilén gátolja az auxin általi GST indukciót. Az autotróf kultúrákban azonban az NBD jelenléte a zárt tenyészedényekben nem idézett elő egyértelmű változást az extrahálható GST aktivitásban (5.15. ábra B), bár egyes koncentrációknál szignifikáns aktivitás csökkenés mutatkozott. Természetesen, egy tisztítatlan kivonatban több izoenzim együttes aktivitása detektálható, így nem zárható ki a magasabb 2,4-D koncentrációknál más jelátviteli út által szabályozott GST aktivitás megjelenése sem.

A 2,4-D koncentrációjától függetlenül a heterotróf kalluszkok 24 órás, a kallusz tömegéhez viszonyítva nagy térfogatú zárt térben történő nevelése nagyon alacsony GUS aktivitást



5.15. ábra: Az etilén receptor gátló 2,5-norbornadién (NBD) hatása a GST- (A,B) és GUS aktivitásokra (C,D) 12 napos dohány kalluszkokban.

eredményezett (5.15. ábra C). Az etilén receptor kompetitor NBD jelenlétében azonban a GUS aktivitás megnőtt, és a mért eredmények hasonlóak voltak a korábban, Petri csészében nevelt kalluszok aktivitásához (5.15. ábra C, 5.13. ábra E). Eredményeink azt mutatják, hogy a *mas1'* promóter működését az etilén – a GST enzim aktivitásához hasonlóan – gátolta.

Az autotróf kalluszok GUS aktivitása a légmentesen zárt edényekben magas volt, az etilén receptorokhoz való kötődésének gátlásával az aktivitás egy alacsonyabb, állandó szinten maradt minden 2,4-D koncentrációnál (5.15. ábra D). Az auxin autotróf kalluszokban tehát a *mas* promóter működését az etilén – a heterotróffal ellentétben – eredetileg serkentette.

5.8. Az auxin-etilén interakció eltérésének feltételezett okai a heterotróf és auxin autotróf kalluszokban

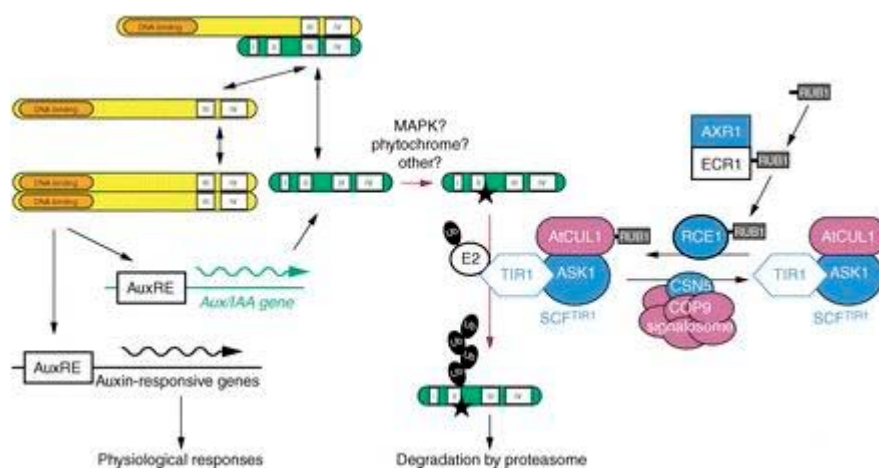
Az etilén eltérő hatását a heterotróf és auxin autotróf dohány kallusz vonalra a jelátviteli útban bekövetkezett változással magyarázhatjuk.

Az általánosan ismert, hogy auxin hatására specifikus mRNS-ek mennyisége gyorsan megemelkedik. Az auxin transzkripcióra kifejtett hatását az Aux/IAA és ARF fehérjék közvetítik. Ulmasov és mtsai (1997) hipotézise szerint az ARF transzkripciós faktorok (az 5.16. ábrán sárga színnel jelölve) növelik a promóterben AuxRE reguláló elemeket tartalmazó gének transzkripcióját (5.16. ábra). Az Aux/IAA proteinek (az 5.16. ábrán zölddel jelölve) az ARF aktivitást módosítva, közvetve szabályozzák a transzkripciót. Az Aux/IAA és ARF fehérjék a C-terminális részükön található konzervált régiók segítségével homo- és heterodimereket képeznek (2.9. ábra). Az ARF fehérjék csak akkor aktiválják a transzkripciót, ha homodimer formában kötődnek a DNS-hez; ha az Aux/IAA proteinnel heterodimert képeznek, inaktívak (5.16. ábra; Rogg és Bartel, 2001). Az Aux/IAA proteinek olyan represszor fehérjék, amelyek stabilitása auxin hatására rendkívül gyorsan, akár 2 percen belül lecsökken (Zenser és mtsai, 2001). A folyamatért az ubiquitin-függő protein degradáció a felelős.

Az 5.16. ábrán látható az SCF osztályba tartozó ubiquitin-protein ligázok szerepe, amelyet *Arabidopsis*-ban írtak le részletesen. Az SCF komplex 4 alegységből áll: SK1, TIR1, cdc53/kullin és F-box fehérje. A képződését az auxin befolyásolja, az ábrán az

auxin-válasz közvetítésében feltehetően pozitív szerepet játszó fehérjéket kékkel jelölték, az auxin által serkentett lépéseket pirossal (Rogg és Bartel, 2001). Az auxinok tehát serkenthetik az Aux/IAA represszor fehérjék ubiquitin-függő degradálását, de szükséges lehet a II-es domén pl. foszforiláció általi módosítása is (csillaggal jelölve).

Ha az Aux/IAA fehérje szintje csökken, az ARF fehérjék nagyobb valószínűséggel dimerizálódnak és serkentik az elsődleges vagy másodlagos auxin-válasz gének transzkripcióját. A primer auxin-válasz gének között van az *Aux/IAA* is, a géntermék azonban auxin jelenlétében az ubiquitinálási út aktiválódásával degradálódhat; auxin hiányában, vagy túl nagy mértékű képződés esetén az ARF fehérjékhez asszociálódva represszálja a transzkripciót (5.16. ábra).



5.16. ábra: A génexpresszióra kifejtett auxin hatás modellje (Rogg és Bartel, 2001). Magyarázat a szövegben.

Az elsődleges auxin-válasz gének között található az ACC-szintáz génje is. Transzkripciója auxin hatására megnövekszik, ami az etilénképződés emelkedéséhez vezet. Az etilén is gátolja saját bioszintézisét az auxin jelátviteli út valamely elemén keresztül, a TIR1 fehérjével kölcsönhatva pedig szabályozza az ubiquitinálási utat is: néhány esetben serkentő hatását tudták kimutatni (Tian és mtsai, 2002). Etilén-inszenzitív *Arabidopsis* mutáns vizsgálatakor Alonso és mtsai (2003) kimutatták, hogy az etilén befolyásolja a *TIR1* gén működését, ezáltal is szerepet játszik az auxin-válaszban az ubiquitin-közvetítte degradációban (5.16. ábra).

