

Egyetemi doktori értekezés

ADATOK A GIBBERELLINSAV ÉS AZ INDOL-3-ECETSAV
NÖVEKEDÉSRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK ÖSSZEFÜGGÉSÉHEZ

A József Attila Tudományegyetem Természettudományi
Karához benyújtja:

BITÓ MÁRIA

biol.-kém. szakos középiskolai tanár

Készült

a József Attila Tudományegyetem Növényélettani
Tanszékén

1967.



Diss. B 57.



TARTALOM

I. BEVEZETÉS	1
II. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
1./ Kísérleti növények nevelése	13
2./ Bab csiranövények gibberellin kezelése és a növekedés mérése /bab teszt/	13
3./ Bab hipokotil szeletek kezelése gibberellinnel	14
4./ A szárdarabok triptofánnal történő infiltrálása	16
5./ Indolil-3-ecetsav mennyiségi meghatározása papirkromatográfiával	16
6./ Indolil-3-ecetsav meghatározása vékonyréteg kromatográfiával	19
7./ Az IES-oxidáz aktivitásának meghatározása	19
a./ Enzimpreparátum készítése	19
b./ Az enzimaktivitás meghatározása	20
8./ Az összfenoltartalom meghatározása	22
a./ A fenolok extrahálása	23
b./ Az összfenoltartalom mérése	23
9./ Polifenoláz és peroxidáz aktivitásának mérése	26
a./ Enzimpreparátum készítése	26
b./ A két enzim aktivitásának mérése	26

10./ Statisztikai számítások	29
A kísérletekben alkalmazott növekedés- szabályozó anyagok jellemzői	30
III. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	32
1./ A GS kezelés hatása a bab csiranövények, illetve a bab hipokotil szeletek növe- kedésére	32
A./ GS-sel kezelt és kezeletlen in- takt bab csiranövények növekedési különbségei és szárazsúly gyarapo- dása	32
B./ A GS-sel kezelt és kezeletlen bab hipokotil szeletek növekedési kü- lönbségei és súlygyarapodása	40
2./ A GS kezelés hatása a bab hipokotil szövetek IES tartalmára, fényben és sötétben	47
A./ A papirkromatográfiás vizsgálatok eredményei	47
B./ Vékonyréteg kromatográfia ered- ményei	51
3./ A GS kezelés hatása az IES-nak tripto- fánból történő bioszintézisére	56
A./ A papirkromatográfiás vizsgálatok eredményei	56

B./ Vékonyréteg kromatográfiás eredmények	62
4./ A GS kezelés hatása az IES-oxidáz aktivitására	65
5./ A GS kezelés hatása a hipokotilek fenoltartalmára	70
6./ A polifenoláz aktivitásának változása bab hipokotilekben GS kezelés hatására, fényben és sötétben	74
7./ A peroxidáz aktivitásának változása a bab hipokotilekben GS kezelés hatására, fényben és sötétben	76
IV. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	78
1./ A GS IES-tartalomra gyakorolt hatására vonatkozó eredmények áttekintése	78
2./ A triptofánból történő IES bioszintézis befolyásolása GS-val	83
3./ Az IES-oxidáz aktivitására vonatkozó eredmények áttekintése	84
4./ A fény hatása a GS okozta auxinszint-változásokra	88
5./ A hajtásrügy jelenlétének hatása	88
6./ A fenoltartalom alakulása a GS kezelt és kezeletlen hipokotilekben	89
7./ A fenol- és az IES-anyagcsere összefüggései	90

8./ A polifenoláz-aktivitás változása a GS- kezelt hipokotilekben és szerepe az IES- szintézisben	92
9./ A peroxidáz-aktivitás változása a GS- -kezelt hipokotilekben és szerepe az IES-szint szabályozásában	94
V. ÖSSZEFOGLALÁS	96
IRODALOM	100

I. BEVEZETÉS

A gibberellineknek és még tovább a kinetineknek a növekedésre gyakorolt hatására vonatkozó újabb ismeretek alapján világossá vált, hogy számos anyagi hatás és tényező kölcsönhatása szabályozza a növekedést, nem csupán az auxin-közvetítette mechanizmus egyedül. Az auxin tehát nem egyedüli szabályozója a növekedésnek, ebben a folyamatban a gibberellinek is részt vesznek.

Az a felfedezés, hogy a gibberellinek a magasabb szervezettségű növények természetes hormonjai, megindította a kutatásokat az auxinokkal való kapcsolatukra vonatkozólag is.

Bizonyos, hogy mind az auxinok, mind a gibberellinek serkentik a növekedést, részt vesznek a sejtmegnyúlásban. Számos kísérlet elvégzése során az auxinok és a gibberellinek hatása között bizonyos összefüggéseket találtak. Azóta e két természetes növekedésszabályozó anyagcsoport kölcsönhatása a legutóbbi évek sokat kutatott témája, amelyre vonatkozólag az utóbbi években számos közlemény jelent meg, de amit megnyugtatóan a mai napig sem sikerült tisztázni.

Auxint és gibberellint tartalmazó, vagy azok keverékében úsztatott szövetszeletek növekedésének tanul-

mányozása azt mutatja, hogy a gibberellin és az auxin hatása legtöbbször szinergikus, máskor viszont additív, vagy szubadditív. Abból a megállapításból, hogy a két növekedésszabályozó anyag szinergikus egymással több szerző azt a következtetést vonta le, hogy a gibberellin hatása az auxin jelenlététől függ. E szerzők szerint szoros kölcsönhatás van a gibberellin és az auxinok között, vagyis a gibberellinek egy auxinnal összekapcsolt mechanizmus útján hatnak.

Más szerzők viszont ellenkező eredményekre jutva azt állítják, hogy az auxinok és gibberellinek növekedésre gyakorolt hatása egymástól független.

Két egymással ellentétes nézet áll tehát egymással szemben az irodalomban, s mindkettőre vonatkozólag számos közlemény jelent meg napjainkban. Az idevonatkozó irodalmi adatok alapján a gibberellinek és auxinok hatásának viszonyát érintő kétféle vélemény lényege a következőkben foglalható össze.

1./ Az 1950-es évek végén jelentkezett először az a nézet, mely szerint a gibberellinek /GS/ és auxinok /a természetes IES/ hatása összekapcsolódik. A kérdéssel foglalkozó első szerzők BRIAN és HEMMING /1957, 1958/ szerint auxin szükséges a gibberellin hatáshoz, vagyis a gibberellin csak auxin jelenlétében hat.

Kialakult az a nézet, hogy a gibberellinek élet-

tani hatása annak tulajdonítható, hogy elsődlegesen hatnak az auxin-szintézisre, tehát növelik a natív auxin mennyiségét és esetleg az auxin transzportját a növényekben.

NITSCH /1957/ kísérletei szerint a GS kezelés a *Rhus typhina*-ban emelte a natív auxin mennyiségét. TSUKAMOTO és SANO /1958/ kísérleti eredményeik alapján megállapítják, hogy a burgonyagumó GS tartalmának emelése növelte az auxin mennyiségét. PHILIPS és munkatársai /1959/ szerint a GS ugyancsak növeli a borsóban az extrahálható indolecetsav /IES/ tartalmát. NITSCH, I.P. és NITSCH, C. /1959/ a "Dwarf Red Kidney" bokor babfajta gibberellines kezelése után az auxinkoncentráció nagymértékű emelkedését észlelték; s a "Kentucky Wonder" karós bab növekedésének gyorsaságát jobban serkentette a gibberellin IES jelenlétében. BOUILLENNE és WALRAND /1959/ szintén arra a megállapításra jutottak, hogy a GS növeli a natív IES koncentrációját a növényekben. MICHNIEWICZ /1962/ is hasonló következtetést vont le kísérletei alapján.

KURASHI és MUIR /1962/ azt közli, hogy a borsóban, babban és napraforgóban a GS kezelés után 2-5-ször több lett a diffuzibilis auxin. RODIONOVA és RUNKOVA /1963/ a GS kezelést követő három óra múlva nyolc természetes auxin-frakcióban jelentős mennyiségi növekedést állapítottak meg a Latrija babfajtában. A keze-

lést követő 24 óra múlva azonban a tesztben már kismértékű volt a GS okozta serkentés a természetes auxinfrakciók vonatkozásában.

GAMBURG /1964/ a genetikailag törpe borsó mutánsoknál vizsgálta a gibberellin és az auxin egymásra hatását. Kísérletei azt bizonyítják, hogy a gibberellin-adagolás hatására az endogén auxin-szint nagyobb lett. DAS és RAO /1965/ a GS és IES egymásra hatását vizsgálva ugyancsak arra az eredményre jutott, hogy a két anyag együttes alkalmazása növelte az auxin tartalmat a csiránövényekben. ERNEST /1966/ közlései alapján is a GS kezelésben részesült növények auxin-szintje emelkedett. Ezen megfigyelések alapján tehát feltehető, hogy a gibberellin az auxin-szintézis közvetlen befolyásolása útján szabályozza a növekedést.

Más szerzők viszont a GS-nek IES-tartalmat növelő hatását úgy magyarázzák, hogy a gibberellinek az indolecetsavnak az indolecetsav-oxidáz enzimrendszer általi elbomlását akadályozzák, tehát mintegy "megóvják" az auxint és ezáltal fokozott IES-szintet s ennek megfelelően fokozott növekedést eredményeznek vagy közvetlenül az enzimre gyakorolt, vagy egy enzimhibitorra gyakorolt közvetett hatás következtében. Így pl. PILET /1957/ szerint a GS kezelés csökkentette az IES-oxidáz aktivitását, s ezáltal egy eszköznek tekinthető az auxin-szint növelésére, vagyis auxinkimélő hatása van. STUTZ és

WATANABE /1957/, valamint PILET és WURGLER /1958/ vizsgálatai szerint a gibberellin kezelés szintén csökkenti az indolecetsav-oxidáz aktivitását és ennélfogva növeli az auxin koncentrációját.

Közel állnak ezekhez az elgondolásokhoz BRIAN és HEMMING /1958/ megállapításai, akik szerint a GS valószínűleg semlegesít egy növekedést gátló rendszert a borsóhajtásokban, amely akadályozza a rendelkezésre álló auxin hatásának kifejtését. Tehát a gibberellin azáltal hat, hogy megszünteti az auxin által indukált növekedés egyik inhibitorát. A borsóhajtás növekedését tehát 3 faktorból álló rendszer szabályozza, az auxin, egy auxin-inhibitor, és a gibberellinszerű anyag. Ehhez kapcsolódik lényegileg a GALSTON /1957, 1959/ által adott hipotézis, amely szerint endogén auxin-takarékosság származhat másodlagosan egy IES-oxidáz inhibitor keletkezéséből, s a gibberellin esetleg ezen inhibitor képződését vagy működését befolyásolja olyan irányban, ami az IES-szint emelkedéséhez vezet.

HOUSLEY és DEVERALL /1961/ kísérleteiben a gibberellin szintén csökkentette az IES elbomlását, s auxinmegóvó hatást eredményezett. Szerintük a gibberellin hatására egy inhibitor képződik, mely gátolja az auxin-elbontó rendszer működését. HALEVY /1963/ közleményében ugyancsak arra következtet, hogy a GS gátolja az indolecetsav-oxidáz aktivitását.

A legutóbbi években megjelent idevonatkozó közlemények egy része a fenti nézeteket támogatja, más része viszont ellene mond ezen adatoknak.

2./ Az ellenkező eredményű kísérleteket áttekintve, kialakul egy másik nézet, amely szerint a GS hatása független az auxinoktól.

GALSTON és McCUNE /1961/, HILLMANN és PURVES /1961/ valamint mások, a saját és mások eredményeinek kritikai elemzése során szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az auxin- illetve gibberellin-hatás előző magyarázata téves. Ezen szerzők szerint az auxin és a gibberellin nem azáltal hat elsődlegesen, hogy egymás koncentrációját befolyásolja. KATO /1961/ hangsúlyozza, hogy az IES és a GS nem azáltal hat elsődlegesen, hogy egymás koncentrációját befolyásolja, vagyis a GS növekedésre gyakorolt hatása nem függ a kérdéses szövet auxin-szintjének változásától.

Több szerző hangsúlyozza, hogy a szinergizmus még nem jelent szoros kölcsönhatást, nem jelenti azt, hogy a gibberellin egy auxin-közvetítette rendszeren keresztül hat.

Sok szerző olyan eredményt kapott, amely szerint a gibberellin-koncentráció emelkedése a növényben nem vezet sem az indolecetsav-tartalom növekedésére, sem pedig az indolecetsav-oxidáz enzimrendszer auxint elbontó aktivitásának megváltozására. Így például HAYASHI

és MURAKAMI /1958/ számos növényben nem talált változást az auxin-szintben a gibberellin-kezelés után.

HILLMANN és PURVES /1961/ kísérleti adatai sem felelnek meg a gibberellin által növelt auxin-szintézis koncepciójának.

Ami pedig a GS és az IES-oxidáz viszonyát illeti, KATO és KATSUMI /1958/ szerint a gibberellineknek nincs hatásuk az IES-oxidáz aktivitására, és később BRIAN és HEMMING /1961/ sem észlelték a gibberellinnek az IES-oxidázra gyakorolt gátló hatását. KEFFORD /1962/ eredményei ugyancsak nem támogatják azt a hipotézist, hogy a gibberellin megnyúlásra való hatása kapcsolatban lenne az IES-oxidáz rendszer gátlásával. Sőt egyesek megnövekedett IES-oxidáz aktivitásról számoltak be /WAY-GOOD, 1961/ GS-val kezelt szövetekben. REINGARD és PALLADINA /1963/ véleménye szerint pedig a GS egyenesen azáltal fejtené ki növekedésserkentő hatását, hogy fokozza az IES-oxidáz aktivitását. Ezek, valamint más tények tehát ellene mondanak a GS úgynevezett "auxin-kímélő" hatásának. Ezek alapján számos szerzőnek az a véleménye, hogy a GS és IES különböző, egymástól független mechanizmus által, és térbelileg is elkülönített rendszerekre hatnak.

3./ A GS és IES hatásának összefüggését harmadik, úgynevezett középutas megoldásban is támogatják. HILLMANN és PURVES /1960/ szerint a GS hatása összefüggés-

ben van az auxin jelenlétével, de ez nem jelenti azt, hogy direkt hat az auxin-anyagcserére. KEFFORD és GOLDACRE /1961/ "Az auxinok megváltozott koncepciója" c. munkájában rámutat arra, hogy az izolált szövetekben az auxin együttműködik a gibberellinokkal a sejtmegnyúlás szabályozásában /az auxin és kinetin viszont együtt hat a sejtosztódás iniciálásában/, mindegyik a sejtekre gyakorolt saját hatása révén. A hipotézis szerint mind a hajtás, mind a gyökér növekedéséhez auxin és gibberellin is szükséges, azonban az új koncepció szerint nem az auxin a növekedést meghatározó tényező, az auxin csupán hajlamosítja, mintegy aktiválja a sejteket a gibberellinre adott reakcióra.

Tekintettel arra, hogy az irodalomban a gibberellin és az indolecetsav kölcsönhatásával kapcsolatosan ennyire megoszlanak a vélemények, a téma kutatása továbbra is indokolt. Meg kell jegyezni ugyanis, hogy az idézett munkákban a szerzők egészen különböző kísérleti növényeket, illetve növényi részeket, különböző módszereket és nagyon eltérő GS koncentrációkat alkalmaztak, s így az eredmények kevéssé, vagy egyáltalán nem hasonlíthatók össze. Kivánatos tehát a GS és IES kapcsolatát azonos objektumon, azonos körülmények között, sokoldalúan megvizsgálni.

Kivánatos továbbá a gibberellineknek az IES anyagcserével való kapcsolatát a fenolvegyületek esetleges

közvetítő szerepére kiterjesztve is tanulmányozni. Irodalmi adatok alapján lehetséges ugyanis, hogy a GS fenolokra gyakorolt hatása következtében közvetve befolyásolja az IES-szintet s a növekedést.

Az utóbbi időben ugyanis egyre több közlemény jelent meg, amely a fenoloknak a növények növekedésében játszott szerepét bizonyítja. Ezek szerint a fenolok többféle módon is beavatkoznak a növények növekedésébe, vagyis szoros kapcsolat áll fenn a növekedés és a fenolvegyületek között.

Amellett, hogy a fenolok szerepelhetnek mint növekedést gátló, illetve serkentő anyagok, és mint auxin-szinergisták, számos közlemény szerint a fenolok szabályozzák az auxin-anyagcserét, vagy az indolecetsav-oxidáz enzimrendszer aktivitásának befolyásolása révén /GORTNER és KENT, 1953; TOMASZEWSKI, 1959; FURUYA, 1962; VARGA és KÖVES, 1962; SÁGYI és GARAY, 1964/, vagy az indolecetsav triptofánból történő biogenezésének szabályozásával /GORDON és PALEG, 1961; KÖVES, 1965/. Az adatok szerint a monofenol vegyületek auxin-oxidáz aktivátorok, a di- és polifenolok pedig az enzim inhibitorai /GASPAR-BASTIN és LEYH, 1964, VARGA és KÖVES, 1962/.

Bizonyítékok vannak arra is, hogy a fenolok mint az oxidatív foszforozódást szétkapcsoló anyagok hatnak a növekedésre /KÖVES, 1965/ és összefüggésben vannak a

a gibberellinszerű anyagok hatásával is. VARGA /1964/ kimutatta, hogy a rizsszemekben az endogén fenolos növekedésgátló anyagok hatását a GS bizonyos koncentrációkban visszafordítja; SIROIS-PARUPS /1965/ szerint pedig a GS a dohányyszövetekben eltüntet egy fenoljellegű savas inhibitor, ami az IES hatását csökkenti. A szerzők szerint a GS akadályozza ennek az inhibitornak a szintézisét, illetve valamilyen módon csökkenti a koncentrációját a szövetekben. Hasonló következtetésre jutott WAREING /1965/ is, a magvak nyugalmi állapotának inhibitor-teóriájával kapcsolatban /az endogén inhibitorok és a GS közötti kölcsönhatás/. MAYER /1959/ szerint a csirázásgátló kumarin a magvak GS-szerű anyagaiban okoz olyan változást, amely a csirázás gátlásához vezet; s ez a GS-kezeléssel megakadályozható. Igen érdekes DAS és RAO /1965/ közleménye, mely szerint a hagymagyökerekben a GS elősegíti a fenolvegyületek szintézisét és ezen keresztül a megnövekedett auxintartalom folytán részt vesz a növekedés szabályozásában.

Ha tehát a GS hat a fenolvegyületek mennyiségére és akciójára, ezen keresztül a szövetek IES-szintjének megváltozására vezethet.

Tovább bonyolítja a kérdést az a tény, hogy a GS, IES és a fenolok képződését és hatását - s általában a növekedési folyamatokat - a fény is nagymértékben

befolyásolja. Vagyis a GS-IES vagy a feltételezett GS-fenol-IES viszonyt fénytől is függő folyamatnak kell tekinteni. Ezt a vonatkozást eddig az irodalomban egyáltalán nem vizsgálták.

Fentiek alapján dolgozatomban a következő kérdések vizsgálatát tűztem ki célul:

1./ Van-e kapcsolat a babnövény szöveteiben a GS és az IES anyagcseréje között? Ennélfogva célom volt megvizsgálni, hogyan hat a babszövetek GS kezelése:

- a./ az objektum növekedésére,
- b./ az endogén IES-tartalomra,
- c./ az IES-nak a triptofánból való bioszintézisére,
- d./ az IES-oxidáz aktivitására.

2./ A GS közvetlenül vagy közvetve - az auxinszintet befolyásoló rendszereken pl. fenolokon át kapcsolódik az IES anyagcseréhez? Hogyan hat tehát a GS kezelés:

- a./ a növekvő szövetek fenoltartalmára, és
- b./ a peroxidáz és fenoláz aktivitására.

3./ Az endogén IES koncentráció befolyásolja-e a GS hatását?

4./ Hogyan hat a fény a GS és IES képződésére és a két fitohormon kapcsolatára?

Tekintettel arra, hogy a fenti kérdések nagyon

bonyolultak és messzire elágazók, disszertációm nem adhat teljes és kimerítő választ minden vonatkozásra, azonban adatokkal hozzájárulhat a probléma jobb megértéséhez.

II. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteimhez a *Phaseolus vulgaris* L. var. nanus "Aranyeső" bokor babfajta 1964-65. évi terméséből származó vetőmagot használtam.

A kísérletek kivitelezése során az alábbi feladatokat kellett elvégeznem:

- 1./ Kísérleti növények nevelése.
- 2./ Bab csiranövények gibberellin kezelése és a növekedés mérése /bab teszt/.
- 3./ Bab hipokotil szeletek kezelése gibberellinnel.
- 4./ Szövetek triptofánnal történő infiltrálása.
- 5./ Indolil-3-ecetsav mennyiségi meghatározása papirkromatográfiával.
- 6./ Indolil-3-ecetsav meghatározása vékonyréteg kromatográfiával.
- 7./ Az IES-oxidáz aktivitásának meghatározása.
- 8./ Összfenoltartalom meghatározása.
- 9./ Polifenoláz és peroxidáz aktivitásának mérése.
- 10./ Az eredmények statisztikai értékelése.

1./ Kísérleti növények nevelése

A magvakat Petri-csészében nedves szűrőpapíron előcsiráztattam, majd 60 óra múlva kiválogattam az egyenlő nagyságú csiranövényeket, s azokat 70%-os viz-tartalomra beállított tiszta homokba, egymástól egyenlő távolságra ültettem és egyenlő /kimért/ mennyiségű Prjanyisnyikov tápoldattal locsoltam. A babnövények üvegházban, 22-23 C° hőmérsékleten, 6000 lux nappali megvilágítás mellett nevelkedtek. A különféle kísérletekhez, azok természete szerint, az 5-10. napon kerültek felhasználásra.

2./ Bab csiranövények gibberellin-kezelése és a növekedés mérése /bab teszt/

A csiranövények gibberellin kezelése az 5. napon történt. Egy gibberellin koncentráció sorozatból Hagedorn-pipettával 0,1 ml-t cseppentettem a hajtás-csúcsra úgy, hogy a növények 0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2; 5; 10; 20; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 300 és 400 µg gibberellin mennyiséget kaptak egyedenként.

Minden koncentrációval 10-10 növényt kezeltem.

A gibberellint 25%-os vizes acetonban oldottam fel, mert irodalmi adatok szerint /PHINNEY, 1962/ a gibberellinnek a sejtekbe való behatolása és felszi-

vódása ebben az esetben a legkedvezőbb.

A növények a kapott gibberellin mennyiségétől függően eltérő mértékben növekedtek. A kezelés utáni 5., 10. és 15. napon megmértem a teljes hajtáshosszúságot és az egyes internódiumok hosszúságát cm-ben és növekedési standard-sorozatokot illetve görbéket készítettem.

A továbbiakban már csak két, a standard alapján kiválasztott gibberellin koncentrációval /közepes és magas/ kezeltem a csiranövényeket. Ez esetben a csiranövények 0,0; 25 illetve 300 μ g GS mennyiséget kaptak egyedenként a hajtáscsúcsra, az 5. napon.

A növények víz- és tápanyagellátása ez esetekben is teljesen egyenlő - kimért - mennyiségű Prjanyisnyikov tápoldattal történt.

3./ Bab hipokotil szeletek kezelése gibberellinnel

Hatnapos bab csiranövényekből a sziklevel eltávolítása után 5 db 3 cm hosszú, hajtáscsúcs nélküli /dekapitált/ és ugyancsak 5 db hajtáscsúcsos hipokotil darabokat vágtam ki. Az 5-5 hipokotil darab együttes súlyát pontosan lemértem, ezután 8 cm $\varnothing$ Petri-csészébe tettem, melybe előzőleg 10 ml tesztoldatot pipettáztam.

A hipokotil darabokat és a hajtáscsúcsos szár-

darabokat 0; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 150; 250; 500; 750 és 1000 ppm koncentrációjú gibberellin-oldatban úsztattam; az egyik sorozatot állandó fényben /3000 lux/, a másikat pedig sötétben inkubálva, 24 óra és 48 óra elteltével megmértem a hossznövekedést /cm-ben/ és a friss-súlygyarapodást g-ban. A 48 órás kezelés után a mintákat 105 C⁰-os szárítószekrénybe helyeztem, súlyállandóságig szárítottam és kiszámítottam a szárazsúly %-ot. Az adatokból standard sorozatot állítottam össze annak megállapítására, melyek azok a GS koncentrációk, amelyek a kísérletekben kívánt növekedést előidézik.

Fentiek alapján a 0, 100 és 1000 ppm GS koncentrációt választottam ki, s így a továbbiakban 6,5 pH-jú Mac-Ilvain-féle puffert /GS 0 ppm/; 6,5 pH-jú pufferben oldott 100 ppm és 1000 ppm koncentrációjú GS oldatokat használtam az inkubáláshoz. Minden Petri-csészébe 20 ml tesztoldatot pipettáztam, abba 9-9 db hipokotil illetve hajtáscsúcsos szárdarabot tettem. Az inkubálás egyrészt fényben, másrészt sötétben történt. 24 órás úsztatás után a szövetdarabok a tesztoldattal telítődnek és ekkor meghatároztam az IES-tartalmat, az IES-oxidáz, a peroxidáz és a polifenoláz aktivitását és az összfenoltartalmat.

4./ A szárdarabok triptofánnal történő infiltrálása

A hatnapos babnövényekből kivágott hipokotil darabokat és hajtásescúcsos szárdarabokat vastagfalú, nagyméretű szivópalackba helyeztem, melybe előzőleg 10^{-3} M-os triptofán-oldatot öntöttem. A szivópalack gumidugójának furatába csapot helyeztem. Ezután gondosan ellenőriztem, hogy minden szövetdarab teljesen alámerüljön a triptofán-oldatba. Vizlégszivattyúval vákuumot létesítettem 20 perces szivatással. 20 perc után a szivatást megszüntettem és a szivópalack csapját megnyitottam, amikor is a betóduló levegő benyomta a triptofán-oldatot a szövetekbe.

A triptofánnal infiltrált hipokotil darabokat a továbbiakban ugyanolyan vizsgálatoknak vetettem alá, mint a triptofánnal nem kezelteteket.

