

Debreceni Egyetem
Tudományegyetemi Karok
Természettudományi és Technológiai Kar
Növénytani Tanszék



Cylindropermopszin (cianotoxin) hisztológiai és citológiai hatásának vizsgálata *Vicia faba* modellnövényben

TDK pályamunka

Készítette:

Riba Milán

II. éves Biológus Msc – növénybiológia szakirány

Garda Tamás

I. éves Biológus Msc – növénybiológia szakirány

Témavezető:

Dr. habil. Máthé Csaba

Debrecen
2012

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
3.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	9
3.1.	A CILINDROSPERMOPSZIN TISZTÍTÁSA.....	9
3.2.	A <i>Vicia faba</i> CSÍRANÖVÉNYEK NEVELÉSE, A TOXINKEZELÉSEK.....	10
3.3.	HISZTOKÉMIAI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI MÓDSZEREK.....	10
3.4.	KROMOSZÓMA („SQUASH”) PREPARÁTUMOK KÉSZÍTÉSE.....	11
3.5.	AZ OLDALGYÖKÉR CSÚCSMERISZTÉMA SEJTEK MITOTIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA.....	11
3.6.	AZ ADATOK ANALÍZISE.....	11
4.	EREDMÉNYEK	12
5.	DISZKUSSZIÓ.....	21
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	24
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	26
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	27

A rövidítések jegyzéke

BSA: borjú szérum albumin
BGST: (Blue Green Sinapis Test) mustár csíranövény-teszt
CMT: kortikális mikrotubulus
CYN: cilindropermopszin
DAPI: diamidino fenilindol
EMT: endoplazmatikus mikrotubulus
GFP: (Green Fluorescent Protein) zöld fluoreszcens fehérje
GSH: glutation
HPLC: magas nyomású folyadékkromatográfia
MS*: Gamborg vitaminnal és 2% szacharózzal kiegészített Murashige és Skoog alaptáptalaj
MTOC: mikrotubulus organizáló centrum
PBS: foszfát pufferelt sóoldat
PFA: paraformaldehid
PPB: pre-profázisos köteg

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban igen komoly környezeti problémát okoznak a felszíni vizeinkben létrejövő cianobakteriális vízvirágzások, víztérszíneződések. A vízvirágzást a feldúsult szerves anyag mennyiség következtében elszaporodott cianobaktériumok okozzák. A cianobaktériumok az egész élővilágban elterjedt fotoszintetizáló prokarióta szervezetek. Elszaporodásukhoz az emberek is nagymértékben hozzájárultak a műtrágyázással és a szennyvízkibocsátással. Ez a jelenség főleg nyáron figyelhető meg mikor hosszabb ideig van meleg és napos időjárás. Ekkor túl sok szerves tápanyag szaporodik fel a vizekben, ami előidézi a cianobaktériumok és az algák gyors szaporodását (Carmichael, 1992). Hazai vízvirágzást eddig a cianobaktériumok néhány faja eredményezett, mint például *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii* és a *Anabaena spiroides* (Vasas és mtsai., 2004). A cianotoxinok a legtöbb esetben az eutrofizálódás következtében létrejövő cianobakteriális vízvirágzások alkalmával dúsulnak fel a felszíni vizekben. A cianotoxinok számos egészségügyi és ökológiai kockázatot jelentenek. Az emberi szervezettel főleg ivóvíz, fürdőzés vagy szennyezett vízből származó élőlény elfogyasztásával kerülhet kapcsolatba (Carmichael, 1992).

Kutatócsoportunk cylindrospermopszin (CYN) cianotoxinnal foglalkozik. A CYN egy hidroximetiluracil csoportot tartalmazó triciklikus guanidin származék, amelyeket főként *Aphanizomenon* és *Cylindrospermopsis* genuszba tartozó törzsek termelnek (Sivonen és Jones 1999). A CYN a pH és a hőmérséklet változásaira nem érzékeny és ráadásul kiválóan oldódik vízben. A CYN egy eukarióta protein szintézis gátló toxin, habár a molekuláris szintű hatásmechanizmusa még nem ismert, valamint pirimidin nukleotid szintézis gátló hatásáról is beszámoltak (Beyer és mtsai, 2009; Metcalf és mtsai, 2004). Máj szövetben megfigyeltek toxin okozta nekrozist, mely a csökkent glutation (GSH) szint miatt alakult ki (Beyer és mtsai, 2009). Állati sejtekben megfigyelték a CYN sejtosztódásra gyakorolt gátló hatását is. Növényekben a fehérje szintézis gátlás mellett változatos növekedésre gyakorolt hatást figyeltek meg. Mustár (*Sinapis alba*) csíranövényekkel végzett kísérletekben növekedés gátló, míg *Hydrilla verticillata* növények esetében növekedést serkentő hatást tapasztaltak (Vasas és mtsai, 2002; Kinnear és mtsai, 2008).

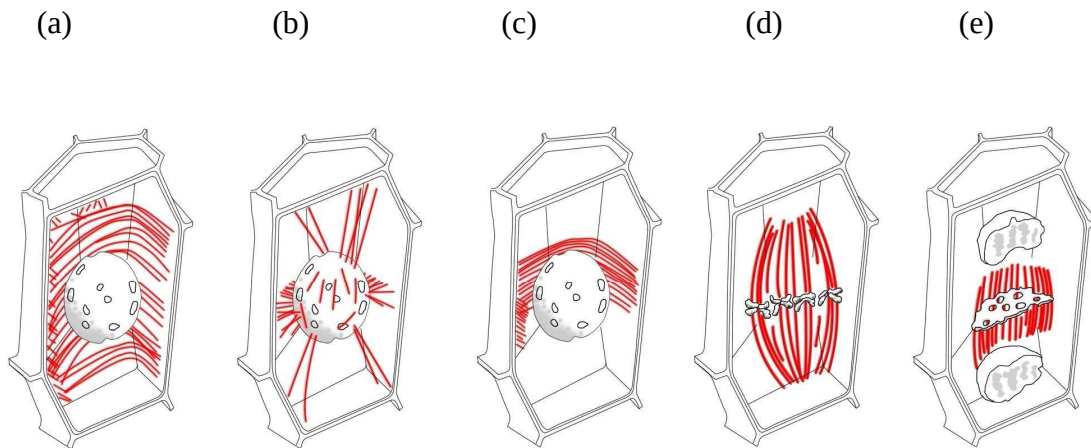
Munkánk során *Vicia faba* (lóbab) modellnövényben vizsgáltuk a toxin hatását. Növekedésvizsgálatok mellett célul tűztük ki a CYN mitotikus aktivitásra és sejtosztódásra

gyakorolt hatásának vizsgálatát. Célunk volt továbbá, a sejtciklus egyes fázisaira jellemző mikrotubuláris rendszer és kromatinszerveződés vizsgálata.

2. Irodalmi áttekintés

Az eukarióta szervezetek növekedése, fejlődése, szaporodása és fajfenntartása jelentős mértékben függ a mitotikus sejtosztódástól, melyet összetett és összehangolt biokémiai és genetikai folyamatok irányítanak. A sejtciklus teszi lehetővé a genetikai információ megkettőződését és átjutását az utódsejtekbe. A mikrotubulusok, amelyeknek számos funkciójuk van, mint például a vezikuláris transzport, a sejtek polaritásának és alakjának meghatározása is szerves része a sejtosztódásnak (Dowling & Nogales, 1998). A mikrotubulusok protein alegységekből alakulnak ki. A tubulin alegység maga heterodimer formában van, ami két szorosan illeszkedő globuláris proteinből, α -tubulinból és β -tubulinból áll. Minden α - és β -monomer rendelkezik konzervált GTP kötőhellyel (Alberts és mtsai., 2008). A mikrotubulusok egyik fő jellegzetessége a polimerizációs és depolimerizációs egyensúlyon alapuló sajátos növekedés, illetve mérettartás. A mikrotubulusok gyors átrendeződését a dinamikus instabilitás teszi lehetővé. (Nogales, 1999). A növényekben nem található mikrotubulus szervező organellum, tehát a mikrotubulusok nukleációját a sejtmembrán és a sejtmag membrán közelében elhelyezkedő fehérje komplexek végzik, amelyek γ -tubulint tartalmaznak (Joshi, 1998; Vogel és mtsai., 2001).

A növényi sejtekben 5 féle mikrotubulusból felépülő struktúrát figyelhetünk meg (1. ábra). Az interfázisban lévő sejtekben kortikális mikrotubulusokat (CMT) láthatunk (1. a ábra). Az endoplazmatikus mikrotubulusok (EMT) váltják fel a kortikális mikrotubulusokat az osztódó sejtekben (1. b ábra), amelyből a preprofázisban kialakul a preprofázis köteg (PPB; 1. c ábra). A PPB eltűnése után a metafázisban kialakul az osztódási orsó (1. d ábra), ezután pedig a telofázis alatt megjelenik a fragmoplaszt (1. e ábra) (Wright & Smith, 2007).



1. ábra: A növényi sejtekben található mikrotubuláris struktúrák. (a): CMT. (b): EMT. (c): PPB. (d): mitotikus orsó. (e): fragmoplaszt. A mikrotubulusok piros színnel láthatók (Goddard és mtsai., 1994 valamint Dhonukshe és mtsai., 2004 nyomán)

A sejtosztódásnak két típusa van: a mitózis (vagy számtartó osztódás) és a meiózis (vagy számfelező osztódás). A mitózis a szomatikus sejtek szaporodását foglalja magába, ahol az utódsejtek ugyanazt a genetikai anyagot tartalmazzák, mint az anyasejt. A meiózis ezzel szemben felére csökkent kromoszómaszámú ivarsejteket (növényekben spórákat) eredményez.

Az osztódásra képes eukarióta szomatikus sejtekre jellemzőek az egymást követő fázisok, melyek egy sejtciklust alkotnak. A sejtciklus alapvetően mitózisból és interfázisból áll. Régebben úgy gondolták, hogy az interfázis a sejtek nyugalmi állapota. Ma már tudjuk, hogy igen fontos események játszódnak le, így az interfázis is külön szakaszokra osztható.

A G1, vagy preszintetikus szakaszban történik meg a sejtek felkészülése az osztódásra. A sejtek növekednek, a különböző sejtorganellek megkettőződnek és beindul a makromolekulák (RNS és fehérjék) szintézise. (Velich, 2001).

S (szintetikus) szakaszban kettőződik meg a DNS, és hiszton fehérjék is ekkor szintetizálódnak. Nemcsak a DNS, a nukleoszóma és az epigenetikus módosítások is átkerülnek az újonnan szintetizálódott kromatinszálla. A hisztonok a többi DNS-hez kapcsolódó fehérjékkel együtt elfoglalják helyüket a DNS-en. A folyamat végére kialakul a két testvérkromatida, melyeket kohezin fehérje komplexek tartanak össze (Costas és mtsai, 2011; Velich, 2001).

A posztiszintetikus (G2) fázisban a sejt már felkészült a mitózisra. A diploid eukarióta szervezetekben az interfázis kezdetén (G1) a sejtmag DNS tartalma 2C. Az S fázisban történő DNS replikáció miatt a G2 fázisban a sejt DNS mennyisége 4C (Velich, 2001).