Harper és mtsai (2000) *Arabidopsis* csíranövények fototrópos görbülését tanulmányozták, amire az *nhp4* mutáns növény nem volt képes. Az egyenlőtlen növekedésen alapuló választ az auxin szabályozza, amely a fénnel ellentétes oldalon koncentrálik. Az etilén a mutánsok fenotípusos abnormalitásait megszüntette a fototrópos válasz esetében, vagyis auxinhatást váltott ki.

A mutációért felelős gén egy transzkripciós aktivátort kódol (ARF7, auxin reguláló faktor). Megállapították, hogy egyéb reguláló elemek – többek között az etilén is - szabályozzák az auxinra adott választ. A szerzők által ismertett hipotézisek szerint az ARF fehérje aktivitása vagy expressziója változik meg, és ez megnövekedett auxin-érzékenységhez vezet. Feltételezik, hogy etilén hiányában az NPH4/ARF7 a meghatározó ARF az auxin-függő génexpresszió szabályozásában.

Az etilén tehát a transzkripciós faktorok arányának vagy interakciójának megváltoztatásában játszhat szerepet. Az etilén akkor vált ki auxinhatást, ha a represszor hatású transzkripciós faktorok (Aux/IAA) lebontását jobban serkenti, mint amilyen a szintézisük sebessége. Az ARF elemek hatásának gátlása is ugyanez vezet, az Aux/IAA represszor szintézise csökken, auxin jelenlétében ubiquitinált lebontása folyik, a másodlagos auxin-regulálta gének indukálódnak. Külső auxin hiányában a hormonok szintézisének, az endogén auxin/endogén etilén egyensúlyának megfelelően alakul a transzkripciós faktorok aránya.

Ez vonatkozik a dohány heterotróf és auxin autotróf sejtvonalainkra is. Hasonló jelenséget figyelhetünk meg, mint a vad típusú *Arabidopsis* növények és az *nhp4* mutánsok esetében. Az exogén 2,4-D, szintetikus auxin alkalmazásával végzett kísérleteink szerint a heterotróf szövetek GST aktivitását mind az auxin, mind az etilén befolyásolta. Az etilén jelátvitel gátlása az etilén-receptorokhoz kapcsolódó NBD-vel megnövelte a 2,4-D-indukálta GST és *mas1*::GUS aktivitást, bizonyítva, hogy a gáznemű hormon az auxinnal ellentétes hatást fejt ki a heterotróf szövetekben. Ebből arra következtethetünk, hogy a 2,4-D megemelte mind az etilén, mind a GST bioszintézisét, de az etilén gátolta bizonyos gének expresszióját, köztük *GST* génekét is.

Az autotróf szövetekben ellenben a GST aktivitást a norbornadién kezelés nem befolyásolta. Az autotróf vonalakban tapasztalt magasabb GST aktivitás eredhet pl. az expresszáladásuk folyamatára kifejtett auxin-etilén interakció megváltozásából, módosulhat a transzkripciós faktorok szintézisének és lebontásának aránya.

Az etilén receptorok gátlása még alacsonyabb *mas1*::GUS aktivitást eredményezett az autotróf szövetekben, és nem mutatott 2,4-D koncentrációtól való függőséget. Ez arra

enged következtetni, hogy az auxin autotróf kalluszokban elsődlegesen az etilén a felelős a *mas1'* promóter aktivitásának indukciójáért. Arra következtethetünk, hogy a *mas1'* promóter aktivitása az autotróf szövetekben elsődlegesen etilén kontroll alatt áll, míg a heterotróf szövetekben sokkal inkább auxin befolyása alatt van.

Eredményeink elsősorban a *mas* promóter aktivitásának változását tekintve bizonyítják, hogy a heterotróf vonalakban, ahol viszonylag kevés etilén képződik auxin hatására, az auxin regulál elsődlegesen. Az autotróf vonalakban sok etilén képződik exogén auxin hatására, ott az etilén szabályozó szerepe jobban érvényesül.

A kísérleteink közben felmerülő kérdések alapján a további kutatásokat a génexpressziós vizsgálatok irányába tervezzük kiterjeszteni. Az adatbázisban sok ismeret található az általunk is vizsgált enzimekről, valamint egyre több adat áll rendelkezésre a jelátviteli út egyes résztvevőiről, a szabályozó fehérjékről, transzkripciós faktorokról. Következő lépésként a glutation peroxidáz és a GSH-PX aktivitással is rendelkező GST enzimek cDNS szekvenciáinak megszerzése után a különböző abiotikus stresszorok valamint auxin és etilén hatására bekövetkező transzkripciós változásokat szeretnénk tanulmányozni. Feltételezzük, hogy ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei nagyban hozzájárulnak az auxin autotrófiához és a stresszrezisztencia növekedéséhez vezető módosulások megismeréséhez.

6. Összefoglalás

1. *masI'* promóter::GUS riporter gént tartalmazó transzgénikus *Nicotiana tabacum* SR1 dohány levelek protoplasztjaiból származó mikrokolóniák auxin-mentes táptalajra történő, többször ismételt átültetésével auxin autotróf kalluszokat állítottunk elő.

Az autotróf sejtek a habituáció során visszanyerték auxin szintetizáló képességüket és osztódnak auxin-mentes táptalajon. Növekedési kinetikájukat tekintve az exponenciális szakasz időben elhúzódó: az első két hétben lassabban nőttek auxint nem tartalmazó táptalajon, mint a heterotrófok auxin jelenlétében, de a 3. hét végére a különbség kiegyenlítődött. Érzékenységük a táptalaj auxintartalmával szemben megváltozott; az exogén auxin növekedésüket gátolja.

2. A hormon anyagcserében bekövetkezett változás tanulmányozása során natív PAGE utáni aktivitás festéssel megállapítottuk, hogy az IES-metabolizmusban fontos aldehid oxidáz (AO) izoenzim mintázata eltért a két kallusz típusban. Indol-aldehid (IAld) szubsztrát alkalmazásával az AO2 izoenzim igen nagy aktivitást mutatott a heterotróf szövetekben; jelezve, hogy az IES-lebontásnak az IAld-en keresztüli útjában az AO2 izoenzim fontos katalitikus szereppel bír. Az IES prekursorát, az indol-3-acetaldehidet (IAAld) használva az AO enzim aktivitásának meghatározására kimutattuk, hogy az AO2 izoenzim indol-3-acetaldehid oxidáz aktivitással is rendelkezik, tehát nem ennek az enzimnek a hiánya limitálja a heterotróf kalluszsejtek IES bioszintézisét.

Az autotróf kultúrában egy új izoenzim (AO1) is működött, amelynek különösen IAAld szubsztráttal volt jelentős aktivitása. Valószínű, hogy ez az újonnan aktiválódó - feltehetően eltérő szabályozottságú - AO1 izoenzim szerepet játszik az autotróf sejtekben az auxin szintézisében, az auxintól független növekedésben.

