

VIZSGÁLATOK TERMÉSZETES NÖVÉNYI FENOLVEGYÜLETEK
NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓ HATÁSÁVAL KAPCSOLATBAN

Doktori értekezés

Készítette:

JUHÁSZ ANNA

biológus

A JATE NÖVÉNYÉLETTANI TANSZÉKEN

Szeged, 1975.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	1. oldal	
Kísérleti anyagok és módszerek	6.	"
Kísérleti eredmények	20.	"
I. Fenolkarbonsavak által indukált. növekedés	20.	"
II. Fenolkarbonsavak hatása bab hi- peketil-szegmentek NS-tartalmára	20.	"
III. Növényi fenolkarbonsavak hatá- sa hipeketil szövet fehérjefrak- cióinak jelölődésére DL-leucin - 14-C jelenlétében. Fehérjefrak - cionálás Sephadex QAE A-50 osz - lepkromatográfiával	24.	"
IV. Az első frakció vizsgálata pe - liakrylamid gél-elektroferézis - sel	36.	"
Kísérleti eredmények értékelése	39.	"
Összefoglalás	49.	"
Irodalom	53.	"

BEVEZETÉS

A növényi fenolvegyületek növekedésre gyakorolt hatása, valamint az auxinokkal való együttthatalása közismert és a növekedésszabályozás intenzíven kutatott területei közé tartozik. A fenolvegyületek akkor kerültek az érdeklődés előterébe, amikor felismerték kofaktor szerepüket az IES enzim exidációjának szabályozásában.

Hosszú ideig a növekedéssel foglalkozó kutatók e fent említett hatásnak tulajdonították a növekedés szabályozásában betöltött szerepüket. Vannak adatok, amelyek arra utalnak, hogy a növényi fenolvegyületek által kifejtett hatást nem lehet egyszerűen az IES szint növelésével magyarázni; ilyen pl. a klorogénsav és az IES szinergizmusának mértéke /KÖVES/ 1965/ Az IES és a klorogénsav bizonyos koncentrációi ugyanis ha együttesen adagoljuk, nagyobb növekedést okoznak hipokotil tesztben, mint az auxin optimális koncentrációban. ABERG és JOHANSSON /1969/ eredményei a fenti következtetést megerősítették. Megállapították, hogy a vanillinsav egyaránt fekezta a zab koleoptil és a búzagyökér növekedését 10^{-4} - 10^{-5} M koncentrációban. Ez az eredmény arra mutat, hogy

nem az auxin által közvetített hatásról van szó.

RAA /1971/ bebizonyította, hogy az enzimszint nem limitálja az oxidáció intenzitását fiziológias koncentrációnál. Tehát feltehetően az endogén IES-oxidáz nem vesz részt döntően az endogén IES-szint kialakításában. P-kumársavval végzett kísérletei alapján ez a kofaktor in vivo rendszerben fiziológias koncentrációban nem fejt ki az enzimre aktiváló hatást.

Felmerült, hogy a serkentő vagy gátló hatást nem maga a fenolvegyület, hanem annak metabolitja váltja ki. pl. ABERG és JOHANSSON /1969/ vanillin és vanillinsavnál ugyanazt a hatást tapasztalták.

A fenti kérdések megoldása nem választható el a megnyúlásos növekedés általános kérdéseitől. A molekuláris biológia a növekedés fogalmában is új koncepciót alakított ki. A növekedés-fejlődés jelenségét úgy fogja fel, mint a genetikai anyag információiban foglalt utasítások megvalósulását. Ez a koncepció vezetett ahhoz, hogy tisztázzák a növekedés-fejlődési folyamatok, a nukleinsav és a fehérjeszintézis kapcsolatát.

A növényi fenolvegyületek auxinnal való

együtthatása és egyes esetekben saját növekedést szabályozó hatása azt a feltevést sugallja, hogy direkt vagy indirekt úton ezek is beavatkoznak a fehérjeszintézisbe. A fenolvegyületek fehérjeszintézissel való kapcsolatát eddig igen kevesen vizsgálták./GREEF 1964, PAPURS 1967, CORREA 1969, BURLEIGH és SMITH 1970/ Az intézetünkben folyó ilyen irányú vizsgálatokat MILASSIN /1971/ kezdte diplomadolgozata keretében.

Vizsgálatait a növényekben természetesen is előforduló szalicilsav, o-kumársav, p-oxi-benzoesav, galluszsav és klóregénsavval végezte. Megállapította, hogy a fent említett fenolkarbonsavak fiziológiás koncentrációban alkalmazva mérsékelt, de határozott növekedésserkentést okoznak, szegmensekben és intakt hipeketilekben egyaránt bab esetében 5×10^{-4} - 10^{-5} M koncentrációban. Általában a növekedésserkentés és a fehérjeszint között pozitív korreláció van - nagyobb mértékű megnyúlást magasabb fehérjetartalom kíséri - csupán a szalicilsav és a ferulasav csökkentette bizonyos koncentrációban a hipeketilek fehérjetartalmát. A fenolvegyületek fehérjeszintézist befolyásoló szerepére vonatkozóan a következő eredményeket kapta az említett koncentrációk alkalmazása esetén.

1. P-exi-benzoésav a jelzett leucin beépülését, tehát a fehérjeszintézist fekozza a szegmentekben, ezzel egyidejűleg magas fehérjetartalom mutatható ki.

2. Szalicilsav és o-kumársavval kezelt szegmentek kontroll körüli fehérjetartalma magas aminosav beépülési százalékkal párosult.

3. A klorogénsav csökkent aminosav beépülést és magas fehérjetartalom emelkedést okozott.

4. Ferulasav esetében a fehérjeszintézis kisebb mértékű gátlása mutatkozik.

Ezen előzmények után a következő célt tűztük ki a dolgozatban.

Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a ferulasav, galluszsav, p-exi-benzoésav, szalicilsav, o-kumársav és klorogénsav 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációit, hogy hogyan hatnak bab hipeketil-szegmentek össz. nukleinsav /RNS, DNS/ tartalmára.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy 5×10^{-5} M koncentrációjú fenelkarbensavval kezelt hipeketil-szegmentek DL-leucin-14-C-vel való inkubációja esetén milyen fehérjefrakciókat kapunk és mely frakciókba épül be a 14-C. Ebből kitűnik, hogy van-e specifikus frakció, ahol a 14-C beépülés kiemelkedő mértékű, vagy a beépülés minden frakcióban egyformán érvénye-

sül.

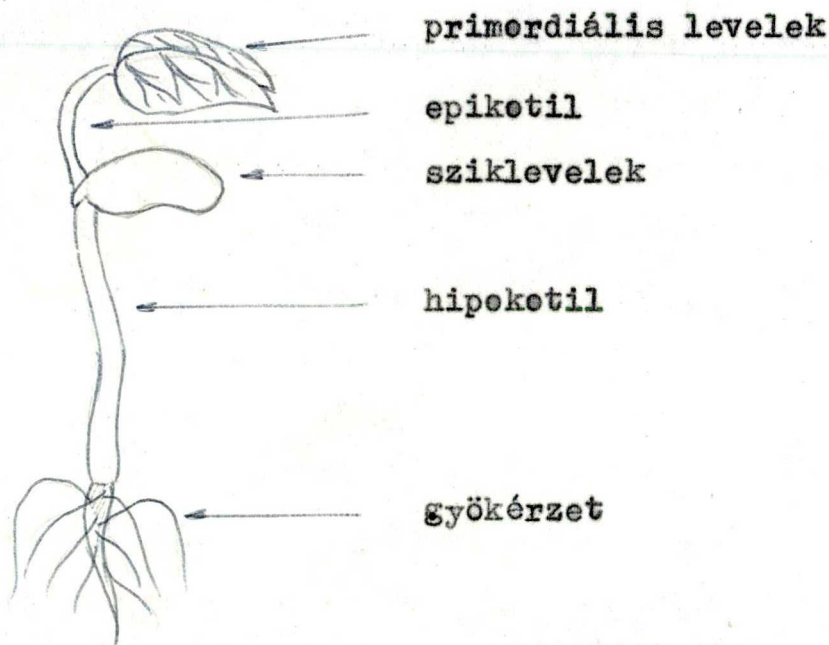
A dolgozat utolsó pontjaként amennyiben beszélhetünk specifikus frakcióról, megvizsgáljuk e frakciók homogenitását, valamint megpróbálunk választ kapni, hogy ez a specifikus fehérje milyen molekulasúlyú lehet.

KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Kísérleti objektumként felhasznált növények és vegyületek

1. Kísérleti objektum

Phaseolus vulgaris /bab/ csiranövények morfológiai jellemzése



1. ábra. Phaseolus vulgaris csiranövény morfológiája

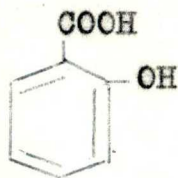
Kísérleteinkhez " Fehér gyöngy " /Phaseolus vulgaris/ bekerbabot használtunk. A babot Petri-csészében, nedves szűrőpapíron 24°C hőmérsékleten 48 órára keresztül csiráztattuk termosztátban. Az egyfer-

ma gyökérhosszúságú csirázó babszemeket csapvízzel öntözött perlitbe ültettük és 25°C-en 4 napig 4000 lux fényintenzitáson neveltük. A 4 napos csiranövények hipokotiljeiből 4 cm hosszúságú szegmenteket vágunk ki / a 4 cm-t mindig a sziklevéltő számítottuk / és használtuk fel a kísérletekhez.

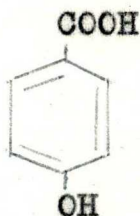
2. A hatásmód szempontjából vizsgált vegyületek

Kísérleteinkben felhasznált és az alábbiakban feltüntetett növényi fenolvegyületek REANAL, illetve MERCK gyártmányúak.

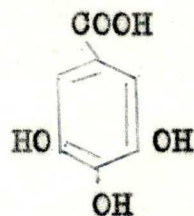
Benzooesav származékok



szalicilsav

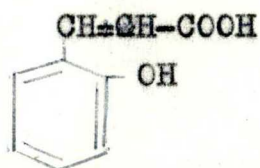


p-oxi-benzooesav

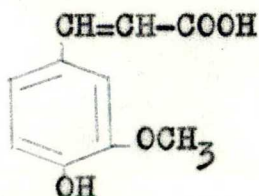


galluszsav

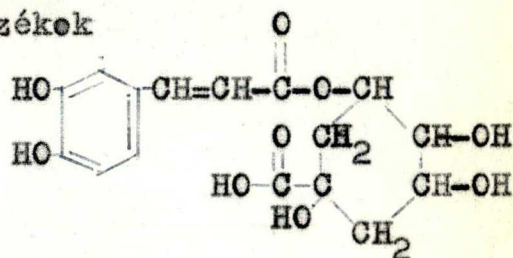
Fahéjsav származékok



o-kumársav



ferulasav

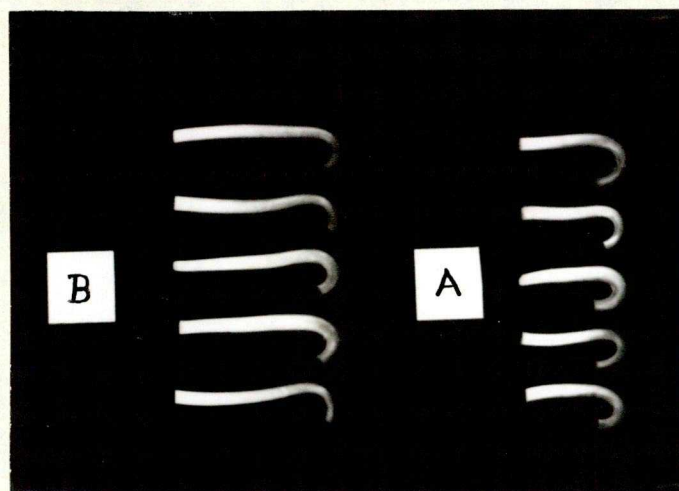


kleregénsav

A fenelkarbonsavakat 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációban alkalmaztuk.

