

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A glutation transzferáz izoenzimcsalád indukciója
nyárfa vonalakban cinkstressz hatására**

Leviczky Tünde

biológus Msc II.

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Gallé Ágnes



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés.....	4
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1. Nehézfémstressz hatásai	5
1.1.1. <i>Cink hatása a növények fiziológiai folyamataira</i>	<i>7</i>
1.2. Nehézfémstressz hatására kialakuló oxidatív stressz	9
1.3. GST ezimcsalád	10
1.4. Génexpresszió szabályozása	12
2. Célkitűzések.....	13
3. Anyagok és módszerek.....	14
3.1. A növényi anyag	14
3.1.1. <i>Felhasznált nyárfa vonalak.....</i>	<i>14</i>
3.1.2. <i>A nyárfa klónok nevelése</i>	<i>14</i>
3.1.3. <i>Nehézfém stressz kezelés</i>	<i>14</i>
3.1.4. <i>Mintavételek</i>	<i>14</i>
3.2. Vízpotenciál mérése nyomáskamra módszerrel.....	15
3.3. Fotoszintézis	15
3.4. GST aktivitás meghatározása.....	15
3.5. GPOX aktivitás meghatározása	16
3.6. GST és referencia gének keresése <i>in silico</i> NCBI	16
3.7. Primer tervezés.....	16
3.8. RNS kivonás	17
3.9. cDNS írás.....	18
3.10. QRT-PCR (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció).....	18
4. Eredmények és értékelésük.....	20
4.1. Vízpotenciál	20
4.2. Fotoszintézis	20
4.3. GST és GPOX aktivitás.....	21
4.4. GST enzimek relatív transzkript szintje	24
4.5. Génexpresszió szabályozása	26
5. Összefoglalás	28
6. Nyilatkozat	31
7. Felhasznált irodalom.....	32
8. Köszönetnyilvánítás	39

Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP-kötő egység (ATP binding cassette)
ATP	adenozin-trifoszfát
CDNB	1-klór-2,4-dinitrobenzol
CHP	kumén hidroperoxid
g_s	sztómakonduktancia
GSH	redukált glutation
GST	glutation transzferáz
GSTU	glutation transzferáz tau csoport
GSTT	glutation transzferáz theta csoport
GSTF	glutation transzferáz phi csoport
GPOX	glutation peroxidáz
PSII	második fotokémiai rendszer
QRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
ROS	reaktív oxigén formák
Φ_{PSII}	effektív kvantumhasznosítás

Bevezetés

A cink nélkülözhetetlen a növények normális működéséhez, viszont túlzott mennyisége stresszhez vezet, melyet oxidatív stressz kialakulása követ, hatására toxikus metabolitok széles skálája jelenik meg a növényi sejtekben. Ezek eltávolításáért felelős a méregtelenítési folyamatok egyik kulcsenzime, a GST, elsősorban glutation transzferáz és glutation peroxidáz aktivitása révén.

Különböző nyárfa klónokat (M-1 *Populus canadensis*, B-229 és P19/66 *Populus deltoides*) hidropónikus kultúrában exogén cink kezelésnek tettünk ki egy héten keresztül (3 és 30 μM). A cink nagyobb koncentrációja az egyik *deltoides* (P19/66) vonal vízpotenciáljának és sztóma konduktivitásának csökkenését okozta. A fotoszintézis mérések során enyhe, nem szignifikáns csökkenéseket tapasztaltunk a 30 μM Zn kezelés hatására. Vizsgáltuk a glutation transzferáz (GST) és glutation peroxidáz (GPOX) aktivitás változásokat gyökérben és hajtásban. A GST aktivitás gyökérben minden esetben, hajtásban jelentősen csak a *P. canadensis* esetében emelkedett meg a 30 μM -os kezelés hatására. A glutation peroxidáz enzim aktivitása is nagy mértékű emelkedést mutatott a nagyobb koncentrációjú kezelés hatására mind gyökér mind hajtás esetében M-1 és B-229 vonalakban.

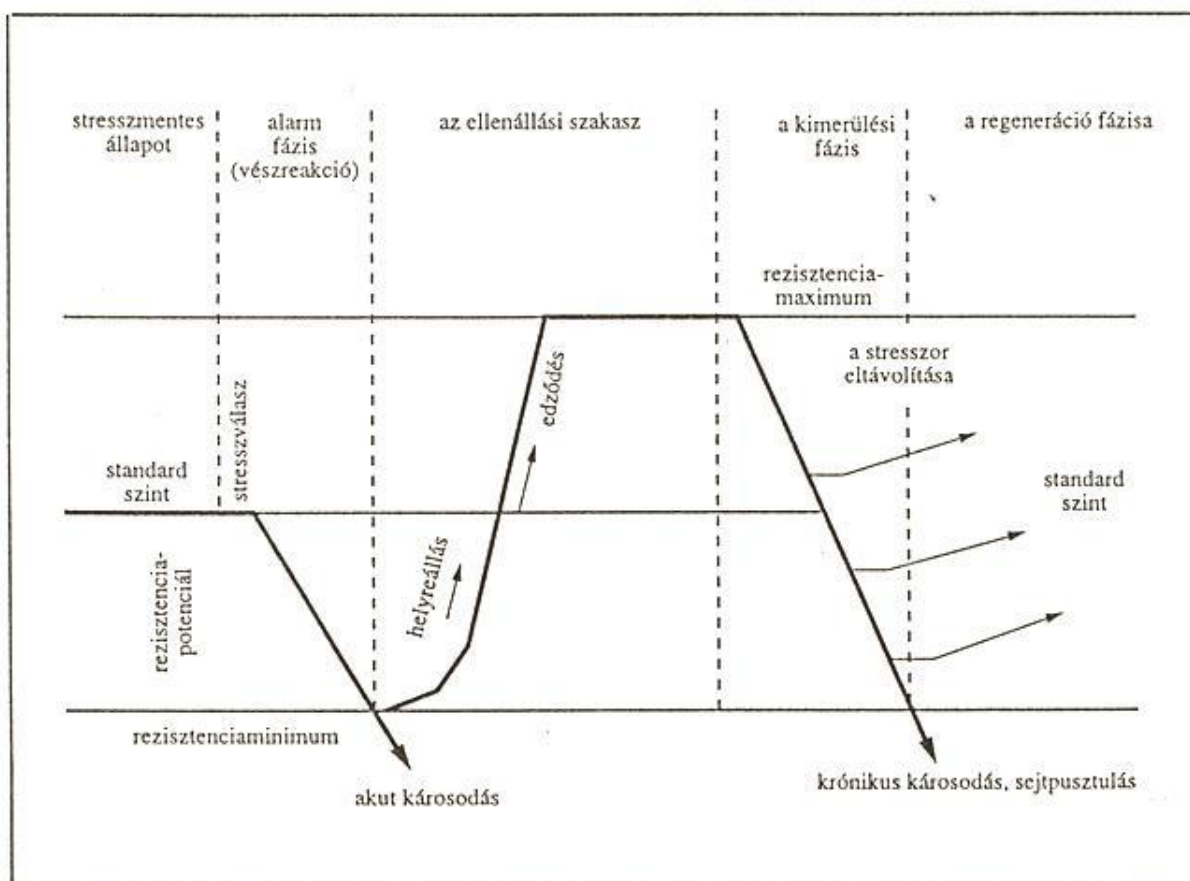
Megvizsgáltuk bizonyos feltehetően stresszvédekezésben fontos GST expressziójában történő változásokat is. Emelkedéseket tapasztaltunk bizonyos GST gének transzkript mennyiségében cink stressz hatására, mely amellet, hogy korrelációt mutat a GST és GPOX aktivitással, időbeni lefutása a *P. canadensis* vonal késői stressz reakciójára utal.

Kísérleteink során bebizonyosodott a glutation transzferáz enzimek jelentős szerepe a cink stresszre adott védekezési reakciókban.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Nehézfémstressz hatásai

A növényeket életük során számos stresszhatás érheti. A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okozhat (Larcher, 1987). A folyamatot általános adaptációs szindrómának nevezzük, melynek részei a Canon-féle vészreakció (másképpen alarm fázis), az ellenállás vagy rezisztencia, és a kimerülés szakasza. A növényi akklimatizáció sikeressége szempontjából döntő fontosságú a stresszor megjelenésére adott gyors vészreakció, mely során megtörténik a jel érzékelése, a jelátvitel, majd a növényi sejtek megváltoztatják a metabolizmusuk, új transzkriptumok és géntermékek jelennek meg.



1.1.ábra: A növényi stresszválasz általános sémája (Szigeti,1998)

A magasabbrendű növények számára létfontosságú ásványi elemek között megkülönböztetünk esszenciális organogén elemeket, makroelemeket, mikroelemeket és

nemesszenciális, egyes esetekben pozitív hatású elemeket. A mikroelemek között találunk nehézfémeket, amelyek hiánya esetén hiánytünetek, többlete esetén mérgezési tünetek jelennek meg a növényeken. A nehézfémek képesek felhalmozódni a talajban, magas koncentrációban károsak, mérgezőek a növényekre nézve. Amikor koncentrációjuk megnövekszik a talajban, a növényeken toxikus tünetek jelenhetnek meg. A tünetek kifejlődése előtt először feldúsulnak a sejtekben, luxus ellátottsági állapot jön létre. Amikor a feldúsulás egy küszöbértéket meghalad az anyagcserében zavarok jelentkeznek, rendszerint fehérjebomlás indul meg, a bomlási termékek klórózist idéznek elő, majd a további feldúsulással a klorózis nekrozisba fordul át. Hatásukra csökken a növekedés és a termésképzés, a fotoszintetikus működés határfoka gyengül, tehát a nehézfémstressz a növény fiziológiája, metabolizmusa és morfológiája szempontjából súlyos károkat okoz. (Láng és mtsai., 2007; Szalai, 1994).

Azonban növények számos védekező mechanizmussal rendelkeznek, ami megvédi őket a nehézfém-toxicitástól. Ezek különböző szinten és módon működnek, meghatározva ezzel a növények azon képességét, hogy mennyire tudják korlátozni a nehézfémek felvételét, gyökérbe és hajtásba való transzportját valamint megkötésüket és kompartmentalizációjukat az organellekben, szervekben (Clemens és mtsai., 2002). A sejtfal képes megkötni fémionokat kationcsere által, szabályozva ezzel a citoplazmába való beáramlásukat (Wang és Evangelou, 1995). Különböző transzmembrán fém-transzportáló fehérjéket azonosítottak, melyek képesek a nehézfémek sejten belüli kompartmentalizációjára, illetve apoplast felé történő irányítására (Williams és Milles, 2005). A felesleges nehézfémek a citoplazmában csökkenthetők kelátorok által úgy, mint fitokelatinok és metallotioneinek (Cobbett and Goldsbrough, 2002). A glutationnak is igen fontos szerepe van a nehézfémek detoxifikálásában (Cobbett, 2000).

Egyes növények alkalmasak a nehézfémek talajból való felvételére és akkumulálására bizonyos koncentrációban anélkül, hogy toxikus tünetek jelennének meg rajtuk. Ezt a folyamatot fitoremediációnak hívjuk. A nyárfát (*Populus sp.*) alkalmasnak találták ilyen fitoremediációs célok ellátására, mivel kiterjedt gyökérrendszere lehetővé teszi számára a talajban található szennyező nehézfémek felvételét és számos ciklussal rendelkezik ezek eltávolítására (Dietz és Schnoor, 2001; Kömives és Gullner, 2000; Kömives és mtsai., 2003).