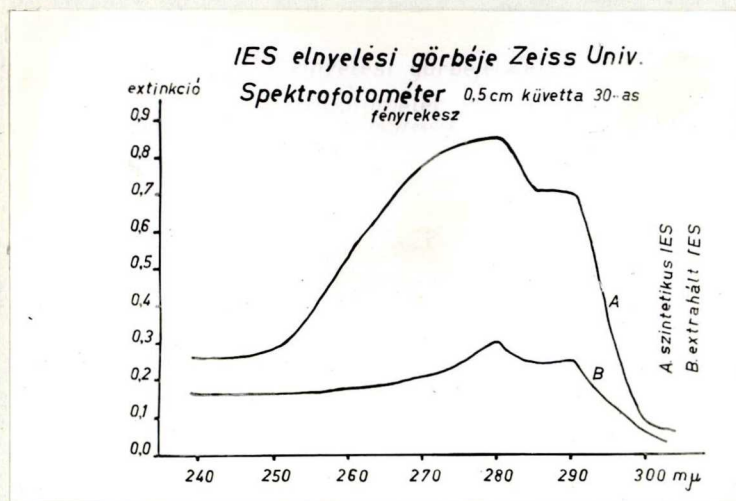
5./ Indolil-3-ecetsav mennyiségi meghatározása papirkromatográfiával /FLETCHER-ZALIK, 1964/

Az előkészített növényi részeket lemerés után azonnal 25 ml hideg metanolba merítettem. Ezután hideg porcelánmozsárban analitikai kvarchomokkal homogenizáltam, majd hűtőszekrényben 24 óráig állni hagytam. Utána az extraktumot szűrtem, és zsirtalanítás céljából

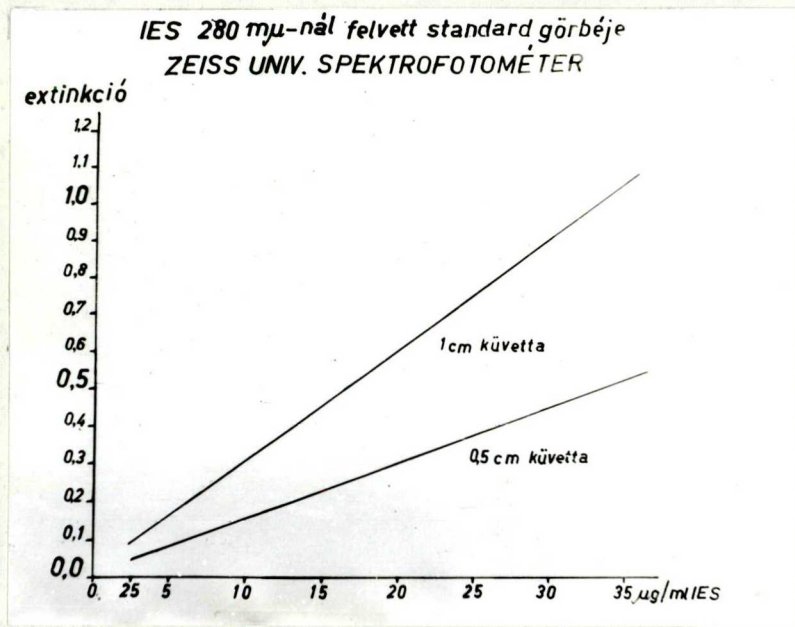
petroléterrel kétszer kiráztam.

Körülbelül 4,5 g friss-anyagnak megfelelő, zsirtalanított extraktum-mennyiséget 40 °C-on vákuum-desztillálással szárazra pároltam. A maradékot 0,5 ml metanollal felvettem és Whatman 1 papír 3 csikjának startpontjára cseppentettem fel, egyenlő mennyiségben. Egy csikra szintetikus IES-t vittem fel összehasonlítás céljából. Felszálló kromatogramot készítettem 16 órás futtatással, izopropanol:7%-os ammónia:víz /8:1:1/ szolvenssel. Levegőn való szárítás után az UV fluoreszcencia alapján és Erlich-reagenssel történő előhívással állapítottam meg az IES-foltok helyét. Ezután a többi kromatogramból az IES-t tartalmazó részt kivágtam és 3,5 ml metanollal 2 óráig eluáltam. Az eluátum IES-tartalmát Zeiss Univerzális Spektrofotométerrel 280 mμ-nál mértem, miután abszorpciós görbéiket is felvettem. Az eluátumok abszorpciós görbéje minden esetben szonos volt azzal a jellegzetes görbével, melyet a szintetikus IES ad /1. ábra/.

A kromatogram foltok eluátumának IES-koncentrációját a 280 mμ-nál kapott extinkció alapján számítottam ki standard görbe segítségével. A standard görbét 2,5-35 μg/ml IES mennyiségeket tartalmazó metanolos oldatok 280 mμ-nál adott extinkciós értékei alapján készítettem el /2. ábra/. A szövetek IES tartalma μg/lg friss-súly értékben van kifejezve.



1. ábra: A szintetikus IES-nak /A/ és az IES-foltok
eluátumának /B/ UV-abszorpciós görbéje



2. ábra: IES UV-fotometrázásához 280 μ -nál készi-
tett standard görbe

6./ Indolil-3-ecetsav meghatározása vékonyréteg
kromatográfiával

A növényi részeket a papirkromatográfiás eljárással azonos módon dolgoztam fel. A különbség csupán az, hogy a 0,5 ml metanolos extraktumot Whatman 1 papir helyett üveglapra felkent szilikagél rétegre /Kieselgel G MERCK/ cseppentettem fel. A futtatás szintén izopropanol-7%-os ammónia-víz /8:1:1/ szolvenssel történt, s ideje 2 óra volt. Levegőn való szárítás után UV-fénnyel és Erlich-reagenssel állapítottam meg az IES-foltok helyét. Az IES-t illetve komplexeit tartalmazó részeket lekapartam, s külön-külön eluáltam 3,5 ml metanollal. Az eluátumok IES-tartalmának mérése és meghatározása a papirkromatográfiánál leirtakkal azonos módon, spektrofotometriával történt.

7./ Az IES-oxidáz aktivitásának meghatározása

/GORDON és WEBER, 1951/

A gibberellinnel kezelt és kezeletlen, dekapitált és hajtáscsúcsos hipokotil darabokat felaprítottam és $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hűtőszekrényben megfagyasztottam.

a./ Enzimpreparátum készítése: 3 g fagyasztott anyagot $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lehűtött porcelánmozsárban eldörzsöltem késhegynyi analitikai kvarchomokkal és 10 ml $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra

lehűtött 6,2 pH-jú Mac-Ilvain-féle pufferoldattal, míg sejtmentes, homogén szuszpenziót nem kaptam. A homogenizátumot 30 percig 5000 fordulattal centrifugáltam. Centrifugálás után a leöntött tiszta folyadékot 6,2 pH-jú Mac-Ilvain-féle pufferrel 15 ml-re töltöttem fel.

b./ Az enzimaktivitás meghatározása: 20 ml-es Erlenmeyer-lombikba a következő reakcióelegyet töltöttem:

3 ml enzimkivonat

2 ml $5 \cdot 10^{-4}$ M vizes IES-oldat

5 ml 6,2 pH-jú Mac-Ilvain-féle puffer

Minden reakcióelegyhez vakpróbát is készítettem

a következők szerint:

3 ml enzimkivonat

2 ml desztillált víz

5 ml 6,2 pH-jú pufferoldat

A fotometráláshoz szükséges kontrol próbát a következő reakcióelegy adta:

3 ml desztillált víz

2 ml $5 \cdot 10^{-4}$ M vizes IES-oldat

5 ml 6,2 pH-jú pufferoldat

A reakcióelegyeket tartalmazó lombikokat 2 órára 25 °C-os sötét termosztátban inkubáltam, majd kolorimetriásan megmértem az elegyek maradék IES-tartalmát.

E célból 5 ml kipipettázott reakcióelegyhez 10 ml GORDON-WEBER-reagenst adtam. A reagens hozzáadása után a kis Erlenmeyer-lombikokat 30 percre 40-50 °C-os

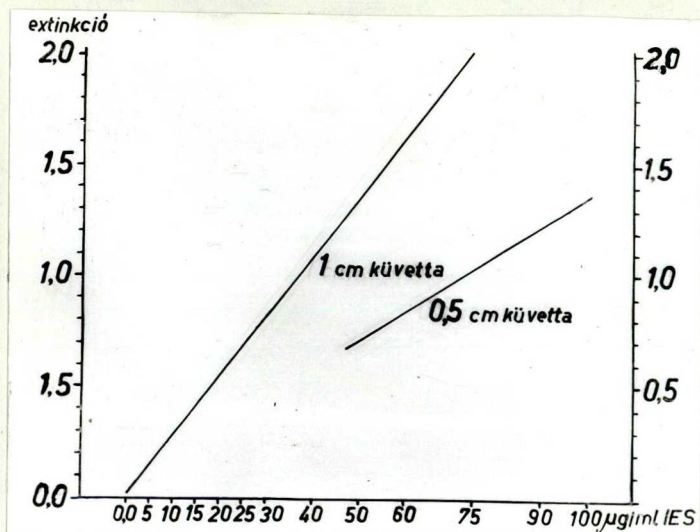
termosztátba helyeztem, hogy az IES-re jellemző vörös szín kifejlődjék /SALKOWSKI-reakció/.

A 30 perc letelte után a reakcióelegyek IES-tartalmát Spektromom 360 fényelektromos fotométerrel mértem 510 mμ hullámhosszúságnál, a vakpróba ellenében.

A színreakció intenzitása a 20. percben éri el maximumát és utána 1 óráig állandó.

Az extinkciós értékek alapján az el nem bomlott IES mennyiségét standard görbéről olvastam le μg/ml-ben.

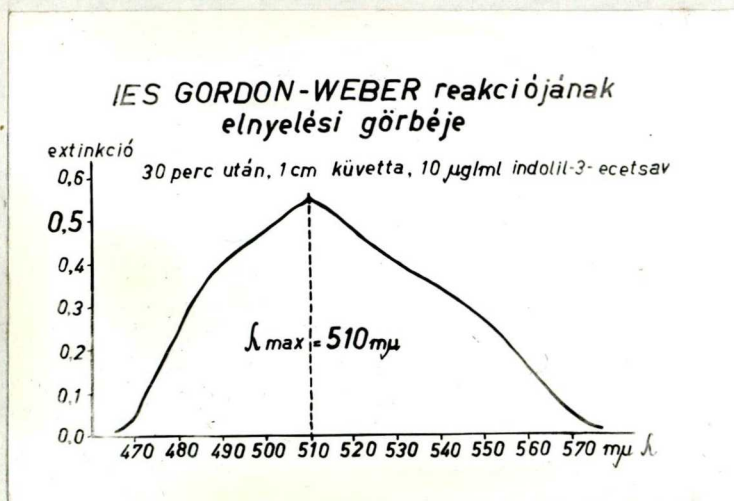
A standard görbét 1-100 μg/ml koncentrációjú metanolos IES-oldatok GORDON-WEBER reagenssel adott színreakciójának fotometrálása útján kapott extinkciós értékek alapján készítettem /3. ábra/.



3. ábra: IES Gordon-Weber reagenssel adott vörös színreakciójának hitelesítő görbéje

Az IES Salkowski-reakciójaként keletkező vörös

szín elnyelési görbét előzőleg felvettem, s az 510 mμ hullámhosszágnál mutatott maximumot /4. ábra/.



4. ábra: IES Salkowski reakciójának abszorpciós
spektruma

Az enzimaktivitást az elbomlott IES μg/óra/lg
friss-súly értékben fejeztem ki.

8./ Az összfenoltartalom meghatározása

A fenoltartalom együttes meghatározása HILLIS és
SWAIN /1957/, SWAIN és HILLIS /1959/, valamint GLICK
/1960/ közlései alapján történt.

a./ A fenolok extrahálása. Az előkészített növényi részeket felapritottam, s minden mintából 5g anyagot mértem le abszolút metanol alatt. Ezután a szöveteket analitikai kvarchomokkal dörzsmozsárban eldörzsöltem és a homogenizátumot 10-15 percig forraltam, majd az oldatot leöntöttem és a szövetet újra extraháltam további 6 porció forrásban lévő metanollal. Az összeöntött metanolos extraktumot vákuumban 45°C -on szárazra pároltam, s a maradékot 10 ml metanolban oldottam fel.

A megmaradt szöveteket ezután a vízben oldódó fenolok kivonása céljából vízzel extraháltam. A vizes extraktumot az előbbihez hasonló módon készítettem azaz a különbséggel, hogy ez esetben 3 extrakció elegendő volt a maradék fenolok kivonásához.

b./ Az összfenoltartalom mérése a Folin-Denis reakció alapján történt. A meghatározandó oldatokból kémcsőbe 1 ml metanolos extraktumot 7,5 ml desztillált vízzel hígítottam, összekeverés után 0,5 ml Folin-Denis reagenst adtam hozzá, ismét összeráztam és pontosan 3 perccel később 1 ml telített Na_2CO_3 oldatot adtam hozzá. A Na_2CO_3 hozzáadása után az oldat azonnal megkékült a fenoltartalomtól függően. Ez a kék szín állás közben erősödik. A színeződés azzal magyarázható, hogy a fenolok a foszformolibdenátot kék színű komp-

lex képződése közben redukálják. A reakció valamennyi fenolra általánosan jellemző, azonban SWAIN és HILLIS /1959/ szerint a különféle fenolok reakcióinak egyéni különbségei e módszernél a legkisebbek.

Az így nyert 10 ml oldatot jól összekevertem és félórai állás után a kék komplex abszorpcióját 1 cm-es küvettában, 725 $m\mu$ -nál mértem Spektromom 360 fényelektromos fotométerrel.

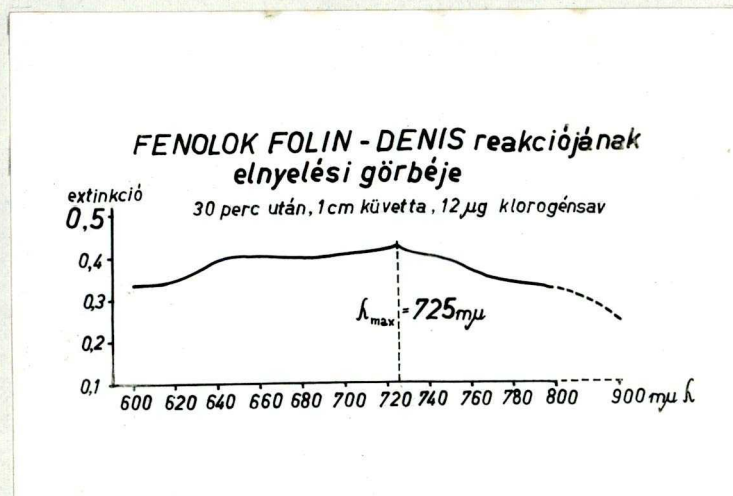
A fotometráláshoz szükséges vakpróbát a következők szerint készítettem:

8,5 ml desztillált víz

0,5 ml Folin-Denis reagens

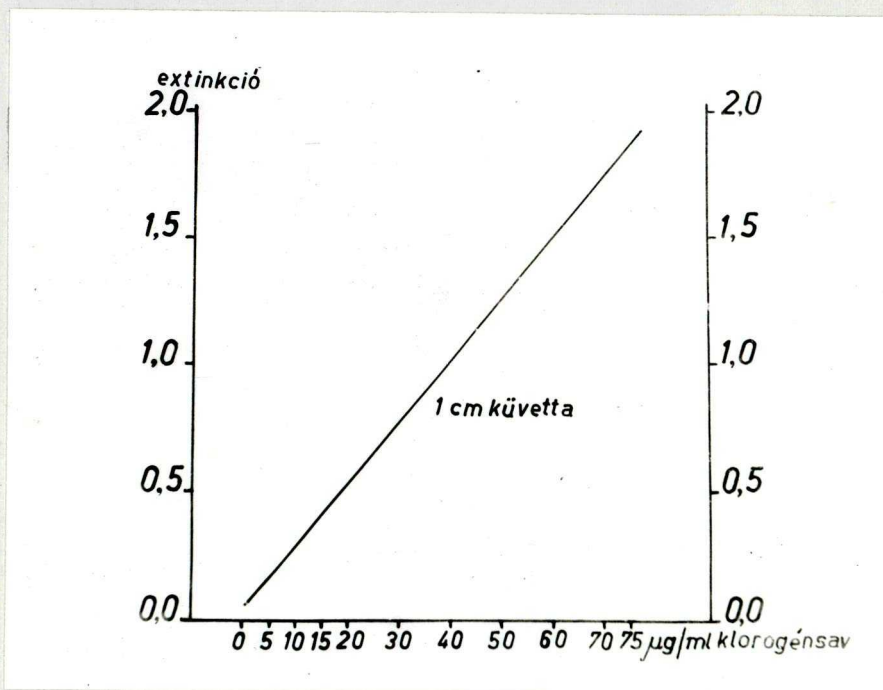
1,0 ml telített Na_2CO_3

A kék komplex elnyelési görbéje igen széles maximumot mutat 620-740 $m\mu$ között; a csúcs 725 $m\mu$ -nál van /5. ábra/.



5. ábra: A Folin-Denis reakció kék komplexumának elnyelési görbéje Zeiss spektrofotométerben

A kapott extinkciókat standard görbe segítségével számítottam át $\mu\text{g/ml}$ -re. A standard görbét 1-75 $\mu\text{g/ml}$ klorogénsav oldatok Folin-Denis reagenssel adott színreakciójának fotometrálnálása alapján készítettem /6. ábra/.



6. ábra: Klorogénsav Folin-Denis reakciójának standard görbéje, 725 $\text{m}\mu$ -nál mérve

Az eredmények tehát klorogénsav-ekvivalensben vannak kifejezve és $\mu\text{g/l}$ g friss-súlyra átszámítva.

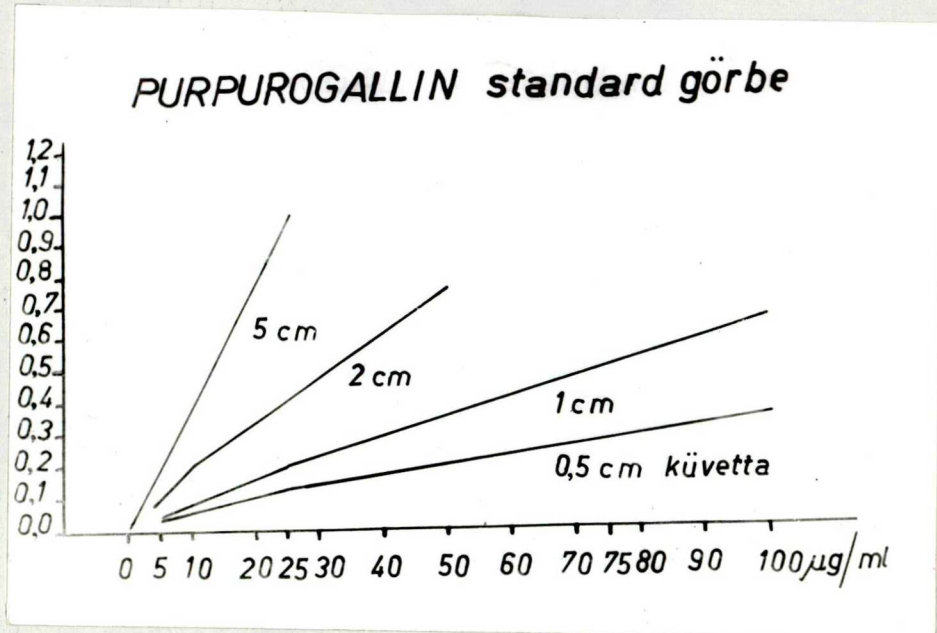
A keletkezett purpurogallin mennyiségét Spektromom 360 fényelektromos fotométerrel mértem.

A mérésekhez az alábbi reakcióelegyeket állítottam össze:

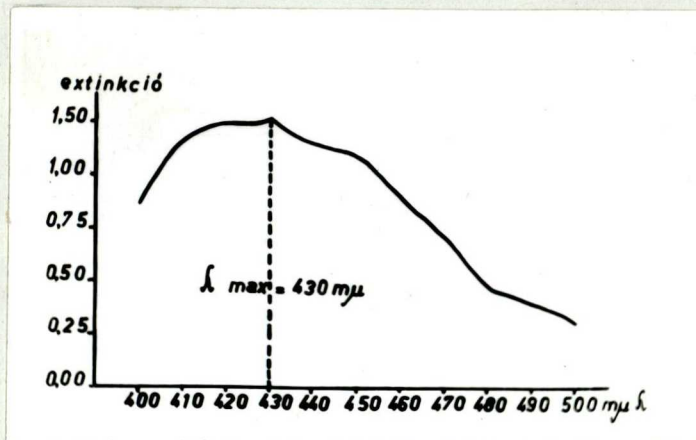
- a./ 50 ml 0,25%-os pufferolt pirogallol
0,25" 0,50%-os H_2O_2
5 ml enzimkivonat
polifenoláz + peroxidáz aktivitás
- b./ 50 ml 0,25%-os pufferolt pirogallol
5 " enzimkivonat
polifenoláz aktivitás
- c./ 50 ml 0,25%-os pufferolt pirogallol
5 " desztillált víz
vakpróba

A reakcióelegyeket 20 percig levegőztettem, majd 20%-os H_2SO_4 hozzáadásával leállítottam a reakciót. A narancs színű festéket éterrel háromszor kiráztam, majd az éteres extraktumot 25 ml-re feltöltöttem. Az a./ és b./ reakcióelegyből kapott éteres oldat szinerósságát Spektromom 360 fényelektromos fotométerrel 430 $m\mu$ mellett, extinkció-értékben határoztam meg. A keletkezett purpurogallin mennyiségét tiszta purpurogallinnal felvett standard görbéről kerestem vissza /7. ábra/.

A purpurogallin elnyelési görbáját előzőleg felvettem, s az 430 $m\mu$ -nál mutatott maximumot /8. ábra/.



7. ábra: Purpurogallin standard görbe 430 $\text{m}\mu$ -nál
mérve



8. ábra: A purpurogallin elnyelési görbéje

10./ Statisztikai számítások

A kísérleti növények GS kezelését és növekedésének mérését esetenként 10-10 csiranövénnyel végeztem. A hajtáscsúcs nélküli /dekapitált/ és hajtáscsúcsos hipokotil darabok hossz- és szárazanyag-gyarapodásának meghatározása 9 db szelettel történt. A laboratóriumi vizsgálatokat és méréseket háromszoros vagy négyszeres ismétléssel végeztem. A dolgozatban közölt kísérleti eredmények minden esetben a mérési adatok átlagértékeinek felelnek meg. Ezek statisztikai megbízhatóságának kifejezésére kiszámítottam a következő mutatókat:

1./ Középhiba /négyzetes eltérés/:

$$s_x = \pm \sqrt{\frac{\sum /x_i - \bar{x}/^2}{n - 1}} \quad \text{ahol } x_i = \text{az egyes mérések értéke}$$

$\bar{x}$ = középérték vagy átlag
 n = a mérések száma

2./ Középérték középhibája:

$$\mu_x = \pm \sqrt{\frac{\sum /x_i - \bar{x}/^2}{n/n - 1/}} \quad \text{vagy röviden} \quad \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

3./ Variációs koefficiens

$$CV = \frac{100 \cdot s_x}{\bar{x}}$$

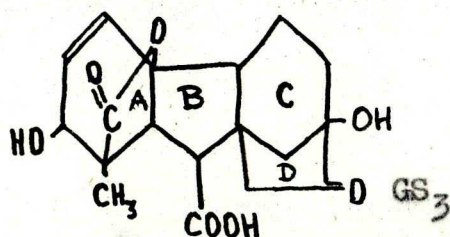
4./ Szignifikáns differencia / /

$$SzD = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\mu_{x_1}^2 + \mu_{x_2}^2}}$$

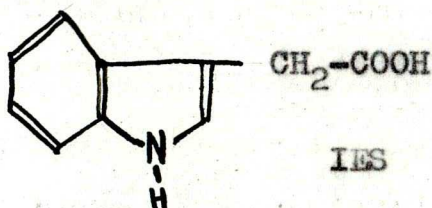
két átlag különbsége osztva a hozzájuk tartozó μ -k négyzeteinek összegéből vont négyzetgyökkel

A kísérletekben alkalmazott növekedés-
szabályozó anyagok jellemzői

a./ Gibberellin. A kísérletekhez felhasznált gibberellin Phylaxia /Budapest/ gyártmányú volt. A készítmény főleg GS₃-at tartalmaz, de kromatográfiás futtatáskor a startvonal közelében egy másik kisebb folt is megjelent, ami arra mutat, hogy kis mértékben egyéb gibberellinek is jelen vannak.

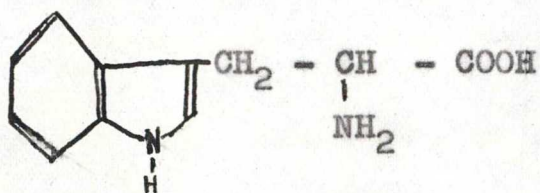


b./ Indolil-3-ecetsav. A Gyógyszeralapanyag Készletező Vállalat /Budapest/ által forgalomba hozott Merck gyártmányú, pro anal. tisztaságú készítményt használtam.



c./ Triptofán. A József Attila Tudományegyetem Szerves Kémiai Intézetében szintetizálták a kísérleteimhez felhasznált triptofánt. Felhasználás előtt a triptofánt etiléterrel kétszer kiráztam az egyéb in-

dolszármazékok - főleg az IES - eltávolítása céljából.



TTP

III. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

1./ A GS kezelés hatása a bab csiranövények, illetve a bab hipokotil szeletek növekedésére

A kísérletekhez azért használtam bokor /törpe/ babfajtát, mert ez GS kezelés hatására intenzívebb növekedéssel reagál, mint a karós babfajta. Először tájékozódó jellegű vizsgálatokat végeztem és megfigyeltem, hogy a különböző GS koncentrációk milyen mértékű növekedési reakciót eredményeznek. Azt is meg kellett figyel-nem, hogy a kitűzött cél szempontjából az intakt bab csiranövények, vagy a bab hipokotil szeletek-e az alkalmasabb tesztobjektumok. Éppen ezért a GS-nek a bab-szövetek növekedésére gyakorolt hatását egyrészt intakt csiranövényekkel, másrészt hipokotil szeletekkel, 16 illetve 10 koncentráció esetében vizsgáltam. A legmegfelelőbb GS koncentrációk kiválasztásához is nélkülözhetetlenek a tájékozódó jellegű vizsgálatok.