3. Fenelkarbonsavak által indukált növekedés mérése

24°C -en termosztátban 4 cm hosszúságú hi-pekotileket 9 cm átmérőjű Petri-csészében úsztattunk, amely 10 ml 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M fenelkarbonsavas inkubáló oldatot tartalmazott. Ezután a hipekotil növekedését a kezdeti és végső hosszúság mérése alapján megállapítottuk.



2. ábra Bab hipekotilek növekedése

A: inkubálás előtt

B: 10^{-4} M klóregénsavval történő inkubálás után

4. A fehérje frakcionálásához és az aminosav beépülésének vizsgálatához használt anyagok

QAE Sephadex A-50

Sephadex G-25 Coarse

Bovine serumalbumine /standard vegyület/

DL-leucin-14-C /Radiochemical Centre, A-

mersham, Anglia/ spec. aktivitás:10,84

mCi/mM

A készülék rajzát a 3. ábra szemlélteti.

5. A polyacrilamid gél-elektroferézishez használt vegyületek

Albumin aus Rinderblut /Bovine Albumin/

Ms: 69 000 /MERCK/

Chymotripsine Ms: 21 000

γ -Globulin aus Rinderblut /Bovine -gle-
bulins/ Ms: 160 000 /MERCK/

Ribonuclease Ms: 13 000 /REANAL/

Cyanogum 41 /Acrylamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ +
N'N'-Methylenbisacrylamid, SERVA/

Dimethylaminopropionitril /DNPN/ SERVA

Ammoniumperszulfát $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Ms:228,21

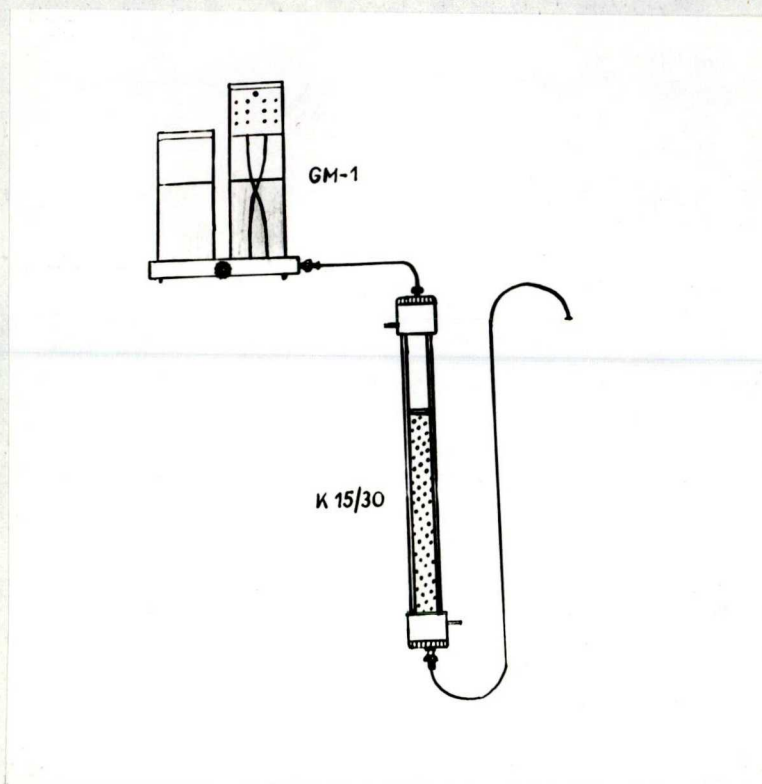
Brómfenolkék

Comassie brilliant blue /MERCK/

Sodium dodecil sulphate /SDS/

II. RNS és DNS mennyiségi meghatározása /BROUGHTON 1970/

5 g bab hípetölt kvarchemekkel és 10 ml



3. ábra. A használt gradiens elúciós rendszer:
GM-1 keverővel és K 15/30-as oszlop-
pal. /PHARMACIA/

hideg metanellal homogenizáltunk. Ezután 10 percig hűtőszekrényben 0°C -en extraháltuk, majd 10 ml hideg metanellal átmostuk. 20 percig 5 000 g-vel centrifugáltuk, a szupernatanst leöntöttük, a maradékot pedig 20 ml hideg 15%-os TCA-val 30 percig 0°C -en extraháltuk. Az extrahálást centrifugálás követte 20 percig 5 000 g-vel. A szupernatanst eltávolítottuk és a maradékot 20 ml forró metanellal 15 percig vízfürdőn, etanol:éter 1:1 arányú keverékével 15 percig/a zsírok eltávolítása céljából/ extraháltuk, majd az oldatot leszűrtük. A maradékhoz 12 ml 1/15 M foszfát puffert /pH 7,4/ és 3 ml 3 M NaOH-t adtunk, majd 60°C -en 60 percig inkubáltuk. Az inkubálási idő elteltével 0°C -ra tettük 20 percig, majd 9 ml jéghideg 3 M HClO_4 -et adtunk hozzá és 60 percig 0°C -en inkubáltuk, majd ezt centrifugálás követte, 0°C -en 10 000 g-vel 15 percig/

A felülúszót leöntöttük /A/, a csapadékot pedig 5 ml 0,3 M jéghideg HClO_4 -el átmostuk, majd centrifugáltuk. A felülúszót az "A"-hoz öntöttük, majd 10x-es hígításban 260 nm-en UV-ben mértük az OD-t. Ebből a mintából az RNS OD-jét tudtuk meghatározni.

A csapadékhoz 10 ml 0,3 M HClO_4 -et adtunk, és 20 percig 100°C -en hidrolizáltuk. Lehűlés után

260 nm-en 3x-es higitásban mértük a DNS OD-jét. Az RNS kalibrációs görbe a 4. ábrán látható. A DNS kalibrációs görbét az 5. ábra szemlélteti. A fent leírt módszerrel nyert kivonat meglehetősen tiszta NS-t tartalmazott. Ezt a 6. ábra mutatja.

III. Protein meghatározása és frakcionálás

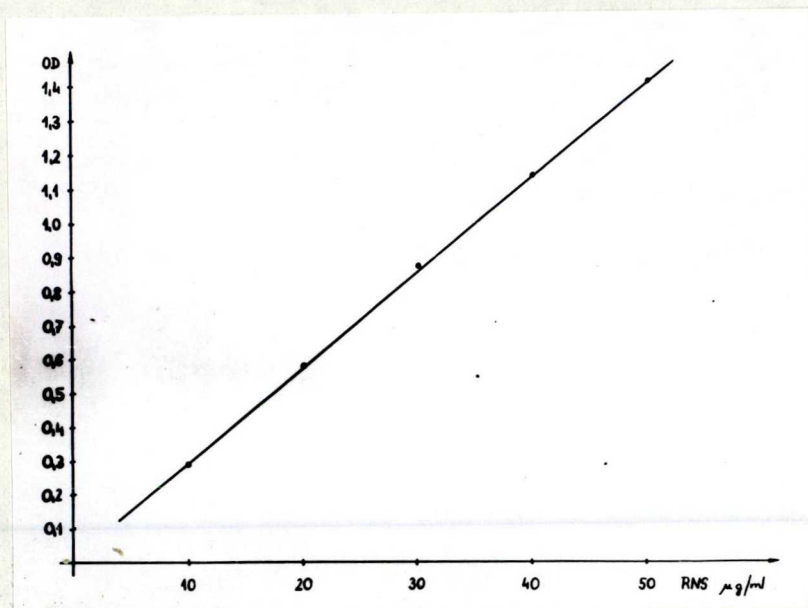
1. Fehérjepreparátum készítése

1 g /5db/ 4 cm-es bab hipokotil-szegmentet homogenizáltunk 1,5 ml 50 mM /pH 7,6/ TRIS-HCl pufferben. A homogenizátumot 20 percig 5 000 g-vel centrifugáltuk. A protein a szupernatansban maradt, amit dialízis után használtunk fel frakcionálásra.

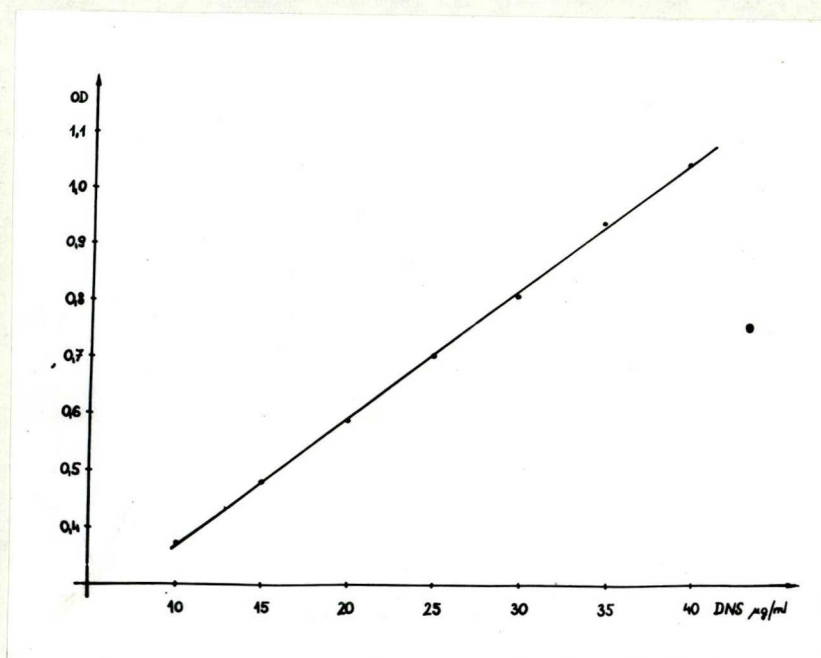
2. Fehérjefrakcionálás /ATKIN és SRIVASTAVA 1970/

A frakcionálás QAE Sephadex A-50 oszlopon történt. A frakcionáláshoz 1,5 cm átmérőjű, 30 cm hosszúságú oszlopot használtunk. Az oszlop megtöltéséhez QAE Sephadex A-50-et, védőréteggént pedig Sephadex G-25 Coarse-t, az equilibráláshoz 0,1 M TRIS-HCl /pH 6,5/ puffert alkalmaztunk.