1.1.1. Cink hatása a növények fiziológiai folyamataira

A cink a mikroelemek csoportjába tartozó létfontosságú, esszenciális elem, melyet a növények kis mennyiségben igényelnek (Marschner, 1995). Talajban 0,001-0,03% mennyiségben fordul elő, különböző ásványok kristályrácsaiban, valamint Zn^{2+} , ZnOH^+ és ZnCl^+ alakban is kötődik a talaj ásványi részeihez. Számos enzimnek strukturális eleme, mások működését aktiválja (pl. karboxipeptidáz, kénsav-anhidráz). A szuperoxid-dizmutáz enzimsalád bizonyos tagjai Cu-Zn tartalmú enzimek, ahol a cink strukturális elemként szerepel (Broadley és mtsai., 2007). A metalloproteinek felépítésében is részt vesz, melyek a DNS-replikációban és transzkripcióban szerepelnek. Itt a Zn-atom tetraédes koordinációja teszi lehetővé a molekula speciális kapcsolódását a specifikus DNS-szekvenciához. Részt vesz a fehérjeszintézisben is, segít a riboszómák strukturális integritásának fenntartásában. Ezenkívül szükséges a szénhidrát-anyagcsere egyes enzimjeinek működéséhez is, hiányában az enzimek működése gátolt. Fontos résztvevője az auxin-szintézisnek (Láng és mtsai., 2007).

A talajban a cink hiány gyakoribb, mint a túlzott cink koncentráció, de számos talaj rendelkezik felesleges cinkkel. Ez főleg olyan emberi tevékenységek eredménye, amelyek befolyásolják a cink kibocsátást a környezetbe, bányászati, kohászati tevékenységek, mezőgazdasági talajok esetén a szennyvíziszap és a mezőgazdasági vegyszerek (Chaney, 1993; Gimeno-Garcia és mtsai., 1996). A magas cink koncentráció a fiatalabb levelek általános klorózisát (Harmens és mtsai., 1993; Ren és mtsai., 1993; Fontes és Cox, 1995), kisebb leveleket eredményez (Ren és mtsai., 1993). A toxicitás mértékétől függően antocianin termelést is generálhat (Harmens és mtsai., 1993; Fontes és Cox, 1995; Lee és mtsai., 1996a). A leveleken barna foltok jelennek meg a nekrosis tüneteként (Fontes és Cox, 1995). A főgyökér növekedése csökken, az oldalgyökerek rövidebbek és kevesebb van belőlük. A gyökerek színe sárgás. (Ren és mtsai., 1993). A cink toxicitás párologtatásra és vízháztartásra gyakorolt hatásával kapcsolatban eddig kevés kutatást végeztek. Kimutatták, hogy a magas cink koncentráció csak kis mértékben gátolja a *Hordeum vulgare* transzspirációját (Brune és mtsai., 1994). Azonban, a hervadás amelyet tapasztaltak, a magas cink koncentráció hatásának kvalitatív jele (Ye és mtsai., 1998).). Méréseik alapján a növények párologtatását és a vízháztartási paramétereit a cink csak magas koncentrációban befolyásolja drasztikusan. A cink toxikus koncentrációja a fotoszintézis gátlását eredményezte az első és a második fotokémiai rendszerben is

Phaseolus vulgaris esetében. (Van Assche és Clijsters, 1986). Kimutatták, hogy ennek oka a magnézium és cink arányának eltolódása, ami magnézium cink általi szubsztitúciójához vezet a kettes fotokémiai rendszerben a víz hasítási helyénél (Van Assche és Clijsters; 1986; Küpper és mtsai., 1996). *Spinacia oleracea*-ban (spenót) túlzott cink ellátottság esetén nagymértékben csökken az ATP szintézis és a kloroplasztisz aktivitása (Teige és mtsai., 1990). Például 1 mmol-os, 50 perces cink kezelés után a szétválasztott elektrontranszport sebessége 26 %-kal csökkent. Amikor a tilakoidokat kezelték 1-2 mM-os cinkkel, 30 perc után figyelték meg a második fotokémiai rendszer víz bontó rendszerének gátlását. (Teige és mtsai., 1990). A cink által okozott gátlás helyreállítható benzidinnel, amely elektrondonor a második fotokémiai rendszer számára (Teige és mtsai., 1990). Azonban 60 perces kitettség elteltével visszafordíthatatlan membránkárosodás következett be, amelyet nem lehetett helyreállítani benzidinnel sem. Teige és mtsai. (1990) javaslata alapján a cink elsődleges toxikus hatása az ATP szintézis gátlása, így tehát a növényekben való energia-anyagcsere gátlása. Nyáfa vonalakban is megfigyelhető a cink kezelés gátló hatása a fotoszintézisre és a sztómakonduktanciára: Fernandez és mtsai. (2011) exogén 1 és 5 mM-os ZnCl_2 kezelés után mind a nettó fotoszintézis mind a sztómakonduktancia csökkenését tapasztalták hibrid nyárfa vonalakban.

A cink és más nehézfémek többszörös inhibítorai számos metabolikus útvonalnak és ezért magas koncentrációban fitotoxikusak (Cobbett, 2000; Schützendübel és mtsai., 2002). Di Baccio és mtsai., (2003) munkája szerint a magas cink koncentráció a lombozat és a száraz tömeg szignifikáns csökkenését okozza. Bittsánszky és mtsai. (2004) eltérő válaszreakciójú csoportokat különböztettek meg a nagyobb léptékű ZnSO_4 koncentrációssal történő exogén kezelés esetén. 10^{-1} M koncentrációban fitotoxikus, nekrotikus tüneteket mutattak a kezelt vonalak, 10^{-2} M koncentráció esetén a levéllemezek fehéredését tapasztalták megtartott növekedési aktivitás mellett, míg alacsony cink koncentráció esetén 10^{-3} M és 10^{-5} M nem észleltek toxikus tüneteket a levéllemezeken. A vizsgált vonalak közül a *P. nigra* magas érzékenységet mutatott alacsony koncentrációk esetén is (Bittsánszky és mtsai., 2004). Cink koncentráció függvényében a glutation transzferázok aktivitása nyárfa esetében optimumgörbét ír le. (Bittsánszky és mtsai., 2004)

1.2. Nehézfémstressz hatására kialakuló oxidatív stressz

Nehézfémstressz következtében gyakran alakul ki oxidatív stressz. Az oxidatív stressz során reaktív oxigén formák (ROS) keletkeznek az oxigén részleges redukciójával. A nehézfémekhez való alkalmazkodás alapfeltétele ezen reaktív oxigénformák eltávolítása, mivel károsíthatják a membránokat, fehérjéket és a nukleinsavakat is. Az oxidatív stressz károsítja a membránlipideket, ezek peroxidációját idézi elő. Ezenkívül proteinek oxidációját, enzimek direkt gátlását, DNS és RNS károsodását okozhatja, mely folyamatok végül a programozott sejthalálhoz vezetnek. A létrejövő reaktív oxigén gyökök: szuperoxid gyökök ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxil gyökök ($HO_2^{\cdot}$), H_2O_2 és hidroxil gyökök ($OH^{\cdot}$). A reaktív oxigénformák tehát oxidatív károsodásokat okozhatnak, de emellett alapvető szerepük van a környezeti stresszek elleni védelemben, a patogén támadások kivédésében, a programozott sejthalálban és a különböző fejlődési állapotok jelátvitelében. (Mittel és mtsai., 2004; Miller és mtsai., 2010)

Nyárfában a nehézfémstressz hatására létrejövő oxidatív stressz egyrészt fontos jelző információ a növény számára hogy védekező mechanizmusokat aktiváljon, másrészt a többlet ROS felszabadulás súlyos károkat okozhat a növény egyedfejlődésében, fiziológiás és molekuláris folyamataiban. Emiatt nagyon fontos az oxidatív stressz során keletkező káros és toxikus molekulák eltávolítása. Erre a növények kifejlesztettek egy hatékony rendszert, amely képes a mérgező vegyületek átalakítására, metabolizmusára és eltávolítására. Az első fázisban az enzimek szubsztrátok átalakítását végzik, a második fázisban konjugáló enzimek a transzformáció során létrehozott funkciós csoportokat használják további konjugációra, ami által kevésbé mérgező metabolitok jönnek létre, és végül a harmadik fázisban ATP függő membránpumpák ismerik fel és szállítják kompartmentumokba a konjugátumot. (Marrs, 1996)

1.2.1. Oxidatív stressz elleni védekezés mechanizmusai

Az oxidatív stressz elleni védekező rendszerben fontos szerepe van a glutationnak, amely egy nagy jelentőségű növényi, endogén antioxidáns. (Alscher és mtsai., 1989) Az alacsony molekulásúlyú tiolvegyület stresszmentes állapotban redukált formában van jelen és csak kis hányadát láthatjuk oxidált formában (May és mtsai., 1998, Noctor és mtsai., 2002). Legfontosabb feladatai közé tartozik a dehidroaszcorbát redukálása az aszorbinsav-

glutation ciklusban, és ez által a reaktív oxigénformák koncentrációjának direkt és indirekt szabályozása (Kutznai és mtsai., 2001). Szerepe van a redox jelátvitelben (Foyer és Noctor, 2005), védekező reakciókat aktivál, részt vesz a génexpresszió szabályozásában (Wingate és mtsai., 1988), a H_2O_2 eltávolításában, herbicidek, lipidperoxidok, metilglioxál eltávolításában, (Marrs és mtsai., 1996) úgy, hogy szubsztrátul szolgál számos antioxidatív mechaizmusban (Tari és mtsai., 2002; Kocsy és mtsai., 2004).

Számos glutation függő antioxidáns enzim ismert, egyik a glutation transzferázok (GST) csoportja. A GST-k többféle enzimatis funkcióval rendelkeznek, ezek közül a legfontosabbak a glutation (GSH) konjugáció általi detoxifikáció és a glutation peroxidáz (GPOX) aktivitásuk.

GSH általi detoxifikáció: Első ismert aktivitásuk, fitotoxikus metabolitokat detoxifikálnak glutation konjugációval. A mérgező metabolitok és herbicidek glutation konjugátumait ABC (ATP-kötő egység) transzporterek juttatják el a vakuólumba (Fear és Swanson 1970).

GPOX aktivitás: Bizonyos GST-k rendelkeznek GPOX aktivitással is, melynek során lipid peroxidok redukcióját katalizálják monohidroxi-alkoholokká. Ez az aktivitás igen fontos a stressztoleranciában (Dixon és mtsai. 2002).