3. Az auxin autotróf kalluszok növekedésének intenzitása a hőmérséklet emelésével nagyobb mértékben nőtt, mint a heterotrófoké, még a heterotrófok számára már kedvezőtlen 35 °C-on is jelentősen gyarapodott friss tömegük a 30 °C-on tartottakhoz viszonyítva. Ez azt jelzi, hogy nemcsak a hormon metabolizmusuk változott meg,

hanem stressztoleranciájuk is. NaCl ill. KNO₂ táptalajhoz adásával végzett kísérleteink az autotróf vonalak megnövekedett abiotikus stressztoleranciáját igazolták.

A vizsgált paraméterek közös eleme az oxidatív stressz, a reaktív oxigén formák képződése. A stressztolerancia részletesebb tanulmányozásához két hétig tartó, 100 mM NaCl kezelést alkalmaztunk, amely az autotróf szövetek növekedését csak kismértékben csökkentette, míg a heterotrófoké kb. 30 %-kal visszaesett.

4. Megállapítottuk, hogy a Na⁺ felhalmozódás mindkét szövetben hasonlóan alakult, tehát a Na⁺ felvétele az autotróf szövetekben nem gátlódott. Az egyéb kationok közül a növényi sejtek turgorának, ionfelvételi folyamatainak és különböző enzimek működésének fenntartásához szükséges K⁺ és Mg²⁺, valamint a másodlagos jelátvivő funkcióval is rendelkező Ca²⁺ szintje magasabb volt a habituált szövetekben, a reaktív gyökök generálásában és az oxidatív stressz folyamatokban részt vevő vas mennyisége alacsonyabb volt. NaCl stressz esetén a különbség a két vonal között az iontartalmak alakulásában még kifejezettebb. A változások jelzik, hogy az autotróf kalluszokban aktiválódtak az ionháztartás módosulásához vezető folyamatok, amelyek hozzájárulhatnak a sejtek növekedésének fenntartásához stressz esetén is.
5. Az antioxidáns enzimek közül a SOD- és kataláz aktivitást a két vonalban összehasonlítva az autotróf szövetben kb. 50 %-kal kisebb aktivitásokat mértünk, ezzel összhangban a sejtek alacsonyabb H₂O₂ tartalommal rendelkeztek. Sóstressz hatására szignifikánsan csak a heterotróf kalluszokban emelkedett meg a H₂O₂ eltávolításában fontos kataláz aktivitása, az autotróf szövetek valószínűleg más védekező mechanizmusokat indukálnak, amelyek eredményeként NaCl kezelés után az antioxidáns enzimek kismértékben aktiválódtak és még alacsonyabb H₂O₂ szint mutatható ki.

A GR aktivitása is indukálódik a heterotróf szövetekben NaCl hatására, míg az auxin autotrófokban alacsonyabb értékeket mérhetünk, és két hetes sóstressz kezelést követően nem szignifikáns az aktiválódás.

6. A guajakol peroxidáz (GPX) aktivitás magasabb volt az autotróf szövetekben. A peroxidázok egyik legfontosabb funkciója a növényi sejtekben a sejtfalkomponensek keresztkötéseinek kialakítása, amely akadályozza a sejt méretének további növekedését. A sejtfal-kötött peroxidázok aktivitásában meglévő különbség lehet közvetlen oka a heterotróf és autotróf vonal eltérő növekedésének. A kovalensen kötött peroxidáz aktivitás 100 mM NaCl jelelétében a heterotróf szövetekben kb. 4-szeresére

emelkedett, az autotróf kalluszokban nem változott. Ezzel magyarázhatjuk, hogy NaCl hatására a heterotróf szövetek növekedése gátlódott, az autotróf kalluszok ugyan lassabban nőttek, de az alkalmazott NaCl koncentráció nem idézett elő növekedésgátlást.

Az IES-lebontásban szerepet játszó peroxidázok aktivitását IES szubsztráttal meghatározva a GPX aktivitás alakulásához hasonlóan az auxin autotrófban mértünk magasabb értékeket, ez NaCl hatására indukálódott. Ez arra utal, hogy az enzim aktivitásának növekedésében nem az endogén IES-szint a meghatározó, hanem egyéb, stresszhatásra is indukálódó elemek.

7. Magasabb volt a két hetes autotróf szövetekben a heterotrófokhoz viszonyítva a glutation S-transzferáz aktivitás is, amely stressz esetén a sejtre káros vegyületek eltávolításában tölt be fontos szerepet: GSH-val konjugálva a nukleofil szubsztrátok toxikussága csökken és lehetővé válik vakuólumba történő kiválasztásuk. Néhány GST izoforma glutation peroxidáz (GSH-PX) aktivitással is rendelkezik. A növényi glutation peroxidáz aktivitás stressz hatásra indukálódik, szerepe lehet pl. a lipidperoxidáció termékeinek károsító hatásai elleni védelemben, a membránintegritás fenntartásában.
8. Kumén hidroperoxid (CHP) szubsztráttal mért glutation peroxidáz aktivitás az auxin autotróf dohány szövetekben kb. 5-ször nagyobb volt, mint a heterotrófokban, és NaCl kezelés hatására indukálódott. Ezzel összhangban a stresszhatás következtében keletkező malondialdehid szintje csökkent az autotróf vonalban mind kontroll körülmények között, mind sóstressz hatására. Ezek az eredmények jelzik, hogy az autotróf kalluszok nagyon hatékony akklimatizációs mechanizmussal rendelkeznek, a stressz-indukált oxidatív károsodás elleni enzimatis védelemben a peroxidázok mellett a GST és különösen a GSH-PX aktivitás emelkedése játszik nagy szerepet.
9. A peroxidázok és a GST aktivitását is befolyásolhatja az etilén. A két kallusz típus etiléntermelését megmérve azt tapasztaltuk, hogy a heterotróf vonal kb. tízszer több etilént bocsát ki, mint az autotróf. NaCl hatására a hormon-függő szövetek etilénszintézise megnő, ez szerepet játszhat pl. a peroxidázok sókezelés hatására bekövetkezett indukciójában. Az autotróf kultúrák azonban kevesebb etilént termeltek, mennyisége NaCl hatására nem emelkedett, peroxidáz aktivitásuk viszont magasabb volt, mint a heterotrófokban. Mindez az etilén eltérő szerepére utal a két kultúrában.

10. Az abiotikus stressz elleni védekezés fontos eleme a védekező mechanizmus reaktív oxigén formák általi indukciója, amit *GST* géneknél bizonyítottak.