Ha az extracelluláris feltételek kedvezőtlenek, akkor a sejt belép egy speciális nyugalmi állapotba, aminek a neve G0 (Gzero). Ebben az állapotban a sejt napokig, hetekig vagy akár évekig is maradhat, mielőtt visszatér az osztódáshoz. Sok sejt marad tartósan G0-ban, ami egy bizonyos idő eltelte után sejthalálhoz vezet (Alberts és mtsai., 2008; Astor, 1986; Michaelis és mtsai., 1997).

A mitózis a szomatikus sejtek osztódási folyamata, ami a sejtmag és a citoplazma osztódását foglalja magába. Négy fázisra osztható:

A profázis előtt még meg kell említeni egy szakaszt, a preprofázist. A mitózis kezdetén a preprofázis alatt alakul ki a preprofázis köteg (PPB). A PPB előrejelzi, hogy az új sejtlemez hol fog kialakulni. A sejtosztódási sík PPB hiányában drasztikusan károsodik és ezt kísérletekkel alá is támasztották. (Dhonukshe és mtsai., 2005).

Profázisban (2. ábra) a kromatinállomány vékony fonalakká alakul, majd ezek a fonalak kondenzálódnak, és a profázis végére fénymikroszkóp alatt rendszerint jól megfigyelhető a két testvérkromatida. A kondenzáció számos hiszton módosításon keresztül szabályozott. A kromatidák a centromeren keresztül kapcsolódnak össze. Létrejönnek a mikrotubulus szervező központok és a sejt két ellentétes pólusa felé vándorolnak. Közben szintetizálódnak a mitotikus orsófonalak. A profázis végére (prometáfázis) a sejtmagvacska és a sejtmaghártya eltűnik (Costas és mtsai, 2011; Sutka, 2004; Velich, 2001).

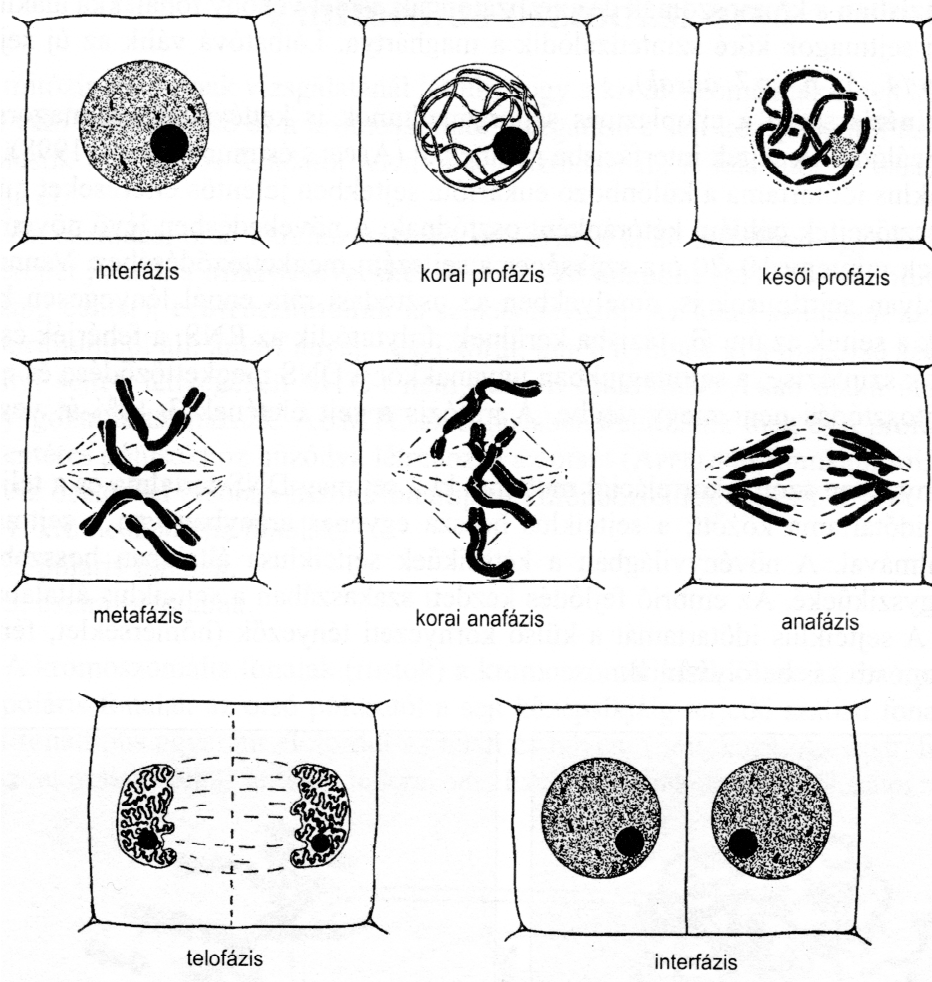
Metafázisban (2. ábra) a kromoszómák kapcsolatot létesítenek a magorsó mikrotubulusaival, és a sejt központi síkjában helyezkednek el. Eléri a teljes spiralizáltságukat, felveszik a jellemző alakjukat, formájukat. A kromoszómák középsíkba rendezése és az ellentétes pólusok felé történő mozgása az osztódási orsó segítségével történik. A mitózis központi eseménye – a testvérkromatida szegregáció – az összes eukarióta sejtben a mitotikus orsó megjelenésétől függ. Az orsó egy bipoláris mikrotubulus köteg, amit a mikrotubulus szervező központ (MTOC – microtubule organizing center) hoz létre. Az MTOC-k az S fázisban képződnek, és a profázisban hozzák létre az orsót, miközben az ellentétes pólusokra vándorolnak. Az osztódási orsóban három fonaltípust különböztetnek meg. A kromoszomális fonalak a kromoszómákat kötik össze az orsó pólusaival, a poláris fonalak pólustól a középsíkig terjedő szabad rostok. Az asztrális fonalak csak állati sejtekre jellemzőek. Az orsó összeszerelődését a mikrotubulus-függő motor proteinek váltják ki a mitózisban.

Az eukarióta sejtekben ezek a fehérjék 2 családba tartoznak: a kinezinek, amelyek általában a mikrotubulus plusz vége felé mozognak és a dineinek, amelyek a mínusz vég felé mozognak. 4 fontos típusuk van: kinezin-5, kinezin-14, kinezin-4 és 10, valamint dynein, ezek különösen fontosak az orsó összeszerelődésében és funkciójában. A növényi sejtekben is leírták a kinezinek fenti típusait, de a dineinek jelenléte nem bizonyított (Alberts és mtsai., 2008).

Kromoszomális fonalak esetében a mikrotubulusok „plusz” végei a kromoszómák centomér régiójában található kinetochorokhoz kapcsolódnak (kinetochor mikrotubulusok). A mikrotubulusok „negatív” végei centroszómán vagy annak közelében végződnek. Anafázis során a kromoszómák mozgását az ún. kinezin fehérjecsoportba tartozó molekulák teszik lehetővé. Gyakran molekuláris motoroknak is nevezik őket. ATP hidrolizációjából nyert energia segítségével képesek megváltoztatni alakjukat, ezáltal mozgatva a kromoszómákat a centroszómák felé (Alberts és mtsai, 2008; Astor, 1986; Uhlmann, 1999; Velich, 2001).

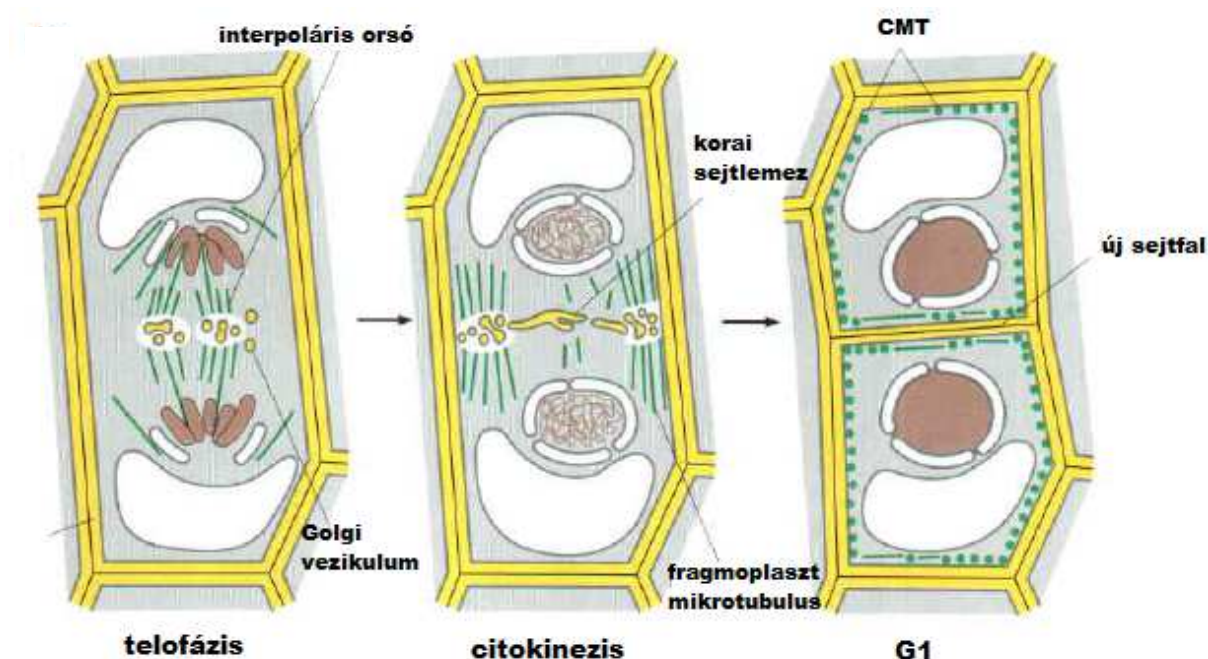
Anafázisban (2. ábra) a testvérkromatidák közötti kohézió teljesen megszűnik, kialakulnak a saját centromerrel rendelkező kromoszómák. A visszamaradt kohézió jelenleg két mechanizmus alapján történhet meg (szeparáz független és a szeparáz függő mechanizmusok). A szeparáz független módon történő eltávolításnál a mikrotubulusok által generált erő az, ami fizikailag eltöri a kohezin gyűrűket. A szeparáz függő mechanizmus esetében a kohezin Ssc alegységeit hasítja a szeparin (Renshaw és mtsai, 2010; Uhlmann, és mtsai, 1999). Miközben a kromoszómák a sejt két ellentétes pólusa felé mozognak, az orsó pólusai is elkezdik az ellentétes irányú mozgást. Ennek következtében a sejt jellegzetes nyújtott alakú lesz, melynek nagy szerepe van a sejtek pontos szeparációjában.

Telofázis (2. ábra) során a sejtmagok köré maghártya szintetizálódik, a kromoszómák elveszítik sajátos mitózisbeli alakjukat (despiralizálódnak) és újra láthatóvá válik a sejtmagvacska. Az osztódási orsó ebben a fázisban szétszerelődik.



2. ábra: A mitotikus sejtosztódás a növényekben (Sutka, 2004).

Végül a citokinezis során a sejt kettéoszlik, miközben a magorsó depolimerizálódik. A növényi sejtekben, az állati sejtektől eltérően, nem kontraktilis gyűrű osztja ketté a sejtet, hanem belülről indul meg az új sejtfa organizációja. A mitotikus orsó maradványaiból létrejön a fragmoplaszt. A fragmoplaszt mikrotubulusain keresztül motorproteinek segítségével a Golgi apparátus vezikulumai eljutnak a sejt középpontjába. A sejtfa szintézishez szükséges poliszacharidokat és glikoproteineket tartalmazó vezikulumok fuzionálnak, és létrehoznak egy lemezszerű struktúrát, amit korai sejtlemeknek neveznek. További vezikulumok fúziójával a sejtlemez kiterjed. A folyamat addig tart, amíg a sejtlemez eléri a plazmamembránt, ezáltal kettéosztva a sejtet (3. ábra) (Alberts és mtsai, 2008; Sutka, 2004; Velich, 2001).