1.3. GST ezimcsalád

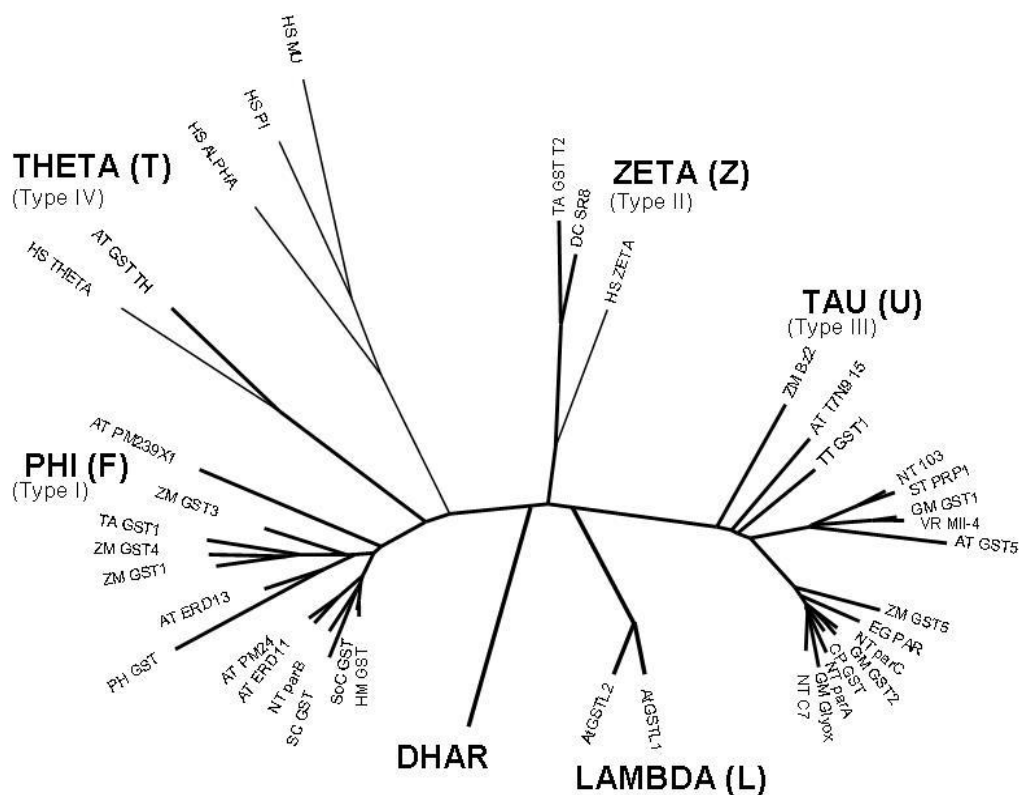
A GST-k az egész növényvilágban elterjedt fehérjék, kimutatták őket állatokban, növényekben és gombákban is. Igen diverz enzimes család, egyes tagok között csupán 10 %-os hasonlóságot találtak (Edwards és mtsai., 2000). Úgynevezett takarítófehérjék, amelyek segítenek például az oxidatív stressz során termelődő méreganyagok eltávolításában. A legtöbb GST 2 alegységből áll, molekulatömegük 25-27 kDa, homo- és heterodimereket képeznek. A dimerek mindkét tagjának a katalitikus egysége 2 komponensből áll, az egyik az N-terminálison lévő konzervatív GSH-specifikus régió, „G-site”, a másik pedig a funkcionális egység, ez a C-terminálison lévő hidrofób szubsztrát kötő régió, „H-site”. A kettő között 5-10 aminosavból álló linker régió található (Dixon és mtsai., 2002). Nagy részük nem rendelkezik szubcelluláris target szekvenciával, így a citoszólban lokalizálódik (Dixon és mtsai., 2002). Bizonyos organellek nagy mennyiségben tartalmaznak GST izoenzimeket, így a kloroplasztisz, a mitokondrium és a vakuólum. Az organellekben

transzlokálódó enzimek N-terminális target szekvenciával rendelkeznek. Kimutatták őket a nukleuszban is, az itt lokalizálódó enzimek is rendelkeznek N-terminális lokalizációs szignállal és egy olyan régióval, amely a nukleinsavakhoz való kapcsolódásukat feltételezi (Dixon és mtsai., 2008).

Az enzimesalád tagjait szekvenciamotívumok alapján osztályozták: nyolc csoportba sorolhatóak. Négy nagy diverzitást mutató csoportja van: phi, theta, tau és zeta, valamint négy kisebb csoportja: dehidroaszorbát reduktáz, lambda, tetraklórhidrokinon reduktáz és a mikroszómális GST-k (Dixon és mtsai., 2002; Soranzo és mtsai., 2004). (1.2. ábra) Ezek az enzimescsoportok különböző funkciókkal rendelkeznek. Funkcióik lehetnek enzimatisusak és nem enzimatisusak. Enzimatisus funkcióik közé tartozik, hogy glutation konjugációval mérgező szubsztátokat detoxifikálnak. Ez a csoportok többségére jellemző tulajdonság, különösen magas GSH konjugáló aktivitással rendelkeznek a növény-specifikus phi és a tau csoportok (Edwards és Dixon, 2000). Glutation függő peroxidáz funkcióval is rendelkeznek, így részt vesznek a sejt normál metabolizmusának fenntartásában oxidatív stressz esetén a theta, a tau és a phi csoportok (Dixon és mtsai., 2002; Basantani és Srivastava, 2007). Kiemelkedik a GPOX aktivitással a theta csoport, így feltehetően a csoport tagjainak fontos szerepe van a membránintegritás fenntartásában stressz körülmények között is. A zeta csoport tagjai izomerizációs reakciókat katalizálnak, és részt vesznek a tirozin katabolizmusban. Fontos szerepük van az optimális membránintegritás fenntartásában. Izomerizációs reakciókat katalizálnak a zeta csoport tagjai. A dehidroaszorbát reduktáz csoport tagjai glutation függő dehidroaszorbát reduktáz aktivitással rendelkeznek. Nem enzimatisus funkcióik apoptózis gátló hatásuk (Pan és mtsai., 2001), részvételük a szenescenciában (Gregersen és Holm, 2007) és az hogy ligandin funkciójuk révén az antocianinok szállításában is részt vesznek. (Marrs és mtsai., 1995; Mueller és mtsai., 2000; Smith és mtsai., 2003)

Nyárfában (*Populus trichocarpa*) 81 GST fehérjét kódoló gént találtak, ebből 9 pszeudogén. Nyolc csoportba sorolták őket, így 58 tau, 9 phi, 3 lambda 3 dehidroaszorbát reduktáz, 2 zeta és 2 theta csoportú GSTt szekvencia található meg a nyárfa genomában. Ide soroltak még hasonlóság alapján 3 elongációs faktor 1B γ -t. A nyárfa 19 kromoszómája közül 15-ön 66 GST gén lokalizációját sikerült meghatározni a 81-ből. Bizonyos gének nagy sűrűségben, kluszterekben helyezkednek el a kromoszómákon, főleg a tau és a phi csoport tagjai, a kis

csoportok tagjai viszont különböző kromoszómákon, egyedülálló lókuszokban lokalizálódnak. (Lan és Yang és mtsai., 2009)



1.2.ábra: A GST enzimesalád tagjai a rokonsági fán láthatók.

1.4. Génexpresszió szabályozása

A GST gének promóter régióiban olyan szabályozó elemek találhatóak, amelyek szerepet játszanak a GST gének transzkript szintjének emelkedésében. Kétszikűek GST promótereiben olyan reguláló szekvenciák vannak, amelyek felelősek a különböző hormon kezelésekre, stresszhatásokra adott válaszokért. Például ilyenek az auxin, etilén, szalicilsav, hidrogén peroxid, hősokk, nehézfém stressz és patogén támadás jelátvitelében szerepet játszó elemek (Itzhaki és mtsai., 1994; Ulmasov és mtsai., 1994; Droog és mtsai., 1995; Chen és Singh, 1999).

2. Célkitűzések

Munkánk során különböző nyárfa klónokat (M-1 *Populus canadensis*., B-229 és P19/66 *Populus deltoides*) hidropónikus kultúrában exogén cink kezelésnek tettünk ki egy héten keresztül (3 és 30 μM).

A alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen hatással van az adott cink kezelés a különböző nyárfa vonalak fiziológiai paramétereire?
2. Hogyan befolyásolják a különböző kezelések a nyárfa vonalak GST és GPOX enzimaktivitását?
3. Milyen változások detektálhatók a kiválasztott GST tau51, tau3, phi4 és theta1 gének expressziójában kontroll és nehézfémstressz körülmények között?
4. Van-e különbség a három vizsgált nyárfa vonal stresszreakciója/toleranciája között?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A növényi anyag

3.1.1. Felhasznált nyárfa vonalak

Kísérleteink során 3 nyárfa fajtaival dolgoztunk, melyek különböző mértékben tolerálták a nehézfém szennyezést. A kísérleteinkben használt M1-es jelölésű nyárfa vonal *Populus canadensis*, a B-229-es, illetve a P19/66-os jelölésűek, pedig *Populus deltoides* vonalak.

3.1.2. A nyárfa klónok nevelése

A nyárfa klónok előnevelése, gyökereztetése hidropónikus környezetben történt 2 hónapon keresztül Hoagland teljes tápoldatban (5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 1 M Fe-EDTA, 0,0475 μmol H_2BO_3 , 14,48 μmol MnCl_2 , 0,8148 μmol ZnCl_2 , 0,3731 μmol CuCl_2 , 0,001213 μmol Na_2MoO_4), 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, 12/12 óra fény/sötét megvilágítási periódussal, 24/19 °C nappali/éjszakai hőmérsékleten, üvegházi környezetben.

3.1.3. Nehézfém stressz kezelés

1,5 hónapos előnevelés után 1 hetes cink kezelést kaptak a növények. Két különböző koncentrációjú kezelést alkalmaztunk, így egyik esetben a felszín alatti vizekre érvényes "B" magyar határértéket vettük figyelembe, amely 200 $\mu\text{g/l}$, és 3 μM -nak felel meg, a másik esetben ennek a határértéknek a 10-szeresével dolgoztunk, amely 30 μM .

3.1.4. Mintavételek

A kísérletekhez az egyhetes kezelés után vettünk mintát, génexpresszió vizsgálatra 2-3 nappal a kezelés után is végeztünk mintavételt. Vizsgálatainkhoz hajtás és gyökérmintákat használtunk.

3.2. Vízpotenciál mérése nyomáskamra módszerrel

Nyomáskamrával végeztük el a vízpotenciál meghatározását. (PMS Instrument Co., Corvallis, USA). Úgy helyeztük be a nyomáskamrába a vizsgálati növény levelét, hogy annak vágott felszíne kiálljon a műszer kamrájára rögzített zárószervezetből. Ezután nitrogén gázt engedtünk a kamrába és addig növeltük a gáz nyomását, míg a növény kamrából kiálló vágott felületén megjelent a xilémnedv, ekkor a gáznyomás ellensúlyozza a levél vízpotenciálját. Az ekkor leolvasott nyomás érték megegyezik (ellenkező előjellel) a növény vízpotenciál értékével. A vízpotenciál meghatározását az egyhetes cink kezelés után végeztük el minimum 5 párhuzamos méréssel.

3.3. Fotoszintézis

Az effektív kvantumhasznosítást (Φ_{PSII}) és a sztómakonduktanciát (g_s) hordozható fotoszintézis mérő rendszerrel mértük (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska-USA). A mért paraméterek alapján a második fotokémiai rendszer (PSII) elektrontranszport-láncának effektív kvantumhasznosítása $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty és mtsai., 1989) került kiszámításra.