A./ GS-sel kezelt és kezeletlen intakt bab csiranövények növekedési különbségei és szárazsúly gyarapodása

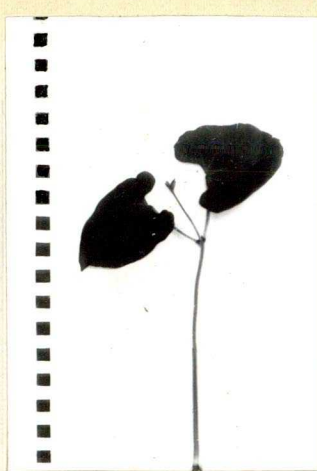
A hatnapos bab csiranövényeket 0,01-400 μ g GS-sel kezelttem növényenként, a II. fejezetben leírt mó-

don. A hajtás- és gyökérrészek növekedését kísérttem figyelemmel. A növekedés-intenzitás összehasonlítása céljából a kezelés utáni 10. napon megmértem minden koncentrációnál a hajtás és a gyökér hossznövekedését. A kísérleti növények a GS koncentrációtól függően különböző mértékben növekedtek, amint azt a 9. ábra fényképsorozata jól mutatja.

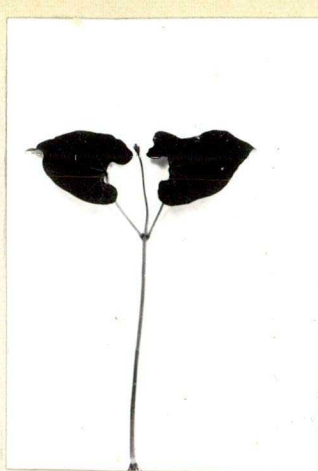
A 10. ábra a kísérleti növények teljes hosszúságát ábrázolja /cm-ben/, a szórások feltüntetésével. Ezek szerint a GS-sel kezelt növények növekedése 300 μg /növény koncentrációig fokozatosan emelkedik, itt eléri maximumát, és a 400 μg /növény koncentrációnál már csökken, amint az a fényképsorozaton is jól látható. A kezeletlen kontrol növények növekedését 100%-nak tekintve, a 300 μg GS-sel kezelt babnövények hossznövekedése 300%-os, tehát háromszorosa a kontrolénak.

A 11. ábra a kezeletlen és GS-sel kezelt növények gyökerének hosszúságát ábrázolja /cm-ben/ a szórások feltüntetésével. A gyökerek növekedése egy bizonyos határon belül ingadozik. A hajtáscsúcsra adagolt GS-nek tehát nincs lényeges hatása a gyökerek növekedésére, s ez meg is felel az irodalomban közölt adatoknak /PHINNEY és WEST, 1960/. A gyökerek átlagos növekedése azonban legtöbb esetben valamivel lemarad a kontroléhoz viszonyítva, de a különbségek nem szignifikánsak.

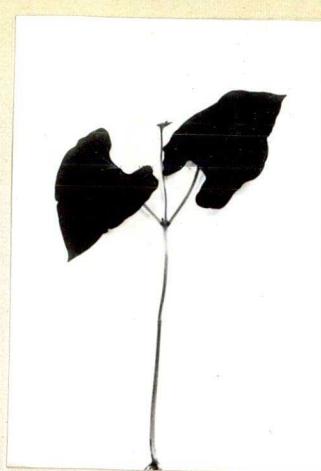
9. ábra: "Aranyeső" bokorbab fajta hajtásának
hossznövekedése GS kezelés hatására



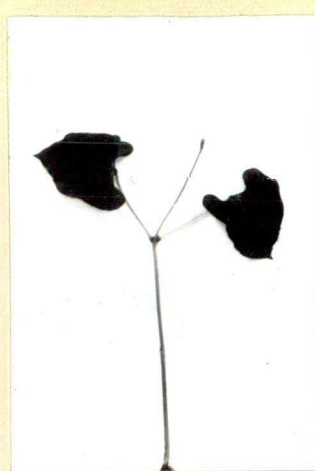
0 /kontrol/



0,1 µg GS



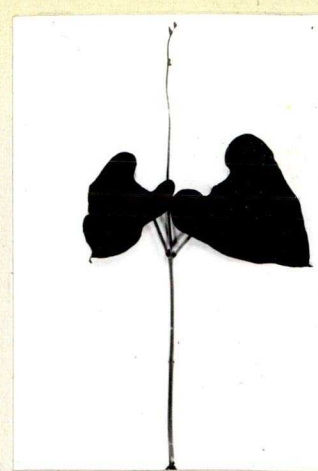
0,2 µg GS



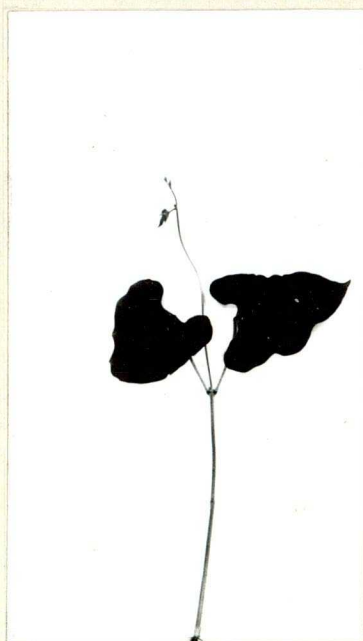
0,5 µg GS



1 µg GS



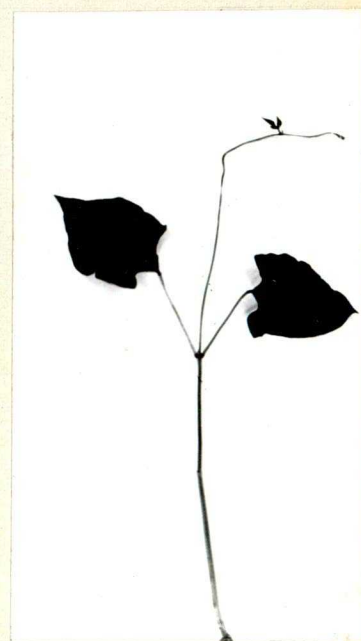
2 µg GS



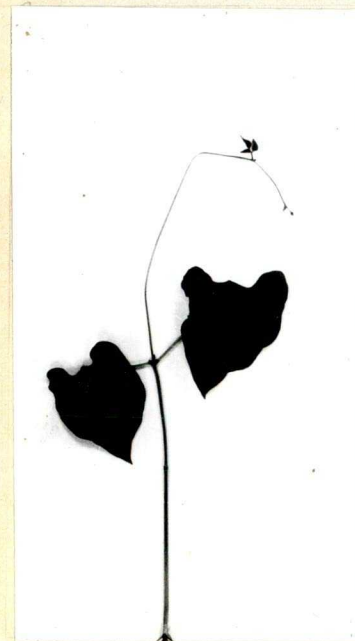
5 µg GS



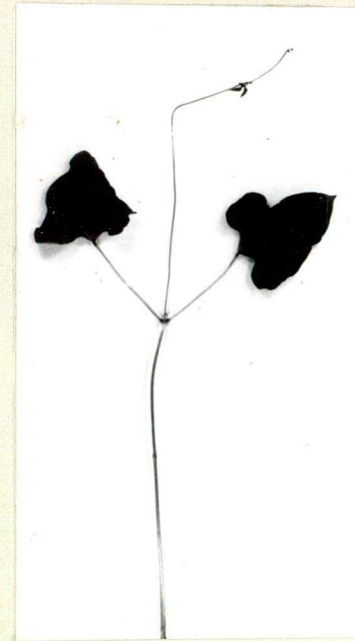
10 µg GS



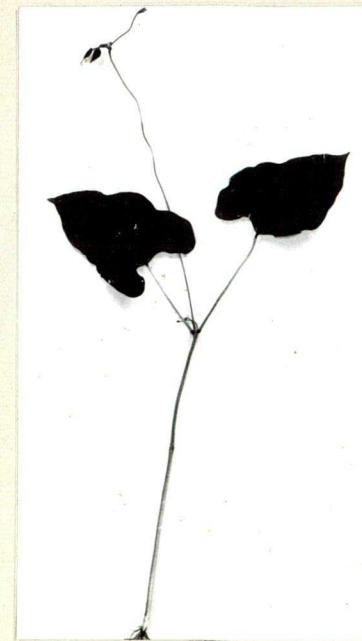
20 µg GS



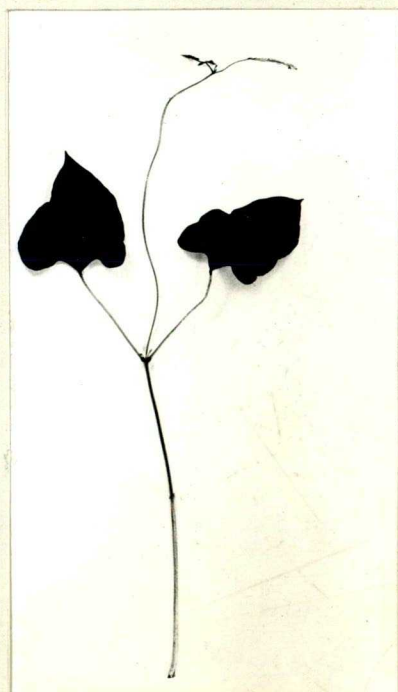
25 µg GS



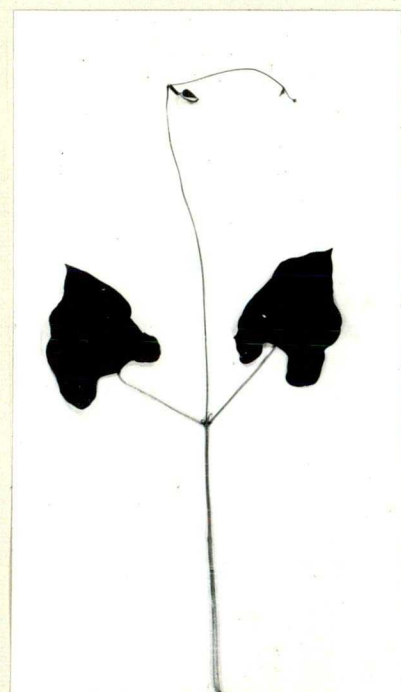
50 µg GS



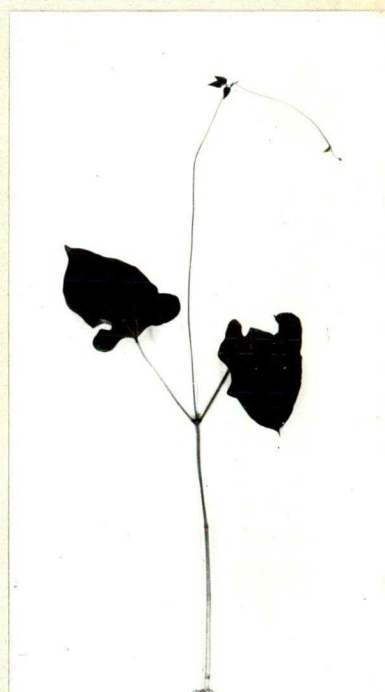
75 µg GS



100 µg GS



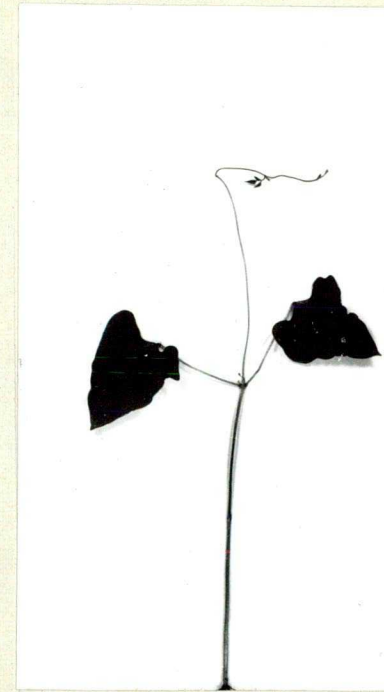
150 µg GS



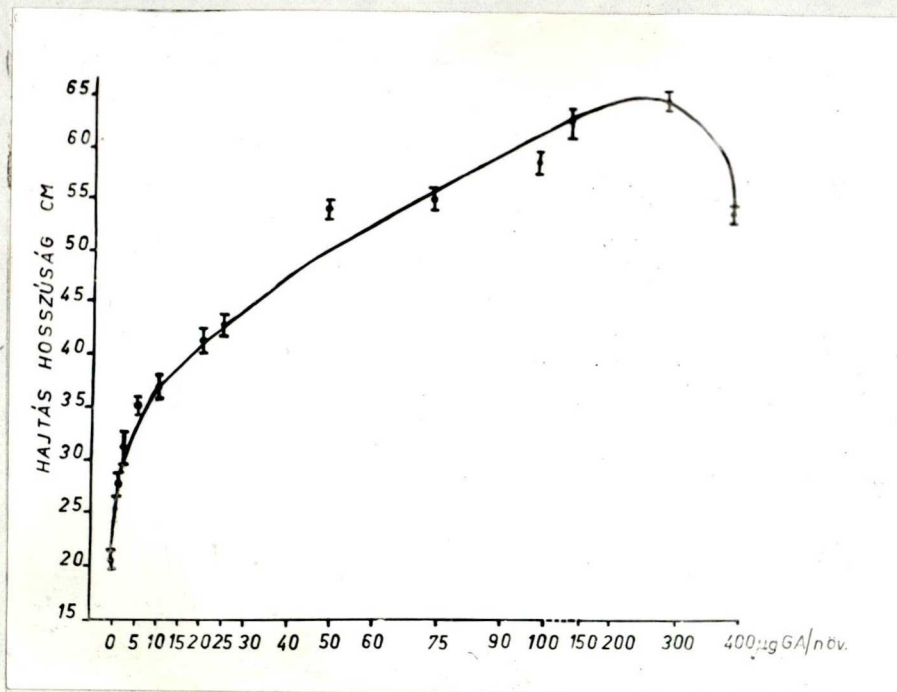
200 µg GS



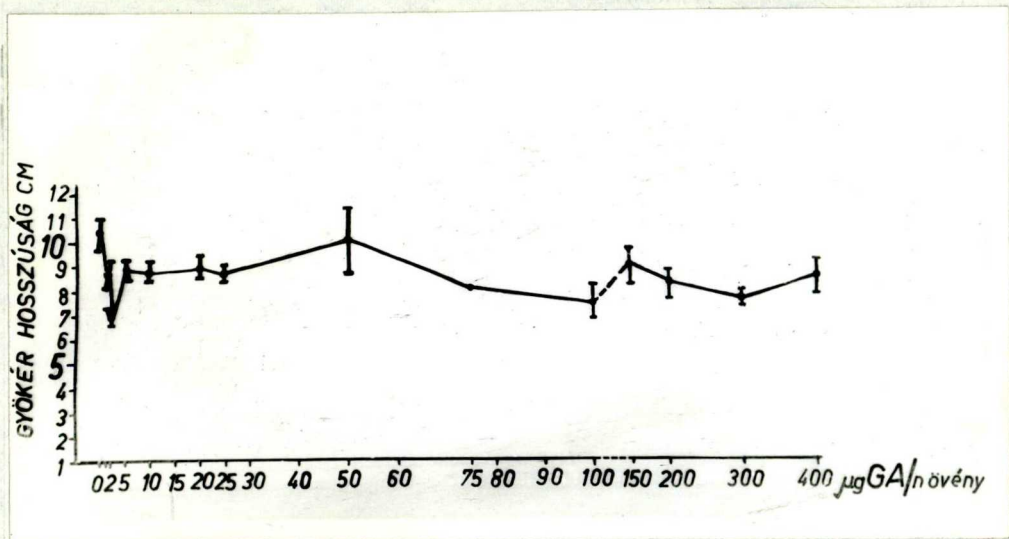
300 µg GS



400 µg GS/növény

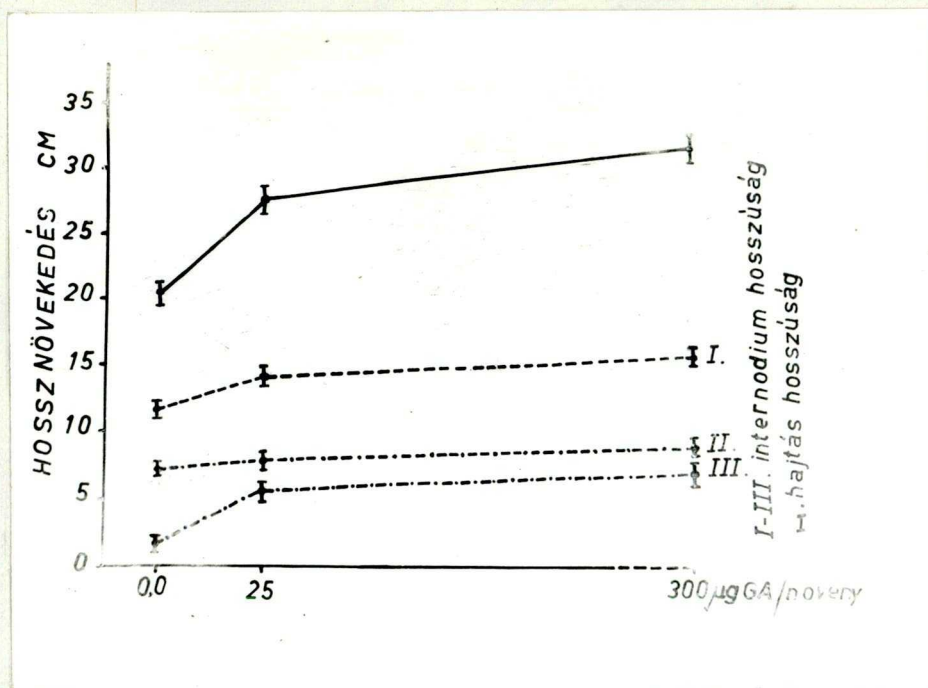


10. ábra: A teljes hajtáshosszúság alakulása GS kezelés hatására a kezelés utáni 10. napon



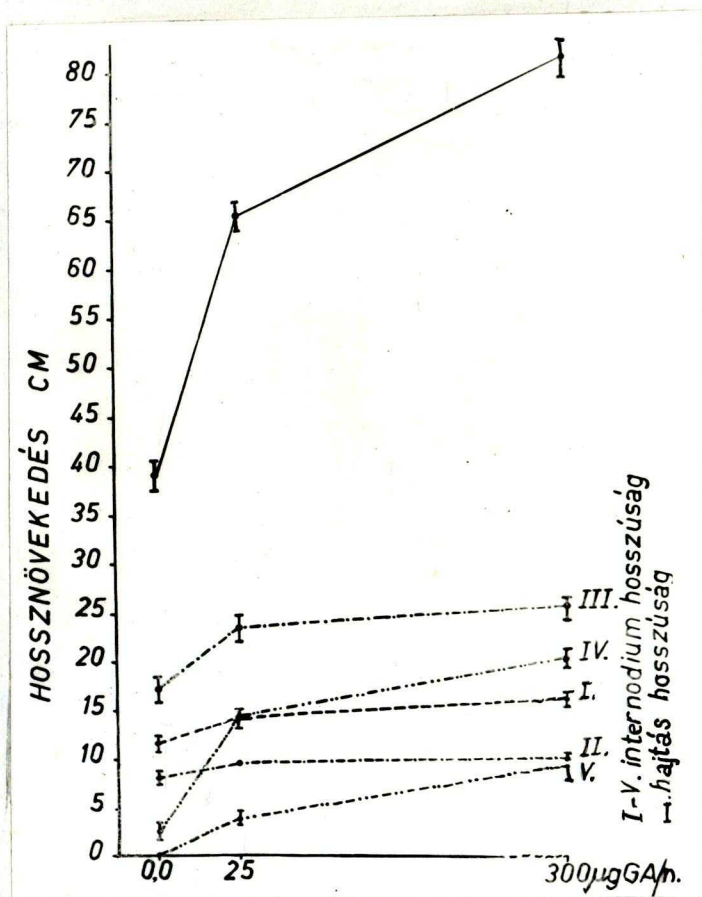
11. ábra: GS-sel kezelt növények gyökerének hosszúsága a kezelés utáni 10. napon

Alaposabb tájékozódás végett megmértem, hogy az egyes internódiumok hogyan nyúlnak meg a GS kezelés hatására. E célból a kezelés utáni 5., 10. és 15. napon külön-külön megmértem az egyes internódiumok hosszúságát is /cm-ben/ és azokat a 12., 13. és 14. ábrán tüntettem fel. A rajzokon a szaggatott vonalak az internódiumok hosszát, a folytonos vonalak a teljes hajtáshosszt jelentik és a szórásokat is feltüntettem. A kezelés utáni 5. napon a hajtás három internódiumból állt, ezek közül az első internódium /a hipokotil/ volt a leghosszabb és az ennél fiatalabb szártagok fokozatosan rövidebbek voltak.

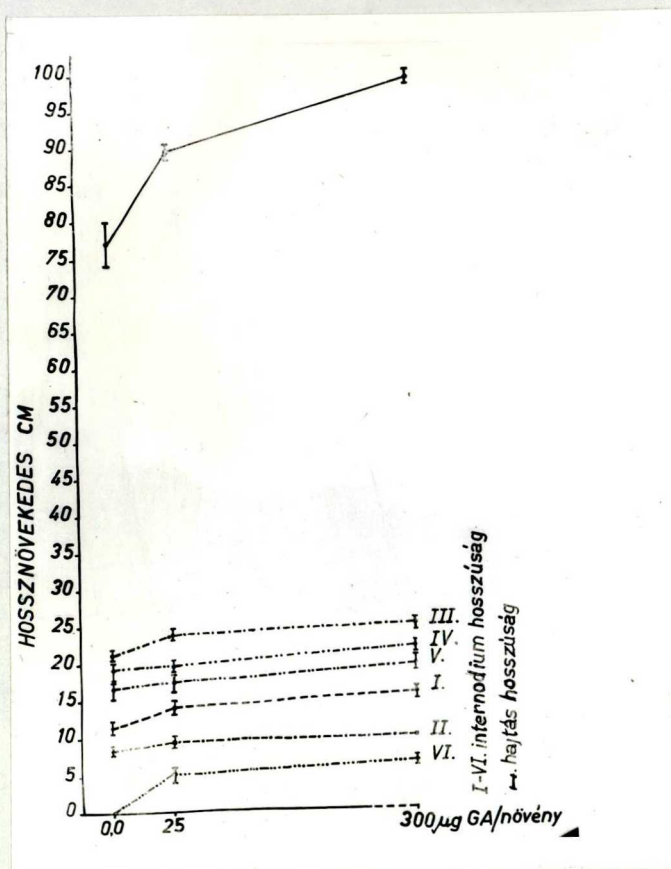


12. ábra: Az egyes internódiumok hosszúsága a GS kezelés utáni 5. napon /folytonos vonal = teljes hajtáshosszúság/

A kezelés utáni 10. és 15. napon azonban az 1-2. internódium növekedése lemaradt és a már kialakult 3., majd ezt követően a 4. internódium bizonyult a leghosszabbnak.



13. ábra: Az egyes internódiumok hosszúsága a GS kezelés utáni 10. napon /folytonos vonal = teljes hajtáshosszúság/



14. ábra: Az egyes internódiumok hosszúsága a GS kezelés utáni 15. napon /folytonos vonal = teljes hajtáshosszúság/

A GS által kiváltott növekedést a friss- és a szárazsúly mérése alapján is meghatároztam, úgy, hogy 10 hajtás és 10 gyökér együttes méréséből számítottam ki az egy hajtásra és egy gyökérre eső átlagos friss- és szárazsúlyt. Az erre vonatkozó adatokat az 1. táblázat tartalmazza.

A gibberellinnel kezelt babnövények egy hajtásának és egy gyökerének átlagos friss- és szárazsúlya, valamint szárazsúly %-a a kezelés utáni 10. napon:

1. táblázat

GS koncent- ráció µg/növény	Friss-súly g		Szárazsúly g		Szárazsúly %	
	hajtás	gyökér	hajtás	gyökér	hajtás	gyökér
0 kontrol	2,242	0,416	0,199	0,044	8,88	10,60
0,1	1,861	0,260	0,154	0,037	8,27	14,20
0,2	2,197	0,357	0,187	0,042	8,51	11,50
0,5	2,903	0,441	0,257	0,059	8,85	10,90
1,0	3,078	0,523	0,284	0,058	9,23	11,09
2,0	2,303	0,256	0,235	0,048	10,20	18,75
5,0	2,743	0,326	0,248	0,048	9,04	14,70
10,0	2,480	0,486	0,228	0,041	9,19	8,44
20,0	2,734	0,384	0,239	0,041	8,74	10,68
25,0	2,936	0,313	0,162	0,031	8,87	9,90
50,0	2,557	0,287	0,221	0,028	8,64	9,75
75,0	3,594	0,565	0,362	0,064	10,07	11,33
100,0	2,685	0,315	0,240	0,043	8,94	13,65
150,0	3,119	0,254	0,287	0,038	9,20	14,96
200,0	2,742	0,300	0,258	0,031	9,41	10,33
300,0	3,227	0,369	0,304	0,039	9,42	10,57
400,0	2,820	0,416	0,264	0,045	9,36	10,82

A táblázat adataiból kiolvasható, hogy GS kezelés hatására a koncentráció növekedésével többé-kevésbé arányosan növekszik a friss-súly is, bár bizonyos hullámzás tapasztalható. A gyökerek friss-súlyában azonban semmilyen törvényszerűség sem található.

Az egy növényre vonatkozó szárazsúly változásairól ugyanaz mondható el, mint a friss-súly változásairól.

Ami a szárazsúly %-ot illeti, általában megállapítható, hogy a GS kezelés nem növelte lényegesen a szárazsúlygyarapodást, bár 17 eset közül 10 esetben némileg emelkedett a szárazsúly %. Az emelkedés kismértékű és nem mindig szignifikáns.