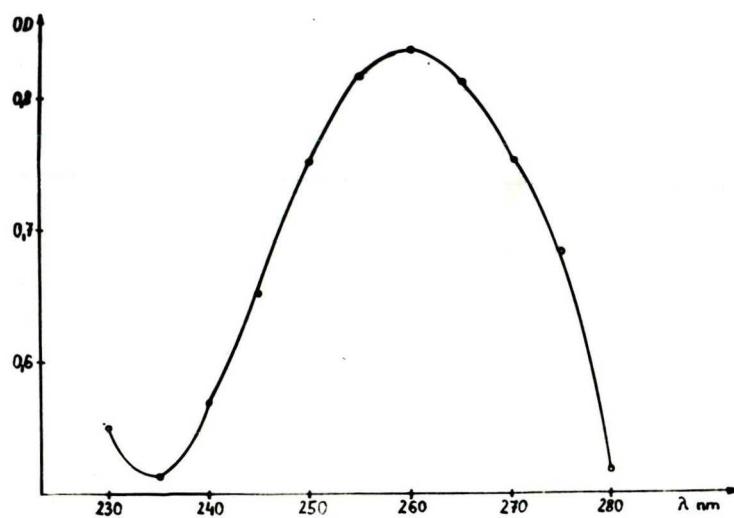
Az oszlop megtöltéséhez QAE Sephadex A-50-t 60 percig forró vízfürdőn előduzzasztottuk. Ezután az oszlopot 24 órán át 0,1 ml TRIS-HCl /pH 6,5/ puf-



4. ábra. RNS hitelesítő görbéje 260 nm-es hullámhossznál /Spektromom 202/



5. ábra. Csirkevér-DNS hitelesítő görbéje 260 nm-es hullámhossznál /Spektromom 202/



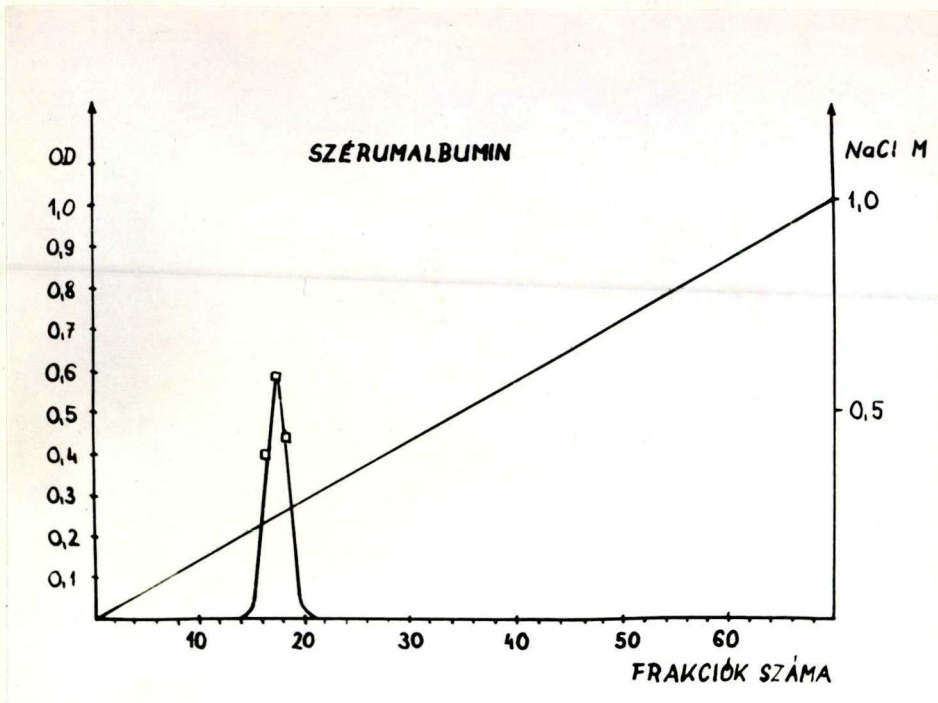
6. ábra. Bab hipeketilből készült nukleinsav
kivonat UV-abszorpció s görbéje.
/Spektromom 202/

ferrel equilibráltuk. Védőréteggént 0,5 cm vastagságban Sephadex G-25 coarse gél-t vittünk az oszlop tetejére.

A védőréteg felett úgy távolítottuk el a puffert, hogy csak egy cm vastagságú fedje az oszlopot. Ezután a gélre 1 ml fehérje-mintát vittünk fel. Megvártuk, míg a fehérje bediffundál a gélbe és megindítottuk a puffer adagolását. Az "A" puffert /TRIS-HCl pH 7,6/ tartalmazó tartályt összekötöttük a "B" puffert /1 M NaCl/ tartalmazó tartállyal. Az "A" pufferben keverést alkalmaztunk a sógradiens kialakítása céljából, mely 0-tól 1 M-ig növekedett. Az eluciót 400 ml pufferrel végeztük és 5 ml-es frakciókat szedtünk. Minden műveletet szobahőmérsékleten végeztünk. A csepegés sebessége 5 ml/perc volt. Az OD-t Spektromon 202 Spektrofotométerrel 280 nm-en UV-ben mértük. Standardként marha szérumalbumint használtunk, melynek az elució görbét a 7. ábra szemlélteti.

IV. Radioaktív izotópos vizsgálatok módszerei

DL-leucin-14-C bab hipoketil fehérjébe való beépülésének vizsgálata



7. ábra. Marha szérumalbumin elució gőrbéje QAE
Sephadex A-50 eszlepen.

4 napos bab hipokotilekből 1 g mintát vettünk és 24°C-en sötétben inkubáltuk. 1 g szövet inkubálásához 5 ml inkubációs oldatot használtunk. Az inkubációs idő 16 óra volt.

Inkubációs közegként 3×10^{-3} M KH_2PO_4 -et használtunk /pH 6,0/. Ebben az oldatban 1% cukrot és 6,6 $\mu\text{Ci/ml}$ DL-leucin-14-C-t oldottunk. Az így elkészített oldattal hígítottuk a fenolkarbonsav törzsoldatokat úgy, hogy azok az adott fenolkarbonsavra számítva 5×10^{-5} M legyenek. A DL-leucin-14-C-vel inkubált szövetet 1,5 ml 50 mM TRIS-HCl /pH 7,6/ pufferben homogenizáltuk. A homogenizátumot 5 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, a felülúszót dializáltuk és az így kapott fehérje-kivonatot használtuk fel frakcionálásra.

A frakciók radioaktivitásának méréséhez 0,5 ml mintát használtunk fel, melyet 11 ml szcintillációs folyadékban oldottunk. A minták aktivitását Packard-Tricarb folyadékszscintillációs spektrométerrel 12,5 % hatásfoknál mértük.

A szcintillációs folyadék összetétele:

5 ml PPO+POPOP / 100 g PPO + POPOP 1000 ml teluelban. Ezt az oldatot még 5x-re hígítottuk teluellal és ezt használtuk fel.

6 ml etanol

A mintáknál 3x1 perces méréseket végeztünk.

V. Poliakrilamid gél-elektroferézis / LAEMMLI 1970 /

A Cyanogumból 30 %-os törzseladatet készítettünk és a csövekbe szeparáló gélként 8 %-ra hígítva használtuk. A gélpuffer 0,3 M TRIS-t és 0,1 % SDS-t tartalmazott. /pH 8,8/ A gél polimerizálásához 10 %-os ammoniumperszulfátot és DNPN-t használtunk. A kádpuffer összetétele 1,6 mM TRIS, 0,1 % SDS és 0,01 M glicin volt / pH 8,3 /. Mintáinkat 0,025 M TRIS, 1% SDS, 10% glicerol, 5% merkaptotetanol, 0,01% brómfenolkék oldatban vettük fel és vittük a gélre. A módszerhez használt standard fehérje-mintákból /ribonukleáz, γ -globulin, szérumalbumin/ melyek 1 mg/ml-t tartalmaztak 25 μ l-t, a frakciónk mintájából pedig 50 μ l-t vittünk fel a gélre. Az áramerősség csövenként 2 mA, 10-15 V volt. Ilyen áramerősség mellett az elektroferézis időtartama 120 perc volt. Fixáló oldatként 50% TCA-t, festő oldatként 0,1% coomassie brilliant blue-t használtunk 50 % TCA-ban oldva. A gélek mosására 3%-os ecetsav volt a legalkalmasabb. A használt csövek hossza 6 cm, át-

mérője 6 mm volt. A géleket a csövekből úgy távolítottuk el, hogy a gél és a cső fala közé injekciós tűvel vizet fecskendeztünk.

KISÉRLETI EREDMÉNYEK

I. Fenolkarbonsavak által indukált növekedés

Kísérleteinkhez az anyag és módszer részben /7. oldal/ feltüntetett fenolkarbonsavak 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációit alkalmaztuk. Eredményeinket az 1. táblázat szemlélteti.

II. Fenolkarbonsavak hatása bab hipokotil-szegmentek NS-tartalmára

A növényi fenolvegyületek hatásmódjára vonatkozó vizsgálatokhoz szükséges azok NS szintet befolyásoló hatásának ismerete a vizsgálati objektumon. Feltételezzük ugyanis, hogy a növekedés és a NS szintézis ok-ekoziati összefüggésben van egymással. Kísérleteinkben a szalicilsav, galluszsav, klorogénsav, o-kumársav, ferulasav és p-oxi-benzoessav 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációit alkalmaztuk. Eredményeinket a 2. táblázat szemlélteti.

A táblázatból látható, hogy valamennyi fenolkarbonsavnak / a szalicilsav kivételével / kisebb nagyobb serkentő hatása mutatkozik 10^{-4} - 10^{-6} M intervallumban.

Az 1. táblázatban szereplő adatokat össze-

Fenelkarbonsav	konzentráció M	megnyúlás a kontroll %-ban
o-kumársav	10^{-3}	119,1
	10^{-4}	150,0
	10^{-5}	150,0
	10^{-6}	104,2
klorogénsav	10^{-3}	104,1
	10^{-4}	108,3
	10^{-5}	144,0
	10^{-6}	102,1
p-oxi-benzoesav	10^{-3}	165,2
	10^{-4}	107,1
	10^{-5}	136,0
	10^{-6}	120,4
galluszsav	10^{-3}	118,1
	10^{-4}	135,0
	10^{-5}	130,2
	10^{-6}	105,1
ferulasav	10^{-3}	102,1
	10^{-4}	122,3
	10^{-5}	119,6
	10^{-6}	114,8
szalicilsav	10^{-3}	95,9
	10^{-4}	96,0
	10^{-5}	99,3
	10^{-6}	103,0

1. táblázat Fenelkarbonsavak hatása bab hipokotil-
-szegmentek megnyúlására

Fenolkarbonsav	konc. M	RNS %	DNS %	össz.NS %
kleregénsav	10^{-3}	129,7	154,2	131,8
	10^{-4}	127,0	128,5	127,1
	10^{-5}	139,0	140,0	126,9
	10^{-6}	124,3	184,2	129,5
o-kumársav	10^{-3}	139,0	190,0	143,5
	10^{-4}	148,6	142,8	148,1
	10^{-5}	155,4	158,5	155,6
	10^{-6}	139,0	179,1	142,5
p-oxi-benzoésav	10^{-3}	125,6	95,7	123,2
	10^{-4}	109,4	135,0	111,7
	10^{-5}	120,2	120,0	120,0
	10^{-6}	114,8	95,7	113,3
galluszsav	10^{-3}	117,5	98,5	115,9
	10^{-4}	122,9	91,4	120,2
	10^{-5}	118,9	110,0	118,1
	10^{-6}	109,4	114,2	109,8
ferulasav	10^{-3}	112,1	104,2	111,4
	10^{-4}	128,3	105,7	126,4
	10^{-5}	114,8	111,4	114,5
	10^{-6}	116,2	87,1	113,7
szalicilsav	10^{-3}	95,9	87,1	95,1
	10^{-4}	87,8	111,4	89,8
	10^{-5}	90,5	100,0	91,3
	10^{-6}	83,7	88,5	84,1

2. táblázat Hipeketil-szegmentek friss súlyra vonatkoztatott NS-tartalom változása a különböző növényi fenolkarbonsavak koncentrációinak függvényében a kontroll %-ban. Kontroll a desztillált vízben inkubált hipeketil.

hasonlítva a 2. táblázatba foglalt NS%-al, le-
venhatjuk azt a következtetést, hogy a fenelkar-
bensavak okozta megnyúlásos növekedés és az össz.
NS, illetve az RNS-tartalom szoros összefüggést
mutat. Viszonylag nagy megnyúlási %-nál az RNS és
az össz.NS %-os mennyisége is megnő.