3.4. GST aktivitás meghatározása

Hajtás és gyökérmintánként egyaránt 500 mg-ot dörzsöltünk el 0,1 M-os pH: 7 foszfát puffer és 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid (PMSF) elegyében, 1 % polivinil-polipirrodilon (PVPP) jelenlétében, jégen. A gézen átszűrt homogenizátumot 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk (12000 x rpm, 15 616 g). Enzimaktivitás mérésére a felülúszót használtuk.

A glutation transzferáz aktivitást Habig és mtsai. (1974) által kidolgozott módszerrel határoztuk meg, melynek során szubsztrátként 1-klór-2,4-dinitrobenzolt (CDNB) használtunk. A reakcióelegy 1ml végtérfogatban 0,1 M-os foszfátpuffert, 1 μ M CDNB-t és 3 μ M redukált glutationt (GSH) tartalmazott, a kontroll mintába GSH helyett tisztított vizet mértünk be. A reakciót a CDNB hozzáadásával indítottuk el. 340 nm-en fotometráltunk, majd a mért extinkció változásból a 2. és 3. perc közötti értékek felhasználásával számoltunk. $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, egy enzim egység (U) = az egy perc alatt keletkezett konjugált termék mennyisége μ mól-ban megadva. Az enzim működését specifikus aktivitás egységben fejeztük ki (U g FT^{-1}).

3.5. GPOX aktivitás meghatározása

A glutation peroxidáz aktivitást Awasthi és munkatársai (1975) által kidolgozott módszer alapján határoztuk meg, szubsztrátként kumén hidroperoxidot használtunk (CHP) (Csiszár és mtsai. 2004). A mérés elve, hogy a glutation peroxidáz aktivitás során szerves hidroperoxidok keletkeznek, melyeket a glutation reduktáz redukált glutation felhasználásával átalakít, így a glutation oxidálódik. Az ennek visszaredukálásához szükséges NADPH mennyiségének mérésével történik a kimutatás. A reakcióelegy 1 ml végtérfogatban 0,1 M foszfát pufferben (pH: 7,0) 0,2 mM NADPH-t, 4 mM GSH-t, 0,05 unit búza extraktumból tisztított GR enzimet, 200 µl enzimkivonatot és 0,1 mM CHP-t tartalmazott. A reakciót CHP hozzáadásával indítottuk el. Egy perc után 340 nm-en fotometráltunk. Így határoztuk meg az extinkciót GSH-t és NADPH-t nem tartalmazó mintával szemben 2 percig. Majd a nem specifikus NADPH oxidáció figyelembe vételéhez az extinkció különbséget meghatároztuk CHP nélkül is. $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, az egy perc alatt fogyott NADPH-t µmólban megadva fejeztük ki az enzimegységet (U), az enzim működését 1 g friss tömegre vonatkoztattuk (U g FT^{-1}).

3.6. GST és referencia gének keresése *in silico* NCBI

Elsőként *Populus trichocarpa* GST szekvenciákat azonosítottunk *in silico*. Az eddig ismert gének kódoló régióit használtuk fel a kereséshez. Mivel az ismert genomú *P. trichocarpa* nukleotid szekvenciája olyan mértékben különbözik az általunk vizsgált nyárfa vonalaktól, ami megnehezíti a qPCR vizsgálatokat a *P. trichocarpa*-ban azonosított GST gének ortológjait kerestük meg a konzervatív domének felhasználásával az NCBI/TGI adatbázisokból.

3.7. Primer tervezés

A kiválasztott szekvenciákra először mindkét szálra komplementer szekvenciájú oligonukleotid primereket terveztünk a Primer 3 program segítségével. Az optimális primerek hossza általában 19-22 nukleotid. A primerek tervezésénél a következő paramétereket adtuk meg: a primer hossza: 19-22 bp, a termék hossza: 50-150 bp, olvadási hőmérséklet: 59-61 °C, G-C tartalom: 30-80%, dimer képződés (komplementaritás) mind a másik mind a saját szekvenciával maximum 3 ponton és nem rendelkezhetnek erős

másodlagos szerkezettel ($\Delta G > -4$ Kcal/mol feletti érték mindkét esetben). Ennek ellenőrzését az IDT DNA (Integrated DNA Technologies) program segítségével végeztük.

3.8. RNS kivonás

Az össz növényi RNS-tartalom izolálását LiCl-módszer alkalmazásával végeztük el. 100mg növényi anyagot dörzscsészében folyékony nitrogén és kvarchomok segítségével homogenizáltunk és 0,375 ml extraháló pufferbe helyeztük és vortexeltük. Folyékony nitrogén jelenlétében az RNázok nem tudják lebontani az RNS-t, a kvarchomok pedig megkönnyíti a homogenizálást. Felhasználás előtt 15 μ l/ml β -merkaptotetanolt adtunk az extraháló pufferhez és 65 °C-on melegítettük. Az extraháló puffer tartalma: 2 % CTAB, 2 % PVPP, 100 mM Tris-HCl (pH:8,0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,5 g/l spermidin, DEP-es vízben oldva (DEP: 0,1 %), autoklávozva. Az elegyet az extraháló pufferben 2 percig 56 °C-on inkubáltuk, és jégre raktuk. Ezután (25:24:1) fenol-kloroform-izoamilalkohol elegyét adtuk hozzá a vizes és szerves fázis elválasztása érdekében, majd 5 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk (13000rpm). A minták felülúszó részét átpipettáztuk egy-egy 300 μ l kloroformot tartalmazó Eppendorf csőbe, ez újabb tisztítási lépés a szerves anyagok eltávolítása érdekében. Újabb centrifugálási lépés (13000 rpm, 3 perc, szobahőmérséklet) után a minták felülúszó részéhez egy újabb Eppendorf csőben 1/3 térfogat 8 M LiCl oldatot adtunk, amely kicsapja az RNS-t, majd 4 °C-on minimum 30 percig inkubáltuk. Ezt centrifugálás követte (13000 rpm, 20 perc, 4 °C). A felülúszót kidobtuk, a csöveket jégen tartva a pelletet 2 M LiCl oldattal mostuk 5 percig, majd centrifugáltunk (13000 rpm, 3 perc, 4 °C). Ezután a mosóoldatot maradéktalanul eltávolítottuk, a pelletet pedig 0,5 %-os SDS oldatban 5 perc alatt feloldottuk, majd 225 μ l kloroform hozzáadása után újból centrifugáltunk (13000 rpm, 3 perc, szobahőmérséklet). A felső fázist ezután új csövekbe pipettáztuk és 0,1 térfogat 3 M Na-acetátot és 3 térfogat 96 % etanolt adtunk hozzá, a Na-acetát a poliszacharidokat az oldatban tartja. Ezután legalább fél óráig -80 °C-on inkubáltunk. Inkubáció után centrifugáltunk (13000 rpm, 20 perc, 4 °C), majd a felülúszót kidobtuk, a pelletet pedig 70 %-os etanollal 10 percig mostuk, majd 5 percig centrifugáltunk (13000 rpm, 4 °C). Az etanolt maradéktalanul lepipettáztuk, a pelletet megszáritottuk. A mosást követően 20 μ l dietil-pirokarbonát (DEP) kezelt steril desztillált vízben feloldottuk az össz RNS-t. Az RNS mennyiségét a 260 nm-en mért optikai denzitás meghatározásával, spektrofotométeren ellenőriztük (U-3310 Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japán). A minták tisztaságára és minőségére az

OD 260/280 és az OD 260/230 arányból következtettünk, illetve elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben) ellenőriztük az esetleges degradációt. A LiCl-os RNS izolálás eredményeként az RNS minták DNS szennyezéstől mentesek voltak, így DNáz kezelést nem végeztünk.

3.9. cDNS írás

Az RNS mintából összesen 1 µg-nak megfelelő mennyiséget reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk random hexamer primerek segítségével. A reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük. Első lépésként a templátot (1µg-nak megfelelő mennyiséget) és a random hexamert 5 percig 70 °C-on hevítettük, majd 4 µl tömény reakciópuffer, 25 mM dNTP mix, ribonukleáz inhibitor és DEP-es víz hozzáadása után az elegyet 25 °C-on, 5 percig inkubáltuk. Következő lépésként reverz transzkriptáz enzimet adtunk az elegyhez, és ezzel egy órán át 37 °C-on inkubáltunk. 10 perces 70 °C-os hevítéssel állítottuk le a reakciót. Az így kapott cDNS-t kvantitatív Real-Time PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) reakciókhoz használtuk fel.

3.10. QRT-PCR (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)

Kvantitatív RT-PCR technikával követtük nyomon a vizsgált gének kifejeződését. A primereket a Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) segítségével terveztük, a használt primereket táblázatban foglaltuk össze (3.1. táblázat). A szintetizált cDNS-eket 1:19 arányban hígítottuk nukleáz mentes vízzel. A reakcióelegy végtérfogata 20 µl volt, amelyben az egyes oligonukleotidok 150 µM végkoncentrációban voltak jelen, a hígított cDNS-ből 9 µl-t, a 2 x SYBR Green PCR Master Mixből (Applied Biosystems, Foster City, California) pedig 10 µl-t használtunk. Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk. A qRT-PCR reakció lefuttatását és detektálását MJ research PCR készülékkel és BioRad (Hercules, California) Real-Time PCR Detektorral végeztük, 96 mintahelyes plate felhasználásával, a következő beállításokkal: 10 perc 90 °C-on, majd 41 cikluson keresztül az alábbi paraméterekkel: 15 másodpercig 95 °C-on és 1 percig 60 °C-on. A ciklusok során minden amplifikációs lépés után detektáltuk a SYBRGreen festék fluoreszcencia intenzitását az Opticon Monitor szoftver segítségével (BioRad, Hercules, California). Méréseinkhez két referenciagént használtunk: Poliubiquitin (BU879229, Brunner és mtsai., 2004), Ubiquitin conjugating enzyme E2 (DT494001, Basa és mtsai,

2009). A PCR lefutását követően az amplifikáció specifikusságát olvadási görbe detektálásával ellenőriztük: 55 °C-tól 90 °C-ig (0,2 °C 0,2 s⁻¹), amely akkor igazolható, ha egy jól körülhatárolható csúcsot ad. Az adatok analíziséhez a 2^{-ΔΔCt} módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittegen, 2001).