3. ábra: A citokinesis folyamata növényi sejtekben. CMT: kortikális mikrotubulus (cortical microtubule) (Alberts és mtsai, 2008).

3. Anyag és módszer

A lóbab (*Vicia faba*) csíranövényeket (*Standard* és *ARC Egypt Cross* fajták) axenikus körülmények között neveltük (Kónya és Tándor, 2008). A faj kromoszómaszáma $2n = 2x = 12$. Az alacsony kromoszómaszám és a kromoszómák nagy mérete miatt, a *V. faba* a citogenetikusok kedvelt modellnövénye. A fentiek miatt a mitotikus kromatin szerveződés változásai jól vizsgálhatóak ebben a növényben.

3.1. A cilindropermopszin tisztítása

A kísérleteinkhez szükséges CYN-t, egy *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) vízvirágból származó cianobaktérium törzsből (ILC-164) tisztították Vasas és munkatársai egy korábban közölt módszer szerint (Vasas és mtsai, 2002). A módszer röviden: 10 napig nevelt tenyészeteket centrifugáltak, majd a keletkezett üledéket -20°C hőmérsékleten tárolták. A fagyasztott sejteket felolvasztották, majd két ismétlésben újrafagyasztották és hagyták felengedni. A kivonáshoz a sejteket egy éjszakán át 90 % (v/v) metanolban tartották (1:3 nedves tömeg: térfogat) folyamatos rázatás mellett 4°C -on. Centrifugálás után az üledéket még kétszer átmosták 100 ml 90 % (v/v) metanollal, majd az elegyített felülúszókat 40°C hőmérsékleten bepárolták. A bepárolt mintát 50 % (v/v) etanolban feloldották és 20 perc

20000 x g-n történő centrifugálás után a felülúszót gélkromatográfia (Toyopearl HW-40; 80 x 3 cm oszlop) segítségével frakcionálták. A frakciókat mustár csíranövény teszt (BGST, Kós és mtsai, 1995) segítségével ellenőrizték.

A toxikus frakciókat elegyítették, majd a töményítés után szemipreparatív C-18-as HPLC oszlopra vitték fel. Az elúciót 1-10 % (v/v) majd 10-30 % (v/v) metanol grádiens segítségével végezték. A preparátum tisztaságát HPLC és kapilláris elektroforézis módszerekkel ellenőrizték, Vasas és mtsai (2002, 2004) módszere szerint.

3.2. A *Vicia faba* csíranövények nevelése, a toxinkezelések

A kísérletek előtt a magvakat felületi sterilizálásnak vetettük alá 50%-os hypo-oldattal 45 percig. Az oldatot 15 percenként cseréltük. Ezután a magvakat háromszor 5 percig steril desztillált vízzel mostuk, az utolsó mosásnál a magokat Erlenmeyer-lombikban hagytuk egy napig, hogy megpuhuljon a maghéj. Másnap a magvakat újrasterilizáltuk 50%-os hypo-oldattal háromszor 5 percig, majd többször mostuk őket steril desztillált vízben. Ezt követően steril körülmények között lefejtettük a maghéjat, és a magvakat agarral szilárdított táptalajon neveltük. Két táptalajt alkalmaztunk, az egyik a Gamborg vitaminjait és 2 % szacharózt tartalmazó Murashige Skoog (MS*) táptalaj (Gamborg és mtsai, 1968; Murashige és Skoog, 1962), a másik az Allen táptalaj (Allen, 1968) volt. A nevelés körülményei: fényintenzitás- 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ (14/10 óra fotoperiódus), hőmérséklet - fényen 22 $\pm$ 2°C, sötétben 18 $\pm$ 2°C. A szilárd táptalajról steril körülmények között 5 ml folyékony táptalajra helyeztük a csíranövényeket, majd az első oldalgyökér kezdemények megjelenése után CYN-t adagoltunk a táptalajhoz: a kontroll mellett 0,01-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációtartományban adagoltuk a toxint. Törzsoldatként 2mg/ml CYN-t használtunk. A toxinkezelés időtartama 3-6 nap volt. A toxinkezelés előtt lemértük a hajtás, a főgyökér és a leghosszabb oldalgyökér hosszát, valamint megszámoltuk az oldalgyökerek számát. Méréseinket a toxinkezelés leteltével megismételtük.

3.3. Hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerek

A gyökércsúcsokat 16-24 órára mikrotiter lemezbe helyeztük, és PBS (NaCl tartalmú foszfát puffer) + 4%-os formaldehid oldatban vagy PBS +3,6%-os PFA (paraformaldehid) oldatban fixáltuk. Másnap a mintákat kétszer 5 percig PBS-ben mostuk, majd hozzáadtunk 40 %-os szacharóz tartalmú PBS-t és vákuuminfiltráltuk 20 percig. Négyórás inkubálást követően, fagyasztva metszést végeztünk Leica Histoslide 2000 mikrotómmal. Ezt követően, a metszeteket legalább egyszer átmostuk PBS-sel és mélyített tárgylemezre helyeztük át, 10

percig permeabilizáltuk 0,5%-os Triton X-100 tartalmú PBS-sel, majd háromszor 5 percig mostuk PBS-sel. A direkt immunfluoreszcenciás jelölés sötétben 16 órán keresztül tartott, Cy3-mal konjugált anti- β -tubulinnal (Sigma). A jelölőoldat térfogata 30 μ l, a *Vicia faba* esetében az antitestet harmincszorosra hígítottuk 1% BSA (borjúsérum albumin, Merck) tartalmú PBS-sel. Az antitesttel jelölt metszeteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk, majd ráhelyeztük a DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, Fluka) festéket. 150 μ g/ml DAPI törzsoldatot használtunk, és azt hígítottuk fel PBS-sel (a végkoncentráció 3 μ g/ml volt). A festés időtartama 1 óra, sötétben. A megfestett metszeteket kétszer 5 percig PBS-sel mostuk, majd áthelyezzük egy másik tárgylemezre és antifading puffert cseppentettünk rá (összetétele: 0.1% p-feniléndiamin + 90% glicerín egyszeres PBS pufferben pH 0.8-ra beállítva 0.5 M Na₂CO₃- 5 M NaHCO₃ puffer segítségével). A preparátumokat Olympus Provis AX-70 konvencionális fluoreszcens mikroszkóppal és Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A fluorokrómok gerjesztési hullámhosszai: 320-360 nm (DAPI) és 540-580 (Cy3) nm az Olympus Provis AX-70, 351/364 nm (DAPI) és 543 nm (Cy3) a Zeiss LSM 510 mikroszkóp esetében.

3.4. Kromoszóma („squash”) preparátumok készítése

A kromoszómapreparátumok készítése során a gyökércsúcsokat 0,1%-os colchicin oldattal kezeltük 4 órán keresztül, majd 20 percig fixáltuk 45% ecetsavban. Ezt követően a gyökereket 60°C-on 5,5 percig hidrolizáltuk 1N sósavban. A kromoszómákat 5%-os kármin-acetáttal festettük 60°C-on 30 percig, majd dörzspreparátumokat készítettünk.

3.5. Az oldalgyökér csúcsmerisztéma sejtek mitotikus aktivitásának vizsgálata

Az oldalgyökér csúcsmerisztéma sejtek osztódóképességének vizsgálatakor minden osztódási stádiumot külön megszámoltunk, majd az adatokból kiszámoltuk a mitotikus indexet az alábbi képlet segítségével: mitotikus index = osztódó sejtek száma/összes sejtek száma $\times$ 100. Az egyes mitotikus stádiumokban lévő sejtek arányát is kiszámítottuk. A sejtek számolásakor figyelmen kívül hagytuk a nyugvó centrum, a kialakuló szállító szövet, és a gyökérsüveg sejtjeit. A korai, ill. a késői mitotikus fázisok indexét is számoltuk.

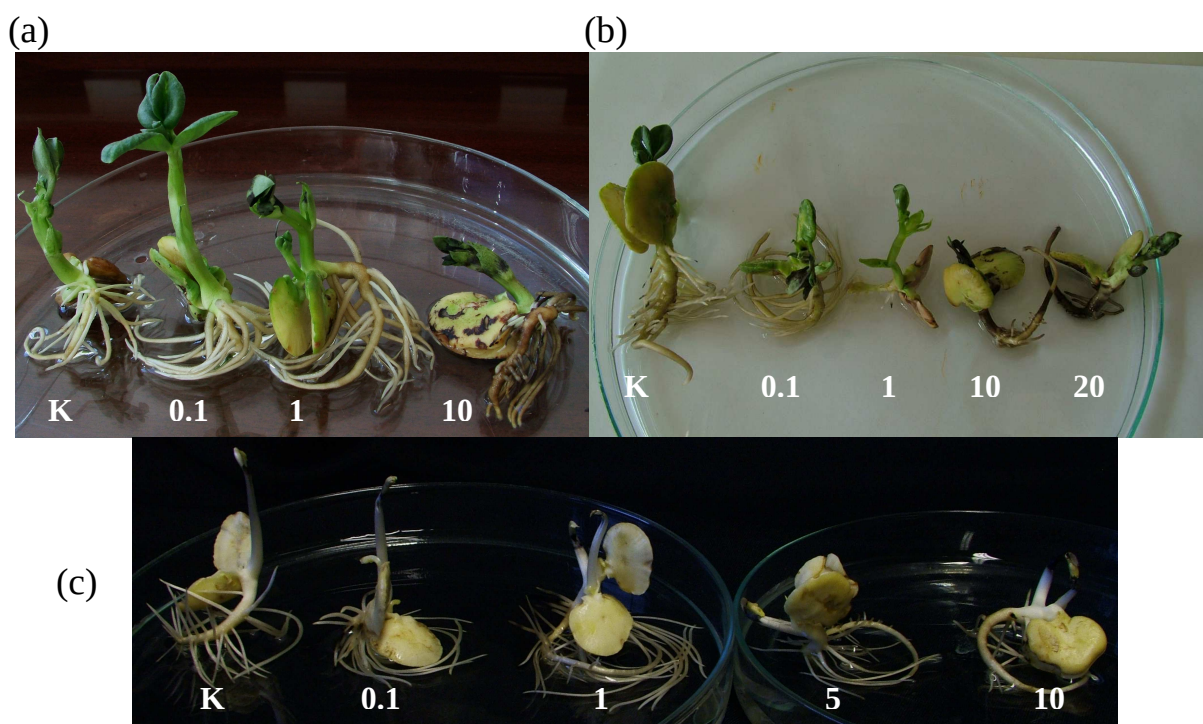
3.6. Az adatok analízise

A növekedést és a mitotikus aktivitásokat három független kísérletben vizsgáltuk. Minden kísérletben legalább 6 párhuzamos mintát analizáltunk. Az átlagok szórását Sigma

Plot 10.0. szoftver segítségével ábrázoltuk.