A 10^{-3} M toxikusnak tekintett fenelkarben-
sav koncentráció a szalicilsav kivételével minden es-
etben növelte az RNS és az össz.NS mennyiségét a
kontrollhoz viszonyítva.

Szalicilsav esetén mind a toxikus, mind
pedig a fiziológiásnak tekintett koncentrációknál
az RNS és az össz.NS mennyisége a kontroll alatt
maradt. A DNS %-os mennyisége a fiziológiás koncent-
rációkban felülmúlja, illetve megegyezik, a toxikus
koncentrációban pedig nem éri el a kontroll értékét.

Az összes többi /klorogénsav, galluszsav,
p-oxi-benzoésav, o-kumársav, ferulasav/ növényi fe-
nelkarbensav optimális és annál magasabb koncentrá-
ciókban egyformán viselkednek az RNS-t és az össz.
NS-t figyelembevéve.

A DNS %-os mennyisége fiziológiás kon-
centrációk esetében a kontroll fölé nőtt minden es-
etben. A toxikusnak tekinthető koncentrációnál $/10^{-3}/$
a DNS %-os mennyisége klorogénsav, ferulasav és

e-kumársav esetén 100 %-nál magasabb érték, p-
-oxi-benzoosav és galluszsav esetében pedig ala-
csanyabb. 10^{-6} M fenolkarbonsav koncentrációnál
e-kumársav, galluszsav és klorogénsav a kontroll
fölé emelkedett, ferulasav és p-oxi-benzoosavnál
pedig a kontroll alatt maradt.

III. Növényi fenolkarbonsavak hatása hipokotíl szö-
vet fehérjefrakcióinak jelölődésére DL-leucin-
-14-C jelenlétében. Fehérjefrakcionálás Sepha-
dex QAE A-50 oszlopkromatográfiával

Korábbi izotópos kísérletekből ismeretes
volt számunkra, hogy a növényi fenolkarbonsavak nö-
vekedést serkentő koncentrációkban /MILASSIN 1971/
általában növelik a szövetek fehérjetartalmát. Egye-
sek a fehérjeszintézis serkentése, mások a fehérjeben-
tás gátlása útján fejtik ki hatásukat. Annak megál-
lapítására, hogy a vizsgált fenolkarbonsavak az össz.
fehérje mennyiségét növelik, vagy csak egyes fehérjé-
két, DL-leucin-14-C-vel való jelölést és kromatog-
ráfiás frakcionálást alkalmaztunk. A bab hipokotilek
fehérjekivonatát ioncserélő oszlopkromatográfiával
frakcionáltuk és mértük a DL-leucin-14-C beépülését
az egyes frakciókba.

A kísérlethez 4 cm hosszú bab hipekotileket használtunk fel, amelyeket a 7. oldalon feltüntetett növényi fenolkarbonsavak és IES 5×10^{-5} M koncentrációival inkubáltunk. Az inkubációs oldat $6,6 \mu\text{Ci/ml}$ DL-leucin- 14-C -t tartalmazott. A frakcionáláshoz felhasznált fehérjekivenatot a 12. oldalon feltüntetett módon nyertük és vittük fel az eszlepra. Eredményeinket a 8-15. ábrák szemléltetik.

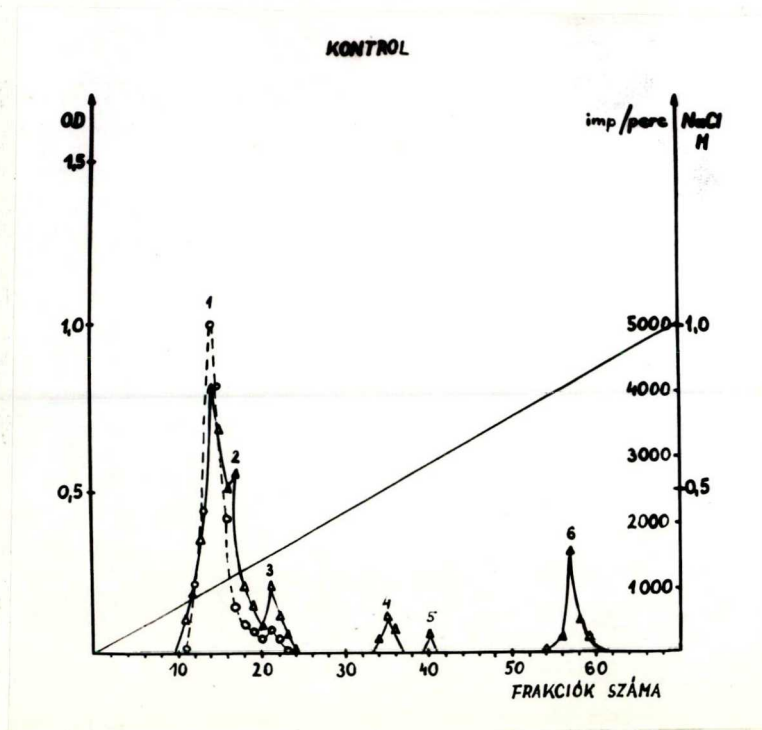
1. Kromatografálás útján nyert fehérjefrakciók

A kontroll fehérje esetében az eluciós görbén hat különböző frakciót tudunk megkülönböztetni, ami ábránkon /8. ábra/ "csúcsok" formájában jelenik meg.

Ferulasav és p-oxi-benzooesavnál a fehérjefrakciók száma megegyezik a kontrolléval, csupán a frakciók között kvantitatív eltérés mutatkozik. Míg a kontroll és a ferulasav esetében a 2. frakció fehérjetartalma kvantitatíve nem éri el az első frakcióét, p-oxi-benzooesav esetében a 2. frakció OD értéke, vagyis a fehérje mennyisége magasan az első frakcióé fölé nőtt.

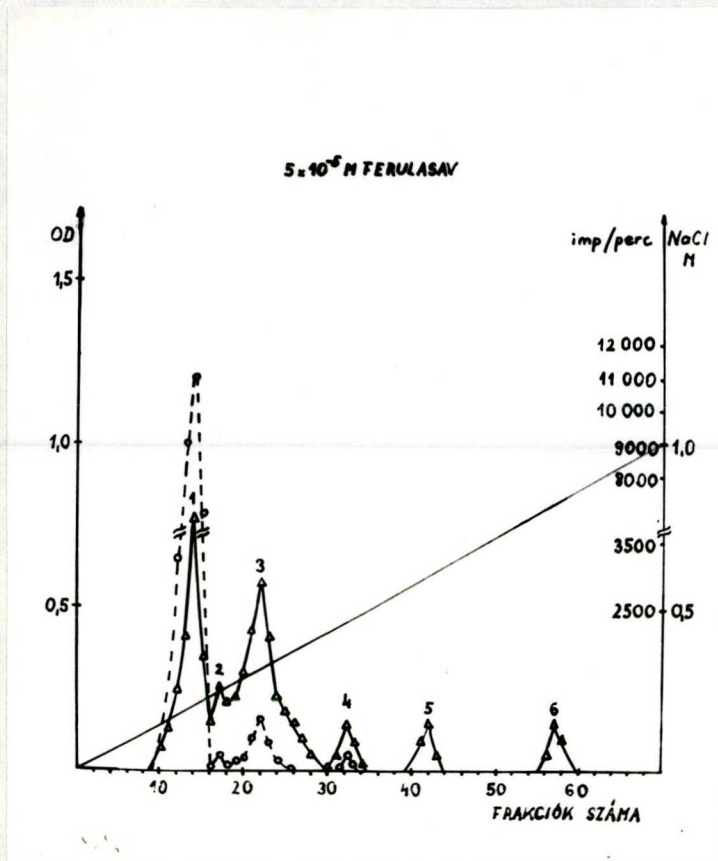
Eredményeinket a 9. és 10. ábra szemlélteti.

Az összes többi fenolkarbonsavnál kevesebb frakciót láthatunk az eluciós görbén. Ugyanez vonatkozik az IES-re is. Az első frakció viszont minden



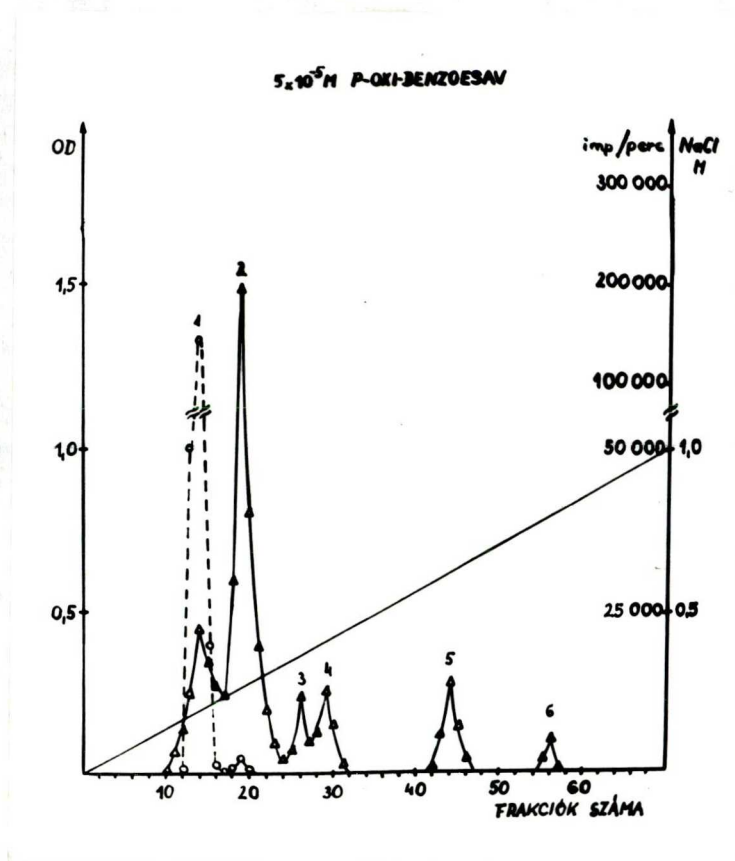
8. ábra. Bab hipoketil fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája Sephadex A-50 eszlepen. Ordináták: optikai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-ből inkorporálódott radioaktivitás imp/perc és az elucióhoz használt NaCl koncentrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók száma

—●—●—●— radioaktivitás
—Δ—Δ—Δ— optikai denzitás



9. ábra. Bab hipokotil fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája Sephadex A-50 oszlopon. Ordináták: optikai denzitás /bal/; DL-leucin- 14 C-ből inkorporálódott radióaktivitás imp/perc és az elucióhoz használt NaCl koncentrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók száma.