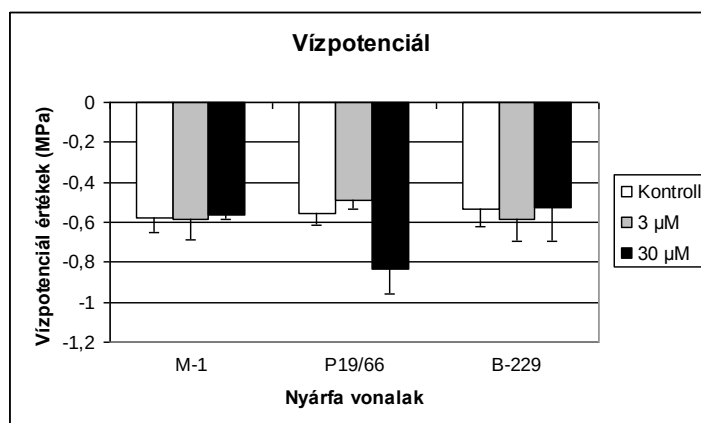
<i>Populus trichocarpa</i> gén orthológ	GenBank Acc. No.	Polaritás	Primer szekvenciája (5'- 3')
PtGSTF4	CK317779.1	forward reverse	GAGCATAAGAAAGAACCAT CTCCATCCACACTGATAA
PtGSTU3	CX178168.1	forward reverse	AGTCTCTTGTTATCCTTGAAT ACACTTCCACCACTTCTT
PtGSTU51	GU065682.1	forward reverse	TAGAGAAGATGAATGGAGTG CAGGATGTGAAGAAAACT
PtGSTT1	GQ377248.1	forward reverse	GTCAAGAATACCACATTAGC AAGCCACACAGACTCTATC

3.1. táblázat: A kvantitatív RT-PCR-hez felhasznált oligonukleotidok.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Vízpotenciál

A vízpotenciál meghatározását egy héttel a cink kezelés után végeztük el (4.1. ábra). A kontroll növények mért vízpotenciál értékeihez képest az M-1-es vonalban, és a B-229-es vonalban nem látható a vízpotenciál értékek jelentős változása 3 μM és 30 μM cink kezelés hatására. A P19/66-os vonal esetén viszont a 30 μM -os kezelés hatására a vízpotenciál értéke jelentősen lecsökken. Amennyiben a vízpotenciál értékek változásai alapján teszünk megállapítást a vonalak cinktoleranciájáról, úgy a magasabb koncentrációval történő kezelés értékeit vehetjük figyelembe és a P19/66-os vonal tűnt a legérzékenyebbnek.

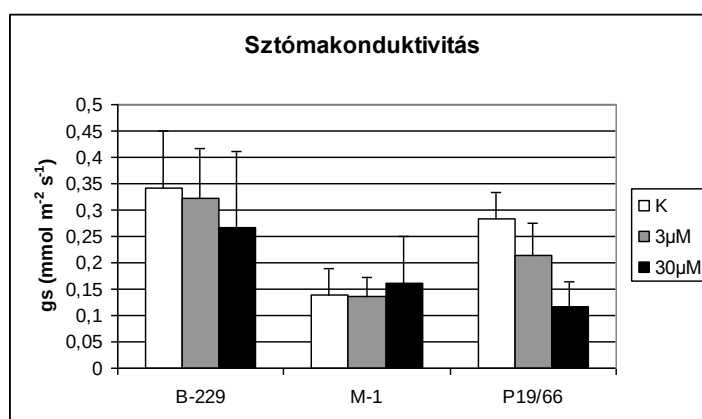


4.1. ábra: Kontroll, 3 μM és 30 μM cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak vízpotenciál értékei (MPa).

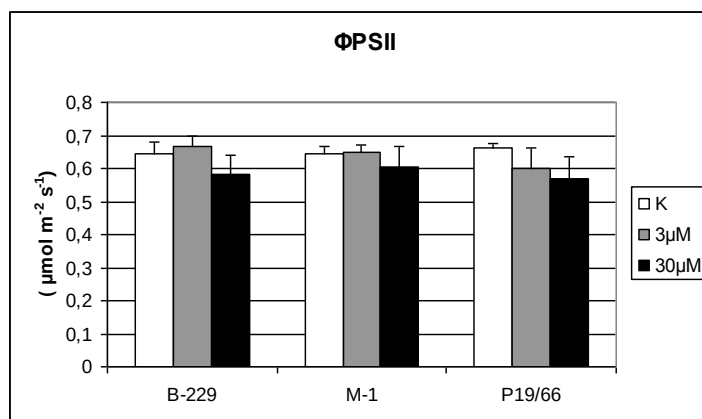
4.2. Fotoszintézis

A sztómakonduktivitás értéke (g_s) a sztóma zárósejtek vízpotenciáljával, a sztómák nyitott állapotával mutat korrelációt. Meghatároztuk a sztómakonduktivitást a levelek felszínén és az összesített értékeket ábrázoltuk. (4.2. ábra) A P19/66-os vonal sztómakonduktivitásának erőteljes csökkenése figyelhető meg a kezelések hatására. A B-229-es vonalnál kisebb mértékű csökkenést, míg az M-1-es vonalnál gyakorlatilag nem változtak az értékek a kezelések hatására.

Az effektív kvantumhasznosítás (Φ_{PSII}) meghatározása során enyhe, nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a 30 μM -os kezelés hatására. A 3 μM -os kezelés csak a P19/66-os mintában okozta az érték csökkenését. A vípotenciál értékeket alátámasztották a sztómakonduktancia és a kvantum hatékonyság értékei, melyek szerint a legérzékenyebbnek a P19/66-os vonal bizonyult (4.3. ábra).



4.2. ábra: Kontroll, 3 μM és 30 μM cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak sztómakonduktivitás értékei.



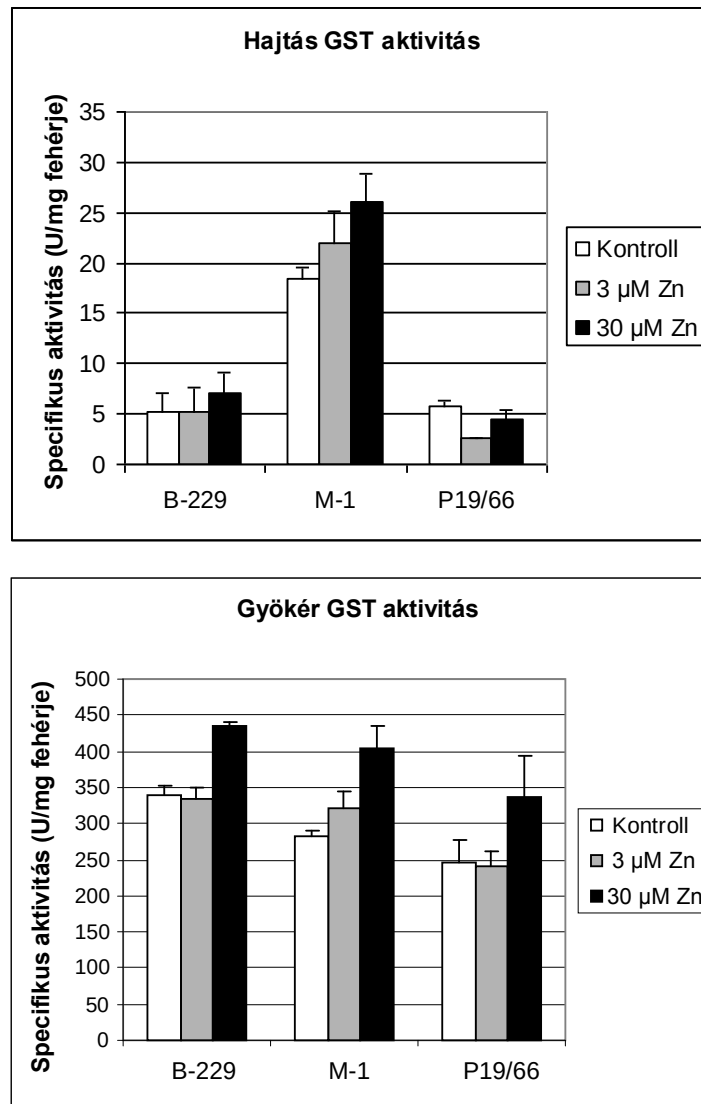
4.3. ábra: : Kontroll, 3 μM és 30 μM cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak effektív kvantumhasznosítása.

4.3. GST és GPOX aktivitás

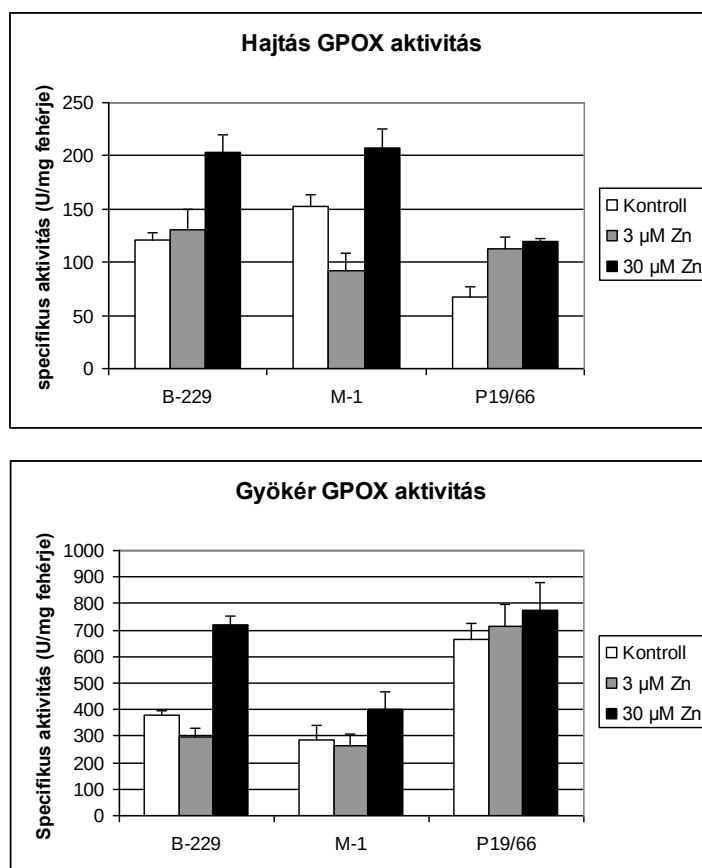
A legmagasabb glutation transzferáz aktivitást a B-229-es vonal 30 μM cinkkel kezelt gyökérmintája esetén mértük. Gyökérminták esetében nagyságrendekkel magasabb GST aktivitás mérhető, mint hajtásminták esetében. Hajtásban a kontroll minták közül az M-1-

es vonal esetén lényegesen magasabb GST aktivitást mértünk. Hajtásmintáknál, a B-229-es vonal esetén a GST aktivitásának megemelkedése látható 30 μ M cink kezelés hatására. A P19/66-os vonalnál az aktivitási értékek nem emelkednek meg, inkább csökkenést tapasztalunk. Az M-1-es fajtánál a GST aktivitás megemelkedett a kontrollhoz képest 3 μ M-os kezelésnél és ez tovább emelkedett a 30 μ M-os cink kezelés után. Gyökérben a nagyobb koncentrációjú cink kezelés mind a 3 vonal esetén a GST aktivitás emelkedéséhez vezetett. A 3 μ M-os kezelés csupán az M-1-es fajta esetén okozott emelkedést gyökérmintáknál. (4.4. ábra)

A GPOX aktivitás hajtásban 3 μ M esetén a B-229-es vonalban enyhén megemelkedett, az M-1-es vonalban lecsökkent, a P19/66-os fajtában pedig közel azonos értéket mutatott, mint a 30 μ M-os kezelés esetén. M-1-es vonal esetén itt is magasabb a GPOX aktivitás a kontroll esetében a többi kontroll mintához képest. A GST aktivitásokhoz hasonlóan a gyökérben magasabb GPOX aktivitás értékeket lehetett meghatározni, mint a hajtásban. Kiemelkedő alap GPOX aktivitást mutatott a P19/66-os gyökérminta (a másik két kontrollal összehasonlítva). 30 μ M-os kezelésnél minden esetben megemelkedett a GPOX aktivitás. Gyökérben a 3 μ M-os kezelés P19/66-os vonalban emelkedést, M-1 és B-229-es vonalban pedig GPOX aktivitás csökkentést okozott. (4.5. ábra)



4.4. ábra: Kontroll, 3 µM és 30 µM cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak GST aktivitása fehérjetartalomra vonatkoztatva.