4. Eredmények

Kísérleteinket sötétben és fényen nevelt növényeken végeztük, és két táptalajt alkalmaztunk. Ezáltal lehetőségünk nyílt arra is, hogy megnézzük, hogyan módosítja a megvilágítás a toxin hatását, valamint két eltérő táptalaj, egy szénhidrát tartalmú (MS*) és egy minimál táptalaj (Allen) módosító hatását is vizsgáltuk. A két *Vicia* fajtában végzett kísérletek alapján meg tudtuk állapítani, hogy az eredmények genotípusonként milyen mértékben térnek el.

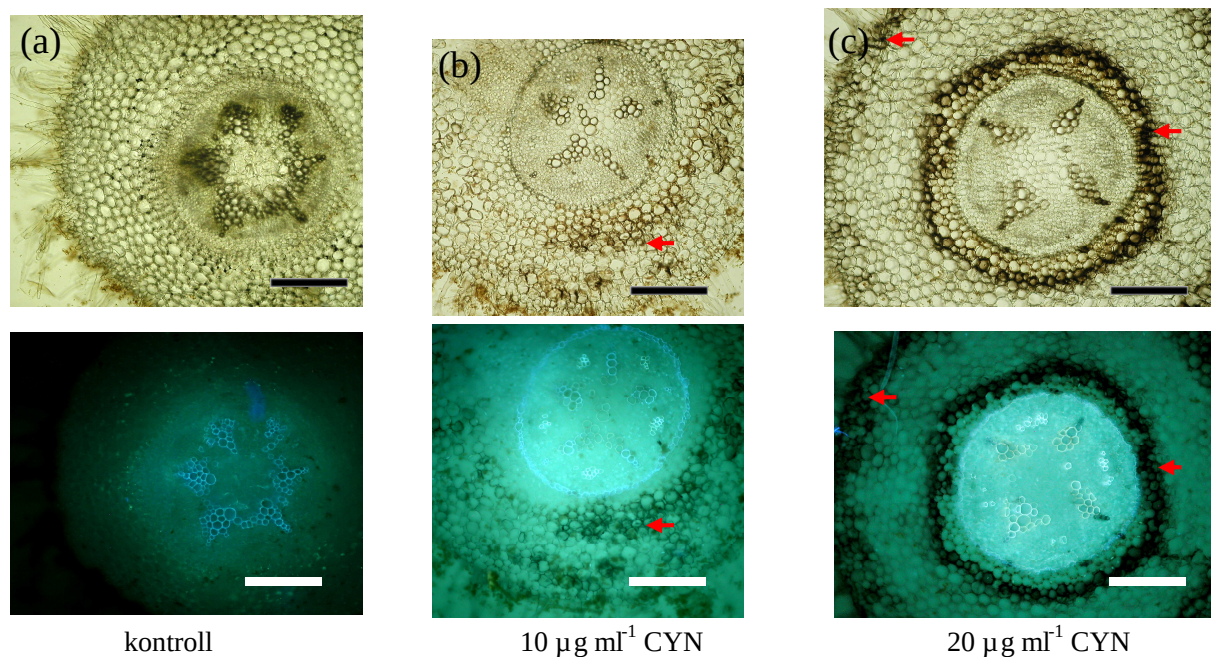


4. ábra: *Vicia faba* (Standard) növények morfológiája a toxintesztek után. (a) 6 napos, MS*, folyamatos fény. (b) 6 napos, Allen, folyamatos fény. (c) 3 napos, Allen, sötét.

Az alábbiakban a *V.faba* „Standard” fajta esetében kapott eredményeket mutatjuk be. Eddigi munkánk során igazoltuk a magas ($10\text{--}20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) toxinkoncentráció a *V. faba* növényekre gyakorolt növekedést gátló hatását mind hajtás mind gyökér esetében, továbbá gyökér nekrozist is tapasztaltunk (4. ábra).

Főgyökér keresztmetszeteken vizsgáltuk a nekrozis mértékét, mely a koncentrációval arányosan változott. Igen magas, $20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentráció a kéregszövetben két

nekrotikus gyűrű kialakulását eredményezte (5. ábra). A tendenciákból arra következtetünk, hogy ez egy védekezési mechanizmus része, ezzel próbálja elkerülni a növény, hogy a toxin bejusson a szállítórendszerbe.

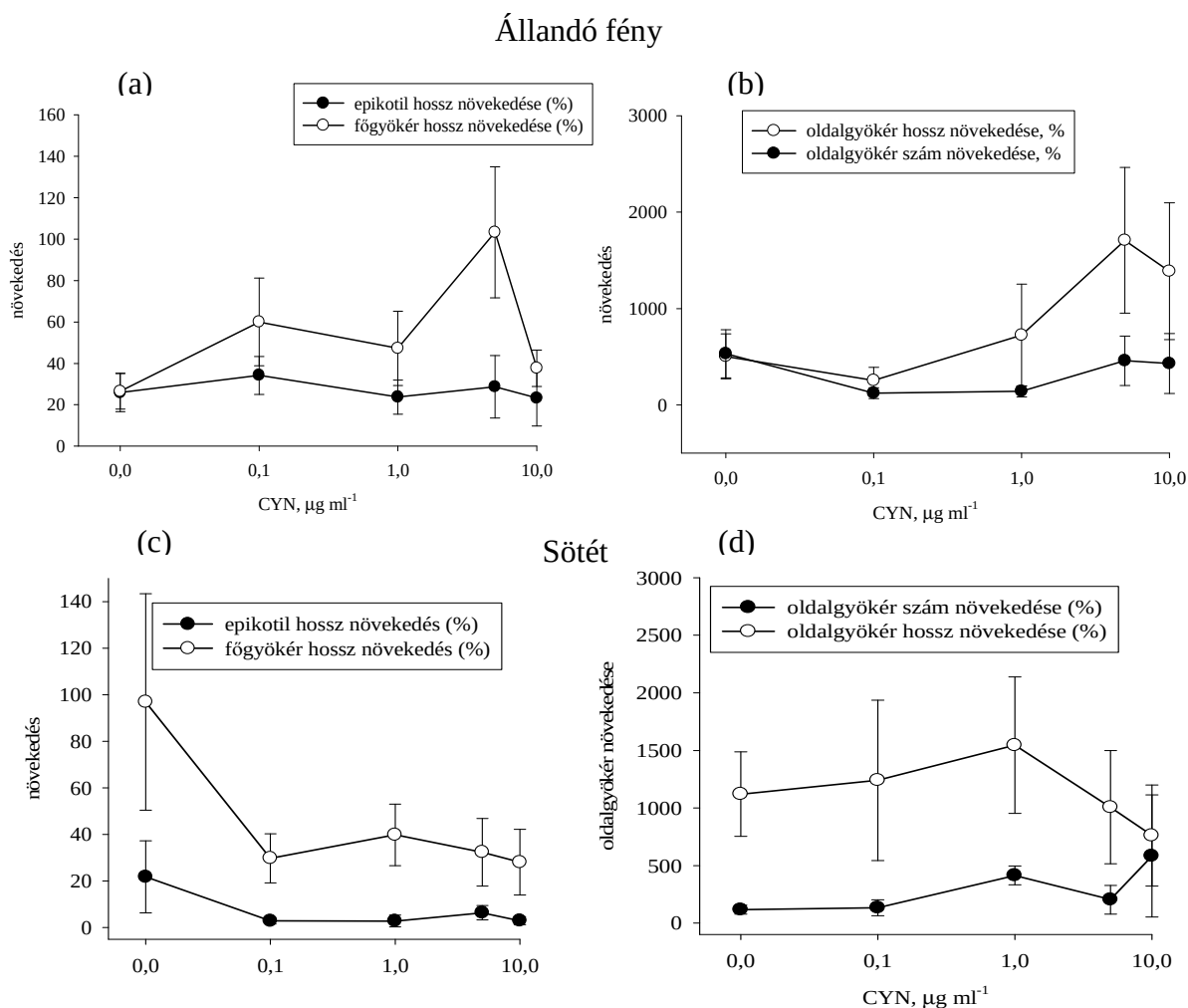


5. ábra: *Vicia faba* (Standard) főgyökér keresztmetszetek (6 napos, Allen táptalaj, folyamatos fény).

(a) Kontroll. (b) 10 µg ml⁻¹ CYN koncentráció nekrotikus foltokkal. (c) 20 µg ml⁻¹ CYN koncentráció a 2 nekrotikus gyűrűvel. Lépték: 300 µm

A toxin állandó fényen, Allen táptalajon nevelt növények esetében serkentő hatást gyakorolt a főgyökér növekedésére, míg sötétben nevelt növényeknél gátlást tapasztaltunk. A hajtás növekedésében nem tapasztaltunk változást.

Sötétben, Allen táptalajon nevelt növényeknél 3 nap után magasabb (1-10 µg ml⁻¹) CYN koncentráció mellett az oldalgyökerek számában növekedést tapasztaltunk. A kezdeti kis koncentrációban megfigyelt növekedésserkentés után az egyes oldalgyökerek növekedése gátolt volt. Állandó fény mellett csak az oldalgyökerek méretében figyeltünk meg szignifikáns eltérést, a CYN serkentette az oldalgyökerek növekedését (6. ábra).

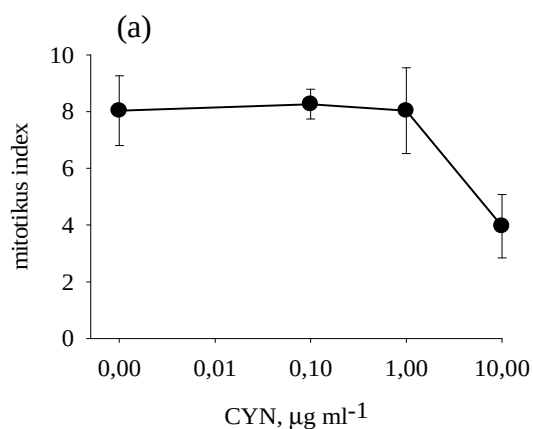


6. ábra: 3 napos *Vicia faba* (Standard) Allen táptalajon nevelt növények. (a) Állandó fényen nevelt növények epikotil és főgyökér hossznövekedése. (b) Állandó fényen nevelt növények oldalgyökereinek hossznövekedése és száma. (c) Sötétben nevelt növények epikotil és főgyökér hossznövekedése. (d) Sötétben nevelt növények oldalgyökereinek hossznövekedése és száma.