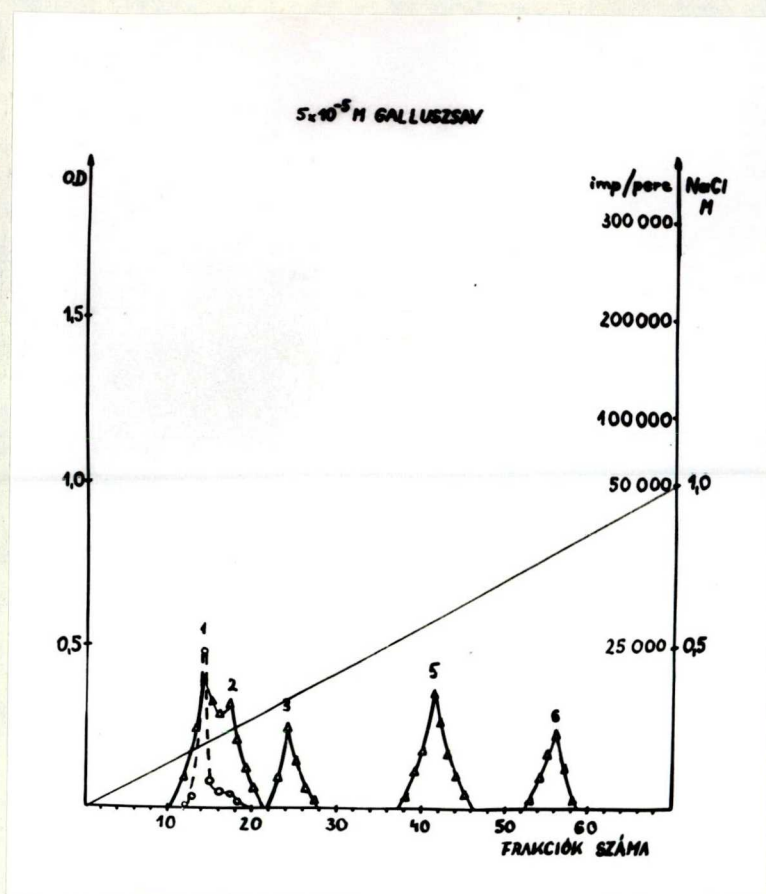
—●—●—●— radióaktivitás
—△—△—△— optikai denzitás



10. ábra. $5 \cdot 10^{-5} \text{ M p-oxi-benzoesav}$ val kezelt bab hipeketil fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája. Sephadex A-50 oszlopon. Ordináták: optikai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-ből inkorporálódott radioaktivitás imp/perc és az elucióhoz használt NaCl koncentrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók száma.

—○—○—○— radioaktivitás

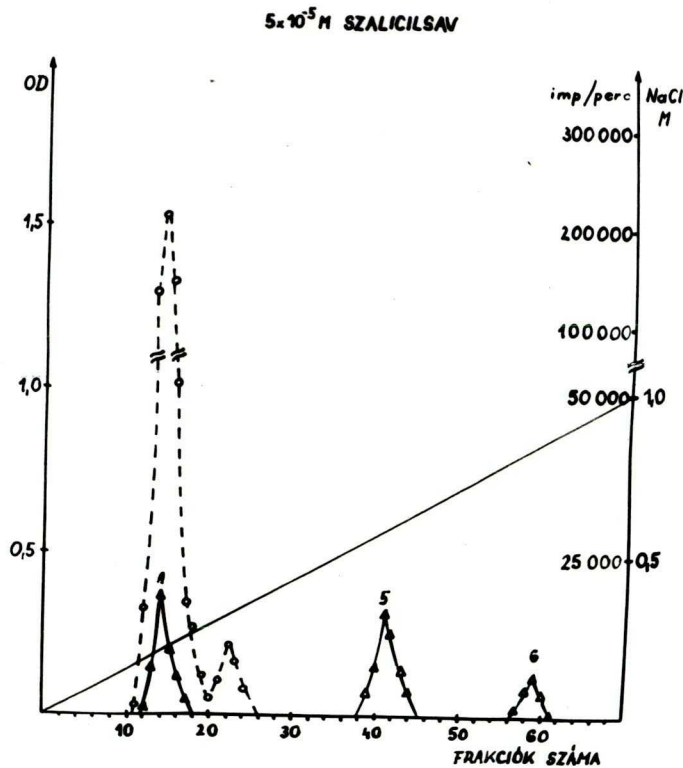
—△—△—△— optikai denzitás



11. ábra. $5 \cdot 10^{-5}$ M galluszsavval kezelt bab hipek-
til fehérjéinek ioncserélő kromatográfiá-
ja Sephadex A-50 eszlepen. Ordináták: opti-
kai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-ből in-
korperálódott radioaktivitás imp/perc és
az elucióhoz használt NaCl koncentrációja
/jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók
száma.

-o- -o- -o- radioaktivitás

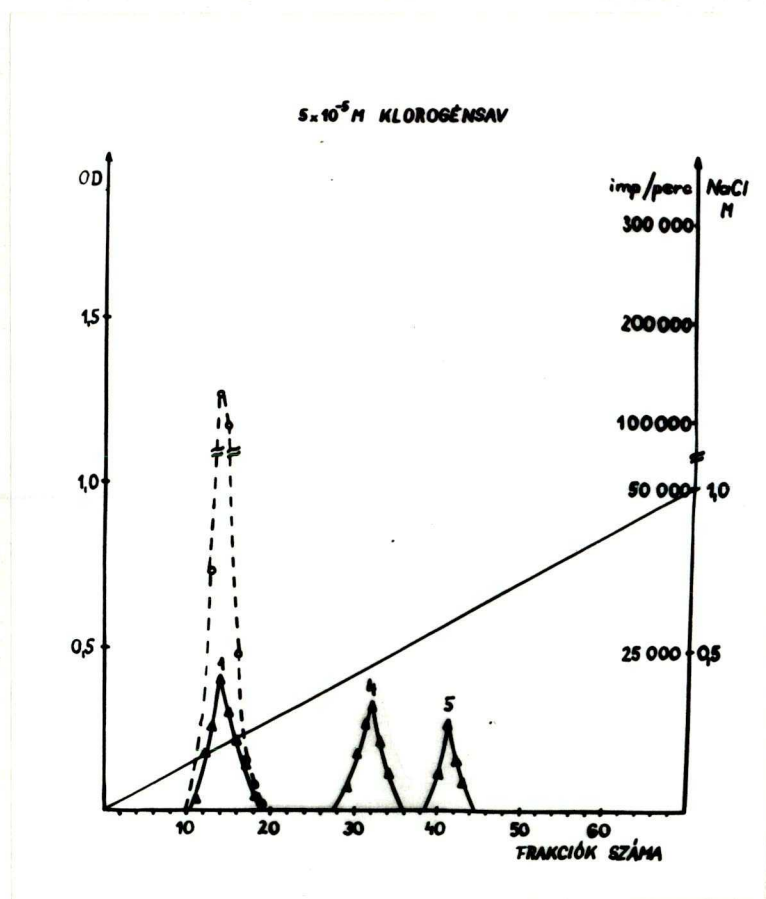
-Δ-Δ-Δ- optikai denzitás



12. ábra. $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ szalicilsavval kezelt bab hipoketil fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája Sephadex A-50 oszlopon. Ordináták: optikai denzitás /bal/; DI-leucin-14-C-ből inkorporálódott rádióaktivitás imp/perc és az elucióhoz használt NaCl koncentrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók száma.

-o- -o- -o- rádióaktivitás

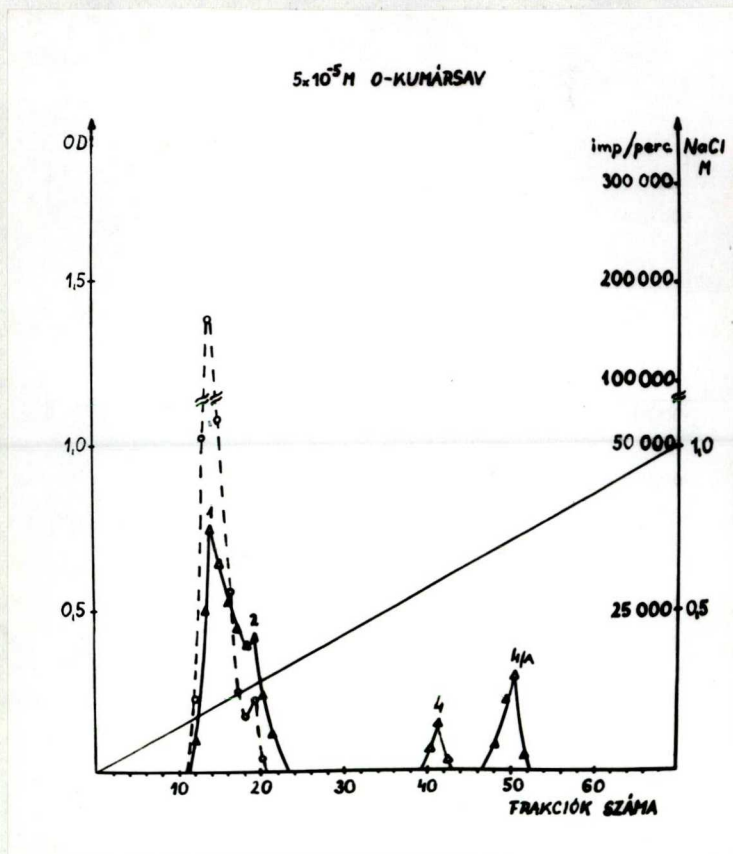
-Δ- -Δ- -Δ- optikai denzitás



13. ábra. $5 \times 10^{-5} M$ klorogénsavval kezelt bab hipo-
ketil fehérjéinek ioncserélő kromatográ-
fiája Sephadex A-50 oszlopon. Ordináták:
optikai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-
-ből inkorporálódott rádióaktivitás imp/
perc és az elucióhoz használt NaCl kon-
centrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-
-es frakciók száma.