A kalluszkok 0,01 - 10 mM H_2O_2 -t tartalmazó táptalajra ültetésével két hét után vizsgáltuk a vonalak toleranciáját ill. GST- és GSH-PX aktivitásuk alakulását. A heterotróf kalluszkok növekedése az autotrófokhoz viszonyítva alacsonyabb H_2O_2 koncentrációnál gátlódott, ami mutatja a habituáltak hatékonyabb H_2O_2 -eliminálását, a sejtek pusztulása azonban mindkét vonalnál azonos exogén H_2O_2 koncentrációnál következett be. Az auxin-függő kalluszkok GST aktivitása 0,1 - 5 mM exogén H_2O_2 koncentráció-tartományban a H_2O_2 növelésével emelkedett, GSH-PX aktivitásukban kisebb növekedés következett be. Az autotróf vonalakban a GST alapaktivitása nagyobb volt, de a külső H_2O_2 mennyiség emelésével kevésbé aktiválódott. A GSH-PX aktivitás is csak az alacsonyabb exogén H_2O_2 koncentrációknál emelkedett meg, viszont 5 mM külső H_2O_2 koncentrációig legalább 50%-kal magasabb aktivitást mutatott, mint a heterotróf vonalban.

Több növényi *GST* promóterében azonosítottak *ocs*- (oktopin szintáz) vagy *ocs*-szerű szekvenciákat, amelyek felelősek bizonyultak mind stressz-, mind biológiailag aktív hormonok és inaktív hormonanalógok-általi indukcióért.

11. *masI'*::GUS génfüziót tartalmazó transzgénikus vonalainkban az auxin- és stressz által indukálható *masI'*::GUS géntermék és a glutation S-transzferáz aktivitását hasonlítottuk össze különböző IES vagy 2,4-D koncentrációjú táptalajon nőtt kalluszkokban. Az autotróf kalluszkok növekedésük alapján mind IES-re, mind 2,4-D-re érzékenyebbek bizonyultak. A GST aktivitás a koncentráció emelésével nőtt mindkét vonalnál, mindkét auxin esetében. Az autotróf szövetek GST aktivitása magasabb volt, mint a heterotrófoké, az auxin hatására bekövetkező indukció kifejezettebb volt, különösen a 2,4-D esetében. A *masI'* promóter aktivitás azonban az autotrófokban volt alacsonyabb, auxin hatására általában nőtt, de nem mutatott korrelációt az auxin koncentrációjával. Az indukció mértéke az autotróf kultúrában 2,4-D alkalmazásánál 3-5-szörös volt.

Az etiléntermelést különböző 2,4-D koncentrációk esetében meghatározva megállapítottuk, hogy a szintetikus auxin megemelte mind a heterotróf, mind az autotróf szövetek etilén produkcióját.

12 A heterotróf szövetek GST aktivitását az auxin és az etilén is befolyásolta. A GST aktivitását mind a legalacsonyabb 0,5 μ M, mind a magas külső 2,4-D koncentrációk indukálták. Az etilén jelátvitel gátlása az etilén-receptorokhoz kapcsolódó NBD-vel megnövelte a 2,4-D-indukálta GST és *masI'*::GUS aktivitást, bizonyítva, hogy a gáznemű hormon az auxinnal ellentétes hatást fejt ki a heterotróf szövetekben. Ebből arra következtethetünk, hogy a 2,4-D megemelte mind az etilén, mind a GST bioszintézisét, de az etilén hatásai között szerepel bizonyos gének expressziójának gátlása, köztük *GST* géneké is.

Az autotróf szövetekben ellenben a GST aktivitást a norbornadién kezelés nem befolyásolta. Az autotróf vonalakban tapasztalt magasabb GST aktivitás eredhet pl. az expresszációjuk folyamatára kifejtett auxin-etilén interakció megváltozásából, ami a transzkripciós faktorok szintézisének és lebontásának aránymódosulásából ered.

Az etilén receptorok gátlása még alacsonyabb *masI'*::GUS aktivitást eredményezett az autotróf szövetekben, és nem mutatott 2,4-D koncentrációtól való függőséget. Ez arra utal, hogy az auxin autotróf kalluszokban elsődlegesen az etilén a felelős a *masI'* promóter aktivitásának indukciójáért. Arra következtethetünk, hogy a *masI'* promóter aktivitása az autotróf szövetekben elsődlegesen etilén kontroll alatt áll, míg a heterotróf szövetekben sokkal inkább auxin befolyása alatt van.

7. Summary

- Auxin autotrophic callus tissues from the leaf protoplasts of transgenic *Nicotiana tabacum* SR1 plants involving *masI'*::GUS gene fusion were generated by transferring microcolonies onto MS medium without IAA and 2,4-D. After several passages the calli growing well on auxin-free medium were selected as auxin autotrophic lines. During this process, which is called habituation, the cells regain the auxin synthesizing capacity and they are able to grow on an auxin-free culture media. The growth of the autotrophic cells exhibits a longer logarithmic, “rapid growth” phase: the fresh weight of the tissues growing on auxin-free medium were less than that of the heterotrophic calli growing in the presence of IAA and 2,4-D, but at the end of the 3rd week the difference disappeared. Their sensitivity to the auxin content in the medium had been changed; the exogenous auxin inhibited their growth.
- The investigation of changes in the IAA metabolism the activity staining for aldehyde oxidase (AO) after native PAGE separation revealed, that the isoenzyme pattern of AO was different in the two types of calli. AO2 exhibited a very strong staining in the heterotrophic tissues using indole-3-aldehyde (IAld) as a substrate, suggesting that in the IAA degradation pathway the oxidation of IAld catalysed by AO2 has an important role. This enzyme could be involved also in the IAA biosynthesis. Using the indole-3-acetaldehyde substrate we demonstrated, that this activity is present in the heterotrophic calli either, which means that the lack of the IAA synthesis of the cultured cells is not due to the limiting AO activity. However, in the autotrophic calli a new isoenzyme (AO1) could be detected, which had considerable activity toward IAld substrate. It is possible, that this newly activated enzyme – which is regulated possibly in a different way – is involved in the synthesis of IAA and in the auxin-independent growth of the autotrophic tissues.
- With the increasing temperatures, the growth rate was elevated at a higher degree in the auxin autotrophic calli than in the heterotrophic cultures: while the heterotrophic

calli was already damaged at 35°C, the fresh weight of autotrophic tissues was significantly higher and, compared to the 30°C, they grew even better. This indicates, that the autotrophic and heterotrophic lines of tobacco calli differ not only in their hormone metabolism, but also in their stress tolerance.

Supplying the medium with different NaCl and KNO₂ concentrations resulted significant differences in the growth of the two cultures and verified the enhanced abiotic stress resistance of the auxin autotrophic lines.

The oxidative stress and the enhanced production of active oxygen species is common component of these different types of abiotic stresses. For further investigation of the stress tolerance of the autotrophic tissues, we have chosen 100 mM NaCl treatment, which did not influence the growth of the autotrophic cells very much after 2 weeks, but resulted a significant, ca. 30 % growth inhibition in the heterotrophic ones.