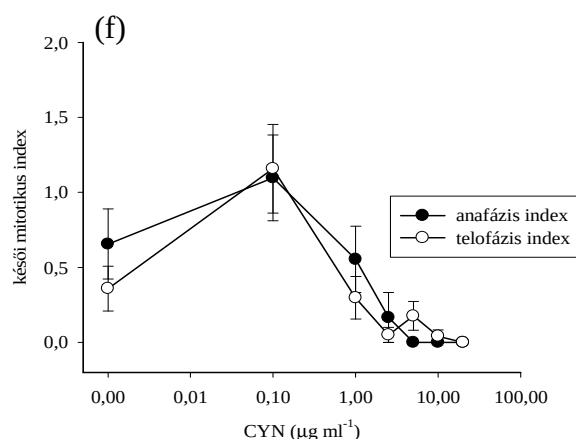
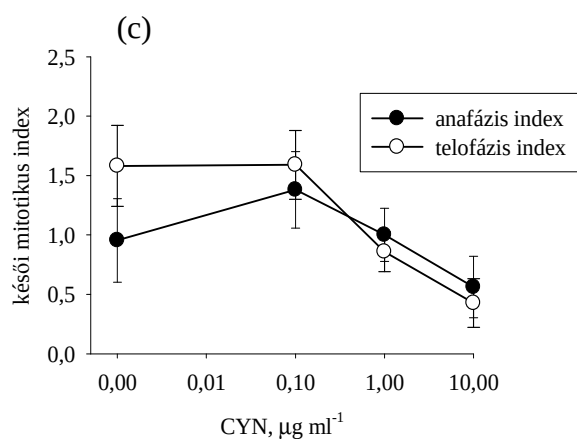
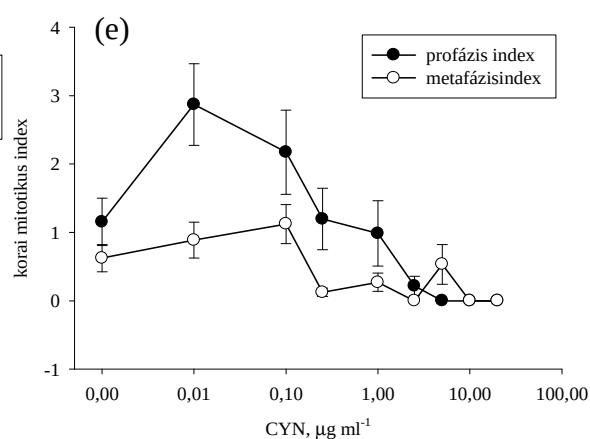
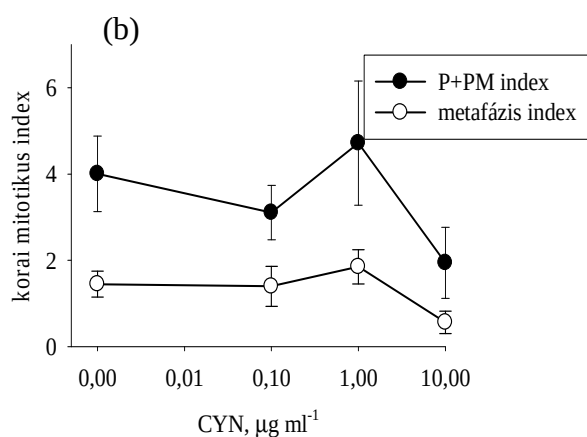
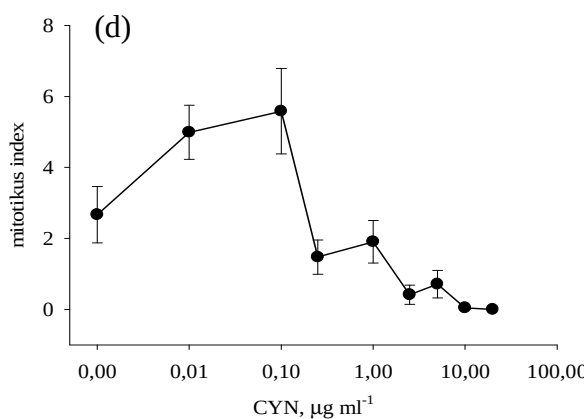
A 3 és 6 napig tartó kísérletek (azonos megvilágítás mellett) hasonló tendenciát mutattak, a 6 napos tesztek során a toxin okozta növekedésbeli változások hangsúlyosabbak voltak.

A két különböző táptalajon végzett tesztek során (azonos megvilágítás mellett) összehasonlítottuk a mitotikus indexeket. Szacharóz tartalmú MS* táptalajon a toxin nem váltott ki mitotikus aktivitásbeli serkentést, míg Allen táptalajon 0,01-0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ toxinkoncentráció tartományban magasabb volt a mitotikus index. Magas koncentráció a mitózisok számának drasztikus csökkenését okozta. Magasabb CYN koncentrációk mellett (1-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a mitózis gátlását tapasztaltuk mindkét táptalaj típus esetében (7. ábra).

Mitotikus aktivitások MS táptalajon, állandó fényen, 6 napos CYN kezelés

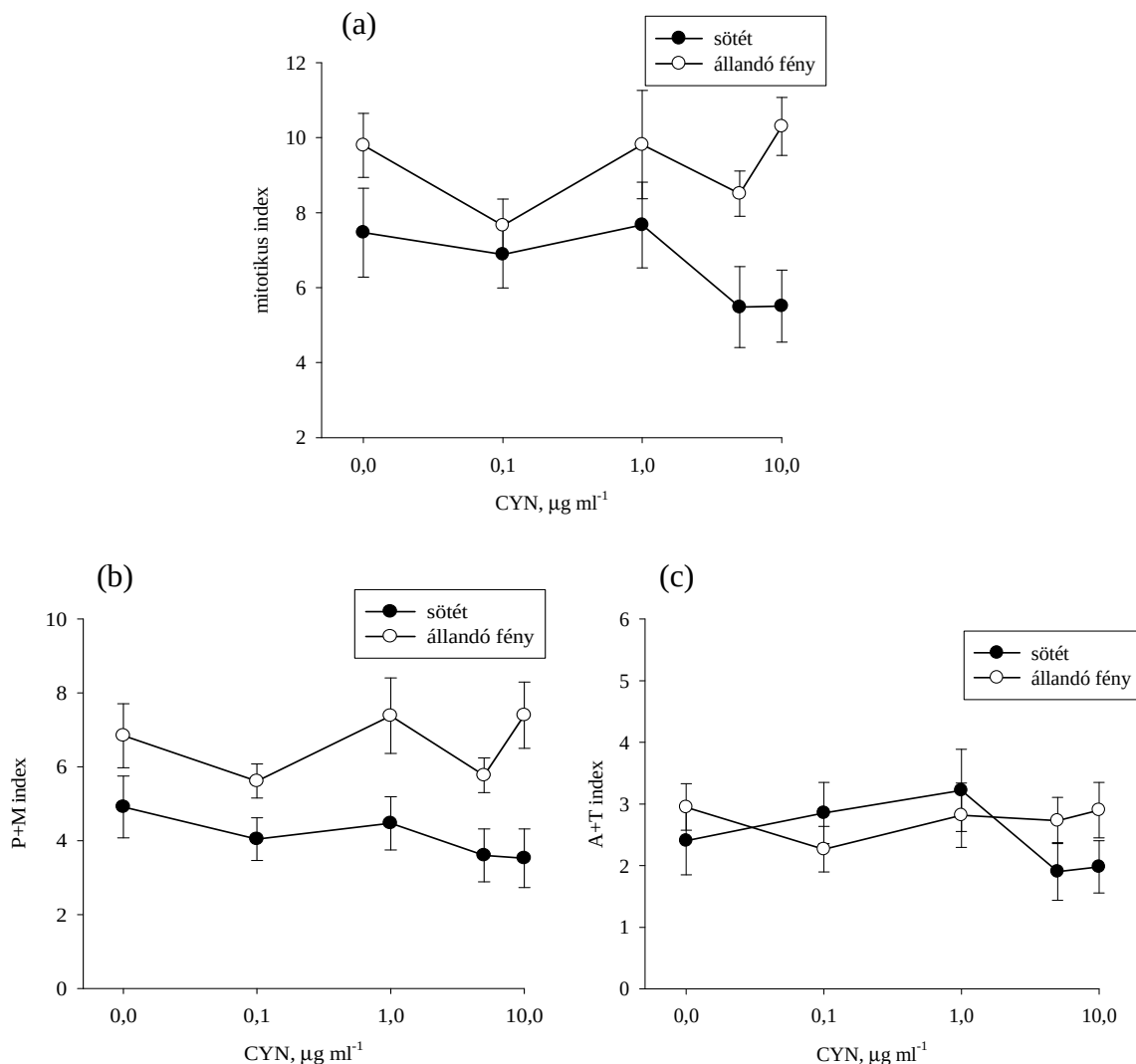


Mitotikus aktivitások Allen táptalajon, állandó fényen, 6 napos CYN kezelés



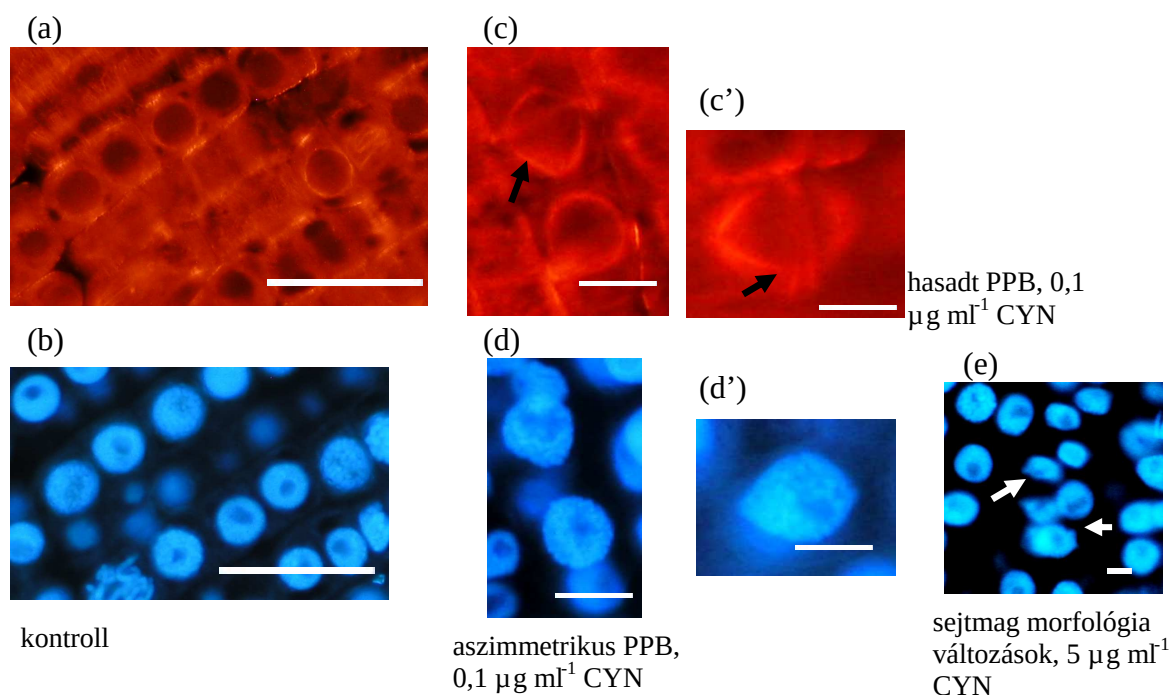
7. ábra: *Vicia faba* mitotikus aktivitások állandó fényen nevelt növényeknél 6 napos kezelések során, 2 különböző táptalajtípuson. (a) MS táptalajon nevelt növények mitotikus indexe (P+PM+M+A+T). (b) MS táptalajon korai mitotikus fázisok (P+PM+M) száma. (c) MS táptalajon késői mitotikus fázisok (A+T) száma. (d) Allen táptalajon nevelt növények mitotikus indexe. (e) korai mitotikus fázisok (P+PM+M) aránya Allen táptalajon. (f) kései mitotikus fázisok (A+T) aránya Allen táptalajon.

A megvilágítás számottevően nem befolyásolta a mitotikus indexek alakulását. Fényen nevelt növények esetében a mitotikus index magasabb volt, mint a sötétben nevelt növényeknél, viszont a görbék lefutása hasonló volt.



8. ábra: *Vicia faba* mitotikus aktivitások Allen táptalajon 3 napos kezelések során. (a) mitotikus index (P+PM+M+A+T). (b) korai mitotikus fázisok (P+PM+M) száma. (c) kései mitotikus fázisok (A+T) száma.