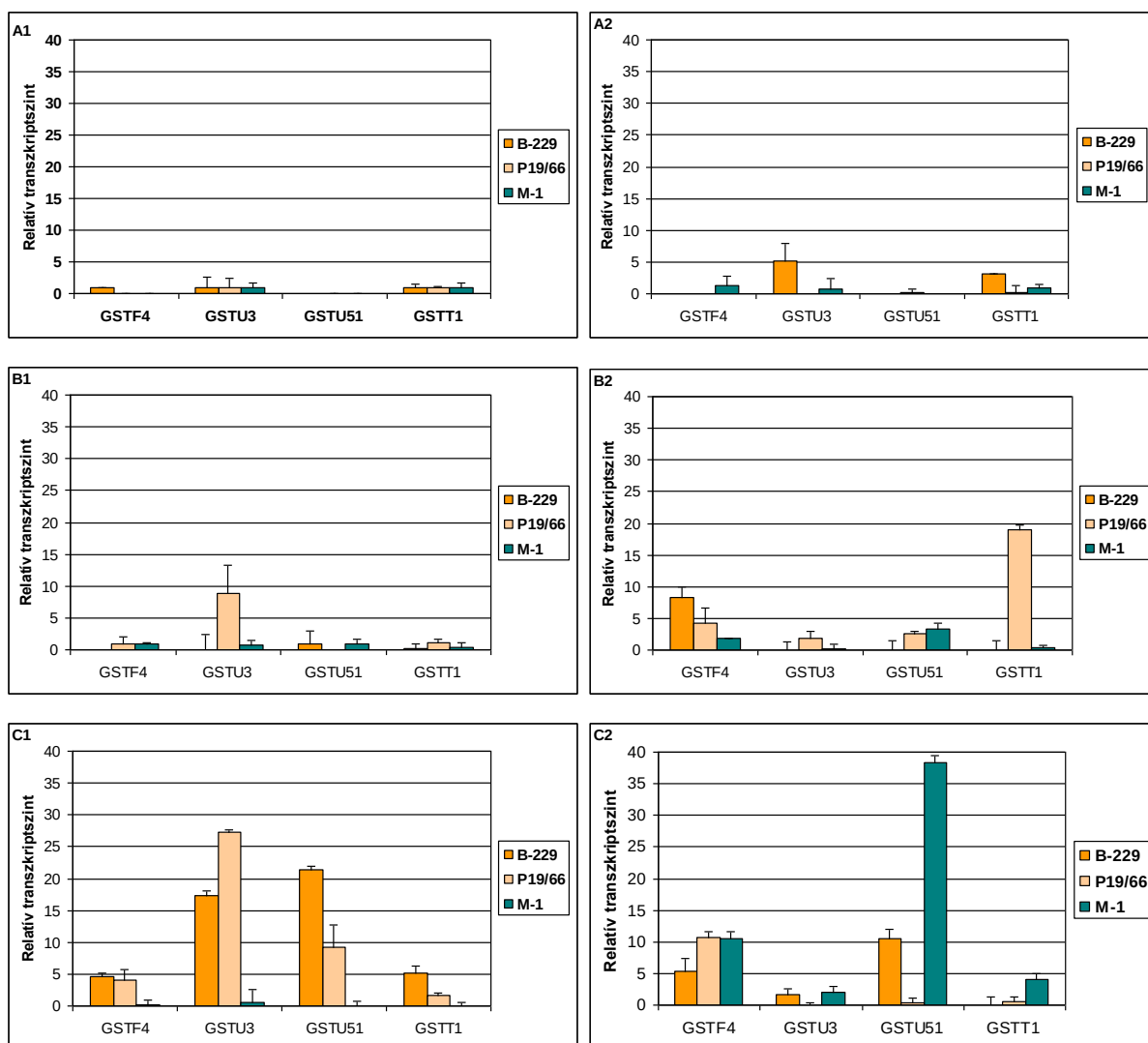


4.5. ábra: Kontroll, 3 µM és 30µM cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak GPOX aktivitása fehérjetartalomra vonatkoztatva.

4.4. GST enzimek relatív transzkript szintje

Kísérleteinkhez 4 gént, a GST-k tau csoportjába tartozó GSTU3 és GSTU51, phi csoportjába sorolható GSTF4 és a theta csoportú GSTT1-es géneket választottuk. A gének által kódolt fehérje GSH konjugáló aktivitása CDNB és p-nitrobenzol klorid (NBC) szubsztráttal szemben (az össz. GST aktivitás meghatározására alkalmas mesterséges szubsztrátok), és katalitikus aktivitása redukált glutationnal (GSH) és CDNB-vel szemben kiemelkedően magas a többi azonos csoportú GST-hez viszonyítva (Lan és Yang és mtsai., 2009). Feltételeztük, hogy ezeknek a géneknek az expressziója és a sejt méregtelenítésében fontos glutation transzferáz aktivitás között nagyfokú korreláció mutatkozik. A theta csoportú GST-t a csoportra jellemző magas glutation peroxidáz aktivitás miatt választottuk ki vizsgálatainkra. Kontroll minták esetén a GSTU51-es gén nem mutatott mérhető expressziót. 3 µM-os cink kezelés esetén az értékek enyhe megemelkedése látható, elsősorban a második mintavételi napon. Az első mintavételi napon a P19/66-os minta

GSTU3-as génje esetében történt transzkriptszint emelkedés, illetve a GSTU51-es génről átíródó transzkriptumok is megjelennek. Jelentősen a GSTF4 esetében a B-229-es vonalban és a GSTT1 esetében a P19/66-os fajtában. A 30 μ M-os cink kezelésnél szignifikánsan magasabb transzkriptszinteket mértünk. Az első mintavételi napon az összes gén expressziós szintje megemelkedett a B-229-es és a P19/66-os fajtákban. M-1-es vonal esetén nem látható transzkriptszint emelkedés. A B-229-es és a P19/66-os fajtákban különösen magas génexpresszió látható a GSTU3 és GSTU51-ben. Míg a második mintavételi napon a P19/66-os vonal transzkriptszintjei nagyrészt csökkennek, addig az M-1-es fajtában ekkor indukálódnak a gének, különösen magas, szignifikáns indukció figyelhető meg GSTU51-es gén esetén. (4.6. ábra)



4.6. ábra: Kontroll, 3 μ M és 30 μ M cink kezelésnek kitett B-229, P19/66 és M-1-es vonalak GST transzkriptszint változása. A: kontroll, B: 3 μ M cink kezelés, C: 30 μ M cink kezelés. 1: első mintavételi nap, 2: második mintavételi nap

4.5. Génexpresszió szabályozása

A legnagyobb transzkriptszint emelkedéseket két tau csoportba tartozó gén mutatta: GSTU3 és GSTU51, de a két gén transzkript mennyisége kontroll állapotban nagy különbséget mutat. Míg méréseink alapján a GSTU51-es gén kontroll növényekben az első mintavételi napon egyáltalán nem, és a második mintavételi napon is csak nagyon csekély mértékben és csak 1 vizsgált vonal esetén fejeződött ki, addig az azonos GST csoportba tartozó GSTU3-as gén expressziója mindkét mintavételi nap esetén megfigyelhető a vizsgált vonalakban. Látható, hogy e két gén expressziója a legerőteljesebb a 30 μ M-os kezelés hatására. Kerestük a két tau csoportú gén közötti alapesetben mért nagyfokú expressziós különbségek okát, ezért megvizsgáltuk promóter régiójukat, választ keresve azokra a kérdésekre, hogy találunk-e olyan elemeket a GSTU3-as gén promóterében, amelyek a GSTU51-től különböző kifejeződését indokolja a kontroll növényekben. Vizsgálataink során -a rengeteg hasonlóság mellett- számos különbséget találtunk a 2 gén promóter régiójában. A GSTU3 gén promótere tartalmaz olyan fény indukált elemeket (SORLIP1/5AT), MYB kötő helyeket (MYBST1, MYB core, CACGTGMOTIF), melyek a GSTU51-ben nem találhatóak meg. Ezenkívül olyan elemeket is azonosítottunk, amelyek felelősek lehetnek a két gén kiemelkedő expressziójáért stressz körülmények között, ilyenek U3-ban az auxin és szalicilsav által indukálható elem (ASF1MOTIFCAMV) valamint a gibberellin válasz elem (PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A), U51-ben pedig az etilén érzékeny elemek (ERELEE4), illetve mindkét gén promóterében számos helyen találtunk olyan motívumot, melyeket a MYB és bZIP transzkripciós faktorok felismernek (EBOXBNNAPA), fényreguláltak és Myb-szerű proteineket kötnek (IBOX), valamint ABRE (ABA responsive element) -szerű elemeket (ABRELATERD1). (4.7. ábra)

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

PtGSU51 GAAACATTCCATACCA-ATTCAAAAAATGGAACAAATTCATCTCATTTTAAATCTCAGTCCGTCCTCGGATTTTCGGCTAAATTCGCG-CCGGAACGCTT

PtGSTU3 AAGGTTTTTTATCCCACTTGAAAGACATGATTTTTTCTTGGGAACATAGAGTATATATCTAATGGGTTC-----AAATCCCACTTGAAAGAAC

ABA responsive element

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

PtGSU51 CCGGTTTCTATTC-CACATGTTTCGT-TCCACTCTTGAAAAAGCCATTGAATC-AAATTGAA-TCTTGTTCAATTTAATTAA-TTAAATCACCACAAT

PtGSTU3 ATGGTTTTTTCATGGAAACATAGAGTATATATGAAAGGCTTCAAAATCCCACTTGAAAGATACCATGTTATCTTTTAAAGTTGAAGTATTTAAAC

Gibberellin-response cis-element

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

PtGSU51 ATAAAAGGCTCTTTTTCATTAC-TATTTTCAATAACAATGATATTGAAAAATA-ATATTGAAATTTATTAT-TACTATTTTCATTAAACAA

PtGSTU3 -CAAAAAGTTTTTTATCCCACTTGAAAGAACATGGTTTTTAAATGGGAACATAGTGTATATATGAAAGGTTTCAAAATCCCACTTGAAAGAAC

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

PtGSU51 TGAATATTAATTTTTTAAATAGATTTATATCTAAATATATGTTTATATTCATGTTGTTTTTTCATGTTTATCTTTGAGGAATTTGAGCAAAACA

PtGSTU3 CTATGCTATTCCTTTTAAAGTTGAAGTATTTAAACCAAA-AAGTTTTTAT-CCCACATTGAAAAAA-CATGGTTTTT-TTTCATGGGAACATAGTGTATATA

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

PtGSU51 AGGGAT--GCTTTAGATTTCAT-TAGCCTTGATAACATTGACCTAACCTTTATATTTAAATATTTGTGTTAAACATTTTACTTTTATTAATTTTATGAT

PtGSTU3 TATGAAAGGGCTTCAAAATCCCACTTGAAAGATACATAT-GTTATCATTTTA-AGTTGAAATATTTAAACCAAAAGATTTTTATCCCACTTGAAAGAAC

IBOX (fényregulált)