Az 1. táblázat adataiból kiszámítható, hogy amíg a GS-kezelt növények friss-súly gyarapodása 10-60%-os, addig a szárazsúly csak 4-15%-kal emelkedett a kontrolhoz viszonyítva. Ez arra mutat, hogy a GS kezelés hatására bekövetkezett növekedés inkább a fokozottabb vízfelvétellel, mint szárazanyag-produkcióval lehet kapcsolatos.

B/ A GS-sel kezelt és kezeletlen bab hipokotil szeletek növekedési különbségei és súlygyarapodása

Az intakt bab növényeken végzett tájékoztató vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy azok nem lesznek jó objektumok a további kísérletekhez nagy méretük, szö-

vettani differenciáltságuk és az egyes növényi részek eltérő kora miatt. Az eltérő korú szövetek esetében ugyanis várható volt, hogy ugyanarra a behatásra különbözően reagálnak, ezért csiranövények helyett kívánatosnak látszott a továbbiakban izolált szövetdarabokkal dolgozni. Olyan növényi részt kellett keresni, ami a tervezett kísérletek szempontjainak legjobban megfelel, ezért választottam a növekedési anyagok vizsgálatánál igen jól bevált hipokotil szeleteket a további vizsgálatokhoz. Legelőször is megállapítottam, hogy a különböző koncentrációjú GS kezelés hatására a dekapitált és a hajtáscsúcsos hipokotilek milyen növekedési reakciókkal válaszolnak. Mivel a fény is befolyásolhatja a GS hatását, ezért egy sorozatot fényben, egy sorozatot pedig sötétben inkubáltam. Ily módon standard sorozatokat készítettem és ezek alapján két megfelelő GS koncentrációt választottam ki a további kísérletekhez.

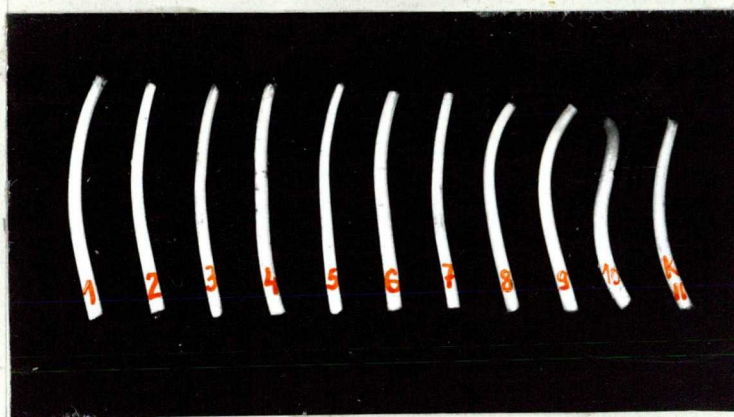
a./ Dekapitált /hajtáscsúcs nélküli/ hipokotileket a II. fejezetben leírt módon 0,01-1000 ppm koncentrációjú GS oldatokban 24 és 48 óráig inkubáltam /az egyik sorozatot fényben, a másikat sötétben/, majd meghatároztam hossznövekedésüket, friss- és szárazsúlyukat.

A kezdetben 3 cm-es dekapitált hipokotil darabok hossznövekedését fényben a 15. ábra, sötétben a 16. ábra mutatja. Amint a képeken látható, a hipokotilek meg-

nyúlása a koncentrációval arányos, vagyis a fényben és sötétben inkubált hipokotilekből egy növekedési sorozat állítható össze. Azonban határozottan megmutatkozott, hogy sötétben a hipokotilek GS kezelésre adott megnyúlási reakciója nagyobb, mint fényben.



15. ábra: Dekapitált hipokotilek GS-re adott növekedési reakciói 48 órás inkubálás után fényben. 1-10-ig: 1000-0,5 ppm; 11 = 0ppm kontrol



16. ábra: Dekapitált hipokotilek GS-re adott növekedési reakciói 48 órás inkubálás után sötétben. 1-10-ig: 1000-0,5 ppm; 11 = 0 ppm kontrol

Gibberellin-oldatban úsztatott dekapitált bab hipokotil szeletek átlagos hossznövekedése és átlagos súlygyarapodása fényben és sötétben.

2. táblázat: 24 órás inkubálás után:

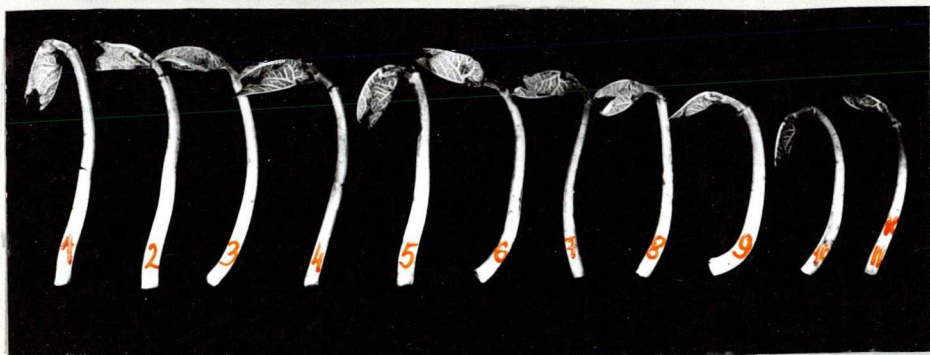
GS koncentráció ppm	Hipokotil hossz. cm		Súlygyarapodás g	
	Fényben	Sötétben	Fényben	Sötétben
0 kontrol	4,02	4,14	0,1181	0,1192
0,5	4,02	4,17	0,1192	0,1198
1,0	4,10	4,17	0,1195	0,1196
5,0	4,07	4,15	0,1226	0,1265
10,0	4,15	4,17	0,1129	0,1273
50,0	4,17	4,20	0,1284	0,1310
100,0	4,22	4,23	0,1295	0,1384
250,0	4,22	4,32	0,1199	0,1346
500,0	4,30	4,37	0,1233	0,1352
750,0	4,32	4,37	0,1246	0,1412
1000,0	4,35	4,42	0,1292	0,1503

3. táblázat: 48 órás inkubálás után:

GS koncentráció ppm	Hipokotil h.		Súlygyarapodás		Szárassúly%	
	Fény	Sötét	Fény	Sötét	Fény	Sötét
0 kontrol	4,17	4,26	0,1412	0,1594	5,21	5,74
0,5	4,22	4,48	0,1458	0,1675	5,37	5,42
1,0	4,30	4,67	0,1565	0,1661	5,10	6,01
5,0	4,42	4,68	0,1573	0,1653	6,36	6,71
10,0	4,47	4,77	0,1512	0,1668	4,23	5,16
50,0	4,45	4,70	0,1597	0,1694	5,61	5,11
100,0	4,50	4,82	0,1661	0,1728	5,70	5,73
250,0	4,55	4,85	0,1658	0,1736	5,35	5,87
500,0	4,60	4,96	0,1675	0,1716	5,31	5,84
750,0	4,67	4,97	0,1728	0,1849	5,67	5,10
1000,0	4,68	5,02	0,1821	0,2210	5,25	6,12

A 2. és 3. táblázat tartalmazza a számszerű adatokat, amelyben a gibberellinnel kezelt dekapitált hipokotil szeletek átlagos hossznövekedését, friss-súly gyarapodását és szárazsúly %-át tüntettem fel. A hossznövekedésen kívül a friss-súly- és a szárazsúlygyarapodás is sötétben nagyobb mértékű, mint fényben.

b./ A hajtáscsúcsos hipokotil szeletek megnyúlása szintén a GS koncentrációtól függően változott, mind fényben /17. ábra/, mind pedig sötétben /18. ábra/.



17. ábra: Hajtáscsúcsos hipokotilek GS-re adott növekedési reakciói 48 órás inkubálás után fényben.
1-10-ig: 1000-0,5 ppm; 11 = 0 ppm kontrol.



18. ábra: Hajtáscsúcsos hipokotilek GS-re adott növekedési reakciói 48 órás inkubálás után sötétben.
1-10-ig: 1000-0,5 ppm; 11 = 0 ppm kontrol.

Gibberellin-oldatban úsztatott hajtáscsúcsos bab hipokotil szeletek átlagos hossznövekedése és súlygyarapodása fényben és sötétben.

4. táblázat: 24 órás inkubálás után

GS koncentráció ppm	Hipokotil hossz.cm		Súlygyarapodás g	
	Fényben	Sötétben	Fényben	Sötétben
0 kontrol	3,84	3,98	0,1019	0,1335
0,5	3,92	4,08	0,0927	0,1310
1,0	4,14	4,16	0,1045	0,1352
5,0	4,14	4,15	0,1087	0,1490
10,0	4,20	4,22	0,1077	0,1358
50,0	4,18	4,24	0,1188	0,1464
100,0	4,22	4,26	0,1254	0,1447
250,0	4,26	4,28	0,1209	0,1487
500,0	4,30	4,32	0,1292	0,1538
750,0	4,32	4,40	0,1363	0,1638
1000,0	4,36	4,46	0,1528	0,1836

5. táblázat: 48 órás inkubálás után

GS koncentráció ppm	Hipokotil h.		Súlygyarapodás		Szárassúly%	
	Fény	Sötét	Fény	Sötét	Fény	Sötét
0 kontrol	4,40	4,58	0,1747	0,2141	4,85	5,14
0,5	4,54	4,60	0,1648	0,2099	4,83	5,31
1,0	4,55	4,62	0,1780	0,2131	4,92	5,64
5,0	4,56	4,72	0,1830	0,2037	5,04	5,56
10,0	4,56	4,76	0,1931	0,2195	5,25	5,81
50,0	4,64	4,76	0,2044	0,2390	5,57	5,86
100,0	4,66	4,80	0,2158	0,2322	5,84	5,84
250,0	4,68	4,84	0,2117	0,2400	4,98	5,97
500,0	4,76	4,84	0,2271	0,2534	5,98	6,07
750,0	4,86	4,94	0,2244	0,2627	6,10	6,30
1000,0	4,92	5,02	0,2447	0,2630	6,16	6,33

A két sorozat összehasonlítása azt mutatja, hogy a GS kezelés ez esetben is sötétben eredményezett nagyobb növekedést és súlygyarapodást. A mérési eredményeket a 4. és 5. táblázatban tüntettem fel. Mint látható a dekapitált hipokotilekéhez hasonló eredményt kaptam a hajtáscsúcsos szárdarabok esetében is.

Ezen tájékoztató jellegű vizsgálatok alapján megállapítható, hogy

1./ A hipokotilek alkalmas teszt-objektumok a további kísérletekhez, mert ez esetben a GS kezelésre adott megnyúlási reakció egyértelműbb és kisebb szórású.

2./ A hajtáscsúcsos hipokotil szeletek a GS kezelésre nagyobb mértékű növekedéssel reagálnak, mint a dekapitáltak.

3./ Mindkétféle hipokotil esetében a GS-indukálta megnyúlás fényben kisebb.

A további kísérletekhez most már a két alkalmas GS-koncentrációt /100 és 1000 ppm/ is kiválaszthattam. A 100 ppm oldatban való úsztatás közepes, az 1000 ppm pedig a legintenzívebb növekedést eredményezte.

Mivel a hajtáscsúcs jelenléte továbbá a fény is látható hatással van a hipokotilek GS-indukálta növekedésére, minden további kísérletet a kezeletlen kontrol mellett, a fenti két GS-koncentrációval, kétféle hipokotillemel, továbbá fényben és sötétben történt inkubálással végeztem el.

2./ A GS kezelés hatása a bab hipokotil szövetek IES tartalmára, fényben és sötétben

A kísérleteket egyrészt dekapitált, másrészt hajtáscsúcsos bab hipokotil darabokkal végeztem, melyeket a II. fejezetben leírt módon 100 és 1000 ppm GS-val kezeltem.

A GS oldaton történő úsztatás után az IES tartalmat egyrészt papir-, másrészt vékonyréteg kromatográfiával határoztam meg.

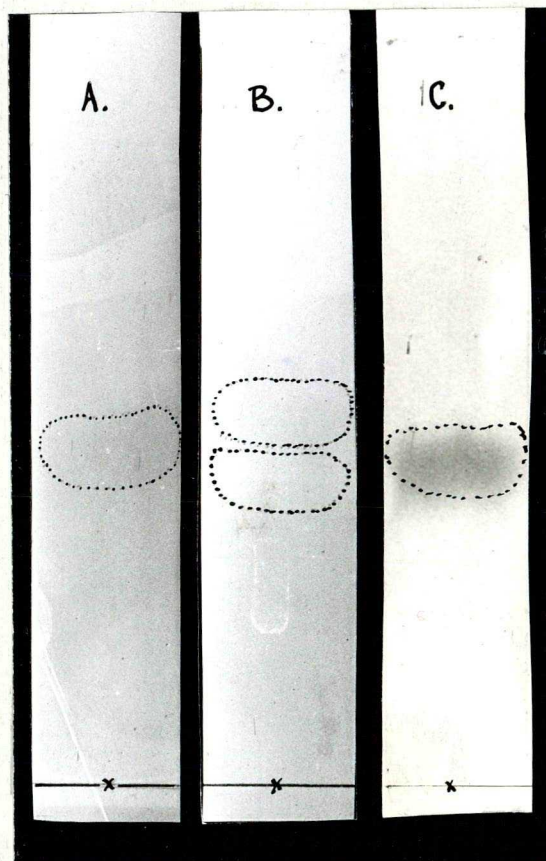
A./ A papirkromatográfiás vizsgálatok eredményei

A papirkromatogramokon levő IES foltokat az Erlich és Gordon-Weber reakció, az R_f érték és UV-fluoreszcencia alapján, továbbá szintetikus IES paralel futtatásával határoztam meg. /Az IES Erlich-reagenssel lila, Gordon-Weber reagenssel rózsaszín színreakciót ad, UV fényben sápadt lilán fluoreszkál./

Ezen tulajdonságok szerint R_f 0,42-0,45 pozícióban minden esetben jól észlelhető módon IES-t lehetett kimutatni. A folt metanolos eluátumának UV abszorpciós görbéje szintén teljesen megegyezett a szintetikus IES abszorpciós görbéjével /1. ábra/.

A papíron legtöbbször egy nagy, néha azonban két IES folt különült el egymás mellett, és mind a kettő

az IES fenti jellegzetességeit mutatta. A 19. ábrán olyan kromatogramok láthatók, ahol az IES egy foltra /A/, ahol az IES két foltra /B/ különült el, valamint a szintetikus IES ellenőrző foltja /C/ is.

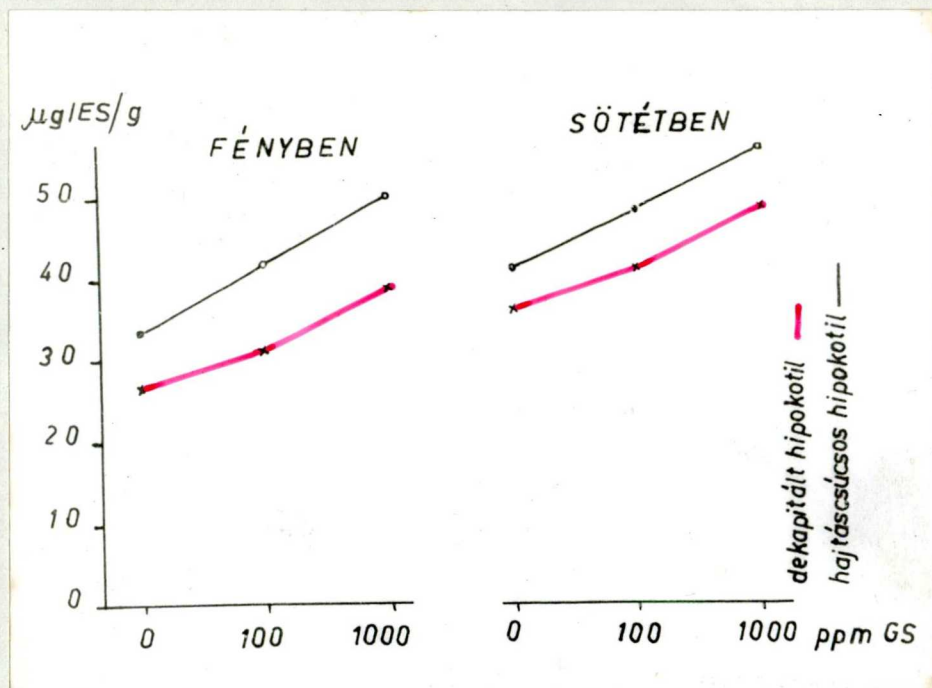


19. ábra: Bab hipokotil szövetből készített IES kromatogramok /papíron/, Erlich reagenssel előhíva.
A és B=bab extraktum, C = szintetikus IES

Az IES-nak két foltra való elkülönülése nem volt meglepő, mivel az utóbbi évek irodalmában többször kimutatták, hogy az IES különböző formái /a szabad IES

és a különböző IES-konjugátumok, illetve kötött IES/ a kromatografáláskor több sávot alkotva jelennek meg /SAHAI SRIASTAVA 1964; FLETCHER és ZALIK 1965; KÖVES 1967/, amelyek mind adják az IES-reakciót és az UV abszorpció is IES jelenlétére vall. Az IES foltot /vagy két foltot/ egy darabban vágtam ki és az összes jelenlevő IES meghatározása céljából külön-külön eluáltam 4-4 ml metanollal 2 óráig, majd fotometráltam.

A GS-val kezelt dekapitást és hajtáscsúcsos hipokotil darabok fényben és sötétben történő inkubálás után mért IES tartalmát a 20. ábra mutatja.



20. ábra: A GS kezelés hatása a bab hipokotil szeletek IES tartalmára.



Az ábra adatai alapján az alábbi megállapításokra jutottam:

a./ Az IES-tartalom a kezeletlen /0 ppm/ és a GS-kezelt szövetekben egyaránt, mind fényben, mind a sötétben, a hajtáscsúcs jelenlétében magasabb, mint a dekapitált hipokotilekben. A különbség különösen a GS-kezelt esetekben szignifikáns, pl. GS 100 ppm-nél $SzD = 2,10$, GS 1000 ppm-nél $SzD = 5,2-5,7$.

b./ Az endogén IES-tartalom sötétben történő inkubálás után nagyobb, mint a fényben történő inkubálás után. A hajtáscsúcsos hipokotilekben átlag $3-5 \mu g/g$, dekapitált hipokotilek esetében pedig $8 \mu g/g$ értékkel lett magasabb az IES-tartalom sötétben, mint fényben.

c./ A 100 és 1000 ppm GS-kezelés minden esetben, tehát úgy fényben, mint sötétben, hajtáscsúcs nélkül és hajtáscsúcs jelenlétében egyaránt, jól észlelhető módon növelte a szövetek IES tartalmát.

d./ A GS-koncentrációk IES szintet növelő hatása megegyezik a megnyúlásra gyakorolt hatással, vagyis a nagyobb megnyúlást eredményező 1000 ppm GS jobban növelte az IES-tartalmat, mint a közepes megnyúlást eredményező 100 ppm GS-koncentráció.

A GS-kezelésnek az IES-tartalom fokozására gyakorolt hatását %-os értékekben - a kezeletlen szövetekben /0 ppm GS/ mért IES mennyiségét 100%-nak véve - a 6. táblázat tünteti fel.

6. táblázat: a GS kezelés hatása az IES
tartalomra, %-ban kifejezve

GS koncent- ráció ppm	IES tartalom emelkedés %			
	Fényben		Sötétben	
	deka- pitált h.	hajtás- csúcsos h.	deka- pitált h.	hajtás- csúcsos h.
0 kontrol	100,0	100,0	100,0	100,0
100	111,0	123,5	114,0	109,5
1000	140,7	147,0	121,0	132,5

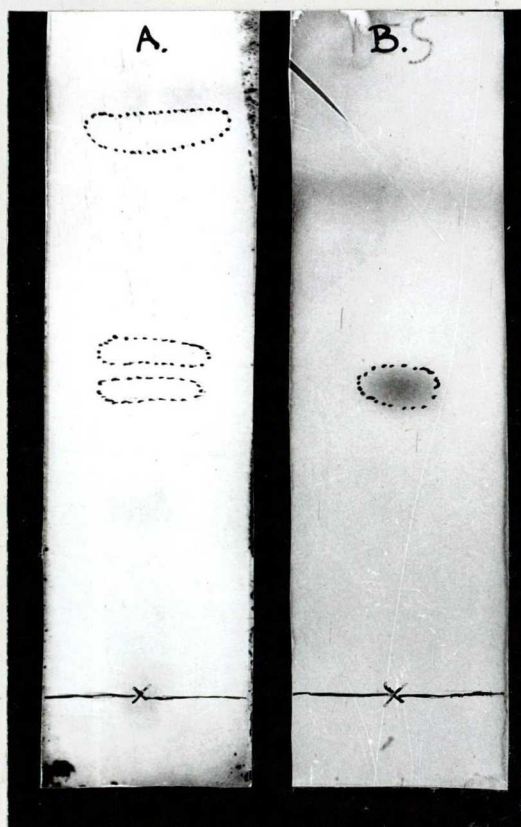
A táblázat adatai azt mutatják, hogy a GS fényben 11-47%-kal, sötétben 9-32%-kal növeli az endogén IES szintet, s hogy az IES tartalom emelkedése hajtáscsúcs jelenlétében általában 7-12%-kal nagyobb mértékű. Legnagyobb hatást az 1000 ppm GS váltotta ki fényben, hajtáscsúcsos hipokotilban /147%/.

B./ Vékonyréteg kromatográfia eredményei

A szilikagél vékonyréteg kromatográfia célja az volt, hogy jobban el lehessen különíteni a szabad IES-t és az IES-konjugátumokat /gyakorlatilag IES-glükozido-
kat/, mint papíron, ahol a legtöbb esetben nem vált szét a két folt. A vékonyréteg kromatográfiát IES meghatározására csak az utóbbi években kezdték alkalmazni és minden esetben úgy találták, hogy a papirkromatográfiánál jobb elkülönülést okoz /KALDEWEY-STAHN 1964;

OHWAKI 1966; BAYER 1967; KÖVES 1967/.

Jelen kísérletekben is lényegesen jobb és élesebb volt az elkülönülés vékonyrétegen, amennyiben az IES-formák minden esetben két, sőt néha három foltra is szétváltak /21. ábra/.



21. ábra: Bab hipokotil szövetből készített IES kromatogramok vékonyrétegen, Erlich-reagenssel előhiva.

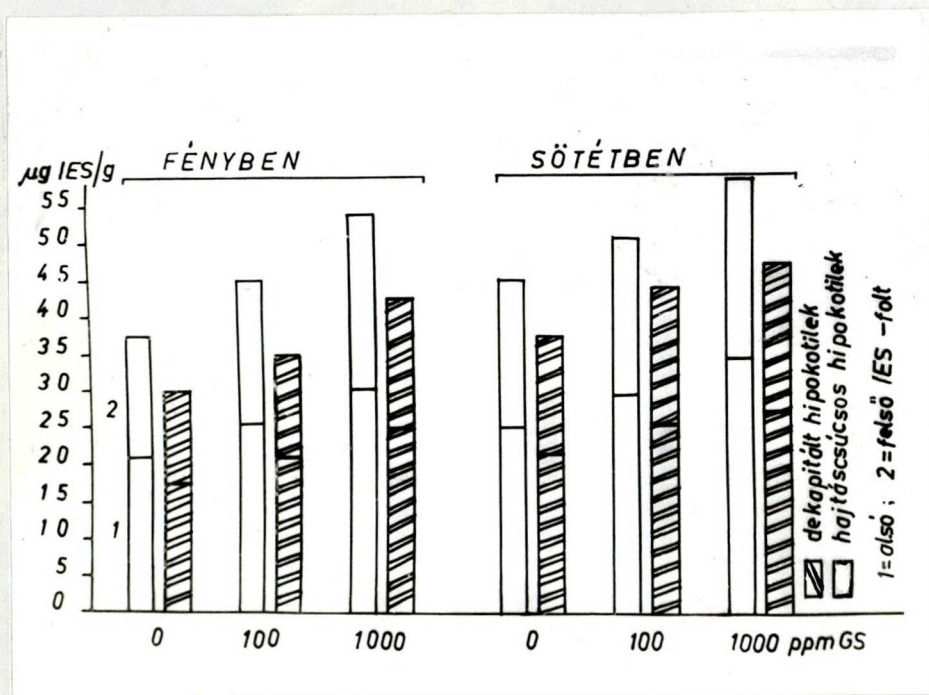
A = bab extraktum; B = szintetikus IES

SAHAI SRIASTRAVA /1964/ és KÖVES /1967/ megállapításai szerint a felső IES-folt túlnyomórészt szabad IES-t tartalmaz, az alsó pedig IES-glükozidok foltja. Ez utóbbi anilinfталáttal cukor-reakciót ad, de ugyanakkor valamennyi IES reakciót is adja. Ez az IES-glükozid folt néha újabb két foltra különült el. Az extraktum hosszabb ideig történő állásakor, vagy ismételt futtatáskor a felső folt nagysága az alsó folt rovására növekszik, ami arra mutat, hogy hidrolízis következtében növekszik az extraktumban a szabad IES mennyisége /KÖVES 1967/. Rf értékek a szilikagélen: szintetikus IES 0,50-0,52; IES-glükozid 0,50; szabad IES 0,54-0,56.

Mivel a szabad IES és az IES-konjugátum vékonyrétegen mindig élesen elkülönült, a kétféle IES-foltot külön is le lehetett kaparni, s így mennyiségüket külön-külön is meg tudtam határozni. Ezek a mérések a papírkromatográfiás eljárással kapott eredmények ellenőrzésére is igen jól felhasználhatók.

Az IES-formák mennyiségi meghatározásának eredményeit a 22. ábra tünteti fel. Ha az itteni IES $\mu\text{g/g}$ értékeket összehasonlítjuk a papírkromatográfiás eljárás eredményeivel /20. ábra/ megállapítható, hogy a kétféle kromatográfia során kapott eredmények igen jól megegyeznek. A különbség csupán annyi, hogy a vékonyréteg esetében általában 3-5 μg -mal magasabb értékeket kaptam g friss-súlyonként. Ennek oka minden bizonnyal

az, hogy a szilikagél rétegen a jobb elkülönülés miatt tömöttebbek az IES-foltok, vagyis kisebb helyre koncentrálnak az anyag és így a foltok kioldásánál kisebb a veszteség, mint papíron, ahol a foltok igen szétterjednek.