-o- -o- -o- rádióaktivitás

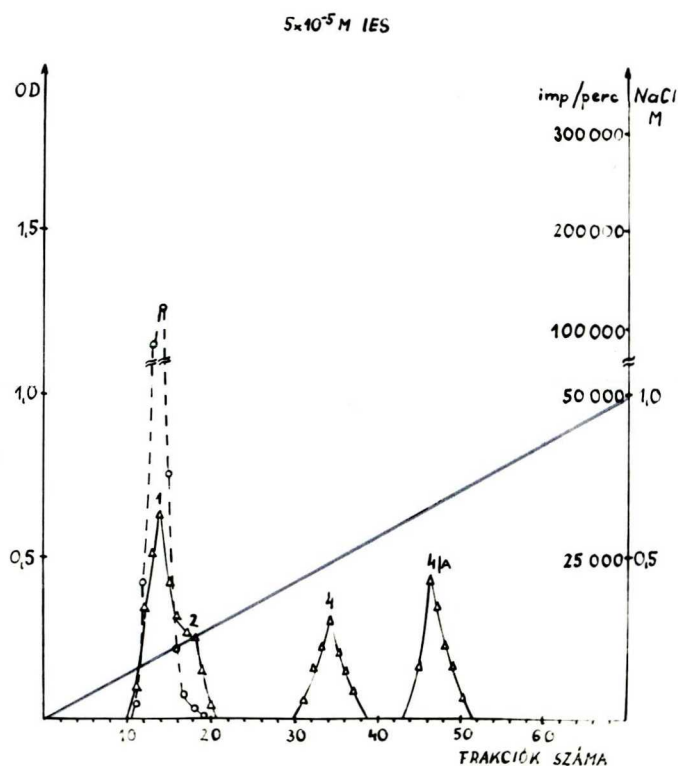
-Δ-Δ-Δ- optikai denzitás



14. ábra. $5 \times 10^{-5} \text{ M } o\text{-kumársavval}$ kezelt bab hipoketil fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája Sephadex A-50 eszlepen. Ordináták: optikai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-ből inkorporálódott radioaktivitás imp/perc és az elúcióhoz használt NaCl koncentrációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es frakciók száma.

-o- -o- -o- radioaktivitás

-Δ- -Δ- -Δ- optikai denzitás



15. ábra. $5 \times 10^{-5} \text{ M IES}$ -es kezelt bab hipokotilek
fehérjéinek ioncserélő kromatográfiája
Sephadex A-50 oszlopon. Ordináták: opti-
kai denzitás /bal/; DL-leucin-14-C-ből
inkorporálódott radioaktivitás imp/perc
és az elucióhoz használt NaCl koncet-
rációja /jobb/. Abszcissza: az 5 ml-es
frakciók száma.

-○- -○- -○- radioaktivitás

-△- -△- -△- optikai denzitás

esetben megjelenik, mégpedig a 14. mintában. Gal-
luszsavnál a 4. frakció kivételével minden más
frakció megjelent. /11. ábra/ Szalicilsavnál az
1. 5. 6. frakciót láthatjuk /12. ábra/, klorogén-
sav esetében pedig az 1. 4. 5. frakciót /13. ábra/.
Ugyanakkor a 4. 5. frakció kvantitativ fölülmúl-
ja a kontroll ugyanezen frakcióinak értékét. O-ku-
mársavnál az 1. 2. 4. frakció, IES-nél az 1. 4.
frakció, mindkettőnél pedig a 4/A frakció jelent
meg, ami a többi fenelkarbonsavnál nem jelentke-
zett, itt viszenylag magas OD értéket ért el. /14.
15. ábra/

2. Radióaktivitás beépülése a fehérjefrakciókba

Ha a DL-leucin-14-C beépülését vizsgál-
juk a frakciókba, a következő eredményeket kapjuk.
/8-15. ábra/

Kontroll: az 1. 2. 3. frakció kivételével
DL-leucin-14-C beépülés nem tapasztalható. Eredménye-
ink azt mutatják, hogy az inkubáció ideje alatt a
fent említett három frakcióban szintetizálódott fe-
hérje. Az első frakcióban az aminosav beépülése, il-
letve a 14-C aktivitás magas, a 2. 3. frakcióban pe-
dig elenyészően kicsi. A 4. 5. 6. frakcióban fehér-

jeszintézis az inkubáció ideje alatt nem észlelhető /8. ábra/.

5×10^{-5} M ferulasav: aminosav beépülés, illetve fehérjeszintézis az 1. 2. 3. 4. frakcióban tapasztalható, de csak az első frakcióban jelentős /9. ábra/.

5×10^{-5} M p-oxi-benzoésav: az 1. 2. frakcióban észlelhető rádióaktivitás, de a másodikban csak minimális /10. ábra/

5×10^{-5} M klorogénsav, galluszsav és IES: esetén az inkubációs idő alatt kizárólag az első frakcióba volt aminosav beépülés./ 11. 13. 15. ábra/

5×10^{-5} M o-kumársav és szalicilsavnál a 14-C beépülés az 1. és 2. frakcióba történt, de a másodikba mindkét esetben elenyészően kicsi. Szalicilsavnál olyan kismértékű volt a 2. frakcióban a fehérjeszintézis, hogy az csak a 14-C beépüléssel volt kimutatható /12. 14. ábra/.

Összefoglalva, minden vizsgált fenolkarbonsavnál elmondhatjuk, hogy jelentős DL-leucin-14-C beépülés csak az 1. frakcióban volt az inkubáció ideje alatt. Kismértékű szintézis tapasztalható még a 2. és a 3. frakcióban, viszont a többi frakciónál aminosav beépülést nem tapasztaltunk. Az első frakció

0,2 M NaCl-nél jött le az eszlepról.

IV. Az első fehérjefrakció vizsgálata poliakril-
amid gél-elektroferézissel

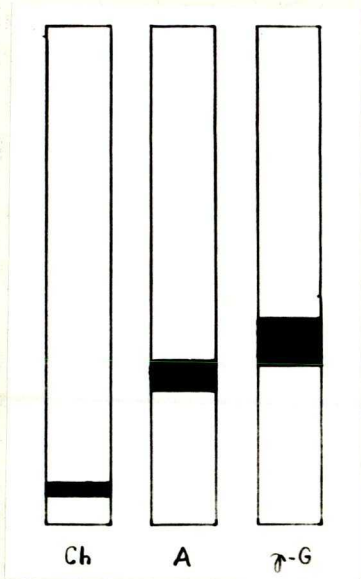
Ha megnézzük a fehérjefrakcionálással kapott fehérjék OD értékeit /8-15. ábra/, azt láthatjuk, hogy minden esetben az első frakció ért el kvantitativ legmagasabb értéket. Ezért a frakciók közül ezt vizsgáltuk tovább. Összehasonlításként elektroferetizáltunk ismert fehérjéket/ 16. ábra/.

Az első frakcióról biztensággal megállapíthatjuk minden fenolkarbonsav és az IES-el kezelt anyag esetében is, hogy a frakció elektroferetikusan egységes, mivel a gélen egyetlen csík formájában jelenik meg /17. ábra/.

A kontroll fehérjekivenet elektroferetikus géljén hat csík látható, amelyek valószínűleg megfelelnek a hat frakciónak. Eredményeinket a 18. ábra szemlélteti.

Amennyiben az SDS-el végzett elektroferézis alkalmas arra, hogy megközelítőleg megadja a frakcióban levő fehérje mólsúlyát, úgy az ismert molekulásúlyú fehérjékkel összehasonlítva az Rf értéket, az első frakcióban levő fehérje molekulásúlya 45-

45-50 000 közé esik.



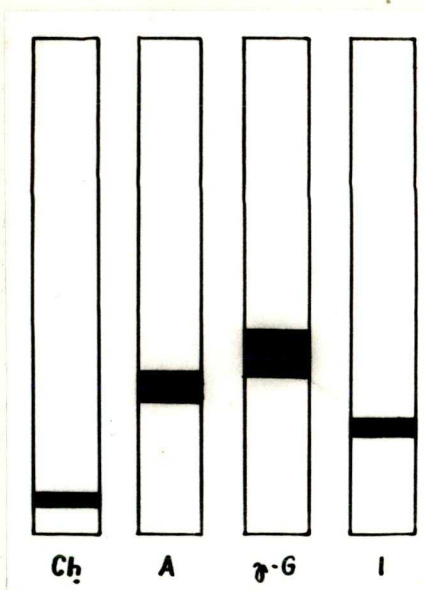
16. ábra

A standard fehérjék
poliakrilamid gél-elekt-
referogramma

Ch : kimetripszin

A : marha szérumalbumin

γ -G : γ -globulin



17. ábra

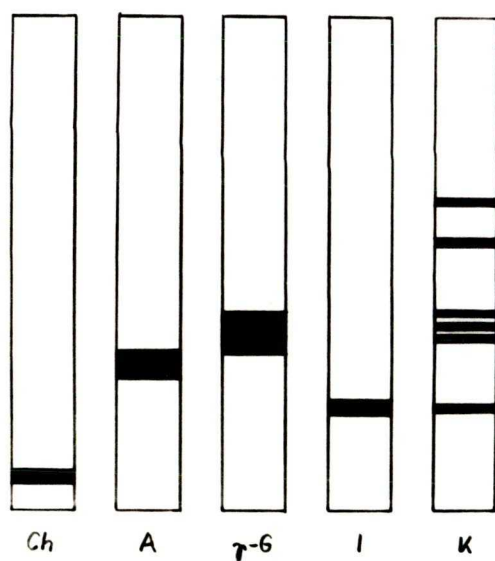
A standard fehérjék
és az első frakció poli-
akrilamid gél-elektrofe-
rogramma

Ch : kimetripszin

A : marha szérumalbumin

γ -G : γ -globulin

I : első frakció



18. ábra A standard fehérjék, az első frakció és a kontroll fehérjekivonat poliakrýl-amid gél-elektroferogrammja

Ch : kimotripszin

A : marha szérumalbumin

γ -G : γ -globulin

I : első frakció

K : kontroll fehérjekivonat

KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELESE

1. Növényi fenolkarbonsavak hatása bab hipokotil- -szegmentek NS-tartalmára

Az össz.NS, RNS és DNS meghatározások eredményei természetesen nem tükrözik mindazokat a specifikus változásokat, amelyek a NS-ak szintézisében, illetve az anyagcserében fontos szerepet játszanak. Viszont eredményeink alapját képezik további fontos vizsgálatoknak, melyek már részletes felvilágosítást adnak a növényi fenolkarbonsavak által indukált megnyúlásos növekedés, a NS szintézis és a fehérjeszintézis közötti összefüggésről. Az elvégzett kísérletek eredményei összhangban vannak a megnyúlásos növekedés és a NS szintézis közötti összefüggésre vonatkozó eddigi ismereteinkkel. Ezen ismeretek lényege abban foglalható össze, hogy a tartós megnyúlásos növekedésnek egyik alapvető feltétele bizonyos NS-ak szintézise. A fiziológiás / 10^{-4} , 10^{-5} M/koncentrációjú növényi fenolkarbonsavak mérsékelten, de minden esetben kifejezetten növelik a hipokotil szegmentek NS-tartalmát. Ezek a növényi fenolkarbonsavak ezen hatásukat tekintve megegyezést mutatnak a

megnyúlásos növekedés hormonjaival.

Az eddigi irodalmi adatok egy része a hormonokra vonatkozik / pl. IES/. A hormonok vagy azáltal fejtik ki hatásukat, hogy növelik a NS-ak szintézisét, vagy pedig gátolják azok lebontását.

Néhány adatunk van arra vonatkozóan is, hogy milyen összefüggés van a DNS szintézise és a spontán megnyúlásos növekedés között. Ezzel kapcsolatosan részletes vizsgálatokat CAPESIUS és BOPP /1970/a, 1970/b/, BOPP és CAPESIUS /1970/, BOPP /1970/. Kísérleteiket *Sinapis alba* hipeketilekkel végezték. Eredményeik azt mutatják, hogy az össz.NS és DNS szintézis és a megnyúlásos növekedés között nincs egyenes összefüggés. Ennek ellenére bizonyos DNS frakciók fokozott szintézise mutatható ki a megnyúló hipeketilekben.