4. Determination of the Na⁺ concentrations of the 2-week-old calli resulted in similar contents in the two types of tissues and indicated, that the Na⁺ uptake of the autotrophic tissues was not inhibited. The levels of K⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ was higher in the autotrophic cultures, but the total Fe, which has a role in the generation of OH· radicals, was lower. NaCl treatment elevated the differences between the cultures. These results suggested, that processes leading to the altered ion homeostasis were activated in the autotrophic calli, which could maintain the growth of the cells even under stress conditions.
5. Comparison of the superoxid dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the two lines revealed about 50 % lower activities in the autotrophic tissues than in the heterotrophic lines, their H₂O₂ content was lower either. After NaCl stress the activity of the H₂O₂ scavenging catalase enhanced only in the heterotrophic calli; the autotrophic tissues probably activate other antioxidant mechanisms, which could lead to even lower H₂O₂ level after salt stress.
Similarly, the activity of GR is induced by NaCl in the heterotrophic calli, while in the autotrophic lines we could measure lower values and there were no significant changes after 2 weeks of salt treatment.

6. The guaiacol peroxidase activity was higher in the autotrophic tissues. One of the most important roles of peroxidases in plant cells is to catalyze the cross-linking of cell wall components and in this way to restrict the expansion of the cells. The differences in cell wall-bound peroxidase activity may be responsible for the different growths of the heterotrophic and autotrophic lines. The covalently bound peroxidase activity increased about 4 times in the presence of 100 mM NaCl in the heterotrophic tissues, but not in the autotrophic cells. The elevated enzyme activity may explain why the auxin autotrophic line grew slowly, but the growth inhibition caused by NaCl was smaller in the autotrophic than in the heterotrophic tissues.
Determination of the activity of peroxidases with IAA substrate resulted in similarly higher activities in the autotrophic tissues, and this was induced further by NaCl treatment. It suggests, that this activity is under the control of the stress-induced elements rather than the endogenous level of IAA.
7. The glutathione S-transferase (GST) activity was higher in the autotrophic line. The GSTs play an important role in the detoxification mechanism by catalyzing the GSH conjugation of toxic substances under stress. Some isoenzymes of GSTs have been shown to exhibit considerable GSH-PX activity. The plant GSH-PXs are induced by different stresses and their function can be the reduction of alkyl hydroperoxides, such as fatty acid hydroperoxides, and in this way to maintain the membrane integrity.
8. Determination of GSH-PX activities with cumene hydroperoxide substrate resulted 5 times higher GSH-PX activities in the autotrophic than in the heterotrophic calli and it was induced during the salt stress. The level of MDA, a lipid peroxidation product in the tissues, was less in the autotrophic line and the amount of this product decreased further on NaCl treatment. These results indicate, that the autotrophic calli do possess a very effective acclimation mechanism, in which the elevation of the activities of the peroxidases, the GST and especially the GSH-PX play an important role.
9. The activities of the peroxidases and the GSTs could be influenced by ethylene. The heterotrophic tissues evolved much more ethylene with an early maximum on an auxin-containing culture medium and the cells increased the ethylene production in the presence of the salt, which can be important e.g. in the induction of peroxidases after NaCl treatment. The ethylene formation was much less in the autotrophic cultures, and

its level did not change significantly on NaCl treatment. Because the peroxidase activity was higher in this type of calli, it seems, that the role of the ethylene is different in the two cultures.

10. The activation of the defense mechanisms by the generation of AOS including H_2O_2 , which is an important part of the abiotic stress response, was the earliest proved in the case of the *GST* genes.

In order to reveal the sensitivities of the two lines to exogenous H_2O_2 , the calli were transferred onto fresh MS medium containing 0.1-10 mM H_2O_2 . The growth of the auxin heterotrophic calli decreased significantly at lower H_2O_2 concentrations. This proves that the autotrophic calli really do possess a more effective H_2O_2 -scavenging mechanism, but the concentration that activated the cell death at the two lines was the same.

There was a considerable induction in the GST activity of the heterotrophic tissues in the presence of 0.1-5 mM exogenous H_2O_2 , the activation of the GSH-PX was not so definite. The activities of the investigated enzymes were higher in the autotrophic calli, but with the increasing H_2O_2 concentrations the enzymes were not induced as much.

Several plant GST promoters have been found to contain *ocs* (octopine synthase) or *ocs*-like elements, which can be induced either by different kind of stresses and biologically active hormones, inactive hormone analogues.

11. The activities of wound- and auxin-inducible *masI'* promoter-driven GUS and GSTs were compared in our transgenic heterotrophic and auxin autotrophic lines growing on medium containing different exogenous IAA or 2,4-D concentrations. The autotrophic calli according to their growth proved to be more sensitive either to IAA or 2,4-D. The GST activity in the autotrophic calli was significantly higher than that in the heterotrophic tissues. The induction was much higher in the autotrophic calli and it was more pronounced following 2,4-D treatment. Comparison of the GUS activities in the heterotrophic and auxin autotrophic lines revealed lower *masI'*:GUS activities in the autotrophic calli, external auxin usually elevated the GUS activities. Comparing to the control, the induction of the GUS activity was 3-5 times higher in the presence of 2,4-D in the autotrophic tissues.

Supraoptimal auxin concentrations in the medium might induce ethylene production.

2,4-D, the synthetic auxin elevated the ethylene evolution in both of the cultures.

12. The GST activity of heterotrophic calli is under the control both of auxin and ethylene. GST activity was increased by different auxin concentrations; the presence of NBD increased further both the GST and *masI'*::GUS activities. This indicates that ethylene and auxin may counteract in the control of GST and GUS activities in the heterotrophic tissues. According to these results we can conclude, that the exogenous 2,4-D elevated the synthesis both of the ethylene and GST, but among the effect of ethylene is the decreasing of expression of specific genes, including *GST* genes.

However, in the autotrophic calli the presence of NBD had no significant effect on the GST activity. The higher GST activity in the autotrophic calli could be the result of e.g. changes of auxin-ethylene interaction on their expression processes, if the shift in the synthesis or degradation of the transcription factors involved in the regulation of auxin-induced genes.

Blocking the ethylene receptors in the autotrophic tissues resulted in an even lower *masI'*::GUS activity which did not exhibit a 2,4-D concentration dependence. This finding allows the conclusion that ethylene is primarily responsible for the induction of the *masI'* promoter activity in the auxin autotrophic tissues. It seems that the activity of the *masI'* promoter in the autotrophic lines is predominantly under the control of ethylene, while in the heterotrophic lines it is much more under the influence of auxin.