22. ábra: A GS-kezelés hatása az IES-formák mennyiségére

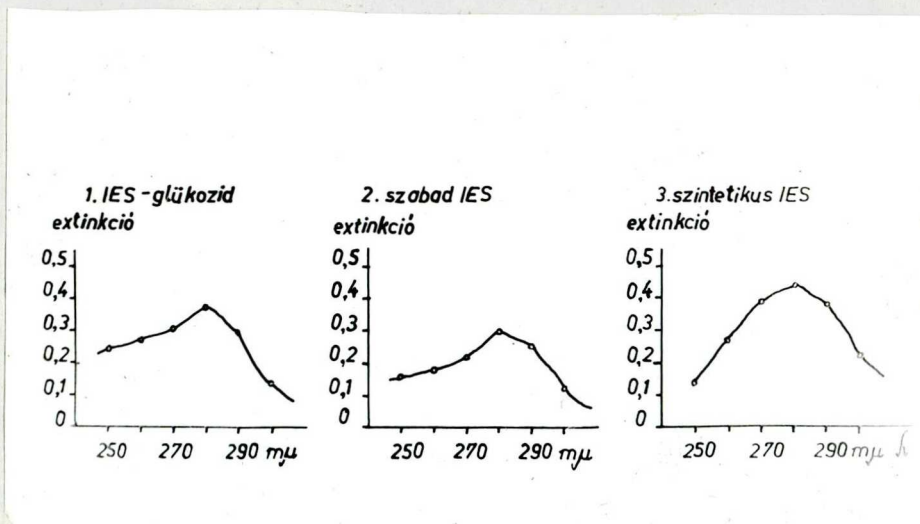
A 22. ábra adatai alapján tehát ugyanazokra a következtetésekre lehet jutni, mint a papirkromatográfia kísérletek esetében. Azokon túlmenően azonban itt még az is megállapítható, hogy az össz-IES-tartalmon belül mennyi a szabad IES és mennyi az IES-konjugátum mennyisége. Az ábra oszlopainak alsó része /1/ az

IES-glükozid mennyiségét, a felső része /2/ a szabad IES mennyiségét jelzi.

Az össz-IES-tartalmat 100%-nak tekintve kiszámítottam, hogy az IES-nak 56-60%-a IES-glükozid formájában van jelen /alsó folt/, és csak 40-44%-a szabad IES /felső folt/. Természetesen azt nem lehet megállapítani, hogy a szövetekben is ténylegesen ilyen arányban van-e a szabad IES jelen, mert nem ellenőrizhető, hogy az extrahálás és a kromatografálás során hidrolizissal mennyi IES szabadul fel. Az alsó és a felső IES-folt ránya azonban a kromatogramokon nagymértékben állandó marad, akár fényben vagy sötétben inkubált, akár kezeltlen vagy GS-kezelt szövetekről van szó; s akár jelen van a hajtáscsúcs, akár nincs. Ugy látszik tehát, hogy a GS-kezelés, bár az összes IES mennyiségét számottevően növeli, a szabad és kötött IES arányát nem változtatja meg.

A két indol-pozitív folt UV abszorpciós görbáját külön-külön is felvettem, és ennek alapján is bizonyítást nyert, hogy mind a két folt IES-t tartalmaz /23. ábra/. Mint látható, mind a két folt UV abszorpciós maximuma az IES-re jellemző 280 mμ-nál van.

Mind a papir-, mind a vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatok azt mutatták tehát, hogy a GS-kezelés hatására a bab hipokotil szeletek IES tartalma emelkedik.



23. ábra: IES-foltok eluátumának UV spektruma/metanolban/

A gibberellinsav IES-szintet növelő eme hatásának több oka is lehet: a GS ugyanis növelheti az IES triptofánból történő bioszintézisét; csökkentheti az IES-oxidáz enzimrendszer aktivitását; de a fenoláz és peroxidáz enzimrendszerre gyakorolt esetleges hatásával is befolyásolhatja az IES tartalmat. A dolgozat további részében ezeket a lehetőségeket külön-külön is megvizsgáltam.

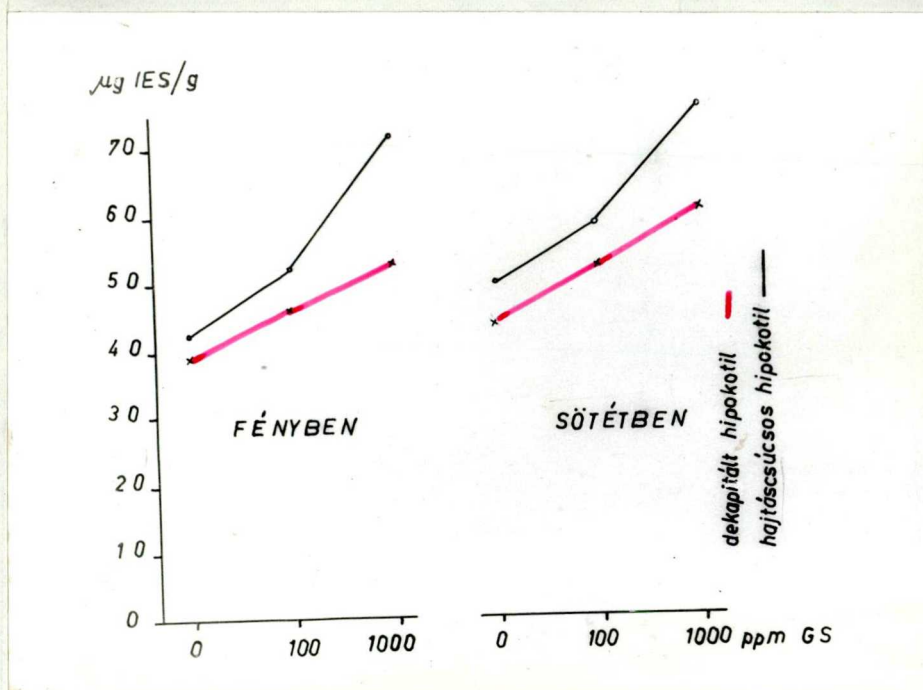
3./ A GS kezelés hatása az IES-nak triptofánból történő bioszintézisére

Ezen kísérletsorozat célja volt meggyőződni arról, hogy a GS az IES-szint előzőekben tapasztalt növelését a triptofánból /TTP/ történő IES-bioszintézisre gya-

korolt hatásával eredményezi-e. Ezért a metodikai részben leírt módon $10^{-3}M$ TTP-oldattal infiltráltam a hipokotil szegmenteket, majd 100 és 1000 ppm GS-oldattal történő 24 órás inkubáció /fényben és sötétben/ után meghatároztam a szövetek IES tartalmát és összehasonlítottam a GS kezelés nélkül kapott eredményekkel.

A./ A papirkromatográfiás vizsgálatok eredményei

A TTP prekuzorral etetett hipokotilek IES tartalmát a GS kezelés a 24. ábrán látható módon befolyásolta.



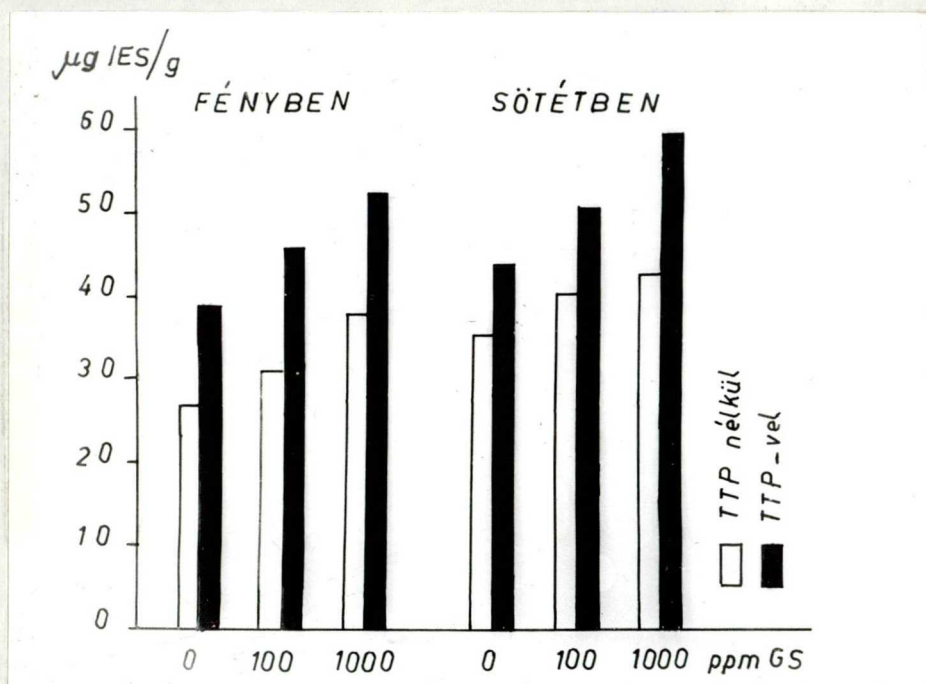
24. ábra: GS kezelés hatása a TTP-vel infiltrált szövetek IES tartalmára

Az ábra adatai alapján nagyrészt ugyanazokat a megállapításokat tehetjük, mint a TTP kezelés nélküli esetekben /20. ábra/; vagyis a GS kezelés itt is jelentősen emelte az IES mennyiségét a kezeletlen kontrolhoz /0 ppm/ képest, azonban az IES abszolút mennyisége jelen esetben mindig nagyobb. Az IES-tartalom különösen a hajtáscsúcs jelenlétében gyarapodott jelentősen, ahol - egy kivétellel - az endogén auxin-szint szignifikáns módon magasabb a dekapitált hipokotilek auxin-tartalmánál /7. táblázat/.

7. táblázat: A hajtáscsúcs jelenlétének hatása a bab hipokotil szeletek IES-tartalmára. /A szignifikancia határa jelen esetben: 2/.

GS kezelés	Hipo- kotilek	IES tartalom $\mu\text{g/g}$					
		Fényben			Sötétben		
		$\bar{x}$	$s\bar{x}$	SzD	$\bar{x}$	$s\bar{x}$	SzD
0ppm	dekap.	39,0	$\pm 1,16$	1,92	44,0	$\pm 5,77$	2,25
	hajtáscs.	42,5	$\pm 1,73$		50,5	$\pm 2,30$	
100ppm	dekap.	46,0	$\pm 4,61$	2,36	51,0	$\pm 5,77$	2,44
	hajtáscs.	52,0	$\pm 1,16$		58,0	$\pm 0,00$	
1000ppm	dekap.	52,5	$\pm 0,86$	7,94	60,0	$\pm 9,24$	2,33
	hajtáscs.	72,0	$\pm 4,61$		76,0	$\pm 0,00$	

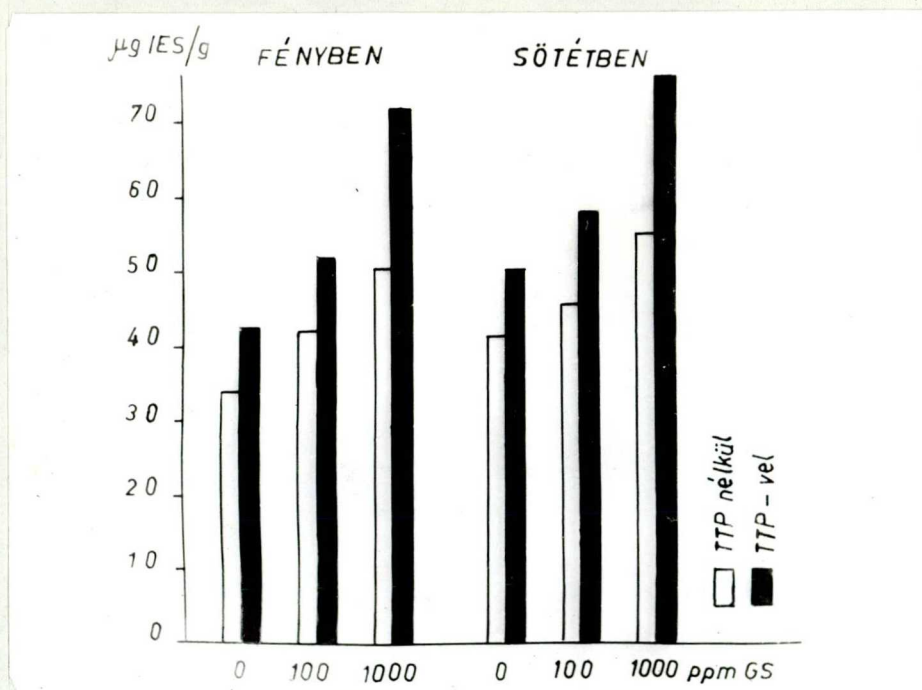
A TTP-vel történt infiltrálásnak az IES-képződésre gyakorolt hatását különösen akkor lehet észlelni, ha a TTP etetés során kapott eredményeket összehasonlítjuk a TTP kezelés nélküli eredményekkel /25-26. ábra/.



25. ábra: Dekapitált bab hipokotilek IES-tartalma GS kezelés hatására, TTP infiltrálással és infiltrálás nélkül.

A 25. ábra dekapitált hipokotilekre vonatkozik. TTP infiltrálás után /sötét oszlopok/ minden esetben /fényben és sötétben is egyaránt/, lényegesen magasabb az IES-tartalom, mint TTP nélkül /világos oszlopok/. Az adatok szerint a szövetek TTP-vel való etetése a

GS kezelés nélküli kontrol hipokotilekben fényben 44%-kal, sötétben 24%-kal növelte az IES-szintézist. A GS-kezelt szövetekben az IES-szintézis növekedése azonban ennél minden esetben nagyobb: fényben 48%-kal, sötétben: 26-39%-kal emelkedett az IES-tartalom. Ez nyilvánvalóan arra mutat, hogy exogén GS alkalmazása azaz a szövetek GS-koncentrációjának emelése az IES-nak triptofánból történő bioszintézisét elősegíti, és úgy látszik, hogy ez a hatás fényben valamivel nagyobb mértékű.

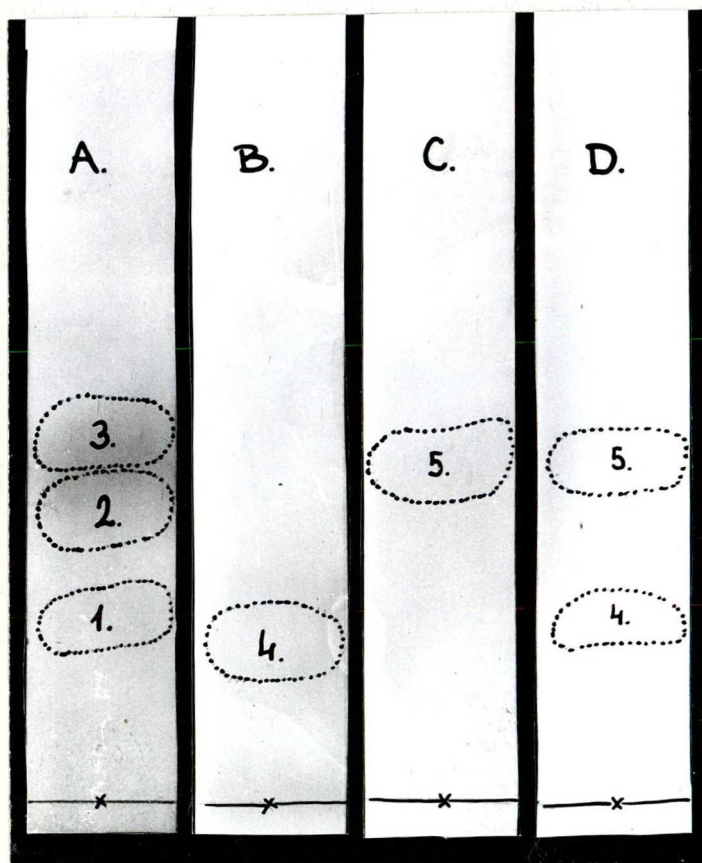


26. ábra: Hajtáscsúcsos bab hipokotilek IES-tartalma GS kezelés hatására TTP infiltrálással és infiltrálás nélkül.

A 26. ábra a hajtáscsúccsal rendelkező hipokotilekkel végzett hasonló kísérletek eredményeit mutatja be. Hajtáscsúcs jelenlétében a változások tendenciája ugyanolyan, mint a dekapitált hipokotilek esetében. A különbség csupán az, hogy az IES $\mu\text{g/g}$ érték mindig magasabb, mint a dekapitált szegmentek esetében. A hajtáscsúcs jelenlétében a GS-sel nem kezelt /kontrol/ hipokotilek TTP-vel történt etetése fényben 20%-kal, sötétben 22%-kal növelte az IES-képződést, míg a GS-kezelt hipokotilekben fényben 24, ill. 43%-kal, sötétben 27 ill. 38%-kal lett több az IES-tartalom. A GS kezelés tehát itt is fokozta az IES-nak TTP-ből való képződését, s fényben valamivel jobban, mint sötétben.

Ezen esetekben az egyes minták IES tartalmát /szabad IES + IES konjugátumok/ együttesen oldottam ki a kromatogramcsikokról és egy összegben határoztam meg.

A papirkromatogramokon az IES erőteljes foltja mellett R_f 0,21 pozícióban a TTP folt is mindig jól észlelhető módon jelent meg, ami arra mutat, hogy TTP-vel való etetés után a hipokotil szövetekben jelentős mennyiségű szabad TTP is van /27. ábra/, ami TTP-vel nem kezelt hipokotileknél általában nem volt tapasztalható.

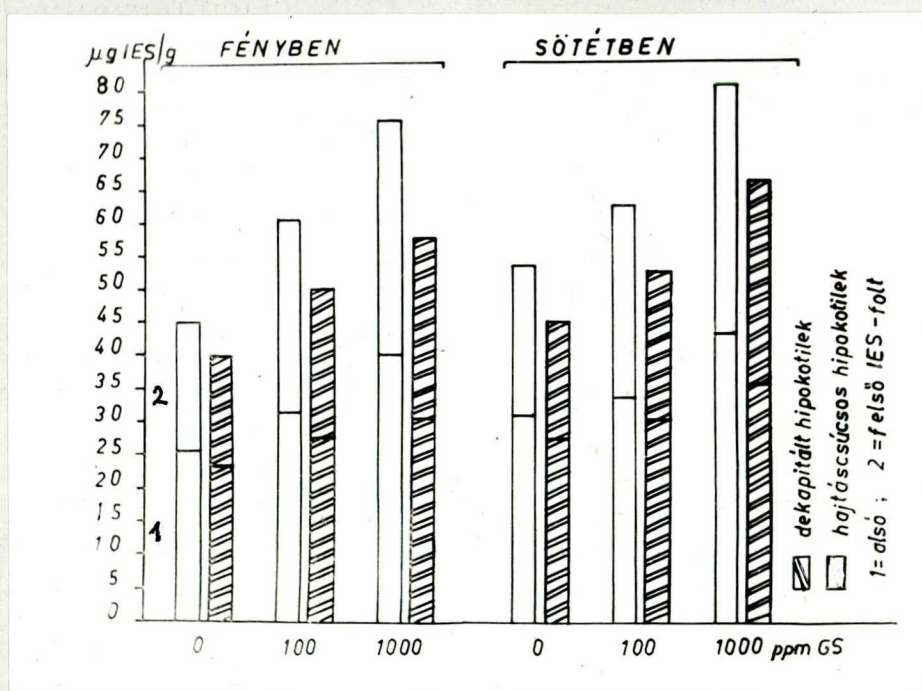


27. ábra: TTP-vel etetett bab hipokotil extraktumból készített papirkromatogram /A/; szintetikus vegyületek ellenőrző kromatogramjaival /B, C, D/. 1=TTP, 2=IES-glükozidok, 3=szabad IES, 4=szintetikus TTP, 5= szintetikus IES

B./ Vékonyréteg kromatográfiás eredmények

Az előző kísérleteket vékonyréteg kromatográfiával is elvégeztem annak megállapítása céljából, hogy a hipokotil szövetek TTP-vel való etetésekor a GS mi-

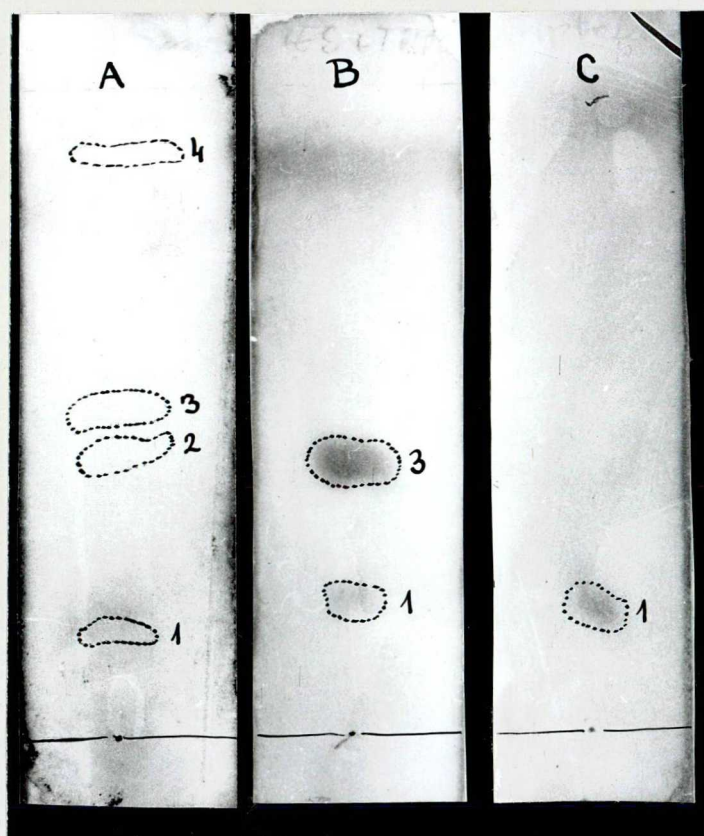
lyen arányban segíti elő a szabad IES és az IES-glükózidok képződését. A két IES-forma meghatározása ez esetben külön-külön történt. Az eredményeket a 28. ábra tartalmazza.



28. ábra: A TTP etetés hatása az IES formák mennyiségére

Az ábra adatai alapján százalékban is kiszámítottam, hogy a TTP-vel való etetés után az össz-IES-tartalomból hány százalék az IES-glükózid /1=alsó folt/, és mennyi a szabad IES /2=felső folt/. Ezen számítások szerint az IES-nak 53-58%-a IES-konjugátum /meghatározásaim szerint glükózid/ formájában, és 42-47%-a szabad sav alakban van jelen.

Ezen adatok teljesen megfelelnek a TTP etetés nélkül kapott arányoknak, ezt úgy látszik, a TTP-vel történt infiltrálás nem változtatja meg. Ugyancsak nem függ az alsó és felső folt IES-tartalmának aránya sem a fénytől, sem a hajtáscsúcs jelenlététől, sőt az alkalmazott GS-koncentrációtól sem.



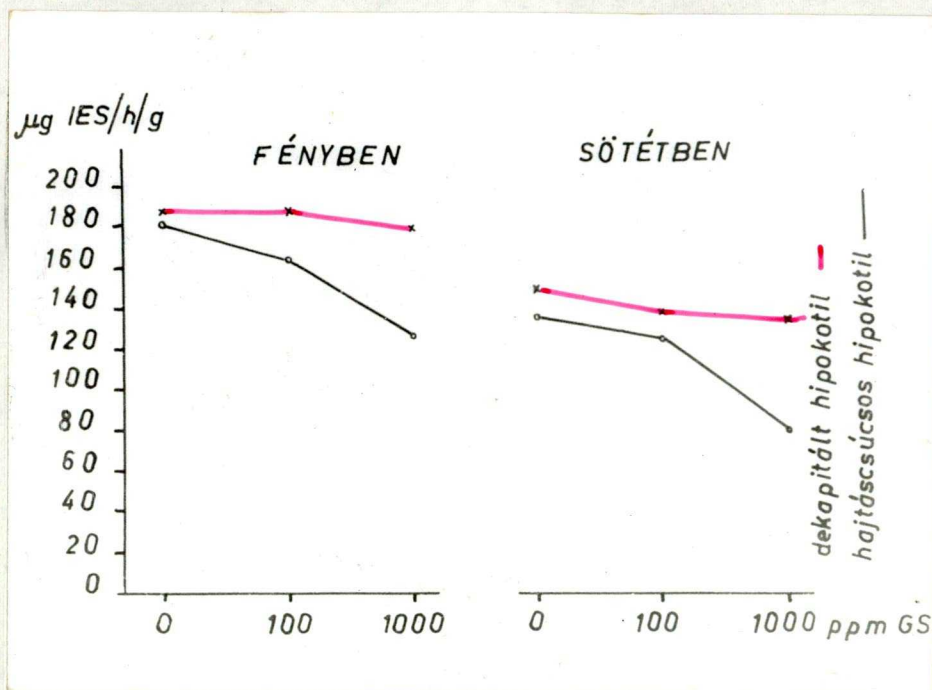
29. ábra: Triptofánnal infiltrált hipokotil extraktumából készített kromatogramok /Erlich reakció/. A=extraktum; B=szintetikus TTP és IES; C=szintetikus TTP. 1=TTP; 2=IES-glükózid; 3=szabad IES; 4=IAN és IAM.

A 29. ábra A/ csíkja TTP-vel etetett szövetekből készült vékonyréteg kromatogramot mutat be. A kromatogramokon mindig megjelent Rf 0,19-0,20 pozícióban a TTP foltja /1/, mely Erlich reagenssel halványlila /A és B/, Gordon-Weber reagenssel sárga színt adott /C/, és ninhidrin-pozitív reakciót is mutatott. Az IES formák /2, 3/ nagyon jól elkülönült két foltján kívül, a frontvonalban még egy indol-pozitív folt tűnt elő, melynek Rf értéke, Erlich reagenssel adott szürkészöld vagy szürkésbarna színreakciója és fluoreszcenciája alapján valószínűleg indolacetonitrilnek /IAN/ vagy indolacetamidnak /IAM/ tekinthető /LARSEN, 1955/. Ezt a foltot, mivel nem kapcsolódik szorosan a témához, közelebbről nem határoztam meg.