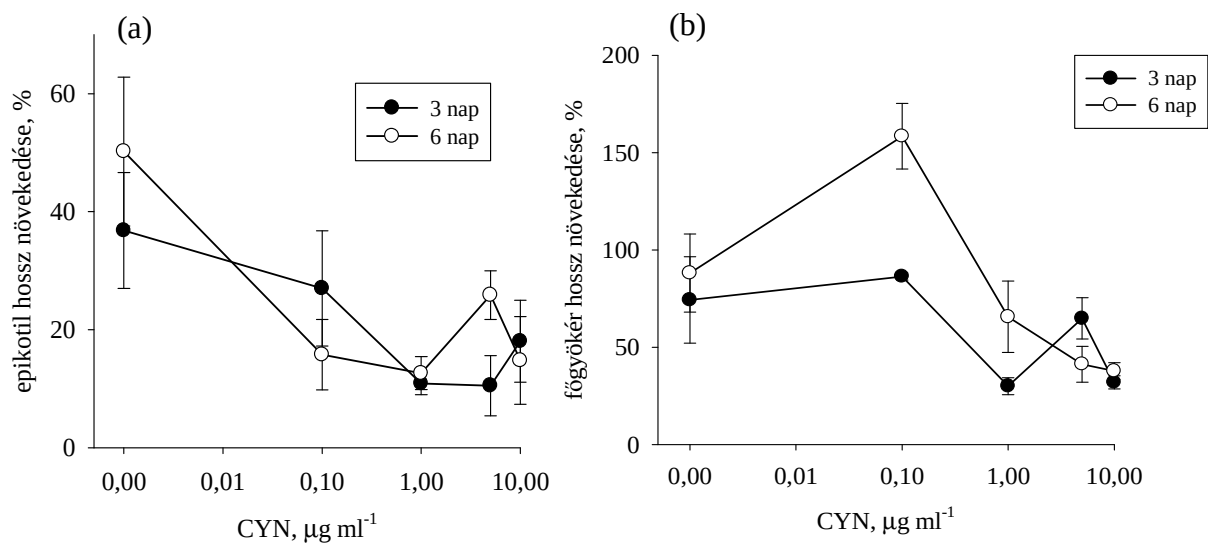
Citológiai vizsgálatok során a kromatin szerveződésben és a mikrotubuláris rendszerben is elváltozásokat tapasztaltunk. Alacsony koncentrációban a toxin a preprofázis köteg (PPB) formációjában okozott változásokat. Megfigyeltünk aszimmetrikus és hasadt PPB-ket, melyeknek a későbbiekben komoly kihatása lehet a sejtosztódásra nézve, hiszen a PPB fogja kijelölni a későbbi osztódási síkot. Magas CYN koncentráció mellett a sejtmag morfológiája szenvedett változásokat (9. ábra).



9. ábra: *Vicia faba* A képeken kék: a DAPI- val festett kromatin; narancs-vörös: cy3 konjugált anti- β -tubulin jelölés. (a) Kontroll növények mikrotubuláris rendszere és (b) kromatin állománya. (c, c') 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál megfigyelhető aszimmetrikus PPB és (d, d') a hozzá tartozó kromatin állomány. (e) 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál tapasztalt sejtmag morfológia változások (nyilak). Lépték: (a), (b): 20 μm ; (c), (d): 10 μm ; (c'), (d'): 5 μm .

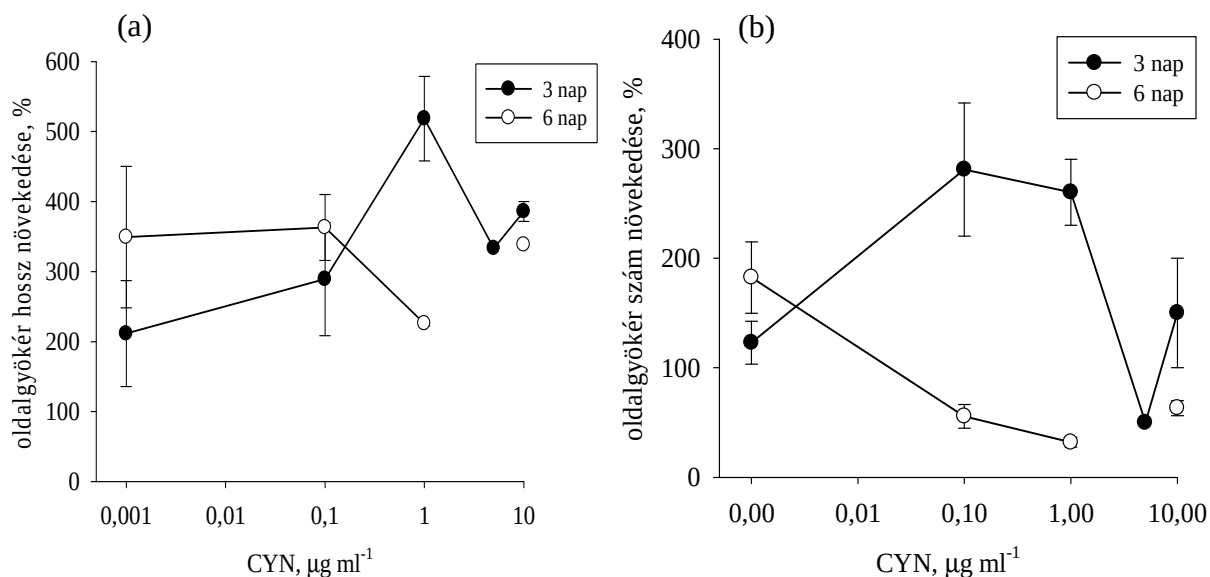
ARC Egypt Cross

Az *ARC* fajta esetében mind rövid (3 nap) mind hosszú távú (6 nap) kezelések során az epikotil növekedése gátolt volt. Főgyökér esetében alacsony (0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) toxinkoncentráció mellett serkentést, míg magasabb koncentráció mellett növekedés gátlást tapasztaltunk (10. ábra).



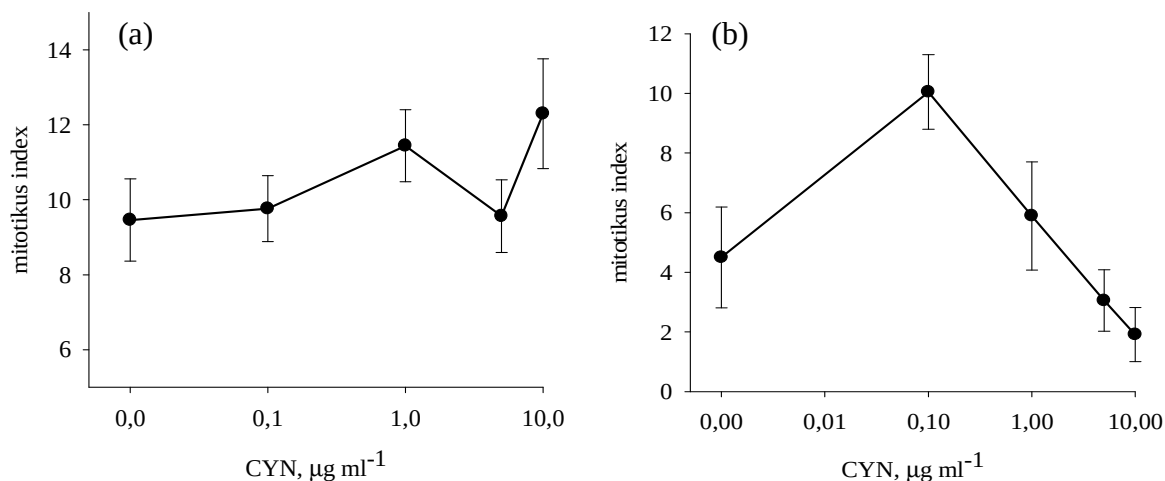
10. ábra: ARC Egypt Cross 3 és 6 napos növények Allen táptalajon megfigyelt (a) epikotil és (b) főgyökér hossz növekedése.

A 6 napos kezelés esetében a növekedésserkentés intenzívebben jelentkezett. A toxin $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációig serkentően hatott az oldalgökök növekedésére 3 napos kezelések alatt, míg 6 napos kezelések alkalmával gátolta ezek növekedését. Az oldalgökök számában hasonló tendencia figyelhető meg (11. ábra).



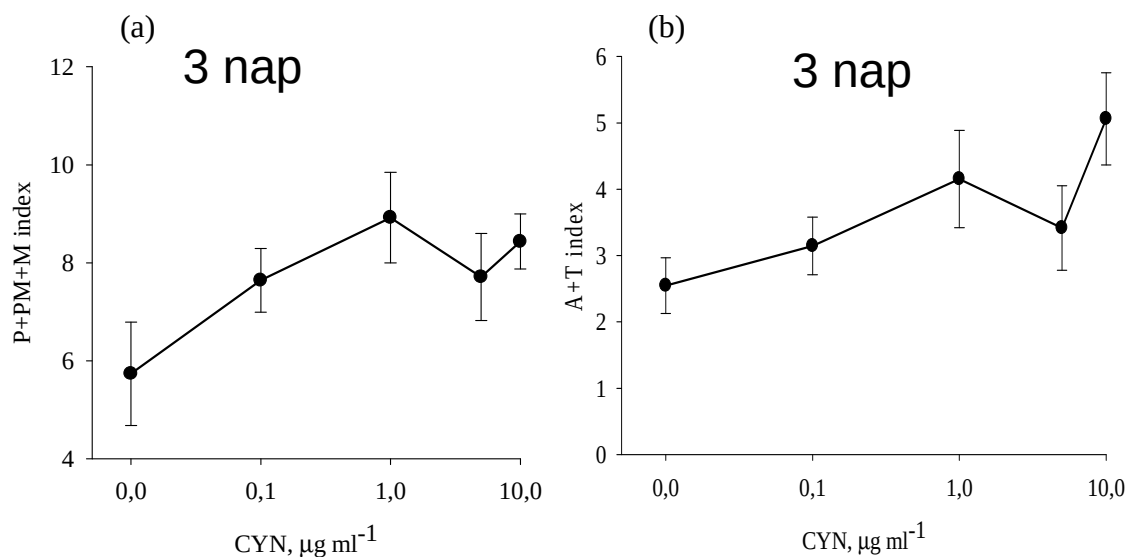
11. ábra: ARC Egypt Cross 3 és 6 napos növények Allen táptalajon mutatott (a) oldalgökök hossznövekedése és (b) oldalgökök szám változásai.

A mitotikus indexben 3 napos kezelések során enyhe növekedést, míg 6 napos kezelések során 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ toxinkoncentrációig a mitózisban egy intenzívebb serkentést majd pedig magasabb koncentrációkban egy erős gátlást figyeltünk meg (12. ábra).



12. ábra: ARC Egypt Cross Allen táptalajon nevelt növények mitotikus indexe (a) 3 napos és (b) 6 napos kezelések során.