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

PtGSU51 ATT-TTGTTTAAATGAATTACTTTAAGTTAATTTAATCTTGACTATTTAGAA-ATATTTTAAATTTGAAATTAATTTGTTGACATG-TATTTG

PtGSTU3 ATGGTTTTTTCATGGAA-ACATAGAGTATATATCTAAGGGTTTCAAAATTTCACTTTGAAAAAAGAAACCCGGGTTCCCGGGTCAACCCG

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

PtGSU51 TATTGCTAATTTATTAATTAATTTATCTTAATTTGAATTA-TGTTTGTGAATATATATATATATATGAAC-ACTCAACCCGGAACGACAC

PtGSTU3 GGTTCCGGGTGACCCGCGGGTCTGCC-GGGTTTGACCGGCTGTTTSCCAAGCCGGTCTTTTATTAACCCCGGACCGTCCASCCACGGATCGACCT

SORLIP1AT (fényregulált)

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

PtGSU51 GCCAAACACCTTCACAACTTAAACATTTTATTTCAATTGAAAAATAAAACACCTACCAAAACAAATTTGACAACTTCCATCACCACCTGATGGCAAA

PtGSTU3 CCGGGG-CGGTTCAGGTTTAATA-ACTGTG-CAAAATATAAATAA-CAACTTCTCGATCCTGAT-ACCTGCTGCATCATGCGTG-CACGGG

Ethylene responsive element

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

PtGSU51 TGTCAAAATTAATACCTGGTGGCTTC-TCCACCCTGAAATATTTTATTTTGCCTTCTCTCAGTGTGAACATTGTAATGGCAGACAGATATATTGG

PtGSTU3 CAACAAGCTCAACATCATATTTTCTGACAAAGACCTGGAATCTGTATATATTATAGAA---GGAGAAGGAAACAAACGCAAGGAAGAGGCTTG

ABA responsive element

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

PtGSU51 GTAAAGAGAAATCTCCGCTCATAA-ATGCTAGGACAGCACACCATGTGTTCCAACTACCCGCAAGGCTGCAATATATTTTACACCCCAACCAATTC

PtGSTU3 TGAGAGCATGAGGTCC-TTGAATGACGCAATTTGCTAGAAATG-TCATGCAATAAGACGACTAGGAAATTAACCCCAACCACTAATCCTTTCAGCTTTT

Auxin responsive element

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

PtGSU51 CAAATAAATACCTCCTCCATTGTCTCTTTCCATATATATATATTTAAACACACAGACTCTAAGAACTTTGTTGCGGCTTGATATATCGATCATGG

PtGSTU3 CTTACAACAAATACCTAGCTTTTCCACTCTGTC---AGATCTCAGCCTTTGGAGTCCCAAGAACGCTAGCGATAAGCATCTTCTTTTCACTTCAAGAAATG

ABA responsive element

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

PtGSU51 CTAAGAGTGAATGTAAGCTTATAGGGGATGGCCGAGCCCTTTTGTGATGAGGGCAAGAAATGCCCTTAATATTAATCTCTGGGGTATGAGTTTCTTGA

PtGSTU3 CTGGTGAATCAAGTAAACCTGTTGGATTGTGGCAAGTCCATTTGGTATGAGAGTGAGAAATAGCATTGGCTGAAAGGCTGTAAGTATGAGTACAGTGA

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

PtGSU51 GGAAGAACTGGGATCCAAAGCCAGCTTCTTCTTGAAATCAAAACCTGTCATTAAGAAATTCAGTTCTGATTCATGATGGCAAGCCCAATTTGTGAATCT

PtGSTU3 ACAAGATTTGTTGAACAAAGGTGCTTTACTCTTCAAAATGAATCCTGTTTCAAGAGAAATCCAGTTCTTGTCCATGATGGGAACCTATTTGTGAGTCA

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

PtGSU51 CTTGTGATAGTGGAGTACATTGATGAGGTTTGGTCTTCTGGACCTACCATCTCCCTCTGATCCTTATGATCGTGGCTTCTCTGCTGGTTTGGGCTGCC

PtGSTU3 CTTATCATTTGTTCAATATATTGATGAGGTTGGAAGGATAAGGCTCCTTTTGTGCTTCTGATCCTTACGAGAGAGCTCAATCTAGGTTCTGGGAGATT

1410

PtGSU51 ATCTCGATGAGAAGG

PtGSTU3 TTGTTGATAGAAG-

4.7. ábra: GSTU3 és GST51 promóterének összehasonlítása

5. Összefoglalás

A nyárfa vonalak talajtisztító, fitoremediációs célú felhasználása igen elterjedt. Az ilyen célú felhasználáshoz alapvető fontosságú az állandó nemesítési tevékenység és a létrehozott klónok állandó szelekciója a nehézfém-tűrés szempontjából. A szélsőséges nehézfémkoncentrációk látható klorózt, nekrozt vagy a teljes növény elszáradását okozhatják. Viszont bizonyos alacsonyabb koncentrációk, melyek a megengedett határérték körül vannak vagy azt csak kis mértékben haladják meg, szemmel nem látható stresszt okozhatnak a növényekben. Ez a stresszhatás a növényekben vagy akklimatizációs folyamatokat indít be, vagy hosszabb idő elteltével kimerüléshez, a növény pusztulásához vezet. A nehézfémstressz hatásának megértése szempontjából fontos előbb a fiziológiai folyamatokat megvizsgálni, majd ezekből kiindulva lehet a folyamatok háttérében levő, stresszvédekezésben szerepet játszó elemeket azonosítani.

A vizsgált növények vízháztartása nem változott jelentős mértékben a cink kezelés hatására, a vízpotenciál paraméter alapján. A kapott értékek szerint a kezelés elsősorban kis koncentrációban ($3\ \mu\text{M}$) nincs különösebb hatással a különböző vizsgált nyárfa vonalak vízpotenciáljára, míg nagyobb koncentrációnál ($30\ \mu\text{M}$) a P19/66-os vonal vízpotenciálja jelentősen csökken, ami a fajta cinkkel szembeni nagyobb érzékenységre utalhat. Ezt támasztja alá a csökkent sztómakonduktancia értéke a fajtának (sztómazáródás) és kvantum hozam paraméterének csökkenése, ami a fotoszintetikus aktivitás bizonyos fokú csökkenését mutatja. A mi adataink jó korrelációt mutatnak az irodalmi adatokkal, melyek szerint a toxikus, magasabb koncentrációjú exogén cink hatására kismértékű változások figyelhetők meg a növények vízháztartásában és a sztómakonduktanciájában (Brune és mtsai., 1994).

Nehézfémstressz hatására a növényi sejtekben toxikus metabolitok széles skálája jelenik meg. Ezek eltávolításáért felelős a méregtelenítési folyamatok egyik kulcsenzime, a GST, elsősorban glutation transzferáz és glutation peroxidáz aktivitása révén. Hajtásban a kontroll minták közül a *P. canadensis* (M-1) vonal esetén lényegesen magasabb GST aktivitást mértünk, mint a *P. deltoides* vonalakban. Ez az eredmény jól korrelál Bittsánszky és mtsai. 2005-ben publikált eredményeivel, melyben a $10\ \mu\text{M}$ -os és tízes léptékkel növekvő ZnSO_4 kezelés hatását vizsgálták *P. canadensis* hajtására. Eredményeik szerint a $10\ \mu\text{M}$ -os-nál magasabb cink koncentráció nem eredményez további növekedést a GST

konjugáló enzimaktivitásban, így az indukció már ennél a koncentrációnál eléri a koncentráció függő optimum görbe maximumát. Gyökérben a nagyobb koncentrációjú cink kezelés mind a 3 vonal esetén a GST aktivitás emelkedéséhez vezetett. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a 30 μ M-os cink kezelés, olyan mértékű stresszhatás a vizsgált fajtákra nézve, hogy minden esetben láthatjuk az enzimműködések megemelkedését. Ennek oka a növények stresszhatással szembeni védekezésének fokozódása, így a felhalmozódó fitotoxikus metabolitok méregtelenítése, és valószínűsíthető ABC transzporterek általi eltávolításuk a vakuólumba, valamint a nehézfémstresszt követő oxidatív stressz eredményeként keletkező lipid peroxidok redukálása a glutation peroxidáz aktivitás révén. A glutation peroxidáz aktivitás indukciójának összefüggését a cink toleranciával már vizsgálták nyárfa esetében (Bittsánszky és mtsai., 2005, Kömives és mtsai., 2003), és kiemelték a theta csoport jelentős detoxifikáló szerepét magas peroxidáz aktivitása révén. A *P. candensis* (M-1) és az egyik *P. deltoides* vonal (B-229) jelentősen megnövelte 30 μ M cink kezelés hatására a GPOX aktivitását, ami feltehetően a sikeres akklimatizációjuk egyik eleme volt. A P19/66-os vonal esetén sem a hajtás glutation transzferáz aktivitása nem emelkedik meg a kezelések hatására, sem GPOX aktivitása nem mutat jelentős eltérést a 3 μ M-os és a 30 μ M-os kezelésre adott válasz között. Ez a vonal nem tudja megnövelni hajtásban a sejtszintű detoxifikációs képességét a magasabb, 30 μ M-os kezelés esetén sem.

A génexpressziós vizsgálatok során felhasznált gének által kódolt fehérjék szubsztátspecifitása és enzim aktivitásuk bizonyos paraméterei ismertek. A Tau csoportú GSTU51-es fehérje kiemelkedő katalitikus aktivitással rendelkezik mind glutationnal, mind a modell szubsztráttal (CDNB-vel) szemben. A másik tau csoportba tartozó fehérje (GSTU3) CDBN-vel szembeni specifikus aktivitásában emelkedik ki a többi GST közül. A phi csoportú GSTF4 szélesebb szubsztrátspecifitású, képes a p-nitrobenzol klorid (szintén modell szubsztrát) konjugálására is (Lan és Yang és mtsai., 2009). GSTT1-es gén a kis létszámú theta csoportba tartozik, melynek tagjai magas glutation peroxidáz aktivitással rendelkeznek. Ezek alapján feltételezhető mind a négy géntermék kapcsolata a sikeres stresszválasszal. A GSTU51-es gén expressziója vizsgálataink alapján stresszhatásra aktiválódik, mivel kontroll mintákban nem volt jelen detektálható mRNS, viszont a kezelések hatására megjelenik a transzkriptuma. Az M-1-es fajtában a 30 μ M-os kezelés során látható, hogy csak a második mintavételi napra indukálódnak a GST gének, amely a vonal későbbi védekező stresszreakciójára, hosszú alarmfázisára utal. A P19/66-os vonal

transzkriptumai a 30 μ M-os kezelés esetén a második mintavételi napra szinte eltűnnek, ami szintén a vonal gyengébb stressztűrésére enged következtetni. A B-229-es vonal transzkriptumainak mennyisége és eloszlása alapján közepes stressztűrésűnek tűnik. Összességében megállapítható, hogy a GST-k magasabb expressziós szintje látható stressz kivédése céljából, amely korrelációt mutat a GST és GPOX aktivitással.