8. Felhasznált irodalmak jegyzéke

- Alonso J M, Stepanova A N, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel F M (2003) Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for *weak ethylene-insensitive* mutants in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 2992-2997
- Alscher R G, Erturk N, Heath L S (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J Exp Bot 53: 1331-1341
- Andrews J, Adams SR, Burton KS, Evered CE (2002) Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. J Exp Bot 53: 2185-2191
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 85: 235-241
- Asada K, Kuniaki K, Kyoko Y (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. J Biol Chem 249: 2175-2181
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. J Biol Chem 250: 5144-5149
- Bartling D, Radzio R, Steiner U, Weiler E W (1993) A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: Molecular cloning and functional characterization. Eur J Biochem 216: 579-586
- Beeor-Tzahar T, Ben-Hayyim G, Holland D, Faltin Z, Eshdat Y (1995) A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. FEBS Lett 366: 151-155
- Bennici A, Bruschi P (1999) Stability of habituation in *Nicotiana bigelovii* var. *bigelovii* shoots regenerated from habituated callus. Plant Sci 143: 195-199
- Bennici A, Buiatti M, Tognoni F, Rosellini D, Giorgi L (1972) Habituation in *Nicotiana bigelovii* tissue cultures: different behaviour of two varieties. Plant Cell Physiol 13:1-6
- Bianchi MW, Roux C, Vartanian N (2002) Drought regulation of *GST8*, encoding the *Arabidopsis* homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. Physiol Plant 116: 96-105
- Bilang J, Macdonald H, King P J, Sturm A (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. Plant Physiol 102: 29-34

- Bilang J, Sturm A (1995) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabelled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* 109: 253-260
- Bisbis B, Dommes J, Kevers C, Foidart J M, Penel C, Greppin H, Gaspar T (1999) Unusual pathway for the biosynthesis of aminolevulinic acid and tetrapyrrolic compounds, including peroxidases, and its relationship with the overproduction of polyamines and underexpression of ethylene in higher plants cancerous cell. *Plant Perox Newslett* 14: 55-68
- Bisbis B, Kevers C, Créche J, Rideau M, Gaspar T (1998) Differential growth dependency of normal and habituated sugarbeet cell lines upon endogenous ethylene production and exogenous ethylene application. *Physiol Plant* 103: 201-208
- Bouchet M, Gaspar T, Thorpe TA (1978) Soluble and cell wall peroxidases and auxin destruction in normal and habituated tobacco callus. *In Vitro* 14: 819-823
- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Van Montagu M, Inzé D (1989) The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J* 8: 31-38
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev in Plant Sci* 13: 199-218
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Printed by American Societies of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, Courier Companies, Inc
- Chammongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann Jr H, Van Montagu m, Inzé D, Van Camp W (1998) Defence activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5818-5823
- Charles S A, Halliwell B (1980) Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem J* 189: 373-376
- Chen R J, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson P H (1998) The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15112-15117

- Chen W, Chao G, Sing K B (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* 10: 955-966
- Cosgrove D J (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 391-417
- Cummins I, Cole D J, Edwards R (1997) Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pestic Biochem Physiol* 59: 35-49
- Cummins I, Cole D J, Edwards R (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J* 18: 285-292
- Curtis RW (1987) Antiethylene properties of AgNO₃ and 2,5-norbornadiene in light and dark in *Vigna radiata*. *J Plant Growth Regul* 6: 41-56
- Cséplő Á, Medgyesy P (1986) Characteristic symptoms of photosynthesis inhibition by herbicides are expressed in photomixotrophic tissue cultures of *Nicotiana*. *Planta* 168: 24-28
- Csiszár J, Szabó M, Tari I, Erdei L (2001) Control of the glutathione S-transferase and *mas1* promoter-driven GUS activity in auxin heterotrophic and autotrophic tobacco calli by exogenous 2,4-D-induced ethylene. *Physiol Plant* 113: 100-107
- Csiszár J, Szabó M, Erdei L, Márton L, Horváth F, Tari I (2003) Why do auxin autotrophic tobacco callus tissue resist oxidative stress: the importance of the glutathione S-transferase and peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic calli. *J Plant Physiol* (Accepted)
- Darvill A G, Albersheim P (1984) Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 243-275
- Dean J V, Gronwald J W, Anderson M P (1991) Glutathione S-transferase activity in nontreated and CGA-154281-treated maize shoots. *Z Naturforsch Teil C* 46: 850-855
- Dean J V, Gronwald J W, Eberlein C V (1990) Induction of GST isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol* 92: 467-473
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13454-13459
- del Poso J C, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* 280: 1760-1763

- Desikan R, Neill S J, Hancock J T (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Rad Biol and Med* 28: 773-778
- Desikan R, Reynolds A, Hancock J T, Neill S J (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 330: 115-120
- Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Botany* 32: 93-101
- Dickinson D A, Forman H J (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64: 1019-1026
- Diekmann W, Venis M A, Robinson D G (1995) Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3425-3429
- Doerner P, Jorgensen J E, You R, Steppuhn J, Lamb C (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380: 520-523
- Droog F (1997) Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and thau. *J Plant Growth Regul* 16: 95-107
- Dudits D, Bögre L, Bakó L, Dedeoglu D, Magyar Z, Kapros T, Felföldi F, Györgyey J (1993) Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division. In: *Molecular and cell biology of the plant cell cycle*. Eds.: Ormrod J C and Francis D, Kluwer Academic Publishers, pp 111-131
- Ederli L, Pasqualini S, Batini P, Antonielli M (1997) Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic content in tobacco plants. *J Plant Physiol* 151: 422-428
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5: 193-198
- Ehsan H, Reichheld J-P, Roef L, Witters E, Lardon F, Van Bockstaele D, Van Montague M, Inzé D, Van Onckelen H (1998) Effect of indomethacin on cell cycle dependent cyclic AMP fluxes in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* 422: 165-169
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100: 234-240
- Fernández-Cañón J M, Peñalva M A (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem* 273: 329-337

- Foyer C H, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 100: 241-254
- Frear D S, Swanson H R (1970) Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9: 2123-2132
- Fuerst E P, Gronwald J W (1986) Induction of rapid metabolism of metolachlor in sorghum (*Sorghum bicolor*) shoots by CGA-92194 and other antidotes. *Weed Sci* 34: 354-361
- Fuerst E P, Irzyk G P, Miller K D (1993) Partial characterization of glutathione S-transferase isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize. *Plant Physiol* 102: 795-802
- García-Florenciano E, Calderón A A, Pedreño M A, Muñoz R, Ros Barceló A (1991) The vacuolar localization of basic isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3-acetic acid catabolism. *Plant Growth Regul* 10: 125-138
- Gaspar T (1998) Plant can get cancer. *Plant Physiol Biochem* 36: 203-204
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Crévecœur M, Greppin H (1988) Biochemical characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Relationship with anatomy, habituation and organogenesis. *Potsdamer Forsh B* 57: 20-30
- Gautheret RJ (1939) Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C R Acad Sci Paris* 208: 118-120
- Gehring C A, Irving H R, Parish R W (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9645-9649
- Gonneau J, Mornet R, Laloue M (1998) A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol Plant* 103: 114-124
- Gray W M, del Pozo J C, Walker L, Hobbie L, Risseuw E, Banks T, Crosby W L, Yang M, Ma H, Estelle M (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13: 1678-1691
- Gronwald JW, Plaisance KL (1998) Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from *Sorghum*. *Plant Physiol* 117: 877-892