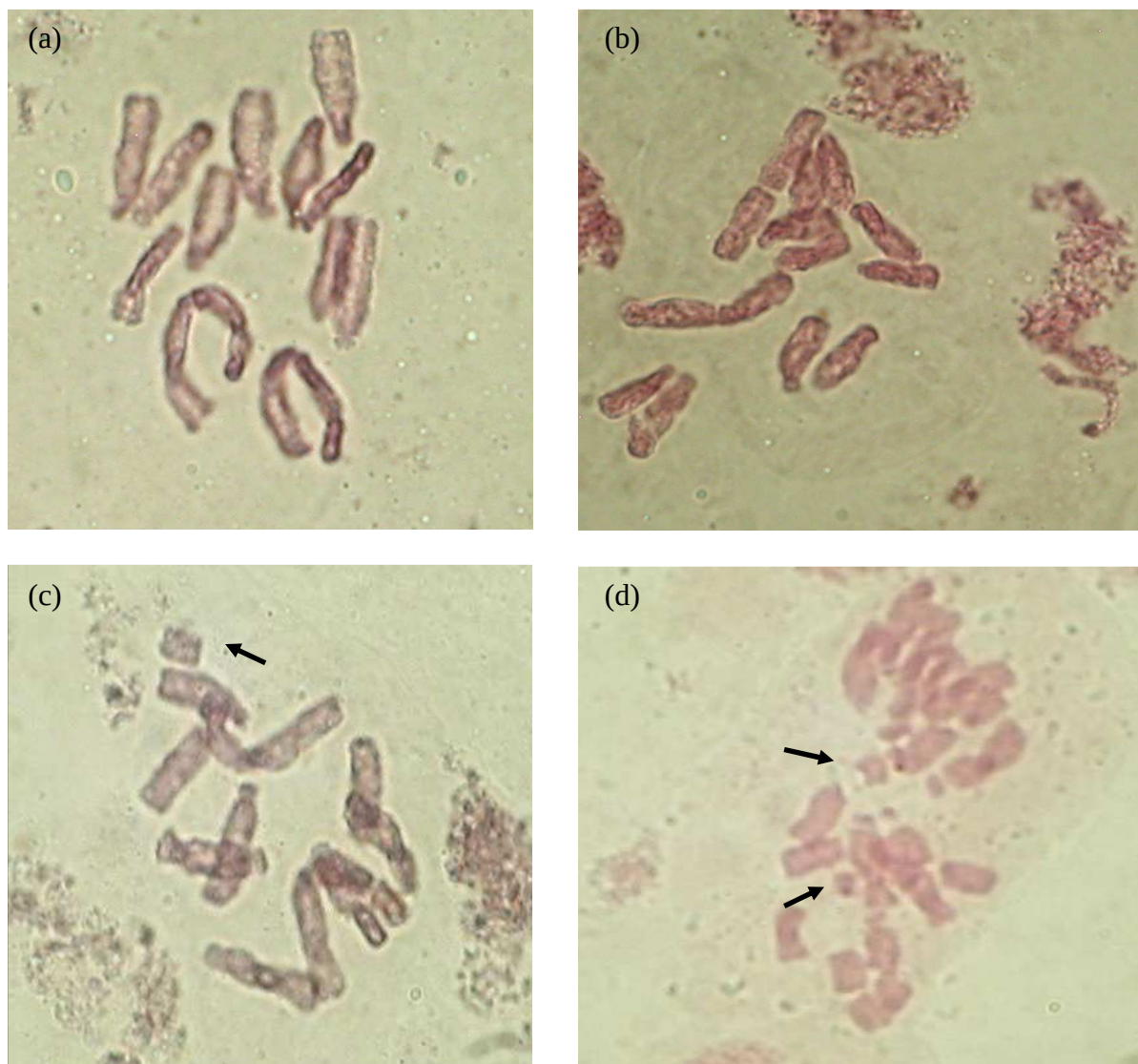
A 3 napos kezelések során a korai (P+PM+M) és a kései (A+T) mitotikus fázisok számában egyaránt növekedést tapasztaltunk, de arányaiban az ana- és telofázisos sejtek száma növekedett nagyobb mértékben (13. ábra).



13. ábra: 3 napos ARC Egypt Cross Allen táptalajon nevelt növények (a) korai mitotikus indexe (P+PM+M) és (b) kései mitotikus indexe (A+T).

A mikrotubulus organizációban a CYN kezelt ARC növények esetében a *Standard* fajtához hasonló változásokat tapasztaltunk: aszimmetrikus, hasadt és kettős PPB-k egyaránt megjelentek (az adatokat itt nem mutatjuk be).

A kromoszóma preparátumok vizsgálata során nem találtunk számbeli eltéréseket, de a toxinkezelt minták között nagy számban találtunk törött kromoszómákat. Ezek túlnyomó részt 0,1-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál jelentkeztek.



14. ábra: *Vicia faba* kromoszóma preparátumok. (a, b) képeken normál metafázisos kromoszómák kontroll növényekből. (c) *Standard* fajtában a képen 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál (d) *ARC* fajtában 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -nél megfigyelhető törött kromoszómák.

5. Diszkusszió

A vizsgálatok során megfigyeltük, hogy magasabb CYN koncentrációk mellett a főgyökér szövetében nekrosis alakul ki. Hisztológiai vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a nekrosis mértéke és a toxin koncentrációjával arányos. A tendenciákból arra következtetünk, hogy ez egy védekezési mechanizmus része, ezzel próbálja elkerülni a növény, hogy a toxin bejusson a szállítórendszerbe. A klasszikus nézet szerint az eukarióta sejtekben a sejthalálnak két alapvető formája ismert. Az egyik a programozott sejthalál, amely során valamely stimulus hatására a sejtben olyan aktív ATP igényes folyamatok zajlanak le, amelyek a sejt elpusztulását eredményezik a membrán integritásának megszűnése nélkül. A másik a nekrosis, amely a sejt tolerancia küszöbét meghaladó stressz hatására kialakuló, a citoplazmamembrán integritásának megszűnésével járó passzív sejthalálforma (Wyllie és mtsai, 1980). A programozott sejthalál egy speciális esete az apoptózis, amelynek során a DNS internukleoszómális hasítása valósul meg a kromatin kondenzációja mellett, később a sejtmag szétesik. Az apoptózis karakterisztikus jele a gélelektroforézis során megjelenő DNS létra (Wyllie és mtsai, 1984). A CYN a nádgyökerekben a kéregszövet és a rhizodermisz nekrosisát, valamint az aerenchimák kalluszos eltömődését idézte elő. Úgy gondoljuk, a nádgyökerek nekrosis és az aerenchimák eltömődése a toxikus hatások kiküszöbölésére szolgáló mechanizmus. Hasonló, a növény által indukált morfológiai változásokat figyelték meg az eutróf vizek üledékében felhalmozódó szerves savak hatására a nádnövényekben (Armstrong és Armstrong, 1999).

A *Standard* genotípus esetében 3 napos kezelések során nem tapasztaltunk változást az epikotil növekedésében. 6 napos és állandó megvilágítás mellett végzett tesztek eredményei alapján $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációig a toxin serkentette a hajtás növekedését, fölötté gátló hatással volt a növekedésre. Az *ARC* fajta esetében a CYN gátolta az epikotil növekedését.

A főgyökér esetében eltérő eredményeket kaptunk:

A *Standard* fajta esetében a 3 napos tesztek során, a fényen nevelt növényeknél növekedésserkentést tapasztaltunk, és csak igen magas koncentrációban volt gátolt a főgyökér növekedése, *ARC* fajtánál alacsony toxinkoncentráció kis mértékben serkentette, magas koncentráció pedig gátolta a főgyökér növekedését. A sötétben tartott 3 napos *Standard* növényeknél a CYN már alacsony koncentrációban is gátolta a növekedést.

A *Standard* fajtán végzett 6 napos kezelések alkalmával, valamint az *ARC* fajta esetében mind rövid, mind hosszú távú teszteknel kettős választ figyeltünk meg, $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációig serkentő, fölötté gátló hatást detektáltunk.

Oldalgökök esetében 3 napos teszteknel, alacsony CYN koncentráció mellett mindkét fajtában méretbeli és számbeli növekedést tapasztalunk, viszont magas koncentrációban gátlást tapasztaltunk, kivéve a sötétben tartott *Standard* fajtánál, ahol $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál tovább nőtt az oldalgökök száma, viszont ezek növekedése gátolt volt. Hosszú távon az oldalgökök kialakulása és növekedése már alacsony CYN koncentráció mellett egyaránt gátolt volt.

A CYN növekedésre gyakorolt hatása az irodalmi adatok alapján minden növényben más és más. A CYN jelentősen gátolta a gyökök megnyúlásos növekedését az axenikus nádnövényekben, az új gyökök képződésére a CYN induktív hatásának bizonyult. A tengelyszervek növekedését a CYN gátolta mustár csíranövényekben (Vasas és mtsai, 2002), *Hydrilla verticillata* vízínövényben azonban a CYN tartalmú kivonatnak stimuláló hatása volt mind a tengelyszervek növekedésére, mind az új gyökök képződésére (Kinneer és mtsai, 2008). A CYN fehérjeszintézis gátló hatású (Froscio és mtsai, 2008), tehát metabolikus inhibítorként gátolhatja a növények növekedését. Azonban a fehérje szintézis inhibitorok a stressz válasza jellemző élettani és biokémiai változásokat is indukálnak a növényekben, amely magában foglalja a megnyúlásos növekedés gátlását (Dhindsa és Cleland, 1975). Kinneer és mtsai (2008) szerint a *Hydrilla* növény a gyökök számának és tömegének növelésével nagyobb detoxifikáló kapacitásra tesz szert. A kutatók kimutatták, hogy a gyökök képesek a CYN részleges lebontására, a megnövekedett gyökértömeg hatékonyabban hidrolizálja a cianotoxint. A fentiekből arra következtettünk, hogy a gyökök esetén a CYN által indukált megnyúlásos növekedés gátlás a stresszválasz része, míg a gyökérszám növekedése védekezési reakció, amely a detoxifikáló kapacitást növeli (Beyer, 2010).

A mitotikus aktivitás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a megvilágítás nem befolyásolta a sejtosztódást, viszont a két eltérő tápközegben nevelt növényeknél már különbséget tapasztalunk a mitotikus indexekben. Allen táptalajon végzett hosszú távú kísérletek során a *Standard* növények ún. kettős válaszreakciót mutattak, azaz alacsony CYN koncentráció mellett megnőtt a mitotikus sejtek aránya, míg magas koncentráció gátolta a mitózist. Ezt a jelenséget egy másik cianotoxinnal, a mikrocisztin-LR-rel kapcsolatos kísérletek során is megfigyelték (Máthé és mtsai 2009).

Az ARC fajta szintén mutatta a kettős válaszreakciót 6 napos kísérletek során, viszont rövid távú tesztek során nem tapasztaltunk gátlást a mitotikus indexben.

Az *ARC Egypt Cross* fajta esetében mind a korai mind pedig a kései mitotikus fázisokban emelkedést tapasztaltunk, de a P+PM+M indexek nem mutattak szignifikáns

különbséget kezelt és kezeletlen növényekben, míg az A+T indexek esetében, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ -es toxinkoncentrációval kezelt növényekben jelentős különbség mutatkozott a kontroll növényekhez képest. Ebből adódóan azt feltételezzük, hogy a növények késői mitózisból való kilépését gátolja a CYN. Ezt rövidtávú szinkronkísérletekkel fogjuk tudni igazolni úgy, hogy egy kontroll és egy kezelt növényből meghatározott időközönként mintát veszünk és a kezelt növény kontrollhoz képest mutatott mitotikus indexeinek meghatározásával látni fogjuk, ha a sejtosztódás valamely fázisa lelassul.