4./ A GS kezelés hatása az IES-oxidáz aktivitására

Mint ismeretes, a növényi szövetek IES tartalmának egy része az IES-oxidáznak nevezett enzimrendszeren keresztül lebomlik, tehát egy adott szövet auxin-koncentrációja függ ezen enzim aktivitásától is. Azok a vegyületek, amelyek csökkentik az IES-oxidáz enzimaktivitását, ezáltal növelik az auxin mennyiségét a szövetekben. Munkám következő részében azt vizsgáltam meg, hogy a GS okozta auxin-szint-növekedés egy ilyen hatáson alapul-e?

A kezeletlen és GS-kezelt bab hipokotil szele-
tek IES-oxidáz aktivitását a 30. ábrán tüntettem fel.

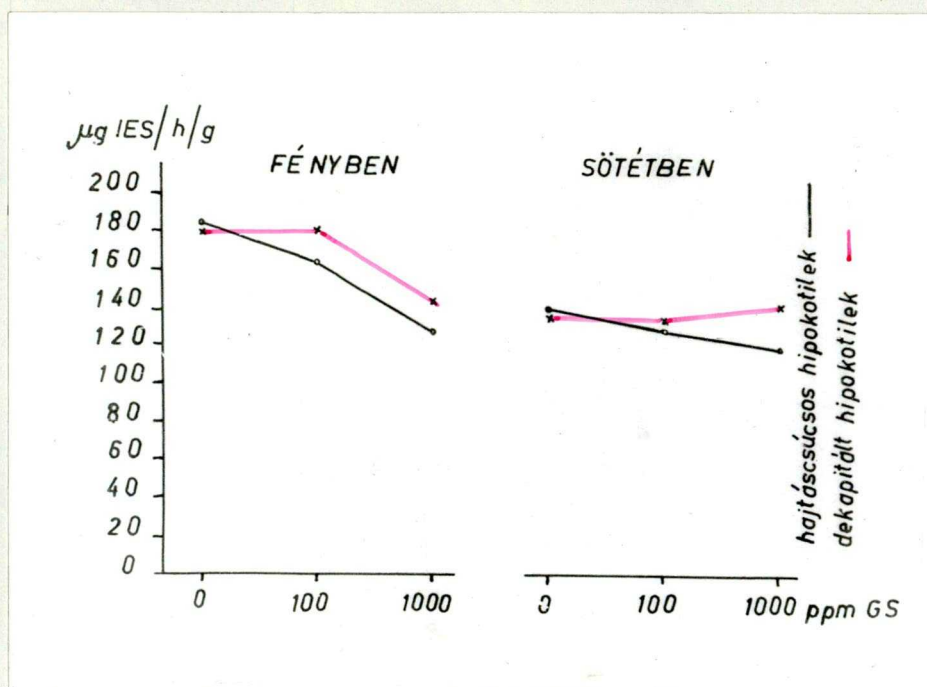


30. ábra: A GS-kezelés hatása az IES-oxidáz-aktivitásra

Az ordinátán az 1 g szövetnek megfelelő enzimrendszer által, 1 óra alatt elbontott IES mennyiséget ábrázoltam. Kezeletlen /Oppm/ szövetekben, fényben és sötétben is, a dekapitált hipokotilekben mérhető nagyobb enzimaktivitás, amely összhangban van azzal az előző megállapítással, hogy ezekben a szövetekben alacsonyabb az IES-tartalom, mint a hajtáscsúcsos hipokotilekben. Másik levonható következtetés pedig az, hogy fényben az IES oxidatív elbontása nagyobb mértékű, mint sötét-

ben, amely szintén összeegyeztethető a sötétben mért nagyobb auxin-koncentrációval. A 100 és 1000 ppm GS-sel való kezelés ezen viszonyokon nem változtat, azonban a hajtáscsúcsos hipokotilekben mind fényben, mind sötétben, csökkentette az IES enzimes lebontását. A GS-kezelés azonban a dekapitált hipokotilekben nem volt hatással, ugyanis a kontrolltól való eltérések nem szignifikánsak.

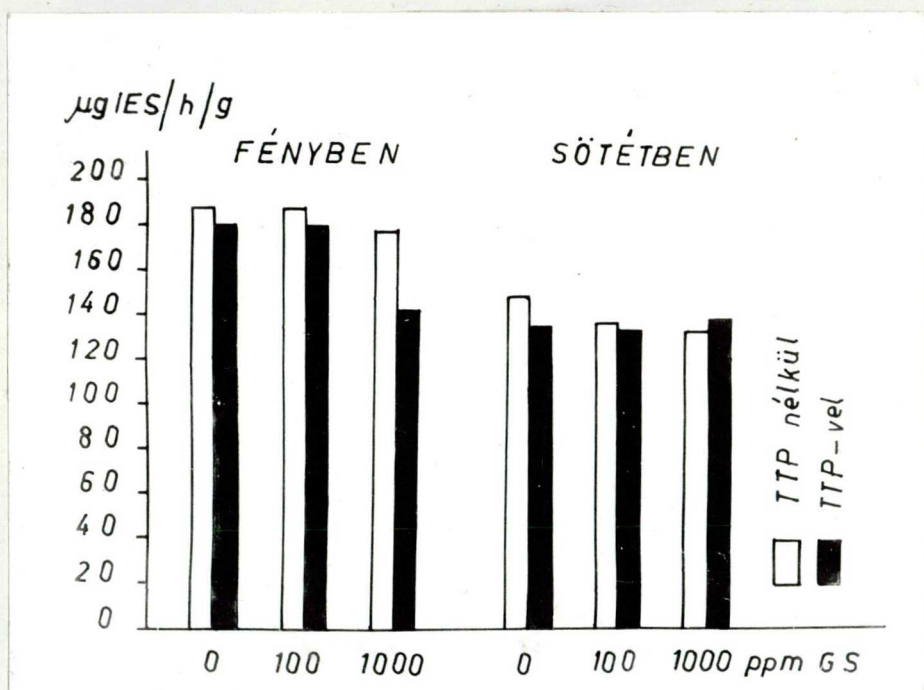
A TTP-vel etetett hipokotilek esetében szintén meghatároztam az IES-oxidáz aktivitását /31. ábra/.



31. ábra: A TTP etetés hatása az IES-oxidáz-aktivitásra

A TTP-vel történő infiltrálás - mint azt az előzőekben

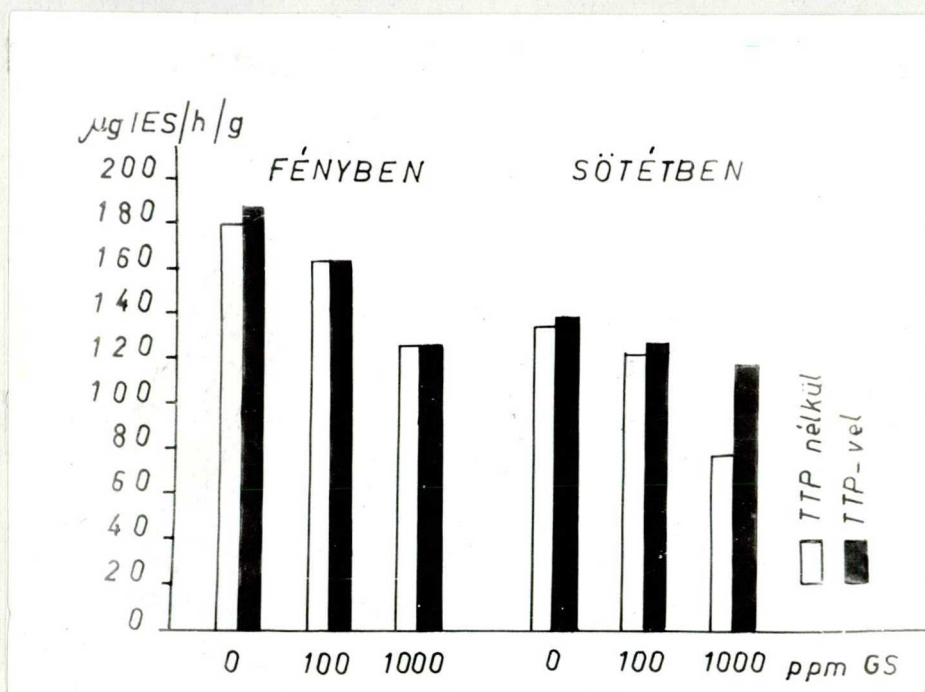
láttuk - az IES-tartalmat emelte, de az auxin-oxidáz aktivitását nem befolyásolta számottevően. Ugyanis az itt mért enzimaktivitások kb. ugyanolyanok, mint a TTP-infiltrálás nélküli kísérletekben.



32. ábra: Dekapitált bab hipokotilek IES-oxidáz aktivitása GS kezelés hatására, TTP infiltrálással és infiltrálás nélkül.

A 32. és 33. ábrákról - ahol a TTP-vel infiltrált és TTP nélküli eredményeket hasonlítottam össze - szintén megállapítható, hogy nincs lényeges különbség a kétféle kísérleti sorozatban az IES-oxidáz aktivitá-

sa között. Csupán két esetben: dekapitált hipokotilekben /32. ábra/ 1000 ppm hatására fényben, hajtáscsúcsos hipokotilekben /33. ábra/, ugyancsak 1000 ppm esetén sötétben van szignifikáns, de ellenkező irányú különbség /-20% és +54%/.



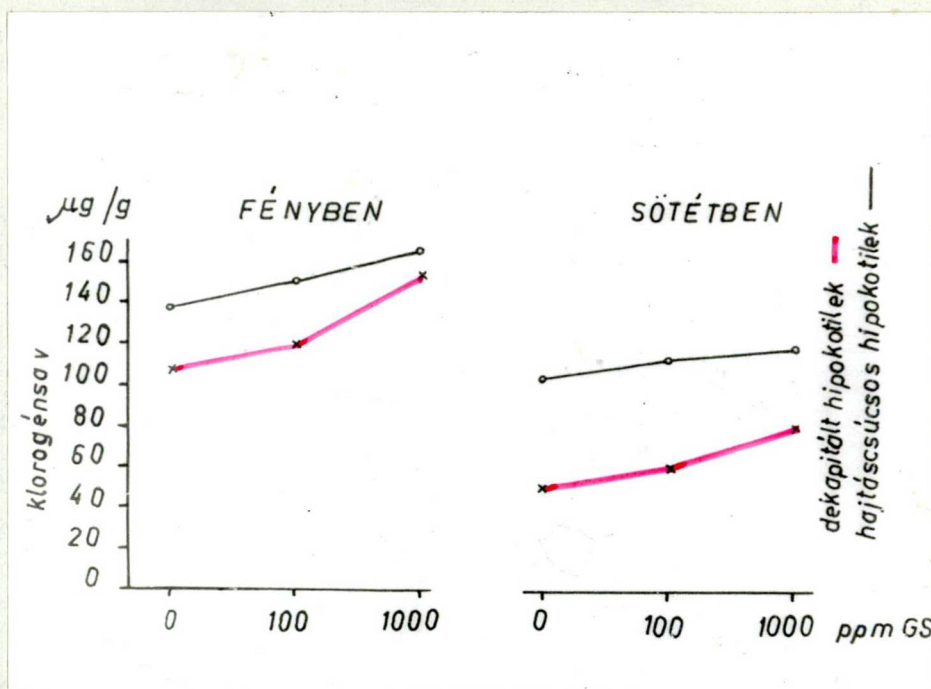
33. ábra: Hajtáscsúcsos bab hipokotilek IES-tartalma GS-kezelés hatására TTP infiltrálással és infiltrálás nélkül.

A kapott adatok tehát azt mutatják, hogy az IES-oxidáz-aktivitást a fény és a hajtáscsúcs jelenléte általában fokozta; s a GS-kezelés a hajtáscsúcsos szárban csökkentette, a dekapitált hipokotilban viszont az

esetek többségében nem befolyásolta az IES enzimikus lebontását. A szövetek TTP-vel való előzetes infiltrálásának sem volt mérhető hatása az enzimtevékenységre.

5./ A GS kezelés hatása a hipokotilek fenoltartalmára

Az összfenoltartalmat a kezeletlen /Oppm/, valamint a 100 és 1000 ppm GS-sel kezelt hipokotilek esetében, fényben illetve sötétben történt 24 órás inkubálás után mértem. Az eredmények a 34. ábrán láthatók.



34. ábra: A GS kezelés hatása a bab hipokotil szeletek összfenoltartalmára

A diagram az 1 g szövetben levő összfenoltartalmat klorogénsavra vonatkoztatva µg-ban adja meg, a világos oszlopok a fényben, a sötét oszlopok a sötétben kapott eredményeket mutatják. A hipokotil szövetek fenoltartalma lényegesen különbözik attól függően, hogy fényben vagy sötétben voltak-e inkubálva. A GS-sel nem kezelt /kontrol/ hipokotilekben például, a sötétben mért összfenoltartalmat 100%-nak tekintve, a hajtáscsúcs jelenléte vagy hiánya szerint 25 illetve 96%-kal több fenoltartalom volt kimutatható fényben.

A hipokotilek GS-sel történő kezelése minden esetben - fényben és sötétben egyaránt - növelte a kontrolhoz képest a fenolkoncentrációt. Ez az ábra oszlopainak magasságából is jól látható, az emelkedés mértékét számszerűen a 8. táblázat mutatja.

8. táblázat: A fenoltartalom emelkedése GS kezelés hatására

GS koncentráció ppm	Fenoltartalom emelkedése %			
	F é n y b e n		S ö t é t b e n	
	dekapitálth.	csúcsos	dekapitálth.	csúcsos
0/kontrol/	100	100	100	100
100	115	115	120	111
1000	149	127	160	113

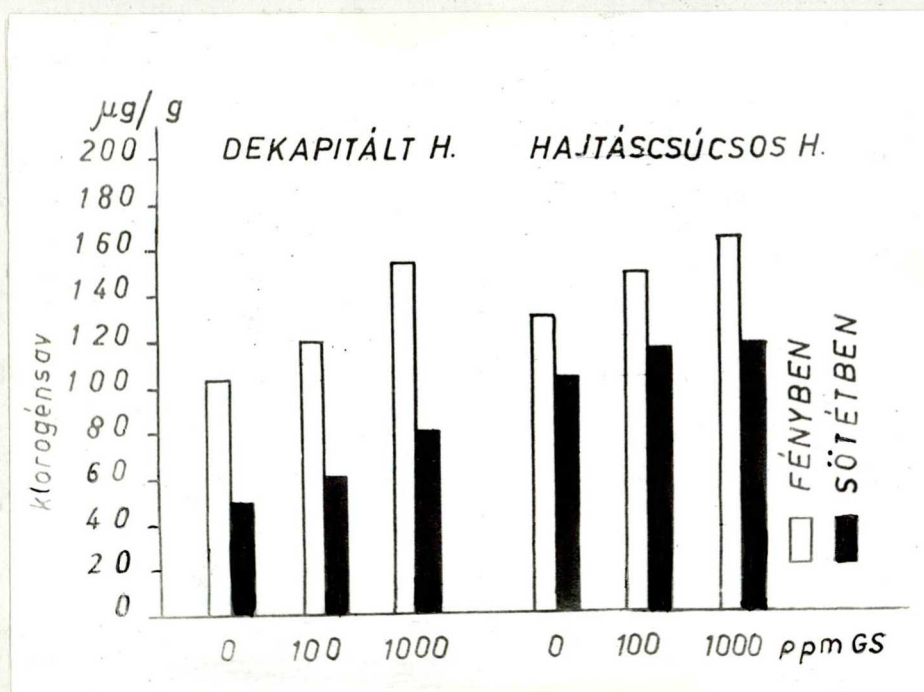
A 34. ábra és a 8. táblázat adataiból többféle vonatkozásban is lehet következtetéseket levonni. Ami a GS kezelésnek a fenolszintet emelő hatását illeti, az a kísérleti körülményektől függően 11-60%-os többletet eredményezett, tehát minden esetben szignifikáns az eltérés a kontrol értékétől.

Ami pedig a fénynek a fenoltartalomra gyakorolt hatását illeti, nemcsak a kontrol, hanem a GS-sel kezelt hipokotilek esetében is feltűnő a fény fokozó hatása: 100 ppm GS kezelés után - a hajtáscsúcs jelenléte vagy hiánya szerint - fényben 29 illetve 100%-kal; 1000 ppm hatására pedig 37 illetve 92%-kal magasabb fenolkoncentrációt lehetett kimutatni, mint sötétben.

A fényen kívül a hajtáscsúcs jelenléte vagy hiánya is befolyásolja a hipokotil szövetek fenoltartalmát és a GS-nek a fenolszintre gyakorolt hatását. A 35. ábrán ezt hasonlítottam össze. Mind a kontrol /Oppm/, mind a GS kezelt hipokotil szövetekben a fenoltartalom a hajtáscsúcs jelenlétében nagyobb. A dekapitált hipokotilek fenoltartalmát 100%-nak tekintve, a hajtáscsúcsos szárdarabokban fényben: 125, 125 és 106%-os; sötétben pedig 200, 183 és 150%-os fenoltartalmat mértem. Ezekhez a százalékos adatokhoz tartozó szignifikancia értékek: 3,22; 2,67; 0,8 illetve 6,3; 6,19 és 6,14 /szignifikancia határ: 1,5/.

A hajtáscsúcs jelenléte a fenoltartalmat tehát

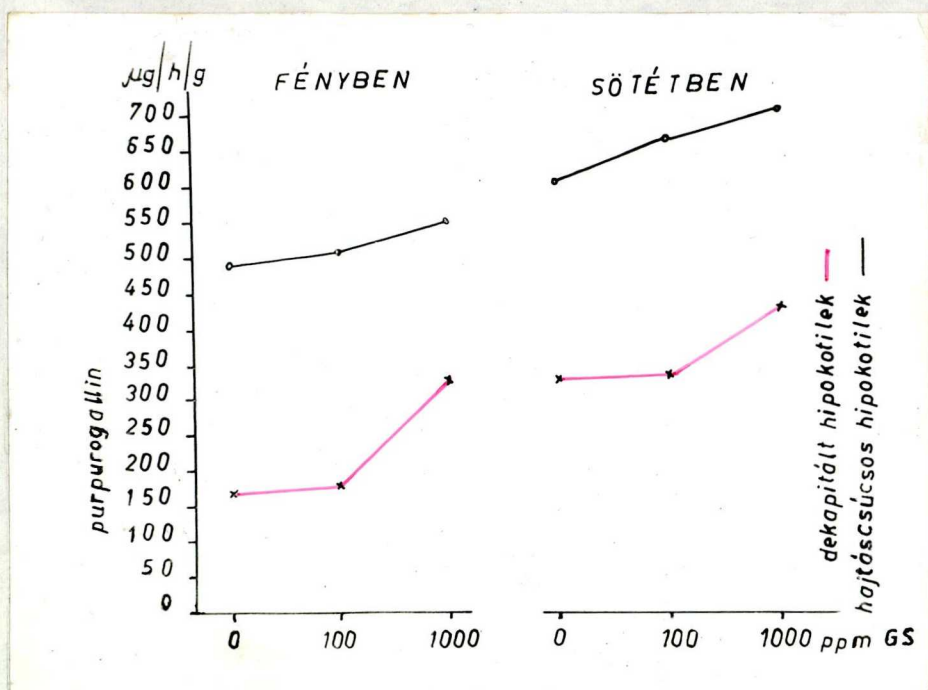
különösen sötétben fokozta jelentősen.



35./ábra: Dekapitált és hajtáscsúcsos hipokotilek össz-fenoltartalma GS kezelés hatására fényben és sötétben

6./ A polifenoláz aktivitásának változása bab hipokotilekben GS kezelés hatására, fényben és sötétben

Mivel a polifenoloxidázok működése a szövetek fenolszintjének befolyásolásán keresztül kapcsolatban van az auxin-anyagcserével, azt is megvizsgáltam, hogy ezen enzimek működése hogyan változik GS kezelés hatására.



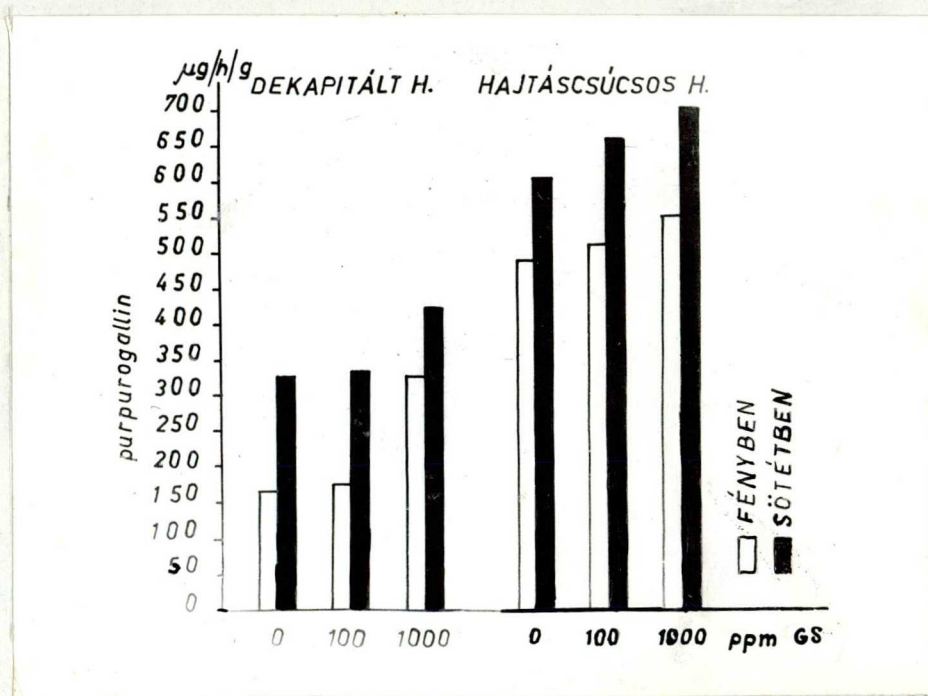
36. ábra: A GS kezelés hatása a polifenoláz aktivitására

Az eredményezet a 36. ábra összegezi. Az ordináta az lg hipokotil szövetben lévő enzim-mennyiség által 1 óra alatt termelt oxidált fenol /purpurogallin/ mennyiségét jelzi.

A 0 ppm GS adatai a kezeletlen, kontrol szövetek polifenoláz-aktivitására vonatkoznak. Mint látható, az enzim aktivitását nagymértékben befolyásolja a hajtáscsúcs jelenléte vagy hiánya, amennyiben a hajtáscsúcsos hipokotilekben 2-3-szor annyi fenolmennyiséget oxidál kinonná az enzim az időegység alatt, mint a dekapitált

hipokotilekben. Ez a különbség a GS kezelés után is megmarad.

Ami pedig a GS kezelés hatását illeti, az különösen 1000 ppm GS kezelés esetében, határozottan emeli az enzim aktivitását. Ez a hatás viszont a dekapitált hipokotilekben nagyobb mértékű /25-100%-os aktivitás-növekedés/, mint a hajtáscsúcsos hipokotilekben /10-20%/.



37. ábra: Dekapitált és hajtáscsúcsos hipokotil szövetek polifenoláz-aktivitása

A 37. ábra a fénynek és sötétségnek az enzimaktivitást befolyásoló szerepét mutatja be. Igen feltűnő,

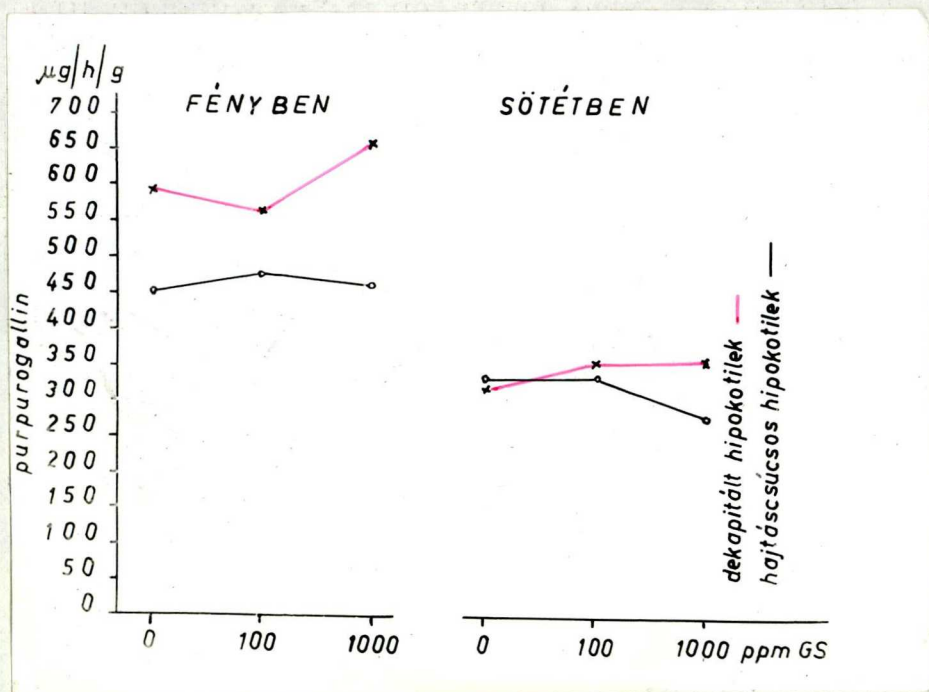
hogy sötétben a polifenolok enzimes oxidációja nagyobb mértékű /dekapitált hipokotilekben 100, 91, 28%-kal; hajtáscsúcsos hipokotilekben 23, 26, 28%-kal/, vagyis a fény láthatólag gátolja ezen enzim tevékenységét.

A polifenoláz aktivitását tehát a bab hipokotil szövetekben a következő tényezők növelik: a hajtáscsúcs jelenléte, a fény hiánya és a GS tartalom emelése /GS kezelés/.

7./ A peroxidáz aktivitásának változása a bab hipokotilekben a GS kezelés hatására, fényben és sötétben

Választott témám szempontjából a peroxidáz működése két szempontból is érdekes. A peroxidázok szubsztrátumai ugyanis a növényi szövetekben egyrészt fenolok, az enzim tehát az oxidált és redukált fenolok arányának befolyásolásán keresztül szintén kapcsolatban lehet az IES anyagcserével. A peroxidáznak azonban szubsztrátuma lehet az IES is, melyet számos irodalmi adat szerint ugyancsak képes eloxidálni, s így ezen az úton is hathat a szövetekben az IES mennyiségére.