- Grossmann K, Kwiatkowski J, Tresch S (2001) Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.) J Exp Bot 52: 1811-1816
- Guevara-Garcia A, Lopez-Bucio J, Herrera-Estrella L (1999) The mannopine synthase promoter contains vectorial cis-regulatory elements that act as enhancers and silencers. Mol Gen Genet 262: 608-617
- Guevara-Garcia A, Lopez-Ochoa J, Lopez-Bucio J, Simpson J, Herrera-Estrella L (1998) A 42 bp fragment of the pmas1 promoter containing an ocs-like element confers a developmental, wound- and chemically inducible expression pattern. Plant Mol Biol 38: 743-753
- Guilfoyle T (1998) Aux/IAA proteins and auxin signal transduction. Trends in Plant Sci 3: 205-207
- Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, Murfett J (1998) How does auxin turn on genes? Plant Physiol 118: 341-347
- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 246: 7130-7139
- Hagège D, Kevers C, Boucaud J, Duyme M, Gaspar T (1990) Polyamines, phospholipids and peroxides in normal and habituated sugarbeet calli. J Plant Physiol 136: 641-645
- Hagège D, Kevers C, Gaspar T (1991) A comparison between ethylene production, ACC and mACC contents, and hydroperoxide level in normal and habituated sugarbeet calli. Physiol Plant 82: 397-400
- Hagège D, Kevers C, Geuns J, Gaspar T (1994) Ethylene production and polyamine content of fully habituated sugarbeet calli. J Plant Physiol 143: 722-725
- Halliwell B, Gutteridge J M C (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford ISBN 0-1985-5294-7
- Harper R M, Stowe-Evans E L, Luesse D R, Muto H, Tatematsu K, Watahiki M K, Yamamoto K, Liscum E (2000) The *NHP4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. Plant Cell 12: 757-770
- Hatfield R D, Ralph J, Grabber J H (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. J Sci Food Agric 79: 403-407
- Hendricks T H, van den Berg B M, Schram A W (1985) Cellular location of peroxidase isoenzymes in leaf tissue of *Petunia* and their affinity for Concanavalin A-Sepharose. Planta 164: 89-95

- Hirt H (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 2: 11-15
- Ievins G, Valcina A, Ozola D (1995) Induction of ascorbate peroxidase activity in stressed pine (*Pinus sylvestris* L.) needles: a putative role for ethylene. *Plant Sci* 112: 167-173
- Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 6: 153-158
- Ishige F, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1993) Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. *Plant Physiol* 101: 193-199
- Ito H, Kimizuka F, Ohbayashi A, Matsui H, Honma M, Shinmyo A, Ohashi Y, Caplan A B, Rodriguez R L (1994) Molecular cloning and characterization of two complementary DNAs encoding putative peroxidases from rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Cell Rep* 13: 361-366
- Itzhaki H, Maxon J M, Woodson W R (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione S-transferase (GST1) gene, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8925-8929
- Jablonkai I (1997) Chemical catalysis of the isomerization of a peroxidising herbicidal thiadiazolidine. In *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, pp. 771-776, British Crop Protection Council, Farnham, UK
- Jabs T, Dietrich R A, Dangel J L (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-1856
- Jackson J A, Lyndon R F (1990) Habituation: cultural curiosity or developmental determinant? *Physiol Plant* 79: 579-583
- Jefferson R A (1987) Fluorogenic assay for β -glucuronidase. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
- Joo J H, Bae Y S, Lee J S (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism *Plant Physiol* 126: 1055-1060
- Kakimoto T (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985
- Kang B G, Newcomb W, Burg S P (1971) Mechanism of auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol* 47: 504-509
- Kevers C, Bisbis B, Faivre-Rampant O, Gaspar T (1999) Putrescine metabolism in fully habituated nonorganic sugarbeet callus and its relationship with growth. *J Plant Physiol* 154: 503-508

- Koshiba T, Mito N, Miyakado M (1993) L- and D-tryptophan aminotransferases from maize coleoptiles. *J Plant Res* 106: 25-29
- Koshiba T, Saito E, Ono N, Yamamoto N, Sato M (1996) Purification and properties of flavin- and molibdenium-containing aldehyde oxidase from maize coleoptiles. *Plant Physiol* 110: 781-789
- Köves E, Szabó M (1987) Ethylene production in habituated and auxin-requiring tobacco callus. Does ethylene play a role in the habituation? *Physiol Plant* 69: 351-355
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langridge W H R, Fitzgerald K J, Koncz Cs, Schell J, Szalay A A (1989) Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase gene is regulated by plant growth hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3219-3223
- Lehman A, Black R, Ecker J R (1996) *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* 85: 183-194
- Leyser H M O, Lincoln C A, Timpte C, Lanner D, Turner J, Estelle M (1993) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme, E1. *Nature* 364: 161-164
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Li Z-S, Zhao Y, Rea P A (1995) Magnesium adenosine 5'-triphosphate-energized transport of glutathione S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol* 107: 1257-1268
- Li Z-S, Alfenito M, Rea P, Walbot V, Dixon R A (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45: 689-693
- Liscum E, Reed J W (2001) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 49: 387-400
- Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M, Frohnmeier H (2000) Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures
- Macdonald H (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiol Plant* 100: 423-430
- Macdonald H, Jones A M, King P J (1991) Photoaffinity-labeling of soluble auxin-binding proteins. *J Biol Chem* 266: 7393-7399

- Madlung A, Behringer F J, Lomax T L (1999) Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. *Plant Physiol* 120: 897-906
- Marrs K A, Alfenito M R, Lloyd A M, Walbot V (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375: 397-400
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Armhein N (1993) ATP/dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
- Matsuda Y, Okuda T, Sagisaka S (1994) Regulation of protein-synthesis by hydrogen peroxide in crowns of winter-wheat. *Biosci Biotech Biochem* 58: 906-909
- May M J, Leaver C J (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* 103: 621-627
- May M J, Vernoux T, Leaver C, Van Montague M, Inzé D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49: 649-667
- Meins F Jr (1983) Heritable variation in plant tissue culture. *Ann Rev Plant Physiol* 34: 327-346
- Michalchuk L, Druart P (1999) Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil® cherry rootstock (*Prunus insica* x *serrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, nonembryogenic calli of *Prunus insica* x *serrula* and *Prunus domestica*. *Physiol Plant* 107: 426-432
- Miller C O, Skoog F, Okumura M H, Von Saltza H, Strong F (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77: 1392-1393
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci* 7: 405-410
- Morgan PW, Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* 100: 620-630
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa (1992) Tobacco BY-2 cell line as the „HeLa” cell in the biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132: 1-30