A hormonok által indukált megnyúlásos növekedéssel kapcsolatban viszont már többen igazolták /NITSAN és LANG 1966, BARLOW 1969, BROUGHTON 1969, HABER et al. 1969, ROSE és ADAMSON 1969, PUROHIT et al. 1969, HOLM és KEY 1969, FOSKET 1970/, hogy a gibberellin indukálta megnyúlásos növekedés és a DNS szintézis között szoros összefüggés van.

Ilyen tekintetben az auxin által indukált növekedést is számosan vizsgálták /DEGANI és ATSMON 1970, MANESHWARI és NOODEN 1971/ és bebizonyították,

hogy a DNS szintézis és a növekedésre gyakorolt hatás között szoros kapcsolat van uberka hipeketilek esetében. Miután a hipeketilekben sejtesztódás alig történik, elsősorban a nem nukleáris frakció növekedéséről lehet szó. Ezt egy sejtfrakcionálással egybekötött izotóp-jelöléses módszerrel igazolták is.

Ismerünk adatokat arra vonatkozóan is, hogy az osztódásra képes szövetekben a fenolvegységek osztódást idéznek elő. Ez az osztódás magába foglalja a szövetek DNS tartalmának növekedését is. Ezt HESS, LEE és SKOOG /1965/, MESZHI /1968/, ZAPROMETOV /1969/ igazolták.

GREEF De /1964/, SVENSSON /1972/. Kuma-rinnal végzett kísérleteikben igazolták, hogy fiziológias koncentrációban növeli a DNS-tartalmat.

Az általunk vizsgált növényi fenolkarbonsavak bab hipeketil-szegmentekre gyakorolt hatásában minden esetben mérhető NS gyarapodásról beszélhetünk, amely az RNS/DNS arány kismértékű megváltozásához vezet fiziológias koncentrációkban is.

A többi vegyülettől eltérően viselkedik mind toxikus, mind fiziológias koncentrációban a

szalicilsav, amely nem okoz NS-tartalom növekedést. Ez összhangban van azzal, hogy a szalicilsavnak lényegileg nincs növekedésserkentő hatása hipokotil tesztben; míg a többi vegyület az NS-tartalom növekedésével megközelítőleg arányosan serkenti a hipokotilek megnyúlását.

Végezetül el kell mondanunk, hogy az RNS és a DNS tartalom növekedése nem csak a NS szintézis fokozott ütemére vezethető vissza, hanem az a NS-lebontás gátlása útján is lehetséges. pl. NS bontó enzimek aktivitásának megszüntatése, illetve csökkentése útján. Hogy ez a folyamat pontosan hogyan megy végbe, azt jelzett prekursorok beépülésének, illetve a NS-ak enzimes lebontásának vizsgálata útján dönthető el.

II. Növényi fenolkarbonsavak hatása DL-leucin-14-C beépülésére hipokotil szövetek fehérjefrakcióiba

Kísérleteink megkezdésekor korábbi ismeretekre támaszkodtunk, melyek szerint a növényi fenolkarbonsavak /MILASSIN 1971/ az alább közölt mértékben folyásolják be a DL-leucin-14-C beépülését bab hipokotil fehérjéibe.

konc. M	fenolkarbonsav	impulzusszám a kontroll %-ban
5×10^{-5}	ferulasav	82 %
5×10^{-5}	klorogénsav	93 %
5×10^{-5}	o-kumársav	135 %
5×10^{-5}	szalicilsav	138 %
5×10^{-5}	galluszsav	145 %
5×10^{-5}	p-oxi-benzoészav	147 %

Ezen eredmények továbbfejlesztése céljából Sephadex ioncserélő kromatográfiával megvizsgáltuk, hogy a szárszegmentek fehérjéi milyen és hány frakcióra bonthatók és ezekbe a frakciókba milyen mértékű a DL-leucin-14-C beépülés. Arra is választ kaptunk, hogy van-e és milyen eltérés van a DL-leucin-14-C beépülés között a kontroll és a fenolkarbonsavakkal kezelt hipoketilek esetében.

Specifikusnak tekinthető minden esetben az első frakció/ kontroll, ferulasav, p-oxi-benzoészav, galluszsav, szalicilsav, klórogénsav, o-kumársav és IES/. Az első frakcióba a DL-leucin-14-C beépülése igen magas azokhoz a frakciókhoz viszonyítva, ahol van izotóp beépülés. Ez a magas aktivitás arra enged következtetni, hogy az inkubáció ideje alatt nagymértékben csak az első frakcióra jellemző fehérje

szintetizálódott. Legjellemzőbb ez a szalicilsav esetében, ahol alacsony fehérje OD érték magas impulzusszámmal párosul. Ferulasav, p-oxi-benzoésav, o-kumársav esetében a második frakcióba is történt izotóp beépülés, de ez az első frakcióval összehasonlítva csak minimális. A kontroll és a ferulasavval inkubált szegmenteknél a 3., az utóbbi esetben a 4. frakcióban is mérhető aktivitás volt.

Számunkra a továbbiakban ennek az első frakciónak a tulajdonságai az érdekesek.

Frakcionálási vizsgálatokat izotóp jelöléssel fenolkarbonsavak jelenlétében eddig még nem végeztek. IES-el kapcsolatos vizsgálatok viszont meállapították, hogy a jelzett aminosav specifikus frakciók proteinjében jelenik meg. A rádióaktivitás IES hatására történő specifikus eloszlása az egyes frakciókban aktinomicin-D-vel megszüntethető. Ezeket az eredményeket PATTERSON és TREWAVAS 1967-ben közölte.

Az ezzel kapcsolatos eddigi vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a növényi fenolkarbonsavak növekedésserkentő fiziológias koncentrációi a fehérjeszintézisre sok tekintetben hasonlóképpen hatnak, mint a megnyúlást előidéző hormonok. Ezt bizonyítják a 8-15. ábrák is.

Az auxinok különböző objektumokban különböző mértékben befolyásolják a 14-C aminosavak beépülését a fehérjékbe. /KEY 1964, KEY 1969/

Több munka bizonyítja, hogy enzimefehérjék szintézisééről van szó, amelyek nélkülözhetetlenek a növekedésben. / THIMANN és LOOS 1957, VENIS 1964, 1966, NOODEN és THIMANN 1966, FAN és MACHLACHLAN 1966, 1967/

Arra vonatkozóan is vannak eredmények, hogy a gibberellin szintén de novo enzimszintézist indukál. /PALEG 1965, VARNER 1964, VARNER és CHANDRA 1964, MOMOTANI és KATO 1966, VARNER 1967/

A fenolvegyületek és a fehérjeszintézis kapcsolatát VAN SUMERE és DENDER /1961/vizsgálta, de ők gátló hatású illetve koncentrációjú fenolvegyületekkel dolgoztak.

PAPURS /1967/ flavonok jelenlétében vizsgálta a DI-leucin-14-C inkorporációját fehérjékbe. Kísérleteiben kimutatta, hogy ezek növekedést gátló hatása a proteinszintézisre gyakorolt hatással függ össze.

III. Poliakrilamid gél-elektroforézis

Miután Sephadex QAE-A-50 oszlopkromatog-

ráfiával történő vizsgálataink és a DL-leucin-14-C beépülés vizsgálata alapján kitűnt, hogy az első frakció minden vizsgált fenolvegyszer esetében megtalálható / a benne található fehérje mennyisége viszonylag nagy / és specifikusnak tekinthető, e frakciót elektroferetizáltuk. Eredményeink alapján e frakció homogénnek tekinthető. A teljes hipoketil-szegment fehérjekivonatánál hat csíkot, illetve frakciót tudunk szétválasztani.

SARKISSIAN és SPELSBERG /1967/ előzőleg auxinnal kezelt 1 cm-es bab hipoketilekből kivont fehérjéket elektroferetizáltak. A kontroll és a 10^{-5} M IES-el kezelt szegmentek esetében három csíkot kaptak, melyek közül az első csík újabb három frakcióra volt bontható. Ha az IES-t 10^{-3} M koncentrációban adagolták, a második csík nem jelent meg. Ha az inkubáció idejét megrövidítették, a nevezett csíknak, illetve fehérjének a 80 %-a már eltűnt.

E csík eltűnésének oka nem ismert. Feltételezhető, hogy ennek oka lehet:

a proteinszint inhibíciója vagy repressziója
az elektroferetikus mobilitás változása.

Feltételezhető az is, hogy az IES represszálja a proteinszintézist. Ugy látszik, hogy a növekedésser-

kentés specifikusan a második csikkel kapcsolatos, mivel növekedésserkentést nem okozó IES koncentrációnál nem található a szövetben.

SPELBERG és SARKISSIAN /1968/ szintén bab növénnnyel végezték kísérleteiket, de ők mag-proteineket elektroferetizáltak. Bázikus és savas proteineket különböztették meg.

SWANK és MUNKRES /1971/ a módszert molekulásúly meghatározásra használta. 1 200-46 000 Ms-ig futtatott peptideket. Azt az eredményt kapta, hogy 1 200-10 000 Ms-ig a peptidek MS-nak logaritmusra lineáris volt, azon túl a görbe elhajlott.

A fent említett két kutató munkájára támaszkodva végeztük el a megközelítő Ms meghatározást.

A vizsgálatok szerint az a feltételezésünk, hogy a vizsgált fenolkarbonsavaknak legalább részben önálló növekedésszabályozó hatása van - amellett, hogy in vivo az IES-oxidáz kofaktor szerepét is betölthetik - több szempontból alátámasztást nyert.

Ezek egyike, hogy a fenolkarbonsavakkal kezelt hipokotilek megnyúlásának mértéke NS-tartalmukkal, illetve az általuk indukált NS-tarta-

len növelésével megközelítőleg arányos, noha IES-oxidásgátlók és serkentők, valamint e tekintetben hatástalanok egyaránt vannak e vegyületek között. Erre egyébként korábbi vizsgálatokban már az is utalt, hogy a szalicilsav kivételével valamennyi jelentékeny megnyúlást okozó fiziológiásnak tekinthető koncentrációban.

Másik eredményünk ezzel összhangban az, hogy minden fenolkarbonsav megnyúlást okozó koncentrációban ugyanannak a fehérjefrakciónak a szintézisét serkenti, amelyét az IES is. Ha ez IES által közvetített hatás volna, aszerint kellene változnia az aminosav-beépülés sebességének, hogy IES-oxidázt serkentő, gátló, vagy közömbös vegyületről van-e szó.

Végül jelenlegi és előző vizsgálataink figyelembevételével nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy fiziológiás körülmények között az endogén fenol-vegyületek inkább növekedésserkentő, mint gátló hatást fejtenek ki a megnyúlásos növekedésre.

ÖSSZEFOGLALÁS

I. Kísérleteink során vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy néhány fenolkarbonsav /ferulasav, p-oxi-benzoosav, galluszsav, szalicilsav, klorogénsav, o-kumársav / 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációkban hogyan befolyásolja a bab hipoketil-szegmentek növekedését.