A 38. ábra mutatja be a kontrol és a GS-kezelt hipokotilekben mért peroxidáz-aktivitást. Az eredmények ez esetben is az 1 g hipokotil szövetben lévő enzim mennyiség által 1 óra alatt termelt purpurogallin mennyiségre vonatkoznak.



38. ábra: A GS kezelés hatása a peroxidáz aktivitására

A kapott eredmények általában hasonlítanak azokhoz az eredményekhez, melyeket az IES-oxidáz mérésekor kaptam. Megállapítható ugyanis, hogy a peroxidáz-aktivitás a dekapitált hipokotílekben nagyobb, mint a hajtás-csúcs jelenlétében; és a fény, illetve a sötétség is az IES-oxidáznál tapasztalt módon hat a peroxidáz működésére, ugyanis a fény növeli, a sötétség pedig csökkenti a fenolok peroxidáz általi eloxidálását. A GS kezelés a peroxidáz aktivitására nem minden esetben egyértelműen hatott, ugyanis a dekapitált hipokotílekben az enzim ak-

tivitása fényben inkább emelkedett, sötétben viszont majdnem változatlan maradt. A hajtáscsúcsos hipokotilek esetében pedig a 100 ppm GS nem változtatta meg, míg az 1000 ppm GS inkább csökkentette a peroxidáz működését. Ezek az eredmények - legalább is részben - szintén emlékeztetnek az IES-oxidáz mérésekor kapott eredményekre.

IV. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

1./ A GS IES-tartalomra gyakorolt hatására vonatkozó eredmények áttekintése

A növényi szövetek GS és auxin-tartalma közötti összefüggést az utóbbi években számos kutató tanulmányozta. Az ilyen tárgyú munkák között viszonylag kevés az olyan eredmény, amely szerint nincs összefüggés a GS növekedést előidéző hatása és az IES-tartalom között. HAYASHI és MURAKAMI /1958/; PURVES és HILLMANN /1959/; HILLMANN és PURVES /1961/; GALSTON és McCUNE /1961/; Ng és AUDUS /1964/, valamint KATO /1961/ ugyan is azt írják, hogy a GS kezelés a vizsgált fajok szövetekben nem változtatja meg az auxinkoncentrációt.

Sokkal több olyan közlemény olvasható, amelyek szerint a különféle növényi szövetek GS kezelése az endogén auxin-szint emelkedéséhez vezet. Az ilyen munkák

túlnyomó többségében azonban a puszta megállapításon túlmenően nem kutatták az IES-tartalom emelkedésének okát. NITSCH /1957, 1959/ Rhus tyhina-ban és babban; PHILIPS és mts. /1959/, BOUILLENNE és WALRAND /1959/, valamint GAMBURG /1964/ borsóban; TSUKAMOTO és SANO /1958/, PALLADINA /1964/ burgonyagumóban; SÁGI és GARRAY /1961/ Lupinusban; MICHNIEWICZ /1962/ őszibúzában; KURASHI és MUIR /1962, 1964/ borsóban, babban, napraforgóban; SASTRY és MUIR /1963, 1965/ paradicsomban; GAMBURG /1964/ kukoricában, HUMPHRIES-WHEELER /1964/ babban, DAS és RAO /1965/ pedig rizslevélben észlelték a GS kezelés alkalmazása után az IES-tartalom növekedését. Azonban a fenti munkák mindegyikében csak különböző biológiai tesztekkel - közvetve - határozták meg a viszonylagos IES-koncentrációt, s egyetlen esetben sem az IES direkt mennyiségi mérésével.

Vannak olyan eredmények is, melyek szerint a GS nem az auxin mennyiségét, hanem annak transzportját fokozza a szervekben /JAKOBS és CASE /1965/; DAVIES és mts./1966/.

VARGA és BÁLINT /1965/ rizs-csiranövényekben tanulmányozta a GS kezelés auxin-tartalomra gyakorolt hatását fényben és sötétben. Az IES mennyiségét a koleoptilek auxinérzékenységének vizsgálatával, illetőleg zab koleoptil-teszttel határozták meg. Az eredmények

nem mutatták az IES-tartalom észrevehető emelkedését a kontrolhoz képest 50, 100 és 500 ppm GS kezelés után. Azonban a szerzők következő munkái során kiderült, hogy a rizs-szövetekben az IES-tartalom oly rendkívül csekély, hogy annak akár egy nagyságrenddel történő emelése sem mérhető kellően, még biológiai tesztekkel sem.

Viszont a bab csiranövények hipokotiljeinek IES-tartalma viszonylag igen magas, ezért rendkívül alkalmas direktmérésekre /FLETCHER és ZALIK 1964/. Ennek alapján kívánatosnak látszott a gibberellin IES-szintre gyakorolt hatását egy ilyen kiválóan alkalmas tesztobjektumon direktmérési módszerekkel meghatározni, amit az irodalomban eddig még nem tettek meg.

Jelen kísérletekben éppen ezért újszerű a GS kezelt szövetekben az IES mennyiségének abszolút meghatározása. Az IES kvantitatív spektrofotometriás meghatározását FLETCHER és ZALIK /1964/ dolgozták ki, és kísérletek céljára 1965-ben alkalmazták először. A JATE Növényélettani Tanszékén a fenti módszer szerint ugyancsak 1965 óta végeznek IES direkt méréseket /KÖVES-VARGA-ÁCS 1965; KÖVES 1966/. Ezek alapján történt kísérleteimben is az IES kvantitatív meghatározása, kromatográfiával és spektrofotometriával.

A kapott eredmények szerint a bab hipokotilek 100 és 1000 ppm GS-sel való kezelése minden esetben, tehát úgy fényben, mint sötétben, hajtáscsúcs nélkül

és annak jelenlétében egyaránt, jól észlelhető módon növelte a szövetek IES-tartalmát. A GS-koncentrációk IES-szintet növelő hatása megegyezik növekedésre gyakorolt hatásukkal, vagyis a nagyobb megnyúlást eredményező 1000 ppm GS jobban növelte az IES-tartalmat, mint a közepes megnyúlást eredményező 100 ppm. Az IES-tartalom növekedése a különböző inkubálási állapotok, továbbá a hipokotilek természete szerint 10-47%-os volt.

Eredményeim szerint a bab hipokotil szövetekben a 24 óra alatt extrahált IES-nek 40-44%-a szabad sav alakjában, 56-60%-a pedig IES-konjugátum formájában van jelen, s ez az arány meglehetősen állandó; a fény és a hajtáscsúcs jelenléte nem befolyásolja számottevően. Az adatok tehát arra mutatnak, hogy a GS kezelés - bár a szövetek össz-IES-tartalmát jelentősen növeli - de a fenti két forma arányát nem változtatja meg.

Az a tapasztalat, hogy a metanolos extraktumból készült kromatogramokon az IES két foltra különül el, megegyezik több kutató eredményével. FLETCHER és ZALIK /1965/ kimutatták, hogy a szövetek rövid ideig tartó /néhány órás/ metanolos kivonása a szabad IES-t oldja ki, az egy éjjelen át történő metanolos extrahálás viszont már a kisebb molekulásúlyú vegyületekhez kötött IES-formákat is kívánja. Ez az ugynevezett könnyebben mozgó kötött IES, vagy IES-konjugátum. A makromolekulák-

hoz kapcsolódó, úgynevezett erősebben kötött IES-t viszont csak 3 órás sósavas hidrolizissal lehet kinyerni. Mivel kísérleteimben 24 órás metanolos extrahálást alkalmaztam, így az extraktum csak a szabad IES-t és a kisebb molekulákhoz kötött IES-t tartalmazza, a proteinekhez és RNS-hez kötött IES viszont nincsen benne.

A kromatogramokon IES-ként viselkedő, egymás mellett lévő két folt közül a felső folt /Rf 0,50/ bizonyult szabad IES-nek, mivel az IES-reakción kívül más reakciót nem mutatott. Az alsó folt /Rf 0,54/ viszont IES-reakción kívül cukorreakciót is adott, ezért IES-glükozidnak tekinthető. KÖVES /1967/ részletesen vizsgálta ezen IES-glükozid természetét, -ugyancsak bab hajtásokból készült kromatogramok esetében - s úgy találta, hogy a konjugátum foszfátreakciót is ad, tehát az IES cukorfoszfátokkal alkotott vegyülete, amit ő az IES átmeneti, esetleg raktározott formájának tekint. Az IES-glükozidok jelenlétét SAHAI SRIASTRAVA /1964/ is tapasztalta.

Mivel kromatogramjaimon a szabad IES és az IES-konjugátum mennyiségének aránya a különböző körülmények között nagymértékben állandó volt, azt lehet gondolni, hogy ez az egyensúlyi arány nem is a szövetekben, hanem az extrahálás és a kromatografálás közben alakul ki. Arra azonban nincs mód, hogy meghatározzuk, hogy a kísérletek folyamán a kötött formákból mennyi IES szabadul fel.

A fentiek szerint kísérleti eredményeim azon szerzők adataival egyeznek meg, akik szerint a GS kezelés emeli az IES-szintet.

2./ A triptofánból történő IES bioszintézis befolyásolása GS-val

A kísérleti eredmények szerint a bab hipokotilek TTP-vel való infiltrálása után a kontrol szövetekben 24-44%-kal emelkedett az IES-tartalom. Ez várható is, mert az IES különböző reakcióutakon TTP-ből keletkezik /SZALAI 1965/. A GS-sel kezelt szövetekben azonban az IES TTP-ből történő bioszintézise ennél nagyobb mértékű: a kísérleti körülményektől függően 39-48% volt. Ennek alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy a szövetek GS koncentrációjának emelése elősegíti az IES-nek TTP-ből történő bioszintézisét, tehát - legalább is egyrészt - ezen a módon vezet az IES-tartalom emelkedéséhez.

Ilyen tárgyú vizsgálatokat az irodalomban csak MUIR /1964/ illetve SASTRY és MUIR /1965/ végeztek. Eredményeim megegyezők, mivel az említett szerzők is azt állapították meg, hogy borsó, és paradicsom enzimpreparátumok GS kezelés után nagyobb mértékben hajtották végre a triptofán IES-sé való átalakítását. Zab ko-leoptillel végzett kísérletek esetében is azt tapasztalták, hogy a TTP által indukált megnyúlás kicsi, de

jelentősen nő GS jelenlétében. A GS-nek csak kis hatása van az indolacetaldehid /IAA/d/ által indukált növekedésre, jelezvén, hogy a prekursorok auxinná történő átalakulási folyamatában a GS az aldehid-állapotot megelőzően működik közre. Ugy látszik, hogy a GS az auxinprekursor átalakítását egy aldehid intermedieren át serkenti.

3./ Az IES-oxidáz aktivitására vonatkozó eredmények áttekintése

Mivel az IES-oxidáz aktivitásának mérése könnyebb, mint az IES-tartalom meghatározása, ezért sokan főként ezen az alapon próbálták a gibberellin és IES kapcsolatának kérdését vizsgálni. Kézenfekvőnek látszott ugyanis az a gondolat, hogy a GS kezelés a szövetekben az IES-oxidáz aktivitását csökkenti, és ezen keresztül fokozza az endogén IES-koncentrációt. Az irodalomban számos ilyen eredményű dolgozatot olvashatunk. Így pl. PILET /1957/ és PILET és WURGLER /1958/ a *Trifolium ochroleucum* GS kezelt levelében csökkent auxinoxidáz-aktivitást mértek, s mivel közben a levélgyekek fokozott megnyúlását tapasztalták, az auxin koncentrációjának növekedését gyanítják. GALSTON /1957, 1959/ szerint egy endogén auxintakarékosság származik másodlagosan egy IES-oxidáz inhibitor képződéséből, s a GS esetleg

ezen inhibitort befolyásolja. STUTZ és WATANABE /1957/, valamint HALEVY /1963/ munkájában a GS kezelés szintén csökkentette az IES-oxidáz aktivitását. HOUSLEY és DEVERALL /1961/ Galstonhoz hasonlóan szintén azt gondolják, hogy a GS hatására egy inhibitor képződik, mely gátolja az auxinelbontó enzimrendszer működését.

Találunk viszont olyan publikációkat is, amelyek szerint a GS kezelés nem befolyásolja az IES-t elbontó enzimrendszer aktivitását /KATO és KATSUMI 1958, PROCKO és mtsai 1966/. KEFFORD /1962/, valamint SÁGI és GARAY /1961/ eredményei sem támogatják azt a hipotézist, hogy a GS megnyúlásra gyakorolt hatása kapcsolatban lenne ezzel a rendszerrel. Sőt vannak, akik egyenesen azt állítják, hogy a GS-kezelés fokozza az IES-oxidáz aktivitását s ezen keresztül fejti ki növekedésserkentő hatását /REINGARD és PALLADINA 1963/.

Saját kísérleteimben, bab hipokotil szövetekben, a GS csökkentette az IES-elbontó tevékenységet, de főként csak akkor, amikor a hajtáscsúcs jelen volt. Dekapitált hipokotilekben viszont általában nem változott számottevően az enzimaktivitás GS hatására. Ebből arra következtethetünk, hogy a GS auxinszintet növelő hatásának csak részben lehet oka az IES elbontástól való megóvása. Hiszen a GS azokban az esetekben is növelte az IES-tartalmat, ahol az IES-oxidáz tevékenységét nem csökkentette, pl. a dekapitált hipokotilekben. A GS által serkentett

növekedés és magasabb IES-szint tehát legfeljebb csak részben adódhat az IES-oxidáz aktivitásának csökkenéséből; részben pedig más mechanizmus szerint valósul meg, valószínűleg a belső auxinszint közvetlen emelése /az IES bioszintézis elősegítése/ révén.

A szövetek TTP-vel való infiltrálása az IES bioszintézisét és ezáltal az auxinkoncentrációt jelentős mértékben emelte, az IES-oxidáz aktivitása azonban változatlan maradt. Vagyis ezekben a kísérletekben nem volt tapasztalható az enzim-adaptációnak nevezett jelenség, nevezetesen az, hogy a szubsztrátum /IES/ koncentrációjának emelkedése az auxinoxidáz aktivitását növeli /GALSTON és DALBERG 1954; ENGELSMA 1964/.

4./ A fény hatása a GS okozta auxinszint változásokra

A GS-kezelés IES-szintet befolyásoló hatásának fénytől való függését nagyon kevesen vizsgálták. Az utóbbi évek irodalmában csupán két erre vonatkozó adatot találtam. HOUSLEY és DEVERALL /1961/ szerint a borsó csúcsi szövetekben a GS-kezelés csökkentette az IES lebontását, de csak fényben. ERNEST /1966/ szerint a fény csökkentése nem befolyásolta a GS kezelés eredményét napraforgóban.

Saját kísérleteimben a hipokotilek a GS kezelésre sötétben nagyobb mértékben reagáltak, mint fényben, s ugyancsak sötétben találtam a nagyobb friss- és szárazsúlygyarapodást. Megállapítható továbbá, hogy az endogén IES-tartalom sötétben történő inkubálás után magasabb, mint a fényben. történő inkubálás esetében. A hajtás-csúcsos hipokotilekben átlag $3-5 \mu\text{g/g}$, dekapitált hipokotilek esetében pedig átlag $8 \mu\text{g/g}$ értékkel lett magasabb az IES-tartalom sötétben, mint fényben.

Mindezekkel összhangban van az a további eredmény is, hogy mind a kontrol, mind a kezelt szövetekben az IES oxidatív elbontása fényben nagyobb mértékű, mint sötétben. Hasonló megállapítást tett a törpe borsóval kapcsolatban végzett kísérletei során GALSTON is. GARAY /1966/ szerint a fény azáltal fokozza az auxin elbontását a szárban, hogy az IES-oxidáz keletkezését gyorsítja.

Viszont amikor a hipokotil szövetekbe TTP-t infiltráltam, a GS hatására fényben több IES keletkezett, mint sötétben. A GS hatásának fénytől való függése tehát elmentmondásnak látszik, ennek tisztázására további vizsgálatok lennének szükségesek. Annyi azonban most is megállapítható, hogy a fény és sötét a GS auxinszintet növelő tevékenységére befolyást gyakorol. A GS hatás fény általi befolyásolásának természete azonban jelen kísérletekből nem ismerhető meg pontosan.

5./ A hajtásrügy jelenlétének hatása

A kísérleti adatok számos esetben azt mutatták, hogy a hajtáscsúcs jelenlétében a hipokotilek a GS kezelésre másképpen reagálnak, mint a hajtáscsúcs jelenléte nélkül.

Az IES-tartalom a kezeletlen /0 ppm/ és a GS kezelt szövetekben egyaránt, mind fényben, mind sötétben, a hajtáscsúcs jelenlétében magasabb, mint a dekapitált hipokotilekben. A különbség különösen GS kezelt szövetekben szignifikáns: az IES-tartalom emelkedése hajtáscsúcs jelenlétében 7-12%-kal nagyobb mértékű. A legnagyobb fokú IES-tartalom-növekedést az 1000 ppm GS váltotta ki a hajtáscsúcsos hipokotilben /147%/. Ugyancsak megállapítható volt, hogy az IES triptofánból történő bioszintézisét a hajtáscsúcs jelenléte mind a kezeletlen, mind a GS kezelt hipokotilekben, nagyban elősegítette.

Az IES-oxidáz aktivitásának vizsgálatánál szintén azt tapasztaltam, hogy a hajtáscsúcsos hipokotilekben GS kezelés hatására csökkent az IES elbontása, dekapitáltakban viszont nem.

Ezek az eredmények tehát arra mutatnak, hogy az IES spontán és GS indukált szintézisében, az IES enzimikus elbontásában, és általában a GS növekedésre

gyakorolt hatásában a hajtásrügynek fontos szabályozó szerepe van. Az már régóta ismeretes, hogy az auxin-szintézis központja a hajtáscsúcsban van /SZALAI 1965/, de úgy látszik, hogy a csúcs emellett a GS hatását is valamilyen módon befolyásolja. Bizonyára korrelációs jelenségekről van szó a GS-sel kapcsolatban is.

6./ A fenoltartalom alakulása a GS-kezelt és kezeletlen hipokotilekben

A fenoltartalomra vonatkozó eredményeim teljes mértékben megegyeznek azzal az általánosan elterjedt nézetrel, hogy a fenolok szintézise fényben nagyobb mértékű, mint sötétben. ZUCKER és AHRENS /1958/ azt találták, hogy a dohánylevelekben a fenolok képződése fényben kétszer olyan intenzív, mint sötétben, és pl. klorogénsav csak megvilágítás hatására képződik. MASUDA /1962/ szerint búzagyökerek esetében a fényben nőtt gyökerek fenoltartalma nagyobb volt, mint a sötétben nőtt gyökereké. ENGELSMA és MEIJER /1965/ is azt írják, hogy a fény befolyásolására a fenolok bioszintézisében jelentékeny serkentés mutatható ki. GARAY /1966/ pedig *Lupinus* levelekben hosszúnappalon nagyobb fenoltartalmat mért, mint rövidnappalon. A fent felhozott példákon kívül még több hasonló eredmény jelent meg az irodalomban.

Ami viszont a GS kezelésnek a fenoltartalmat befolyásoló hatását illeti, a vélemények nem ennyire egyöntetűek, bár ezt a kérdést nagyon kevesen vizsgálták. DAS és RAO /1965/1/ eredményei szerint a hagyma csiranövényben a GS elősegíti a fenolsavak szintézisét és ezen keresztül a megnövekedett auxintartalom folytán részt vesz a növekedés szabályozásában. SÁGI és GARAY /1961/ viszont a *Lupinus albus* csiranövény vizsgálatakor arra a következtetésre jutott, hogy a GS nem serken-ti a fenolvegyületek mennyiségét.

Saját kísérleteimben azonban a bab hipokotilek GS-kezelése minden esetben, tehát fényben és sötétben egyaránt, számottevő fenolkoncentráció emelkedéshez vezetett. A GS-nek ez a hatása fényben nagyobb mértékű, mint sötétben.

7./ A fenol- és az IES-anyagcsere összefüggései

Jelen dolgozat eredményei alapján úgy látszik, hogy a bab hipokotilekben az összefenoltartalom és az IES-tartalom hasonlóan változik, vagyis a GS-okozta növekedés intenzitásával arányos. Az adatok tehát azt mutatják, hogy a növekedés mértéke, az IES mennyisége, és az összefenoltartalom között határozottan egyenes összefüggés áll fenn. A fenoltartalom és az IES-tartalom között ilyen egyenes arányú összefüggést talált GARAY/1963/

Lupinus növényekben, és KOITAI /1966/ rizs-csiranövényekben. Ez arra mutat, hogy ez az összefüggés más növényekre is érvényes, sőt talán általános jelenség lehet.

Ha az összefenoltartalom alakulását összehasonlítjuk az IES-oxidáz aktivitásának változásával megállapítható, hogy legalább is a hajtáscsúcsos hipokotilekben, a kettő fordított arányban áll, amennyiben a GS-okozta magas fenoltartalom csökkent IES-elbomlással párosult. Ezt az összefüggést az irodalmi adatok alapján a következőképpen lehet magyarázni. VARGA és KÖVES /1962/, TOMASZEWSKI /1961/, valamint SÁGI és GARAY /1964/ kimutatták, hogy a polifenolok gátolják, a monofenolok pedig serkentik az IES-oxidáz aktivitását. A GS-kezelés hatására keletkezett magasabb összefenoltartalmon belül tehát valószínűleg megnő a polifenoloknak a monofenolokhoz viszonyított aránya, s mivel a polifenolok az IES-oxidáz ismert inhibitorai, a GS-kezelt hipokotilekben észlelhető nagyobb auxintartalom esetleg ennek a következménye, legalább is részben /a hajtáscsúcsos hipokotilekben/.

Ezzel az elgondolással az irodalomban többször is találkozni lehet, ugyanis több szerző is azzal magyarázza a GS "auxinkimélő" hatását, hogy a GS csökkenti az IES oxidatív lebomlását. Ez a hatás - mint előbb már láttuk - egyrészt onnan adódhat, hogy a GS közvetlenül az IES-oxidáz enzim működését akadályozza, de eredhet onnan is, hogy a gibberellin egy "harmadik faktor", azaz fenolos

IES-oxidáz inhibitor képződésének elősegítésén át vezet auxinmegtakarításra /BRIAN és HEMMING 1958, GALSTON és WARBURG 1959, WEIJER 1959, HOUSLEY és DEVERALL 1961, stb./. Munkám során kapott eredmények is részben erre mutatnak.

8./ A polifenoláz-aktivitás változása a GS-kezelt hipokotilekben és szerepe az IES-szintézisben

A GS-sel kezelt hipokotilekben, különösen magasabb GS-koncentráció esetén, a polifenoláz enzim aktivitása emelkedett. Különösen feltűnő volt ez a hajtáscsúccsal rendelkező hipokotilekben, mert a hajtáscsúcs jelenléte valamilyen korrelációs hatás folytán jelentősen növelte ezen enzim működését.

A kapott eredményekből azt lehet észrevenni, hogy a polifenoláz-aktivitás mértéke szintén egyenes arányban van a GS-előidézte megnyúlás intenzitásával, az IES-tartalommal, és az összfenoltartalommal. Ezek az értékek ugyanis minden esetben a GS-sel kezelt szövetekben nagyobbak, mint a kezeletlen kontrolban; és a hajtáscsúcs jelenlétében szintén nagyobbak, mint a dekapitált hipokotilekben.

A polifenoláz működése és az IES-tartalom az irodalmi adatok alapján szoros összefüggésben van: a polifenoláz-aktivitás emelkedése elősegíti, gyorsítja a

szövetekben az IES bioszintézisét. Az IES triptofánból való keletkezését ugyanis oxidációs reakcióknak tekintik, amelyekben a redoxi-rendszert képező fenol-vegyületeknek fontos szerepük lehet. A fenolokat a polifenoláz kinonokká oxidálja, a kinonok, pedig, mint erős oxidálószer, könnyen oxidálják a triptofánt auxinná. HENDERSON és NITSCH /1962/ az orto-difenolok, különösen a kávé- és klorogénsav triptofánt oxidáló hatását emelik ki. KÖVES /1966/ kandidátusi disszertációjában szintén kimutatta, hogy egyes fenolvegyületek /klorogénsav, kávésav, galluszsav, fahéjsav/ oxidált alakjai elősegítik az IES triptofánból való keletkezését, s ezen az úton növelik az IES mennyiségét a növényi szövetekben. SARKISSAN és SPEISBERG /1964/ szerint is a triptofán oxidálószerekkel könnyen oxidálódik IES-vá; az IES azonban relative stabil vegyület lévén, nem bomlik azonban tovább. Ezért feltételezhető, hogy a szövetekben a triptofán oxidációjának mértéke nagyobb, mint az IES oxidációja, így az auxin felhalmozódhat.

Mindezek alapján végül is arra a következtetésre lehet jutni, hogy a GS a bab hipokotilekben azért fokozza az IES-koncentrációt, mert növeli a polifenoláz aktivitását, ami a kinonok fokozottabb képződésével elősegíti az auxinszintézist a triptofánból.

9./ A peroxidáz-aktivitás változása a GS-kezelt hipokotilekben és szerepe az IES-szint szabályozásában

A GS-kezelt szövetekben a peroxidáz-aktivitás változásai nagyrészt megegyeznek az IES-oxidáz-aktivitás változásaival. Ugyanis a peroxidáz működése is a dekapitált hipokotilekben, illetve fényben volt nagyobb. A 100 ppm GS kezelés azonban a peroxidázra még annyira sem hatott, mint az IES-oxidázra; az 1000 ppm-es kezelés azonban szintén némileg csökkentette aktivitását. McCUNE és GALSTON /1959/ ugyancsak arról számolnak be, hogy a GS csökkentette a peroxidáz működését a törpe kukoricában.

A peroxidáz-aktivitás alakulása a GS kezelés hatására tehát nagyon hasonlít az IES-oxidáz alakulásához, ezért KOLTAI /1966/ azt gondolja, hogy a peroxidáz részt vesz az IES-oxidáz rendszerben. Valóban az IES-oxidázt már régóta peroxidázokkal hozzák összefüggésbe, s hogy a két enzim azonos-e vagy nem, azt az utóbbi időkben többen vitatták. GARAY 1963-as összefoglalásában például még azt írta, hogy sokan tévesen auxin-oxidázként irtak le peroxidázokat, és hogy a különböző növényekben előforduló auxin-oxidáz és peroxidáz nem azonosak.