- Nakajima H, Yokota T, Natsumozo T, Noguchi M, Takamasi N (1979) Relationship between hormone content and autonomy in various autonomous tobacco cells cultured in suspension. *J Plant Cell Physiol* 29: 1489-1499
- Neill S J, Desikan R, Clarke A, Hurst R D, Hancock J T (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247
- Nobécourt P (1939) Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C R Soc Biol* 130: 1270-1271
- Noctor G, Foyer C H (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer C H (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann Jr H, Kangasjärvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis* rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signalling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849-1862
- Peck S C, Kende H (1995) Sequential induction of ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant Mol Biol* 28: 293-301
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen G J, Grill E, Schroeder J I (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Polle A (2001) Dissecting the superoxide dismutase – ascorbate – glutathione – pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 126: 445-462
- Prasad T K, Anderson M D, Martin B A, Stewart C R (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- Quiroga M, Guerrero C, Botella M A, Barceló A, Amaya I, Medina M I, Alonso F J, de Forchetti S M, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127
- Reed J W (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 6: 420-425
- Reinemer P, Prade L, Hof P, Neuefeind T, Huber R, Zettl R, Palme K, Schell J, Koelln I, Bartunik H D, Bieseler B (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-

- transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J Mol Biol* 255: 289-309
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray J A H (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544
- Romano C P, Cooper M L, Klee H J (1993) Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 5: 181-189
- Rogg L E, Bartel B (2001) Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Developmental Cell* 1: 595-604
- Roxas V P, Lodhi S A, Garrett D K, Mahan J R, Allen R D (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 41: 1229-1234
- Ruegger M, Dewey E, Gray W M, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12: 198-207
- Sagi M, Omarov R T, Lips S H (1998) The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci* 135: 125-135
- Scherer G F E, André B (1989) A rapid response to a plant hormone: Auxin stimulates phospholipase A₂ in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 111-117
- Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116: 687-693
- Sharma Y K, Leon J, Raskin I, Davis K R (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5099-5104
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305-1319
- Sisler E C, Serek M (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol Plant* 100: 577-582
- Sitbon F, Dargeviciute A, Perrot-Rechenmann C (1996) Expression of auxin-inducible genes in relation to endogenous indoleacetic acid (IAA) levels in wild-type and auxin-overproducing transgenic tobacco plants. *Physiol Plant* 98: 677-684

- Smith I K, Vierheller T L, Thorne C A (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 175: 408-413
- Stals H, Inzé D (2001) When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Sci* 6: 359-364
- Stearns J C, Glick B R (2003) Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotech Adv* 21: 1-18
- Stefanov I (1992) Ph.D. Thesis, József Attila Tudományegyetem, Szeged, Hungary
- Stepanova A N, Ecker J R (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol* 3: 353-360
- Syono K (1979) Correlation between induction of auxin nonrequiring tobacco calluses and increase in inhibitor of IAA-destruction activity. *Plant Cell Physiol* 20: 29-42
- Szabó M, Tari I, Köves E (1981) Indoleacetic acid oxidase activity in heterotrophic and autotrophic (habituated) tobacco callus tissues. *Biochem Physiol Pflanz* 176: 691-699
- Szabó M, Köves E, Stefanov I, Molnár J (1994) Auxin autotrophy of *Nicotiana tabacum* tissue cultures originating from protoplasts. *Biol Plant* 36 (suppl) S40 p 134
- Taiz L, Zeiger T (1998) *Plant Physiology*. Sunderland, MA, USA, Sinauer Associates Inc
- Takahashi Y, Kuroda H, Tanaka T, Machida Y, Takebe I, Nagata T (1989) Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G₀ to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9279-9283
- Takahashi Y, Nagata T (1992) parB: An auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 56-59
- Talalay P, De Long M J, Prochaska H J (1988) Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8261-8265
- Tari I, Mihalik E (1998) Comparison of the effects of white light and the growth retardant paclobutrazol on the ethylene production in bean hypocotyls. *Plant Growth Regul* 24: 67-72
- Tieman D M, Taylor M G, Ciardi J A, Klee H (2000) The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5663-5668
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J (1994) The *ocs* element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogs. *Plant Mol Biol* 26: 1055-1064

- Ulmasov T, Ohmiya A, Hagen G, Guilfoyle T J (1995) The soybean *GH2/4* gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol* 108: 919-927
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J (1997) ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5844-5849
- Upadhyaya A, Sankhla D, Davis T D, Sankhla N, Smith B N (1985) Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *J Plant Physiol* 121: 453-461
- Vallelian-Bindschedler L, Schweizer P, Monsinger E, Metraux J-P (1998) Heat-induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species. *Phys Mol Plant Pathol* 52: 185-199
- Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 3: 330-334
- Venis M A, Thomas E W, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G, Guern J (1990) Impermeant auxin analogues have auxin activity. *Planta* 182: 232-235
- Vranová E, Inzé D, Van Berusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227-1236
- White PR (1939) Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am J Bot* 26: 59-64
- Wightman F, Forest J C (1978) Properties of plant aminotransferases. *Phytochemistry* 17: 1455-1471
- Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D, Langebartels C, Sandermann H Jr (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol* 106: 1007-1014
- Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11795-11800
- Zettl R, Schell J, Palme K (1994) Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido[7-³H]indole-acetic acid: Identification of a glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 689-693
- Zhang B, Shing KB (1994) *Ocs* element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2507-2511

Zhang K, Letham D S, John P C (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2-12

Zhu J-K (2001) Plant salt stress tolerance. *Trens Plant Sci* 6: 66-71

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a Növényélettani Tanszék jelenlegi és korábbi tanszékvezetőinek, Dr. Erdei Lászlónak, Dr. Zsoldos Ferencnek és Dr. Köves Erzsébetnek, akik bizalmat szavaztak nekem, és segítettek munkámat az elmúlt időszakban.

Különösen hálás vagyok témavezetőm, Dr. Szabó Margit, és Dr. Tari Irma felbecsülhetetlen szakmai és erkölcsi támogatásáért, türelmes tanításáért, amelyet szakdolgozó (egyetemi hallgató) korom óta folyamatosan tapasztalhattam.

Köszönettel tartozom a Növényélettani Tanszék minden tagjának, akik a közvetlen munkahelyi légkör megteremtésén túl a kísérletek elvégzésében pótolhatatlan segítséget nyújtottak. Hálával tartozom az asszisztenseknek precíz és áldozatos munkájukért, amellyel segítettek a kísérletek gyors és hatékony kivitelezését, különösen Ádámné Meszlényi Máriának, Hegyesiné Tandari Máriának, Kispálné Szabó Ibolyának, Ördög Mónikának és Vári Sándornének, és mindenkinek, akiket név szerint nem említettem meg.

Köszönöm Horváth Ferencnek és Dr. Pécsváradi Attilának a számítógép rejtelmeinek megismerésében és használatában nyújtott segítségét, valamint a hallgatók érdeklődését és lelkesedését, ami kitartó munkára készítet.