A szalicilsav kivételével minden sav minden koncentrációjának hatására a növekedés fölmulta a kontroll értékét. Szalicilsav esetében egyedül 10^{-6} M koncentrációban emelkedik a növekedés %-os értéke kevéssel a kontroll fölé.

II. Ha a fent említett fenolkarbonsavak hatását vizsgáljuk bab hipoketil-szegmentek NS-tartalmára 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M koncentrációkban, a következő eredményeket kaptuk:

Az össz NS-tartalom minden koncentrációban a kontroll érték fölé nőtt, a szalicilsav kivételével.

Az RNS tartalom is szintén a kontroll fölé emelkedett minden koncentrációban, kivéve a szalicilsavat.

A DNS tartalom 10^{-4} , 10^{-5} M a fenolkarbonsavak fiziológiásnak tekinthető koncentrációinál



minden esetben a kontroll fölé emelkedett. 10^{-3} M-nál p-oxi-benzoosav, galluszsav és szalicilsav hatására a szegmentek növekedése a kontroll érték alatt marad; 10^{-6} M-nál pedig p-oxi-benzoosav, ferulasav és szalicilsav esetében marad a kontroll érték alatt, a többi esetben a kontroll fölé emelkedik. /2. táblázat/

III. Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan is, hogy a fent említett/fent említett/fenolkarbonsavak és az IES hogyan befolyásolják bab hipeketil-szegmentek fehérjefrakcióinak alakulását és a DL-leucin-14-C beépülését a fehérjékbe. A frakcionálást Sephadex QAE A-50 ioncserélő oszlopon végeztük.

A növényi fenolkarbonsavakkal kezelt és a kontroll hipeketil-szegmentek gradiens elucióval nyerhető fehérjefrakcióinak a száma eltérő volt. A fehérje OD értékek kvantitativ is különböztek. A kontroll elució görbájén hat frakciót láthatunk. /8. ábra/

Az 5×10^{-5} M ferulasav és p-oxi-benzoosavas kezelésnél a frakciók száma megegyezett a kontrolléval. Más esetekben a frakciók számát illetően eltérés mutatkozott az egyes fenolkarbonsavak esetében.

A DL-leucin-14-C beépülésével kapcsolatosan megállapíthatjuk, hogy az inkubáció ideje alatt az első frakcióban található fehérje szintetizálódott legnagyobb mennyiségben. Ez a megállapítás igaz a kontrollra, a fenolkarbonsavakkal és az IES-el kezelt hipokotilekre vonatkozóan is. /8-15. ábra/ DL-leucin-14-C beépülés a 2. 3. frakcióban is kimutatható, de csak kis mértékben.

IV. Poliakrýlamid gél-elektroferézissel megvizsgáltuk a frakcionálással kapott első frakcióban található fehérje homogenitását.

Ennek során azt állapítottuk meg, hogy az első frakció minden esetben egységes volt, tehát a gélen egyetlen csík formájában jelentkezett. /17. ábra/

Ismert molekulasúlyú fehérjékkel összehasonlítva azt az eredményt kaptuk, hogy az első frakcióban található fehérje molekulasúlya 45-50000 közé esik.

RÖVIDÍTÉSEK

DNPN		dimetilaminópropionitril
SDS		Na-dedecil szulfát
IES		indol-3-ecetsav
NS		nukleinsav
RNS		ribonukleinsav
DNS		dezoxiribinukleinsav
Ms		molekulasúly

IRODALOM

- ABERG, B.; JOHANSSON, I. 1969. Studies on plant growth regulators. Some phenolic compounds - Lantbr. Högsk. Ann., Uppsala, 35, 3-27.
- ATKIN, R.K.; SRIVASTAVA, S.B.I. 1970. Studies on Protein Synthesis by Senescing and Kinetin-treated Barley Leaves. - Physiol. Plant., 23, 304-315.
- BARLOW, P.W. 1969. Cell growth in the the absence of division in root meristem. - Planta, 88, 215-223.
- BOPP, M.; CAPESIUS, I. 1971. Streckungshemmung durch Fudr bei den Hypokotylen von Sinapis alba. - Planta, 96, 35-42.
- BROUGHTON, W.I. 1969. Relations between DNA, RNA and protein synthesis and the cellular basis of the growth response in gibberellic acid-treated pea internodes. - Ann. Bot., 33, 227-243.
- BROUGHTON, W.I. 1970. Determination of total Nucleic Acids in Plant Tissue. - Anal. Biochem., 38, 291-295.

- BURLEIGH, M.; SMITH, M. J. H. 1970. The site of the inhibitory action of salicylate on protein biosynthesis in vitro. - Biochem. J., 117.
- CAPESIUS, I.; BOPP, M. 1970. DNA-Synthesehemmung durch 5-Fudr bei *Sinapis alba*. - Z. Naturforschung 25, 1475-1477.
- CAPESIUS, I.; BOPP, M. 1970. Über die Synthese von DNA in den Keimpflanzen von *Sinapis alba* L. - Planta, 94, 220-228.
- DEGANI, Y.; ATSMON, D. 1970. Enhancement of non-nuclear DNA synthesis associated with hormone-induced elongation in the cucumber hypocotyl. - Exp. Cell Res., 61, 226-229.
- DEGANI, Y.; ATSMON, D.; HALEVY, A. H. 1970. DNA synthesis and hormone induced elongation in the cucumber hypocotyl. - Nature, 228, 554-555.
- FOSKET, D.E. 1970. The time course of xylem differentiation and its relation to DNA synthesis in cultured *Coleus* stem segments. - Plant Physiol., 45, 64-68.
- FAN, D.F.; MACHLACHLAN, G.A. 1966. Control of cell-lar activity by indolacetic acid. - Can. J. Botany, 44, 1025-1034.
- GREEF De, J.A. 1964. Changes induced by coumarin

and trans-cinnamic acid in desoxiribonucleic acid /DNA/ content and growth of pea roots. - *Enzimologia*, XXVII, 311-325.

HABER, A.H.; FOARD, D.E.; PERDUE, S.W. 1969. Actions of gibberellic and abscisic acids on lettuce seed germination without actions of nuclear DNA synthesis. - *Plant Physiol.*, 44, 463-467.

HESS, C.E. 1965. Phenolic compounds as stimulators of root initiation. - *Plant Physiol.*, 40,

HOLM, R.E.; KEY, J.L. 1969. Hormonal regulation of cell elongation in the hypocotyl of rootless soybean: An evaluation of the role of DNA synthesis. - *Plant Physiol.*, 44, 1295-1362.

KEY, J.L. 1966. The effect of purine and pyrimidine analogues on growth and RNA metabolism in the soybean hypocotyl: the selective action of 5-fluorouracil. - *Plant Physiol.*, 41, 1257-1264.

KÖVES, E. 1965. Adatak a természetesen előforduló fénlkarbonsavak növekedésszabályozó hatásának mechanizmusához. - Kandidátusi értekezés Szeged.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Prote-

ins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. - Nature, 227, 680-682.

LEE, T. T.; SCOOG, F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of Tobacco Tissue cultures. - Physiol. Plant., 18, 386-401.

MANESHWARI, M.G.; NOODEN, L.D. 1971. A requirement for DNA synthesis during auxin induction of cell enlargement in Tobacco pith tissue. - Physiol. Plurum., 24, 282-287.

MESZHI, A.V. 1968. Dejsztvie nekoterüh fenelev narezst tkanej merkevi. - Szeebscs. AN. Gruz., Tbiliszi, 1, 121-224.

MILASSIN, M. 1971. Diplomadelgezat, Szeged.

NITSAN, L.; LANG, A. 1965. Inhibition of cell division and cell elongation in higher plants by inhibitors of DNA-synthesis. - Develop. Biol., 12, 358-376.

NOODEN, L.D. 1968. Studies on the Role of RNA-synthesis in Auxin Induction of cell enlargement. - Plant Physiol., 43, 140-150.

NOODEN, L.D. 1966. Action of inhibitors RNA and protein synthesis on cell enlargement. - Plant Physiol., 41, 157-164.

- PALEG, L.G. 1964. Cellular localization of the gibberellin-induced response of Barley endosperm. - Collog. Intern. Centre. Natl. Rech. Sci., Paris, 1963, 123, 303-317.
- PAPURS, E. V. 1967. Effect of various plant phenols on protein synthesis excised plant tissue. - Canad. J. Bot., 45, 427-433.
- PATTERSON, B.D.; TREWAVAS, A. J. 1967. Changes in the Pattern of protein synthesis induced by 3-indolylacetic acid. - Plant Physiol., 42, 1081-1086.
- PUROHIT, A.N.; NANDA, K.K.; PRABHA, A. 1969. Effect of some growth substances and antimetabolites on elongation of the first internode in eophyllus buds of Briophyllum tubiflorum. - Havr. Bot. Gaz., 130, 102-106.
- RAA, J. 1971. Degradation of indol-3-yl-acetic acid in homogenates and segments and of cabbage roots. - Physiol. Plant., 24, 498-505.
- ROSE, R.I.; ADAMSON, D. 1969. A sequential response to growth substances in coleoptiles from - irradiated wheat. - Planta, 88, 274-281.
- SARKISSIAN, I.V.; SPELSBERG, T.C. 1967. Auxin-induced elimination of a protein in bean hypocotyl. - Nature, 214, 319-320.

SHIMODA, O.; MASUDA, Y.; YANAGISHIMA, N. 1967.

Nucleic acid metabolism involved in auxin-induced elongation of yeast cells. - *Physiol. Plant.*, 20, 299-305.

SVENSSON, S.B. 1972. The effect of Coumarin on growth production of dry matter, protein and nucleic acids in roots of maize and wheat the interaction of coumarin with metabolic inhibitors. - *Physiol. Plant.*, 27, 13-24.

SWANK, R.T.; MUNKRES, K. D. 1971. Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide gel with Sodium Dodecyl Sulphate. - *Anal. Biochem.* 39, 462-465.

THIMANN, K.V.; LOOS, G.M. 1957. Protein synthesis during water uptake by potato tuber tissue. - *Plant. Physiol.* 32, 274-279.

VAN SUMERE, C.F.; DEDONDER, A. 1971. The effects of some naturally occurring and synthetic phenolics and related compounds on the uptake and incorporation of phenylalanine-1-¹⁴C by *Clorella vulgaris* - *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 65, 159-175.

VARNER, J.E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in Barley endosperm. - *Plant. Physiol.*, 39, 413-415.

- VARNER, J.E. 1967. Hormonal control of enzyme production in Barley endosperm. - Plant. growth regulators., New York, Acad. Publ., 219-222.
- VARNER, J.E.; CHANDRA, R.G. 1964. On the synthesis of α -amylase in Barley endosperm. Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 100-106.
- VENIS, M.A. 1964. Induction of Enzymatic Activity by Indolyl-3-acetic Acid and its Dependence on Synthesis of Ribonucleic Acid. Nature, 202, 900-901.
- ZAPROMETOV, M.N.; MESZHI, A.V.; GOCIRIDZE, A.A. 1969. Vlijanie presztejsih szeedinenij i produ tev ih ekiszlenija na reszt kallju-szev Daucus carota i Partenocissus tricuspidata. - Szeebscs. AN. Gruz. SzSzR, Tbiliszi, 56, 217-220.