A citológiai vizsgálatok során elváltozásokat figyeltünk meg a preprofázis köteg formációjában. A rendellenességeket mindkét fajtánál megfigyeltük, ezek kialakulása nem függ a tesztek időtartamától, a tápközeg minőségétől és a megvilágítástól sem. A CYN más modellnövényben is okozott rendellenes PPB-ket, ezért úgy gondoljuk, hogy ez a hatás általános a növényi sejtek esetében (Beyer és mtsai, 2009).

A preprofázis köteg kontroll sejtekben is megduplázódhat (Hasezawa és mtsai, 1994), mi azonban nem találtunk eltéréseket a kontroll növényekben. Nogami és mtsai, (1996) cikloheximid kezelt hagyma gyökerekben széles és dupla PPB-ket figyeltek meg. A jelenség hátterében feltehetőleg mikrotubulusok kötegelésében résztvevő fehérjék mennyiségének csökkenése áll. Dohány sejtekben a cikloheximid kezelés szintén indukálta a dupla preprofázisok kialakulását (Mineyuki, 1999). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a CYN a PPB-re gyakorolt hatása összefüggésben áll a toxin által kiváltott fehérjeszintézis gátlással (Beyer, 2010).

A kettős PPB-k kialakulása az osztódási sík eltolódását eredményezi, ez pedig ferde osztódási orsó és fragmoplaszt kialakulásához vezet. Ezek a jelenségek sejtmorfológiai változásokat okoznak (Dhonukshe és mtsai., 2005). Saját megfigyeléseinket *Vicia faba* növények fixált metszetein végeztük.

További eredmények és a részletek pontosabb kiderítése érdekében fixálatlan (élő) sejtekben tervezünk hasonló vizsgálatokat. A GFP-tubulin fúziós fehérjék használata jó lehetőséget kínál az élő sejtek citoszkeletális rendszerének tanulmányozására (Mathur, 2004).

Megállapítottuk, hogy a toxin nem okozott számbeli eltéréseket a kromoszómakészletben, viszont szerkezeti aberrációk jelentkeztek alacsony toxinkoncentráció mellett. Ilyen elváltozásokat korábban nem írtak le CYN kezelt állati vagy növényi sejtekben (Lankoff és mtsai, 2007).

6. Összefoglalás

Munkánk során igazoltuk a magas ($10\text{--}20\ \mu\text{g ml}^{-1}$) CYN koncentráció *V. faba* növényekre gyakorolt növekedés gátló hatását mind hajtás mind gyökér esetében, továbbá gyökér nekrózist is tapasztaltunk. A nekrózis feltételezhetően egy védekezési mechanizmus része, a növény így próbálja gátolni a toxin szállítószövetbe való bejutását. A toxin növekedésre gyakorolt hatása nagy mértékben függ a megvilágítástól, a kezelés időtartamától és a genotípustól. 6 napos kezelések során hajtás esetében a *Standard* fajtában kis toxin koncentráció mellett serkentés, míg nagy koncentrációban gátlás volt megfigyelhető. Ezzel szemben az *ARC* fajtánál csak gátlást tapasztaltunk az epikotil növekedésben. Főgyökér esetében kettős válaszreakció volt megfigyelhető: mindkét fajtánál a fényen végzett 3 és 6 napos tesztek során a főgyökerek növekedésében alacsony toxinkoncentráció mellett serkentést, míg magas koncentráció mellett gátlást tapasztaltunk. Az oldalgyökerek számában és méretében is növekedést figyeltünk meg alacsony CYN koncentrációnál, míg magas koncentrációban gátlást tapasztaltunk mindkét fajtánál kivéve a sötétben nevelt *Standard* fajtát ahol magas CYN koncentráció mellett is nőtt az oldalgyökerek száma.

A megvilágítás számottevően nem befolyásolta a mitotikus indexek alakulását, de Allen táptalajon 6 napos kezeléseknél $0,01\text{--}0,1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ toxinkoncentráció tartományban a mitotikus index jelentősen magasabb volt a kontrollhoz képest. Ez a tendencia MS* táptalajon nem jelentkezett. Magas CYN koncentráció a mitózisra nézve gátló hatású volt. 3 napos tesztek során azt tapasztaltuk, hogy a mitotikus index magas toxinkoncentráció mellett is tovább nő, és a korai (P+PM+M) és a kései (A+T) mitotikus fázisok számában egyaránt növekedést tapasztaltunk, de arányaiban az ana- és telofázisos sejtek száma növekedett nagyobb mértékben. Ebből adódóan azt feltételezzük, hogy a növények késői mitózisból való kilépését gátolja a CYN, melyet rövidtávú szinkronkísérletekkel kívánunk igazolni. Mivel a növekedési és mitotikus görbék némileg eltérnek, ezért arra következtetünk, hogy a toxin nem csak a sejtosztódásra van hatással, de a sejtek megnyúlását is befolyásolja.

A citológiai vizsgálatok során a kontroll növényekre nem jellemző hasadt és dupla preprofázis kötetégeket figyeltünk meg a toxinnal kezelt növények esetében. A jelenség általános volt az alacsony CYN koncentrációval kezelt növényeknél. A jelenség feltehetően a toxin fehérjeszintézis gátló hatása következtében a mikrotubulusok kötegelésében résztvevő fehérjék mennyiségének csökkenésével magyarázható. A rendellenes PPB-k a sejtciklus későbbi szakaszaira is hatással vannak, hatásukra ferde osztódási orsó és fragmoplaszt alakul ki. A részletek pontosabb kiderítése érdekében fixálatlan (élő) GFP-tubulin fúziós fehérjét

termelő sejtekben tervezünk hasonló vizsgálatokat. Megállapítottuk továbbá, hogy a toxin hatására kromoszóma aberrációk (törések) jelennek meg.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani témavezetőnknek, Dr. Máthé Csabának.

Köszönjük Dr. Mészáros Ilonának, Dr. Borbély Györgynek, Dr. Mikóné Hamvas Mártának, Dr. Surányi Gyulának, Jámbrik Katalinnak, Demeter Zitának, Tándor Ildikónak, Jambrovics Károlynak, Beyer Dánielnek és a DE TEK TTK Növénytani Tanszék minden dolgozójának, amiért lehetővé tették munkánkat, és hasznos tanácsokkal láttak el bennünket.

Köszönjük Dr. Vasas Gábornak és munkatársainak (DE TTK Növénytani Tanszék) a kísérletek során felhasznált toxint.

Köszönjük Prof. Dr. Vereb Györgynek (DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) a konfokális mikroszkóppal végzett megfigyelésekben nyújtott segítségét.

A *Vicia faba* ARC Egypt Cross magokat Dr. Walid M El-Rodeny (Centre of Agricultural Research, Institute of Field Crops Research, Food Legumes Research Section, P.O. Box 33717, Sakha Agricultural Research Station, Kafr El-Sheikh, Egyiptom) bocsátotta rendelkezésünkre, amit ezúton is köszönünk.

8. Irodalomjegyzék

- Alberts, B.**, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell, 5th edition. Garland Science.
- Allen, M.M.** (1968) Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. 4, 1–4.
- Beyer, D.** (2010) A cilindropermopszin és a mikrocisztin-LR (cianotoxinok) citológiai hatásai *in vitro* elállított nád (*Phragmites australis*) növényekben. Doktori (PhD) értekezés.
- Beyer, D.**, Surányi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdődi, F., M-Hamvas, M., et al. (2009). Cylindropermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. Toxicon, 54(4), 440-449.
- Costas, C.**, Desvoves, B., & Gutierrez, C. (2011). A chromatin perspective of plant cell cycle progression. Biochimica et Biophysica Acta.
- Dhindsa, R.S.**, Cleland, R.E. (1975). Water stress and protein synthesis II. Interaction between water stress, hydrostatic pressure, and abscisic acid on the pattern of protein synthesis in *Avena* coleoptiles. Plant Physiology: 55, 782–785.
- Dhonukshe, P.**, Mathur, J., Hulskamp, M., Gadella, T.W.J. (2005) Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. BMC Biology: 3, 11.
- Downing, K.H.**, Nogales, E. (1998) Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. Current Opinion in Structural Biology: 8, 785-791.

- Froscio, S.M.**, Humpage, A.R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R. (2008) Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon*: 51, 191-198.
- Gamborg, O.L.**, Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Goddard, R.H.**, Wick, S.M., Silflow, C.D., Snustad, D.P. (1994) Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiology*: 104, 1-6.
- Hasezawa, S.**, Sano, T., Nagata, T. (1994) Oblique cell plate formation in tobacco BY-2 cells originates in double preprophase bands. *Journal of Plant Research*: 107, 355–359.
- Jacalyan, V.**, Ben, D., Jamina, O., Dale, B., Kerry, B., Michael, S. (2001) Phosphorylation of γ -Tubulin Regulates Microtubule Organization in Budding Yeast. *Developmental Cell*: 1, 621-631.
- Joshi, H.C.** (1998) Microtubule dynamics in living cells. *Current Opinion in Cell Biology*: 10, 35-44.
- Kinnear, S.H.W.**, Fabbro, L., Duivenvoorden, L.J. (2008) Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*: 54, 187–194.
- Kónya, Z.**, Tándor, I. (2008) A mikrocisztin-LR hatása a mitotikus citoszkeleton és kromatin szerveződésére *Vicia faba* gyökércsúcsokban. OTDK pályamunka.
- Kós, P.**, Gorzó, Gy., Surányi, Gy., Borbély, G. (1995) Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry* 225: 49-53.
- Lankoff, A.**, Wojcik, A., Lisowska, H., Bialczyk, J., Dziga, D., Carmichael, W.W. (2007) No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. *Toxicon* 50: 1105-1115.

- Mathur, J.**, (2004) Cell shape development in plants. *Trends Plant Sci.* 9: 583-590.
- Máthé, C.**, Beyer, D., Erdődi, F., Serfőző, Z., Székvölgyi, L., Vasas, G., MHamvas, M., Jámbrik, K., Gonda, S., Kiss, A., Szigeti, Z.M., Surányi, G. (2009) Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology*: 92, 122–130.
- Metcalf, J. S.**, Barakate, A., & Codd, G. A. (2004) Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters*, 235(1), 125-129.
- Mineyuki, T.** (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *International Review of Cytology*: 187, 1-49.
- Murashige, T.**, Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nogales, E.** (1999) A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 56, 133-142.
- Nogami, A.**, Suzaki, T., Shigenaka, Y., Nagahama, Y., Mineyuki, Y. (1996) Effects of cycloheximide on preprophase bands and prophase spindles in onion (*Allium cepa* L) root tip cells. *Protoplasma*: 192, 109-121.
- Renshaw, M. J.**, Ward, J. J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F. J., & Tanaka, T. U. (2010) Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Developmental Cell*, 19(2), 232-244.
- Sutka, J.** (Ed.). (2004) Növényi citogenetika. Mezőgazda Kiadó, Bp.
- Uhlmann F.**, Lottspeich F., Nasmyth K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, 400, 37-42.

- Vasas, G.,** Gáspár, A., Páger, C., Surányi, G., Máthé, C., Hamvas, M. M., et al. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(1), 108-115.
- Vasas, G.,** Gáspár, A., Surányi, Gy., Batta, Gy., Gyémánt, Gy., M. Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, Gy. (2002) Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Analytical Biochemistry* 302: 195-203.
- Velich, I.** (Ed.). (2001) Növénygenetika. Mezőgazda Kiadó, Bp.
- Wright, A.J.,** Smith, L.G. (2007) Division plane reorientation in plant cells. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: Cell division control in plants. *Plant Cell Monographs*: 9, 33-5.