A GSTU3-as gén olyan elemeket tartalmaz, amelyek a GSTU51-es gén promóterében nincsenek jelen és feltehetően indokolják kifejeződését kontroll körülmények esetén, ezen elemek között kettő fény általi indukálódó reguláló elemet találtunk (Hudson és Quail, 2003, Jiao és mtsai., 2005). Illetve különbségek mutatkoztak még a két gén hormon hatásokra adott válaszreakciójában. Mindkettő gén nagy mennyiségben tartalmaz abszcizinsav indukálható régiókat, de a GSTU3 promóterében több ilyen elemet találtunk (Pl. MYBCORE, MYBST1; Urao és mtsai., 1993; Baranowskij és mtsai., 1994). Mindkét gén promóter régiójában közös, hogy hordozzák Xu és mtsai. (2002) által szintén azonosított különböző hormon szabályozást közvetítő elemeket (abszcizinsav, etilén és auxin indukció) melyek közül bizonyosak egyértelműen a stresszválaszhoz is kapcsolhatóak.

A különböző mérési eredményeink alapján a fajtákról megállapítható, hogy a P19/66-os fajta nehézfémstresszre érzékeny, mivel a 30 μ m-os kezelés hatására fiziológiai paraméterei csökkennek, GST és GPOX aktivitása hajtásban már nem változik, vizsgált génjeinek transzkriptumai a 2. mintavételi napra eltűnnek. A B-229-es *P. deltoides* vonal cinkstresszre vizsgált fajták közül a legrezisztensebbnek tűnik, fiziológiai paraméterei kismértékben csökkennek, enzimaktivitása minden vizsgált esetben megemelkedik a magasabb cink koncentráció esetén a génexpresszió változásaihoz hasonlóan. Az M-1-es fajta késői stresszreakciót mutat. Ezt mutatják stagnáló fiziológiai paraméterei, enzimaktivitásának késői megemelkedése és transzkriptumainak 2. mintavételkor történő megjelenése a magasabb cink koncentráció esetén. Ettől függetlenül a *P. canadensis* vonal fiziológiai paramétereire nem volt hatással a stressz, így sikeres akklimatizációt mutat, ami alapján rezisztensnek minősül a másik két vonallal összevetve. Kísérleteink alátámasztották a GST enzimek védelmi funkcióját mind konjugáló mind peroxidáz aktivitásuk révén cink általi nehézfémstressz során nyárfa vonalakban, az enzimek aktivitásának megemelése szerves részét képezi a sikeres akklimatizációnak.

6. Nyilatkozat

Alulírott Leviczky Tünde a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- vízpotenciál mérést,
- GST aktivitás meghatározását,
- GPOX aktivitás meghatározását,
- GST és referencia gének keresését *in silico*,
- primer tervezést
- RNS kivonást
- cDNS írást
- QRT-PCR-t

végeztem el.

.....
aláírás

2012. november 15.

7. Felhasznált irodalom

Alscher R, Amundson R, Cumming J, Fellows S, Fincher J, Rubin G, Van Leuken P, Weinstein L. Seasonal changes in the pigments, carbohydrates and growth of red spruce as affected by ozone. *New Phytol* 1989;113:211–223.

Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1975;250:5144-5149.

Baranowskij N, Froberg C, Prat S, Willmitzer L. A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J* 1994;13:5383-5392.

Basantani M, Srivastava A. Plant glutathione transferases – a decade falls short. *Can J Botany* 2007;85:443-456.

Bittsánszky A, Kömives T, Gullner G, Gyulai G, Kiss J, Heszky L, Radimszky L, Rennenberg H. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. *Environment International* 2005;31:251-254.

Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. Zinc in plants. *New Phytologist* 2007;173:677–702

Brune A, Urbach W, Dietz KJ. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant, Cell and Environment* 1994; 17:153-162.

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SHBMC. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *Plant Biol.* 2004;4:14doi:10.1186/1471-2229-4-14.

Chaney RL. Zinc phytotoxicity Szerk: Robson AD, Zinc in Soil and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands 1993;135–150.

Chen W, Singh KB. The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* 1999;19:667–677.

Clemens S, Palmgren M, Kämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant* 2002;7:309-315.

Cobbett CS. Phytochelatins and their roles in heavy-metal detoxification. *Plant Physiol* 2000;123:825-32.

Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu.Rev.PlantPhys.* 2002;53:159-182.

Di Baccio D, Tognetti R, Sebastiani L, Vitagliano C. Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*Populu* x *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol* 2003;159:443-52.

Dietz AC, Schnoor JL. Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect* 2001;109(Suppl.1);163-8.

Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. Protein family review. *Genome Biol* 2002a;3:3004.1-3004.10.

Dixon DP, Davis BG, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. *J Biol Chem* 2002b;277:30859-30869.

Dixon DP, Hawkins T, Hussey P, Edwards R. Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany* 2009;10:1093-365.

Droog F, Spek A, van der Kooy A, de Ruyter A, Hoge H, Libbenga K, Hooykaas P, van der Zaal B. Promoter analysis of the auxinregulated tobacco glutathione S-transferase genes Nt103-1 and Nt103-35. *Plant Mol Biol* 1995;29:413–429.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 2000;5:193-198.

Frear DS, Swanson HR. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2S-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochem* 1970;9:2123–2132.

Fontes RLF., Cox FR. Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. *Journal of Plant Nutrition* 1995;18:1893-1906.

Foyer CH, Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 2005;29:1056-1071.

Genty B, Briantais J-M, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989;990:87-92.

Gregersen PL, Holm PB. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J* 2007;5:192-206.

Gimeno-Garcia E, Andreu V, Boluda R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution*, 1996;92:19–25.

Guerra F, Duplessis S, Kohler A, Martin F, Tapia J, Lebed P, Zamudio F, González E. Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. *Environmental and Experimental Botany* 2009;67:335-334.

Harmens H, Gusmao, NRCPB, Den Hartog, PR, Verkleij JAC, Ernst WHO. (1993). Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 1993;141:309-315.

Hudson ME, Quail PH. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol* 2003;133:1605-1616.

Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Plant Biol* 1994;91:8925-8929.

Jiao Y, Ma L, Strickland E, Deng XW. Conservation and Divergence of Light-Regulated Genome Expression Patterns during Seedling Development in Rice and Arabidopsis. *Plant Cell* 2005;17: 3239-3256.

Kocsy G, Kobrehel K, Szalai G, Duviau M-P, Buzás Z, Galiba G. Thioredoxin h and glutathione as abiotic stress tolerance markers in maize. *Environ Exp Bot* 2004;52:1001-112.

Kömives T, Gullner G. Phytoremediation. In: Wilkinson RE, editor. *Plant-environment interactions*. New York: Marcel Dekker; 2000.p. 437-52.

Kömives T, Gullner G, Rennenberg H. Roles of glutathione and glutathione-related enzymes in remediation of polluted soils by transgenic poplars. In: Davidian J-C, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H, editors. *Sulfur transport and assimilation in plants. Regulation, interaction and signaling*. Leiden: Backhuys Publishers; 2003.p. 101-9.

Kupper H, Kupper F, Spiller M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 1996;47:259-266.

Kuźniak E, Skłodowska M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Sci* 2001;160:723-731.

Lan T, Yang Z, Yang X, Liu Y, Wang X, Zeng Q. Extensive Functional Diversification of *Populus* Glutathione S-Transferase Supergene Family *The Plant Cell* 2009;21:3749-3766.

Láng F. Növényélettan. A növényi anyagcsere I. kötet Szerk: Láng Ferenc ELTE Eötvös Kiadó 2007.

Larcher W. Ökophysiologie der Pflanzen. Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag 1994.

Lee CW, Jackson MB, Duysen ME, Freeman TP, Self JR. Induced micronutrient toxicity in 'Towndown' Kentucky bluegrass. Crop Science 1996a;36:705-712.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2001;25:402-408.

Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. Nature 1995;375:397-400.

Marrs KA. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annu Rev Plant Phys 1996;47:127-158.

Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants(2nd edn.)Academic Press, San Diego 1995.

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. J Exp Bot 1998;49:649-667.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ 2010;33:453-467.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 2004;9:490–498.

Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein Plant Phys 2000;123:1561–1570.

Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 2002;53:1283-1304.

Pan L, Kawai M, Yu LH, Kim KM, Hirata A, Umeda M, Uchimiya H. The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Lett* 2001;508:375-378.

Ren F, Liu T, Liu H, Hu B. Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year old American ginseng plants. *Journal of Plant Nutrition* 1993;16:393-405.

Smith AP, Nourizadeh SD, Peer WA, Xu J, Bandyopadhyay A, Murphy AS, Goldsbrough PB. *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J* 2003;36:433–442.

Soranzo N, Mizzi L, De Toma G, Sari-Gorla M, Frova C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics* 2004;271:511-521.

Szalai I. Ásványi táplálékok. In: A növények élete. Az életjelenségek analízise a molekuláris szinttől az ökológiai szintig I. kötet. Szerk: Szalai István JATEPress 1994.

Szigeti Z. Növények és a stressz. In: Növényélettan. A növényi anyagcsere II. kötet. Szerk: Láng Ferenc ELTE Eötvös Kiadó 1998;915-983.

Tari I, Szalai G, Lőrincz Zs, Bálint A. Changes in thiol content in roots of wheat cultivars exposed to copper stress. *Biol Plant* 2002;45:255-260.

Teige M, Huchzermeyer B, Schultz G. Inhibition of chloroplast ATPsynthase/ATPase is a primary effect of heavy metal toxicity in spinach plants. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 1990;186:165-168.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T. The ocs element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol Biol* 1994;26:1055–1064.

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 1993;5:1529-1539.

van Assche F, Clijsters H. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 1986;125:355-360.

Wang J, Evangelou V. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. In: Pessaraki M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Markel Dekker, Inc., New York, pp. 1995;695-717.

Williams L, Mills R. P_{1B}-ATPases-an acient family of transition metal pumps with diverse function in plants. *Trends Plant* 1995;10,491-502.

Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Phys* 1988;87,206–210.

Xu FX, Lagudah ES, Moose SP, Riechers DE. Tandemly duplicated safener-induced glutathione S-transferase genes from *Triticum tauschii* contribute to genome- and organspecific expression in hexaploid wheat. *Plant Physiol* 2002;130:362-373.

Ye Z, Baker A.J.M., Wong MH, Willis AJ. Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aquatic Botany* 1988;61:55-67.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Gallé Ágnesnek**, témavezetőmnek, aki türelemmel végigkísérte a munkámat és kifogásolhatatlan szakmai felkészültségével, tanácsaival és ötleteivel segítette, hogy ez a dolgozat létrejöhessen.

Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma tanszékvezető egyetemi docensnek, amiért lehetővé tette számomra, hogy a Növénybiológia Tanszék szakdolgozója lehessenek.

Benyó Dániel Phd. hallgatónak, amiért szakmai és gyakorlati segítségnyújtásával segítette munkámat és dolgozatom elkészülését.

Továbbá az SZTE TTIK Növénybiológia Tanszék valamennyi oktatójának, doktoranduszának, laboránsának és nem utolsósorban a családomnak.