A legutóbbi vizsgálatok azonban szinte egyértelműen azt bizonyítják, hogy az IES-oxidáz lényegében peroxidázzal azonos. WATANABE és STUTZ /1960/ továbbá GARAY

/1966/ az enzim különféle tisztítási folyamataiban nem tudták az IES-oxidázt és a peroxidázokat elválasztani, s ezért most már úgy gondolják, hogy szoros rokonság van közöttük. EVANS és ALLDRIDGE /1965/, RICARD és NARI /1966/, és mások az IES-t lebontó enzimet egyenesen peroxidáznak nevezik. OCKERSE és mtsai /1966/ munkájukban kifejtik, hogy az IES oxidatív elbontását peroxidáz végzi, azonban a növényi szövetekben kb. 6 féle peroxidáz, un. izoenzim vagy másképpen "izozim" van, s ezek egyike az IES-oxidáznak nevezett enzim.

FARKAS-tól eredő szóbeli értesülés szerint is 5-6-féle izoenzimre bontható minden növényi peroxidáz; s az egyes izoenzimek szerepe különböző lehet. Így pl. az IES oxidatív lebontását is egy ilyen peroxidáz izoenzim végzi.

Ugy látszik tehát, fenti munkák alapján bizonyosra vehető, hogy az IES-oxidáz lényegében peroxidázzal azonos, s ezért kaptam a két enzimre nézve olyan hasonló eredményt.

A peroxidáznak egyébként a polifenolázéhoz hasonló szerepet tulajdonítanak az IES TTP-ből való keletkezési folyamatában is, hiszen a fenolokat a polifenolázon kívül a peroxidáz is kinonokká tudja oxidálni. RIDDLE és MAZELIS /1964/ pl. megfigyelték, hogy a peroxidáz a TTP-t indol-3-acetamiddá alakítja s ez a prekursor deaminálással IES-vá alakul. Mivel azonban saját munkámban

a GS vagy nem hatott a peroxidázra, vagy pedig csökkentette, nem pedig emelte aktivitását /1000 ppm/, a peroxidáznak ilyen természetű szerepére vonatkozólag nem lehet következtetéseket levonni.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A munka célja volt az IES direkt mennyiségi mérésével meghatározni, milyen kapcsolat van a GS és az IES anyagcsere között a szármegnyúlásban; továbbá, hogy a GS közvetlenül vagy közvetve, s milyen módon hat az IES-tartalomra. Ennélfogva a GS-sel kezelt bab hipokotilek növekedését, IES-tartalmát, az IES triptofánból történő keletkezését, az IES-oxidáz aktivitását, összfenoltartalmát, valamint polifenoláz és peroxidáz-aktivitását mértem és hasonlítottam össze a kezeletlen kontrollal. A vizsgálatokat "Aranyeső" törpe bab fajtaival végeztem. Az eredmények az alábbiakban összegezhetők:

1./ A GS-sel kezelt intakt csiranövények hajtásának növekedése 300 µg/növény koncentrációig emelkedik, itt eléri maximumát, majd az ennél nagyobb koncentrációk hatására már csökken. A hajtásnövekedéssel arányos a friss- és szárazsúlygyarapodás is. A GS a gyökerek hosszát, és súlygyarapodását általában nem befolyásolta.

2./ Az izolált hipokotil szeletek megnyúlása egyértelműbb és kisebb szórású, mint az intakt növényeké, s megnyúlásuk, a friss-súlyuk és száraz-súlygyarapodásuk a GS koncentrációval 1000 ppm-ig arányos.

3./ A hajtáscsúccsal rendelkező hipokotilek a GS kezelésre nagyobb mértékű megnyúlással reagálnak, mint a dekapitáltak; s mindkétféle hipokotil esetében a GS-indukálta megnyúlás sötétben nagyobb mértékű.

4./ A bab hipokotilek 100 és 1000 ppm GS-sel való kezelése minden esetben jól észlelhető módon növelte a hipokotil szövetek IES-tartalmát. A GS-koncentrációk IES-szintet befolyásoló hatása meggyezik a növekedésre gyakorolt hatásukkal, vagyis a nagyobb megnyúlást eredményező 1000 ppm GS jobban növelte az IES-tartalmat, mint a közepes megnyúlást okozó 100 ppm. Az IES-tartalom emelkedése a GS hatására a körülményektől függően 10-47 %-os volt.

5./ A bab hipokotilek TTP-vel való infiltrálása után a GS-sel kezelt szövetekben 24-43 %-kal nagyobb volt az IES-tartalom, mint a kontrol szövetekben. A GS tehát elősegíti az IES-nak TTP-ből való keletkezését, és nagyrészt ezen a módon vezet az auxintartalom emelkedéséhez.

6./ A hipokotil szövetekben a 24 óra alatt extrahált IES-nak 40-44 %-a szabad sav alakjában, 56-60 %-a pedig IES-konjugátum /glükózid/ alakjában van jelen s ez az arány igen állandó; a fény és a hajtás-csúcs jelenléte, de a TTP-vel való etetés sem befolyásolja számottevően. A GS-kezelés a fenti két IES-forma arányát nem változtatja meg.

7./ A GS-kezelés a hajtás-csúcs jelenlétében csökkentette az IES-oxidáz aktivitását, a dekapitált hipokotilekben viszont nem befolyásolta az enzim működését. A GS által serkentett növekedés és a magasabb IES-tartalom tehát legfeljebb csak részben adódhat az IES-oxidáz aktivitás csökkentéséből, un. "auxin-kimélő" hatásból.

8./ A bab hipokotilek endogén IES-tartalma sötétben való inkubálás után magasabb, mint fényben. Ezzel összhangban az IES oxidatív elbontása fényben nagyobb mértékű, mint sötétben. A GS auxinszintet növelő tevékenységére is befolyást gyakorol a fény.

9./ A hajtás-csúcs jelenlétében a hipokotilek a GS-kezelésre másképpen reagálnak, mint anélkül. Az IES-tartalom valamennyi hipokotilben, fényben és sötétben egyaránt, hajtás-csúcs jelenlétében magasabb; s ugyanakkor csökken az IES elbontása is. Tehát az IES spontán és GS indukálta szintézisében és az IES

enzimatis elbontásában egyaránt, a hajtáscsúcsnak fontos korrelatív szabályozó szerepe van.

10./ A bab hipokotilek GS-sel történő kezelése minden esetben, tehát fényben és sötétben egyaránt, számottevően /15-49 %-kal/ növelte az összfenol-tartalmat. A GS-nek ez a hatása fényben nagyobb mértékű, mint sötétben. A GS-kezelés hatására keletkezett magasabb összfenoltartalmon belül valószínűleg megnő a polifenoloknak a monofenolokhoz viszonyított aránya, s mivel a polifenolok az IES-oxidáz inhibitorai, a magasabb auxintartalom - legalább is részben - ennek következménye is lehet.

11./ A GS növeli a szárszövetekben a polifenoláz aktivitását, különösen hajtáscsúcs jelenlétében. A polifenoláz-aktivitás emelkedése a kinonok fokozottabb képződésével elősegíti a TTP IES-vá történő oxidációját, vagyis az IES bioszintézisét. A GS tehát a polifenoláz működésének növelésén át, közvetve is fokozhatja a szárban az IES-koncentrációt.

12./ A GS-sel kezelt hipokotilben a peroxidáz-aktivitás változásai nagyrészt megegyeznek az IES-oxidáz aktivitásával, ami megerősíti azt a nézetet, hogy az IES-oxidáz tulajdonképpen egy peroxidáz izoenzim.

IRODALOM

1. BAYER, M.H.: 1967. Thinlayer chromatography of auxin and inhibitors in *Nicotina glauca*, *N. langsdorffii* and three of their tumor-forming-hybrids. *Planta* 72: 329-337.
2. BRIAN, P.W.-HEMMING, H.G.: 1957. A relation between the effects of gibberellic acid and indolylacetic acid on plant cell extension. *Nature*, 179, 517.
3. BRIAN, P.W.-HEMMING, C.: 1958. Complementary action of gibberellic acid and auxins in *Platanus* internode extension. *Ann. Bot.* 22: 1-17.
4. BRIAN, P.W.-HEMMING, H.G.: 1961. Interaction of gibberellic acid and auxin in extension growth of pea stems. *Plant growth regulation*. Ames, Iowa State Univ. 645-656.
5. BOUILLENNE-WALRAND, M.: 1959. Action des gibberellines sur la croissance végétale supérieures. Relations avec l'acide beta indol-acétique. *Mémoires de la Landhogesch. Gent. Gent*, 24: 705-717.
6. COLOWICK, S.P.-KAPLAN, W.O.: 1955. *Methods in enzymology*, New York. I-IV.

7. DAS, V.S.R.-RAO, K.R.: 1965. The inhibition of gibberellin-induced elongation of rice leafsheath by auxin. *Current Sci.*, Bangalore, 34: 5. 156.
8. DAS, V.S.R.-RAO, J.V.S.: Onion root gibberellins. *Current Sci.*, Bangalore, 34: 1. 28.
9. DAVIES, G.R.-SETH, A.K.-WAREING, P.F.: 1966. Auxin and kinetin-interaction in apical dominance. *Science*, Washington, 151: 3709. 468-469.
10. ENGELSMA, G.: 1964. Destruction of hydroxycinnamic acids coupled to oxidation of indolyl-3-acetic acid by peroxidase as a possible mechanism for adaptiv changes of indolyl-3-acetic acid oxidase activity. *Nature*, London 22: 4927. 88-89.
11. ENGELSMA, G.-MEIJER, G.: 1965. The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. II. Indole-acetic acid oxidase activity and growth. *Acta Bot. Neerl.*, Amsterdam 14: 1. 73-92.
12. ERNEST, L.C.: 1966. Auxin gibberellin relationships in the sunflower. *Diss Abstr.* Ann. Arbor, 26: 10. 5674-5675.

13. EVANS, J.J.-ALLDRIDGE, N.A.: 1965. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *Phytochem.*, Oxford, 4: 3. 499-503.
14. EVENARI, M.: 1949. Germination inhibitors. *Bot. Review.* 15: 153-194.
15. FLETCHER, R.A.-ZALIK, S.: 1963. Quantitative spectrophotometric determination of indolyl-3-acetic acid. *Nature*, 199: 903-904.
16. FLETCHER, R.A.-ZALIK, S.: Effect of light quality on growth and free indoleacetic acid content in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 39: 328.
17. FLETCHER, R.A.-ZALIK, S.: 1965. Effect of light several spectran bands on the metabolism of radioactive IAA in bean seedlings. *Plant Physiol.* 40: 549-555.
18. FURUYA, M.-GALSTON, A.W.-STOWE, B.B.: 1962. Isolation from peas of co-factors and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxidase. Reprinted from *Nat. Vol.* 193: 456-457.
19. GALSTON, A.W.: 1957. Studies on indoleacetic acid oxidase and its inhibitor in light-grown peas. *Plant Physiol.* 32: XXI.

20. GALSTON, A.W.: 1959. Investigations on a substance whose level in tissue is controlled by the red-far-red reversible photoreaction - in Withrow, R.B.: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. Am. Assoc. Adv. Sci. Washington D.C.
21. GALSTON, A.W.-DALBERG, L.Y.: 1954. The adaptive formation and physiological significance of indole acetic acid oxidase. Amer. Jour. Bot. 41: 373-380.
22. GALSTON, A.W.-McCUNE, D.C.: An analysis of gibberellin auxin interaction and its possible metabolic basis. Plant growth regulation. Ames, Iowa State Univ. Pr. 611-625.
23. GALSTON, A.W.-PURVES, W.K. 1951. The mechanism of action of auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 192-195.
24. GALSTON, A.W.-WARBURG, H.: 1959. An analysis of auxin-gibberellin interaction in pea stem tissue. Plant Physiol. 34: 16-22.
25. GAMBURG, K.Z.: 1963. Kineticseskij analiza izai-modejsztvija gibberellina i aukszin gibberellinü i ih dejsztvie na raszteniia. Moszkva, Izd. AN. SzSzSzR., 143-148.

26. GAMBURG, K.Z.: 1964. Vzaimosvjaz' dejstvija gibberellina sz aukszinom. Reguljatorü rosztu i roszt rasztenij. Moszkva, Izd. Nauka, 77-100.
27. GARAY, A.: 1966. A növekedés szabályozása. Akadémiai doktori értekezés, Fertőd.
28. GASPAR, T.-BASTIN, M.-LEYH, C.: Composés phénoliques, acide beta-indol-acétique et activité auxines-oxydasique. Bull. Classe Sci., Bruxelles, 1964. 50: 7. 799-815.
29. GLICK, D.: 1960. Methods of biochemical analysis. I.27.
30. GRIFFITHS, L.A.: 1957. Nature, 180. 286-287.
31. GORDON, S.A.-PALEG, L.G. 1961. Formation of auxin from tritophan through action of polyphenols. Plant Physiol. 36: 838-845.
32. GORDON, S.A.-WEBER, R.P.: 1951. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 26: 192-195.
33. GORTNER, W.A.-KENT, M.: 1953. Indolacetic acid oxidase and an inhibitor in pineapple tissues. Jour. Biol. Chem. 204: 593-603.
34. HALEVY, A.H.: 1963. Interaction of growth-retarding compounds and gibberellin on indolacetic acid oxidase and peroxidase of cucumber seedlings. Plant Physiol. Lancaster, 38: 731-737.

35. HAYASHI, T.-MURAKAMI, Y.: 1958. The relationship between gibberellin and indolacetic acid. Proc. 1st Symposium on Gibberellin Res in Japan. Tokyo.
36. HILLIS, W.E.-SWAIN, T.: 1957. The phenolic constituents of *Prunus domestica* II. The analysis of tissues of the victoria plum tree. J. Sci. Ford Agric. 10: 135-144.
37. HILLMAN, W.S.-PURVES, W.K.: 1961. Does gibberellin act through an auxin-mediated mechanism. Plant growth regulation, Ames, Iowa State Univ. Pr., 589-600.
38. HOUSLEY, S.-DEVERALL, B.J.: 1961. The influence of gibberellic acid on indole-3-acetic acid disappearance from solutions containing excised pea stem tissues and indole-3-acetic acid oxidase. Plant growth regulation. Ames, Iowa State Univ. Pr. 627-642.
39. JAKOBS, W.P.-CASE, D.B.: 1965. Auxin transport, gibberellin, and apical dominance. Science, Washington 148: 3678. 1729-1731.
40. KALDEWEY, H.-STAHL, E.: 1964. Die quantitative Auswertung dünnschichtkromatographisch getrennter Auxine in Avena-Tageslichttest nach Söding. Plata 62: 22-38.

41. KATO, J.: 1958. On the interaction of gibberellin with auxins and growth inhibitors. *Physiol. Plant.* 11; 10-15.
42. KATO, J.: 1961. Physiological action of gibberellin with special reference to auxin. *Plant growth regulation*. Ames, Iowa State Univ. 601-609.
43. KATO, J.-KATSUMI, M.: 1958. Effect of gibberellins on IAA-oxidase. *Naturwiss.* 45: 344.
44. KATSUMI, M.-PHINNEY, B.O.-PURVES, W.K.: 1965. The roles of gibberellin and auxin in cucumber hypocotyl growth. *Physiol. Plant.* 18:462-473.
45. KEFFORD, N.P.: 1962. Auxin-gibberellin interaction in rice coleoptile elongation. *Plant Physiol.* 37: 3. 380-386.
46. KEFFORD, N.P.-GOLDACRE, P.L.: 1961. The changing concept of auxin. *Am. Jour. Bot.* 48: 643-650.
47. KOITAI, É.: 1966. Rizs csiranövények fenoltartalmának, polifenoláz és peroxidáz aktivitásának vizsgálata, különös tekintettel az árasztásos viszonyokra. Szakdolgozat, Szeged.
48. KÖVES, E.: 1965. Adatok a természetesen előforduló fenolkarbonsavak növekedést szabályozó hatásának mechanizmusához. Kandidátusi értekezés, Szeged.

49. KÖVES, E.: 1967. Bab csiranövények β -indolilecetsav anyagcseréje. Szeged, Kéziratban.
50. KÖVES, E.-VARGA, M.: 1958. Growth-inhibiting substances in rice straw. Acta Biol. Szeged. 4:13-16.
51. KÖVES, E.-VARGA, M.: 1959. Comparative examination of water- and ether-soluble inhibiting substances in dry fruits. Fyton, 12: 93-99.
52. KÖVES, E.-VARGA, M.: 1960. Gabonatarló maradványokban előforduló fenolkarbonsav jellegű gátlóanyagok hatása másodvetésű növények magvainak csirázására. Agrokém. és Talajtan. 9: 135-144.
53. KÖVES, E.-VARGA, M.-ÁCS, I.: 1965. Investigation of the content of the growth regulating substances of rice grains with reduced viability. Bot. Közlem. 52: 4. 185-192.
54. KURAIISHI, S.-MUIR, R.M.: 1962. Increase in diffusible auxin after treatment with gibberellin. Science, 137: 760-761.
55. KURAIISCHI, S.-MUIR, R.M.: 1963. Diffusible auxin increase in a resette plant treated with gibberellin. Naturwissenschaften, 50:337-338.

56. KURAISHI, S.-MUIR, R.M.: 1964. Paper chromatographic study of diffusible auxins. *Plant Physiol.* Lancaster, 39: 1. 23-28.
57. LARSEN, P.: 1955. Growth substances in higher plants. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III.* 565-625.
58. MASUDA, Y.: 1965. Effect of light on a growth inhibitor in wheat roots. *Physiol. Plant.* Copenhagen, 15: 4. 780-790.
59. MAYER, A.M.: 1959. Joint action of gibberellic acid and coumarin in germination. *Nature*, London. 184: 4689. 826-827.
60. MICHNIEWICZ, M.: 1962. Analiza chromatograficzna endogennych regulatorów wzrostu u pszenicy ozimej poddanej działaniu, gibberelliny. *Acta Agrobot.* Warszawa, 11: 197-211.
61. MUIR, R.M.: 1964. Conversion of triptophan to auxin by plant tissue preparations. *Plant Physiol.* 39: XVII.
62. NITSCH, J.P.: 1957. Growth responses of woody plants to photoperiodic stimuli. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 70: 512-519.
63. NITSCH, J.P.-NITSCH, C.: 1959. Modification du métabolisme des auxines par l'acide gibberellique. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, Paris, 5: 20-23.

64. Ng, E.K.-AUDUS, L.J.: 1964. Growth regulator interactions in the growth of the shoot system of *Avena sativa* seedlings. I. Jour. Exp. Bot. 15: 67-95.
65. OHWAKI, Y.: 1966. Thin-layer chromatography of diffusible auxin of corn coleoptiles. Bot. Mag. Tokyo, 79: 200-201.
66. OCKERSE, R.-SIEGEL, B.Z.-GALSTON, A.W.: 1966. Hormone-induced repression of peroxidase isozyme in plant tissue. Science, Washington, 151: 3709. 452-453.
67. PALLADINA, T.A.: 1964. Vlijanie gibberellina na prorashtanie klubnej kartofelja, obrabotannuh GMK is szoderzsanie v nih aukszinov. Fiziol. Raszt. Moszkva, 11: 2. 321-324.
68. PHILLIPS, I.D.J.-VLITOS, A.J.-CUTLER, H.: 1959. The influence of gibberellic acid upon endogenous growth substances of the Alaska pea. Contrib. Boyce Thompson Inst. 20: 111-120.
69. PHINNEY, B.O.-WEST, CH.A.: 1960. Gibberellins as negative plant growth regulator. Ann. Rev. Plant Physiol. 11: 411-446.
70. PILET, P.E.: 1957. Action des gibberellines sur l'activité auxines-oxidasique de tissues cultivés in vitro. Compt. rend. acad. sci. Paris, 245: 1327-1328.

71. PILET, P.E.-WURGLER, W.: 1958. Action des gibberellines sur la croissance et l'activité auxines-oxydasique du *Trifolium ochroleucum* Hudson. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 68: 54-63.
72. PROCKO, R.F.-BOJCSUK, O.B.-DRABKINA, J.SZ.: 1966. Do pütannja pro mechanizm diji gibberellinu. II. Vplüv gibberellinu na aktüvniszt' dejaküh fermentiv, ta vmiszt rosztvüh recsovün v étiol' ovanüh prorosztkah gorohu. Ukr. Bot. Zs., Küjiv, 23: 3. 13-18.
73. PURVES, W.K.-HILLMANN, W.S.: 1959. Experimental separation of gibberellin and auxin actions in etiolated pea epicotyl sections. Physiol. Plant. 12: 786-798.
74. REINGARD, T.A.-PALLADINA, T.A.: 1963. Izmenenija v szoderzsanii rosztaktivirujuscsih vescsesztv u kartofelja pri obrabotke gibberellinom. Dokl. AN SZ SzSzR. 153: 481-484.
76. RICARD, J.-NARI, J.: 1966. Contribution a l'étude des mecanismes de la degradation de l'acide β -indolylacetique par la peroxydase de raifort. Biochim. Biophys., Amsterdam, 113: 1. 57-70.

76. RIDDLE, V.M.-MAZELIS, M.: 1964. A role for peroxidase in biosynthesis of auxin. *Nature*, London, 202: 4930. 391-392.
77. RODIONOVA, N.A.-RUNKOVA, L.V.: Dejsztvie gibberellovoj kislötü na szoderzsanie eszteszvennüh auxinov i na nekatorüe fiziologicseszkie processzü v rasztenijah. Gibberellinü i ih dejsztvie na rasztenijah. Moskva, 1963. Izd. AN SzSzSzR. 134-138.
78. SAHAI SRIASTAVA, B.I.: 1964. The auxins in immature corn kernels. *Reg. Nat. Croiss. Végétale*, Paris, 179-189.
79. SÁGI, F.-GARAY, A.S.: 1961. Effect of gibberellic acid on growth and indoleacetic acid oxidase activity of *Lupinus albus* L. exposed to different photoperiods. *Nature*, London, 191: 4790. 824-825.
80. SÁGI, F.-GARAY, A.: 1964. Enzymatic indole-3-acetic acid destruction in the different, genetically determined growth types of *Lupinus luteus* L. *Physiol. Plant.* 17: 269-274.
81. SASTRY, K.K.S.-MUIR, R.M.: 1963. Gibberellin: effect on diffusible auxin in fruit development. *Science*, Washington, 140: 3566. 494-495.

82. SASTRY, K.S.K.-MUIR, R.M.: 1965. Effects of gibberellic acid on utilization of auxin precursors by apical segments of the *Avena* coleoptyle. *Plant Physiol.* 40: 294-298.
83. SIROIS, J.C.-PARUPS, E.V.: 1965. Studies on the effect of gibberellic acid on some endogenous growth regulators of tobacco. *Physiol. Plant. Copenhagen*, 18: 1. 70-78.
84. STUTZ, R.E.-WATANABE, R.: 1957. The gibberellins II. the effect of gibberellic acid and photoperiod on indolacetic acid oxidase in *Lupinus albus* L. Semiannual Rept. Biol. Med. Research Div. Argonne Natl. Lab. 107-109.
85. SWAIN, T.-HILLIS, W.E.: 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents.
86. SZALAI, I.: 1965. *Növényélettant. Egyetemi jegyzet II. Jegyzetellátó Vállalat, Bp.*
87. TOMASZEWSKI, M.: 1959. Chlorogenic acid-phenolase as a system inactivating auxin isolated from leaves of some *Prunus* L. species. *Bull. Acad. Pol. Scie.* 7: 127-130.

88. TOMASZEWSKI, M.: 1961. A relationship between the phenol-phenolase system and the processes and auxin inactivation in apricot and peach shoots. Arboretum Kornichis, Roosnik, 6.
89. TSUKAMOTO, Y.-SANO, S.: 1958. Studies on the dormancy of potato tuber. I. The relation between gibberellin treatment and change of growth substance. Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ., 21: 39-50.
90. VARGA, M.: 1957. Examination of growth-inhibiting substances separated by paper chromatography in fleshy fruits. II. Identification of the substances of growth-inhibiting zones on the chromatograms. Acta Biol. Szeged. 3: 213-223.
91. VARGA, M.: 1963. Az auxinok kutatásának újabb eredményei és problémái. Növénytermelés. 12:291-298.
92. VARGA, M.: 1964. Germination - and growth - inhibiting substances in rice grains. Acta Biol. Szeged, 10: 65-78.
93. VARGA, M.: 1965. Az indolecetsav-oxidáz aktivitás és IES-tartalom vizsgálata szárazművelésű és különböző magasságú vízborítás alatt nevelt rizsnövényekben. /Megjelenés alatt/.

94. VARGA, M.-BÁLINT, I.: 1965. The effect of gibberellin on the growth, indoleacetic acid content and on the activity of indoleacetic acid oxidase in rice seedling.
95. VARGA, M.-KÖVES, E.: 1961. Methodological examinations concerning the growing of oat seedlings for auxin-assay. *Acta Biol. Szeged*, 7: 39-44.
96. VARGA, M.-KÖVES, E.: 1962. Effect of phenolic compounds on the activity of indoleacetic acid oxidase. *Acta Biol. Hung.* 13: 273-281.
97. WAREING, P.F.: 1965. Dormancy in plants. *Sci. Progr.*, London, 53: 212. 529-537.
98. WATANABE, R.-STUTZ, R.E.: 1960. Effect of gibberellic acid and photoperiod on indoleacetic acid oxidase in *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 35: 359-361.
99. WEIJER, J.: 1959. Interaction of gibberellic acid and indoleacetic acid in *Impatiens*. *Science*, Washington, 129: 3353. 896-897.
100. ZUCKER, M.-AHRENS, J.F.: 1958. Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobacco leaves. *Plant Physiol.* Lancaster, 33: 4. 246-249.

Ezúton fejezem ki köszönetemet Dr. Szalai István tanszékvezető professzor úrnak, hogy engedélyezte a disszertációmhoz szükséges kísérleteknek intézetében történő elvégzését. Köszönetet mondok Dr. Bertényiné Dr. Varga Magdolna docensnőnek, témavezetőmnek, értékes útmutatásaiért, az értekezés összeállításánál nyújtott segítségéért és hasznos tanácsaiért.

